



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**OBTENCIÓN Y ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LOS
COMPLEJOS DE INCLUSIÓN ÁCIDO FERÚLICO-
CICLODEXTRINAS**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
M. EN C. PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS**

PRESENTA:

I.A. ARMANDO TORRALBA GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. EDITH GRACIELA GONZÁLEZ MONDRAGÓN

CO-DIRECTOR:

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA

Huajuapán de León Oaxaca, México, Noviembre 2014

El presente trabajo fue realizado en las Instalaciones de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, así como en la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa.

Para la realización del trabajo se contó con el apoyo económico de CONACyT para Armando Torralba González a través de la beca de maestría y beca mixta, con número de registro 288504, y para el proyecto 181049. Parcialmente por el PROMEP, de la Secretaría de Educación Pública, con clave UTMIX-PTC-037. De la empresa WACKER Mexicana S.A. de C.V. con la donación de las ciclodextrinas comerciales grado alimenticio.

AGRADECIMIENTOS

Por medio de estas líneas quiero agradecer a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

Al Posgrado de Productos Naturales y Alimentos por su contribución a mi formación como Maestro en Ciencias, por su disponibilidad en asesorías, por facilitar en tiempo y forma el proceso de titulación.

Al Área de Biofísicoquímica de Proteínas del Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por el apoyo proporcionado durante mi estancia para la realización de la parte experimental del proyecto de tesis. Así mismo agradecer a los compañeros que ahí se encuentran por compartir sus conocimientos y por hacer de esa estancia una agradable experiencia.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al comité revisor conformado por la Dra. Edith G. González Mondragón, la Dra. Araceli Vega Paz, la M. en C. Alma Y. Salazar Govea, el Dr. Rafael A. Zubillaga Luna y el Dr. Vania S. González Robles por tomarse el tiempo para la revisión, discusión y análisis del documento de tesis durante el desarrollo del proyecto.

A la empresa WACKER Mexicana S.A. de C.V. por la donación de las ciclodextrinas comerciales grado alimenticio.

A la Dra. Edith González Mondragón por su aporte invaluable no solamente en la realización del proyecto, sino también en mi formación como estudiante, como trabajador y como persona.

Al Dr. Rafael A. Zubillaga Luna por aceptarme como su estudiante, por guiar y realizar importantes aportes al proyecto, por brindarme la confianza y el conocimiento en el manejo de los equipos de calorimetría de titulación isotérmica así como el de espectrofotómetro de fluorescencia, y sobre todo por mostrarme que la investigación no está desvinculada de la convivencia y sana diversión.

Debo agradecer de manera especial a la Dra. Araceli Vega Paz por facilitar los medios para que se llevara a cabo la experimentación con las técnicas de calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría. También por la asesoría en el análisis de los resultados y discusión de los mismos.

Al Dr. Ponciano García Gutiérrez por sus charlas amenas y por darse el tiempo para enseñarme el uso de software mediante el cual se obtuvo la simulación computacional (*docking*).

Al M. en C. Atilano Gutiérrez Carrillo adscrito al Laboratorio de RMN de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por el apoyo, la orientación y por tomarse el tiempo para analizar y establecer las mejores condiciones para llevar a cabo la experimentación de RMN de los complejos con ciclodextrinas. Además por compartir su amplia experiencia en el tema.

Así mismo mi agradecimiento al Dr. Domingo Salazar Mendoza por siempre ser accesible al préstamo del uso de sus equipos de laboratorio y de material didáctico.

Al Dr. Vania por facilitarme el uso del laboratorio de Biotecnología para poder realizar parte de la experimentación del presente proyecto.

A Francisco Gómez Castillo por su apoyo en el préstamo de material y equipo de laboratorio.

DEDICATORIA

Hoy puedo ver alcanzada esta meta en gran parte por ustedes, ya que siempre estuvieron motivándome a lo largo de este proceso. Gracias por su aliento, comprensión, consejos y su amor infinito.

A mis padres, María Antonieta y Armando
A mis hermanos, Eduardo y Miguel

A ti por ser mi musa, mi fuente de energía, de sabiduría, calma y consejo en todo momento.

Dani

Por su compañía a través de mensajes, sus palabras y la mejor vibra del mundo.
Gracias mans!

Stefi, Karla, Andrea, Eréndira, Erick, Iván y
Omar

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su energía y sus consejos en cada momento de mi vida.

Mandos

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	1
I. MARCO TEÓRICO	2
1.1. ÁCIDO FERÚLICO	2
1.1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA, PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DEL ÁCIDO FERÚLICO	3
1.1.2. IMPORTANCIA DEL ÁCIDO FERÚLICO EN ALIMENTOS	5
1.2. CICLODEXTRINAS ALFA, BETA Y GAMA	7
1.2.1. PAPEL BIOLÓGICO, ESTRUCTURA QUÍMICA, PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS E INOCUIDAD	7
1.2.2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS	10
1.2.3. IMPORTANCIA DEL USO DE LAS α CD, β CD Y γ CD EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS	14
1.2.4. MÉTODOS DE ACOMPLEJAMIENTO EMPLEANDO CICLODEXTRINAS	16
1.2.5. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON CICLODEXTRINAS	17
1.2.5.1. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS	18
1.2.5.1.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	18
1.2.5.1.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO Y TERMOGRAVIMETRÍA	19
1.2.5.1.3. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD DE FASES	21
1.2.5.2. ANÁLISIS TERMODINÁMICO DEL PROCESO EN LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS	23
1.2.5.2.1. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA	23
1.2.5.2.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	24
1.2.5.3. EFECTO DEL ESTADO DE PROTONACIÓN EN EL ACOMPLEJAMIENTO CON CICLODEXTRINAS	26
1.2.5.3.1. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL (<i>DOCKING</i>)	26

II.	ESTADO DEL ARTE	28
2.1.	FORMACIÓN DEL COMPLEJO ÁCIDO FERÚLICO-CICLODEXTRINA Y SU ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	29
2.2.	ANÁLISIS DE LA ENERGÉTICA DEL PROCESO DE ACOMPLEJAMIENTO DEL ÁCIDO FERÚLICO CON LAS CICLODEXTRINAS	31
III.	JUSTIFICACIÓN	35
IV.	HIPÓTESIS	37
V.	OBJETIVOS	38
5.1.	OBJETIVO GENERAL	38
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1.	PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE ÁCIDO FERÚLICO Y DE LAS CICLODEXTRINAS, EMPLEANDO UN MISMO DISOLVENTE	39
6.2.	OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS SÓLIDOS DE ÁCIDO FERÚLICO-CICLODEXTRINA	41
6.3.	DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE ÁCIDO FERÚLICO-CICLODEXTRINA	41
6.3.1.	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	41
6.3.2.	TERMOGRAVIMETRÍA Y CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	42
6.3.3.	DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DE FASES AF-CD	42
6.4.	ENERGÉTICA DEL PROCESO DE ACOMPLEJAMIENTO DEL ÁCIDO FERÚLICO CON CICLODEXTRINAS	42
6.4.1.	CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA	42
6.4.2.	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	43
6.5.	EFFECTO DEL ESTADO DE PROTONACIÓN DEL AF EN EL PROCESO DE ACOMPLEJAMIENTO CON CICLODEXTRINAS	45
6.5.1.	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	45
6.5.2.	SIMULACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR (<i>DOCKING</i>)	45
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
7.1.	SOLUBILIZACIÓN A HOMOGENEIDAD DEL ÁCIDO FERÚLICO Y DE LAS CICLODEXTRINAS, EN UN DISOLVENTE COMÚN	47
7.2.	CONFIRMACIÓN DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO AF-CD	48
7.2.1.	ESPECTROS DE INFRARROJO	48
7.2.2.	TERMOGRAMAS DE TERMOGRAVIMETRÍA Y CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	51
7.2.3.	DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DE FASES	54
7.3.	ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO	55
7.3.1.	CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA	55

7.3.2. TITULACIÓN FLUOROMÉTRICA	58
7.4. EFECTO DEL ESTADO DE PROTONACIÓN DEL AF SOBRE LA AFINIDAD DE ACOMPLEJAMIENTO	62
7.4.1. TITULACIÓN FLUOROMÉTRICA	62
7.4.2. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL (<i>DOCKING</i>)	67
VIII. CONCLUSIONES	70
IX. PERSPECTIVAS	72
X. REFERENCIAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ácido ferúlico unido por enlace ester con lignina y un polisacárido.	3
Figura 2.	Isómeros de la molécula de ácido ferúlico: (A) <i>trans</i> y (B) <i>cis</i> .	3
Figura 3.	Estados de protonación que presenta el AF en disolución a pH 4.0, 7.0 y 9.0.	4
Figura 4.	Estabilización por resonancia del radical de ácido ferúlico.	5
Figura 5.	Estructura química de las alfa, beta y gama ciclodextrinas.	7
Figura 6.	Disposición estructural de los hidroxilos primarios y secundarios en las ciclodextrinas.	8
Figura 7.	Posibles formas de inclusión de la molécula huésped en las ciclodextrinas.	11
Figura 8.	Tipología de los diagramas de solubilidad de fases.	22
Figura 9.	Metodología realizada para el análisis de la formación de los complejos AF-CD así como de la energética del proceso de su acomplejamiento.	39
Figura 10.	Comparación de los espectros de IR.	49
Figura 11.	Comparación de los termograma de TGA.	51
Figura 12.	Comparación de los termograma de CDB.	53
Figura 13.	Diagrama de solubilidad de fases del ácido ferúlico en presencia de α CD (●), β CD (■) y γ CD (◆).	54
Figura 14.	Titulaciones calorimétricas isotérmicas del AF con α CD (A), β CD (B) y γ CD (C).	56
Figura 15.	(A) Espectros de emisión de fluorescencia del AF durante la titulación fluorométrica con α CD, β CD y γ CD a pH 9.0. (B) CME del AF al inicio y al final de la titulación fluorométrica con la α CD, β CD y γ CD.	59
Figura 16.	Curvas de titulación fluorométrica del AF con la α CD (●), β CD (■) y γ CD (◆) a pH 9.0.	61
Figura 17.	(A) Espectros de emisión de fluorescencia del AF con carga 1 ⁻ durante la titulación fluorométrica con α CD, β CD y γ CD a pH 7.0. (B) CME del AF al inicio y al final de la titulación fluorométrica con la α CD, β CD y γ CD, a los pHs 7.0 y 4.0.	63
Figura 18.	Curvas de titulación fluorométrica del AF con la α CD (●), β CD (■) y γ CD (◆) a pH 7.0 (A) y pH 4.0 (B).	65
Figura 19.	Estructuras en 3D de los complejos AF- α CD (A), AF- β CD (B) y AF- γ CD (C).	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características fisicoquímicas de las ciclodextrinas.	9
Tabla 2.	Constantes de acomplejamiento de algunos saborizantes incluidos en α CD y β CD.	15
Tabla 3.	Análisis espectroscópico por IR de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas sintetizadas por vía enzimática y química.	18
Tabla 4.	Análisis por calorimetría diferencial de barrido de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas sintetizadas por vía enzimática y química.	20
Tabla 5.	Análisis por termogravimetría de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas.	20
Tabla 6.	Estudios de solubilidad de fases de algunos compuestos acomplejados con ciclodextrinas.	22
Tabla 7.	Parámetros termodinámicos obtenidos por CTI del proceso de acomplejamiento entre algunos compuestos con las ciclodextrinas naturales.	24
Tabla 8.	Análisis por espectroscopía de fluorescencia de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas sintetizadas por vía enzimática y química.	26
Tabla 9.	Técnicas utilizadas para el estudio de las propiedades termodinámicas y estructurales de los complejos formados entre el ácido ferúlico con las CDs naturales y sintetizadas químicamente.	28
Tabla 10.	Solubilidad del AF y las CDs empleando diferentes disolventes.	47
Tabla 11.	Permanencia o desaparición de las bandas características del AF libre y acomplejado con la α CD, β CD y γ CD.	49
Tabla 12.	Temperaturas y porcentajes de pérdidas de peso obtenidos a partir de los termogramas de TGA del AF, la α CD, β CD y γ CD así como de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD.	51
Tabla 13.	Temperaturas de las transiciones conformacionales obtenidas a partir de los termogramas de CDB del AF, la α CD, β CD y γ CD, así como de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD.	53
Tabla 14.	Cálculo de la K_s para el acomplejamiento del AF con las CDs naturales.	55
Tabla 15.	Parámetros termodinámicos de la formación de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD obtenidos por CTI.	56
Tabla 16.	Valores de K_a obtenidos por titulación fluorométrica para los complejos α CD-AF, β CD-AF y γ CD-AF.	62
Tabla 17.	Valores de la K_a y de la ΔG_a obtenidos por titulación fluorométrica de la formación de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD a pH 9.0, 7.0 y 4.0.	65
Tabla 18.	Puntuaciones de ΔG_a de los complejos α CD-AF, β CD-AF y γ CD-AF a distintos estados de protonación del AF (0 y 1 ⁻).	67

ABREVIATURAS

AF	Ácido ferúlico
CDs	Ciclodextrinas
α CD	Alfa ciclodextrina
β CD	Beta ciclodextrina
γ CD	Gama ciclodextrina
AF-CD	Complejo Ácido ferúlico-Ciclodextrina
AF- α CD	Complejo Ácido ferúlico-Alfa ciclodextrina
AF- β CD	Complejo Ácido ferúlico-Beta ciclodextrina
AF- γ CD	Complejo Ácido ferúlico-Gama ciclodextrina
K_a	Constante de acomplejamiento
K_s	Constante de solubilidad
ΔG_a	Energía libre de Gibbs de acomplejamiento
ΔH_a	Entalpía de acomplejamiento
ΔS_a	Entropía de acomplejamiento
CTI	Calorimetría de titulación isotérmica
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
TGA	Termogravimetría
IR	Infrarojo

RESUMEN

En el presente trabajo se acomplejó al ácido ferúlico (AF) con las ciclodextrinas (CDs) naturales α CD, β CD y γ CD; todas las moléculas fueron solubilizadas en fosfatos 50 mM, pH 9.0. La formación de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD, se comprobó mediante un análisis comparativo de las moléculas libres con respecto a los complejos formados empleando las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (CDB), Infrarojo (IR), termogravimetría (TGA) y diagramas de solubilidad de fases. Además, se empleó por primera vez la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (CTI) para el estudio de la energética del proceso de acomplejamiento del AF con la α CD, β CD y γ CD, obteniendo de manera directa los valores de la entalpía (ΔH_a), la constante de equilibrio (K_a) así como de la estequiometría (n); y mediante relaciones termodinámicas, se calcularon los parámetros de acomplejamiento ΔG_a (energía libre de Gibbs) y ΔS_a (entropía). La espectroscopía de fluorescencia se utilizó como técnica comparativa para obtener K_a y ΔG_a . Estos parámetros también fueron determinados empleando la titulación fluorométrica y variando la carga del AF (0, 1⁻ y 2⁻). Además, se realizó una simulación del acoplamiento molecular (*docking*) para evaluar el efecto del AF con carga 0 y 1⁻, en el valor de la ΔG_a . Los resultados mostraron que en las condiciones experimentales usadas el AF se introdujo en la cavidad de la α CD, β CD y γ CD, observándose cambios o desaparición de bandas (espectros de IR), picos (termogramas de CDB) y pendientes (termogramas de TGA) característicos de algunos grupos funcionales de las moléculas libres, así como un incremento en la solubilidad del AF. Por otro lado, los valores negativos de la ΔH_a y ΔG_a indicaron que la formación de los complejos fue exotérmica y espontánea, y que el proceso del acomplejamiento fue entrópicamente favorecido para la β CD y la γ CD, pero no para la α CD. Además, que la afinidad del acomplejamiento fue en el siguiente orden β CD > γ CD > α CD, lo cual se corroboró con los resultados de la espectroscopía de fluorescencia. El efecto del estado de protonación del AF provocó cambios en la K_a , mostrando que la carga 1⁻ generó valores más negativos de ΔG_a en el acomplejamiento con las tres CDs naturales estudiadas. Los órdenes de afinidad para el AF con carga 0 y 2⁻ fueron β CD > γ CD > α CD, y con carga 1⁻ β CD > α CD > γ CD. Por otro lado, el análisis por *docking* generó las posibles estructuras en 3D de los complejos AF-CD, mostrando que el AF se introdujo en las tres CDs con la misma orientación, en donde el anillo del benceno se ubicó en el centro de la cavidad, el ácido carboxílico interactuó con la entrada más ancha de la CD, mientras que el alcohol y el grupo metoxilo se encontraron en contacto con la entrada más angosta; y en el caso del acomplejamiento con la α CD la molécula del AF quedó más expuesta al disolvente con respecto a las otras dos CDs. Los valores de la ΔG_a obtenidos del análisis por *docking* indicaron que la carga del AF no influyó en la afinidad del acomplejamiento, contrario a lo observado con los resultados experimentales; esto pudo deberse a que no se consideraron las moléculas de agua en la simulación de *docking*, las cuales pueden tener un papel muy importante en las interacciones que se forman durante el proceso de acomplejamiento, o contribuir de manera significativa en el valor de la ΔS de desolvatación. En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que las condiciones experimentales establecidas permitieron utilizar la técnica de CTI para determinar los parámetros termodinámicos de manera confiable, además que la β CD sería la más recomendada para acomplejar al AF, independientemente de su carga, en base al orden de afinidad observado (β CD > γ CD > α CD).

I. MARCO TEÓRICO

En esta sección se presenta información sobre la estructura química, las propiedades fisicoquímicas y biológicas tanto del ácido ferúlico (AF) como de la α CD, β CD y γ CD. También se muestra la importancia de estas moléculas en la industria alimentaria. Por último, se expone información sobre algunas de las técnicas más utilizadas para la obtención de complejos utilizando ciclodextrinas (CDs), y para el análisis de la energética del proceso de formación de dichos compuestos.

1.1. ÁCIDO FERÚLICO

Actualmente existe un gran interés sobre la ingesta de compuestos polifenólicos debido a que se les ha conferido un efecto positivo en la salud de los consumidores (El Gharras, 2009). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y provienen del metabolismo secundario de las plantas aportándoles aromas, sabores o coloraciones característicos y/o como mecanismo de defensa (Cheynier, 2005). Se les ha clasificado en ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico), flavonoides (flavonoles, flavanoles flavonas, flavononas, isoflavonas, proanticianidinas), estilbenos y ligninas (Manach, Williamson, Morand, Scalbert & Rémésy, 2005).

El ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico), es un compuesto que pertenece al grupo de los ácido fenólicos y se sintetiza bioquímicamente por la vía metabólica del ácido shikímico en la ruta de los fenilpropanoides (Dewick, 2002). Se encuentra localizado en la pared celular de las plantas unido por un enlace éster a algunos polisacáridos, derivados glicosilados o ésteres de los ácidos quínico, shikímico y tartárico, formando de este modo parte de una estructura compleja (Figura 1) (Saulnier & Thibault, 1999; Harris & Trethewey, 2010); por ejemplo, en los granos de cereal el AF es el más abundante y se encuentra unido a los arabinosilanos de la pared celular (El Gharras, 2009). La concentración de AF varía dependiendo del material vegetal, en granos de trigo la concentración puede ser de 5 g/kg, en azúcar de remolacha 9 g/kg, en los granos de maíz 5 g/kg y los granos de arroz contienen del 1.5 al 2.8% de este ácido (Ou *et al.*, 2007).

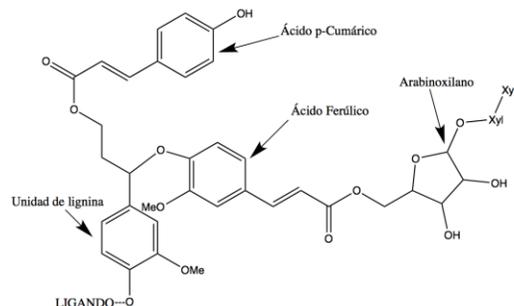


Figura 1. Ácido ferúlico unido por enlace éster con lignina y un polisacárido (Buranov & Mazza, 2009).

Para liberar al AF de la pared celular se utilizan métodos químicos o enzimáticos, en los primeros se lleva a cabo una hidrólisis con ácidos o bases concentrados (2N) (Kumar & Pruthi, 2014); en el segundo caso se utiliza a la feruloil esterasa (E.C. 3.1.1.73) producida principalmente por hongos, siendo más eficiente esté último método, Xiros *et al.* (2009) lograron recuperar el 80% de AF a partir de bagazo de cereales utilizados en la producción de cerveza, usando a la enzima producida por *Fusarium oxysporum*.

1.1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA, PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DEL ÁCIDO FERÚLICO

La estructura base de la molécula del AF corresponde al ácido cinámico, donde el anillo bencénico esta hidroxilado en la posición *para*- y oxigenado en la posición *meta*-, con respecto al enlace vinílico unido a un grupo carboxílico. Esta disposición de los sustituyentes en el benceno hace que la molécula sea altamente conjugada (Figura 2).

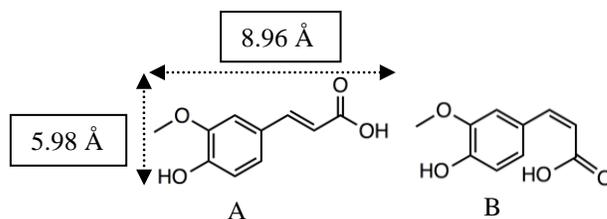
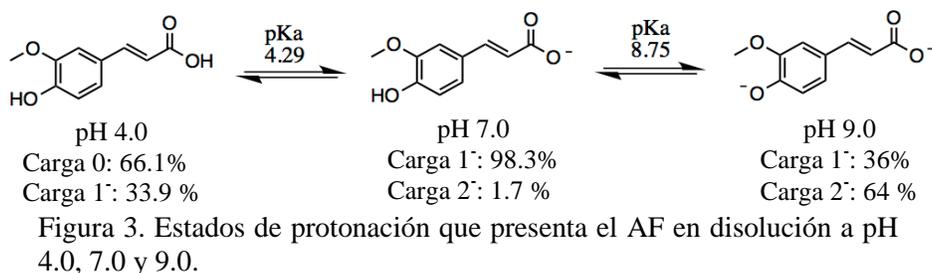


Figura 2. Isómeros de la molécula de ácido ferúlico: (A) *trans* y (B) *cis*.

El AF tiene una masa molar de 194.18 g/mol y punto de fusión de 174 °C, es fotosensible, termoestable, posee un sabor muy astringente y amargo (Zhao &

Moghadasian, 2008). Es un ácido dibásico debido a que en solución acuosa tiene la capacidad de desprender dos protones; la primera desprotonación produce un anión carboxilato y la segunda genera el anión fenolato (Figura 3), con valores de pK_a de 4.29 y 8.75, respectivamente (Goldberg, Lang, Selig & Decker, 2011).



Los porcentajes de las cargas mostradas en la figura anterior fueron obtenidos mediante la siguiente ecuación para el grado de desprotonación σ ($0 < \sigma < 1$) (Karshikoff, 2006):

$$\sigma = \frac{10^{pH-pK_a}}{1+10^{pH-pK_a}} \quad \text{Ec. 1}$$

La molécula de AF fluoresce con longitudes de onda máximas de excitación y emisión de 310 nm y 330 nm, respectivamente (Zhang, Li, Jia, Chao & Zhang, 2009). En solución acuosa a pH 6.0 (configuración *trans*-) este compuesto es capaz de absorber luz en la región del ultravioleta presentado dos máximos de absorción a los 284 nm ($\log \epsilon = 4.18$) y 307 nm ($\log \epsilon = 4.19$) (Graf, 1992). Es altamente soluble en metanol, etanol y acetato de etilo; moderadamente soluble en éter, y presenta muy baja solubilidad con benceno, éter de petróleo y agua (0.69 mg/mL). El AF recuperado de plantas usualmente se encuentra como el isómero *trans*-, y una vez disuelto en agua después de dos semanas a temperatura ambiente solamente el 23% cambia a la forma *cis*- (Graf, 1992). Con la finalidad de incrementar la solubilidad del AF en disolventes acuosos, Kikugawa, Tsuchiyama, Kai & Sakamoto (2012) esterificaron al AF con diglicerol, empleando un proceso enzimático, lo que no afectó su actividad antioxidante así como su propiedad para absorber luz UV, y lograron una solubilidad de 980 mg/mL. También se ha estudiado

la inclusión del AF en CDs, este método es muy prometedor debido a que la formación de los complejos le brinda a la molécula huésped estabilidad y mayor solubilidad en disolventes acuosos.

Los compuestos polifenólicos poseen varias propiedades biológicas; en el caso del AF puede actuar como antioxidante cediendo el hidrógeno de su grupo hidroxilo para neutralizar a los radicales libres, produciéndose el radical fenoxilo que tiene la capacidad de deslocalizar al electrón por resonancia confiriéndole de este modo estabilidad a la molécula, lo cual se esquematiza en la figura 4 (Tsuchiyama, Sakamoto, Fujita, Murata & Kawasaki, 2006). También se reportó que no es un compuesto mutagénico y que además mostró actividad antimutagénica del 50% contra 5NFAA [ácido-3-(5-nitro-2-furil)-acrílico] y azida de sodio (Birošová, Mikulášová & Vaverková, 2005). De igual modo, se le ha conferido al AF actividad antiinflamatoria, antitrombótica y anticancerígena (Fujita *et al.*, 2008; Ramar *et al.*, 2012; Urbaniak, Szela & Marcin, 2013).

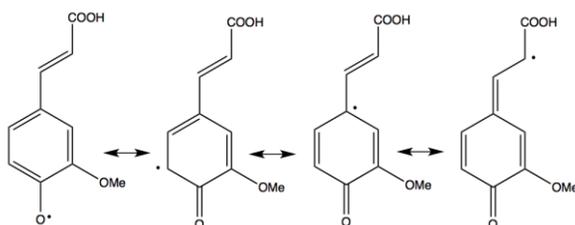


Figura 4. Estabilización por resonancia del radical de ácido ferúlico (Graf, 1992).

1.1.2. IMPORTANCIA DEL ÁCIDO FERÚLICO EN ALIMENTOS

Se sabe que el AF se absorbe en el tracto digestivo para que pueda ser metabolizado (Bourne & Rice-Evans, 1999). El AF presenta baja toxicidad a una dosis letal media (DL50) de 2,113 mg/kg en ratas (Tada, Tayama & Aoki, 1999).

El AF en el área de alimentos ha sido utilizado como precursor en la producción de la vainillina, como aditivo alimentario ya sea por su función antioxidante o antimicrobiana, o como ingrediente para la formulación de alimentos funcionales (Ou & Kwok, 2004).

Tal es la importancia del AF que se han generado patentes para su producción

(Satya & Jasmine, 2008), o su uso como materia prima para producir vainillina mediante procesos enzimáticos (Funk & Brodelius, 1992; Rosazza, Huang, Dostal, Volm & Rousseau, 1995; Westcott, Cheetham & Barraclough, 1993; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2000; Priefert, Rabenhorst & Steinbuchel, 2001; Overhage, Steinbüchel & Priefert, 2003; Ali *et al.*, 2008; Rui Zhou *et al.*, 2014).

Por otro lado, como antioxidante el AF a dosis de 5 y 10 μM mostró ser más eficaz en la inhibición de la oxidación de lípidos y proteínas, con respecto al ácido gálico, galato de propilo, ácido cafeico, malvidina, delphinidina, catequina, epicatequina, rutina o quercetina (Heinonen *et al.*, 1998).

Como agente antimicrobiano, fue capaz de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, y levaduras (Lattanzio, De Cicco, De Venere, Lima & Salerno, 1994). Como conservador, se estudió también el efecto del AF en la inhibición de la enzima polifenol oxidasa así como en la carga microbiana en camarones (*Litopenaeus vannamei*), empleando soluciones de AF al 1 y 2% (w/v), almacenándolos en hielo durante 10 días. Los resultados de este estudio mostraron que bajo las condiciones mencionadas, el AF fue capaz de inhibir la actividad de la polifenol oxidasa, así mismo, se observó una disminución en el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas, Estos resultados fueron comparables con los observados cuando se usó metabisulfito de sodio al 1.25 % (Nirmal & Benjakul, 2009).

El uso del AF fue aprobado en Japón como aditivo alimentario, y en Europa y Estados Unidos fue legislada su aplicación como antioxidante en bebidas por parte la FDA (Graf, 1992). Se ha observado que el AF en los alimentos es menos afectado por los cambios de pH en comparación con otros ácidos fenólicos, tales como el clorogénico, cafeico y gálico (Friedman & Jürgens, 2000). En el tema de los alimentos funcionales, existen patentes de la formulación de alimentos suplementados con AF para prevenir y corregir situaciones de hipertensión (Atsushi, Ryuji & Ichiro, 2006; Atsushi *et al.*, 2008). También, es ampliamente utilizado como una sustancia ergogénica en alimentos deportivos debido a que es un potente antioxidante y estimula la secreción de hormonas (Ou & Kwok, 2004).

Por todo lo señalado, el AF es una molécula de interés motivo por el cual actualmente se está realizando investigación para su recuperación a partir de fuentes

naturales y desechos agroindustriales como el salvado de trigo utilizado para la producción de aceite en el Reino Unido (Charalampopoulos, 2014), el agua generada en el proceso de nixtamalización (Asaff, 2010) y a partir de pulpa de remolacha (López *et al.*, 2011).

1.2. CICLODEXTRINAS ALFA, BETA Y GAMA

1.2.1. PAPEL BIOLÓGICO, ESTRUCTURA QUÍMICA, PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS E INOCUIDAD

En la naturaleza algunos microorganismos aseguran su fuente de carbono y energía excretando al medio ambiente a la enzima ciclodextrinaglicosil transferasa (EC 2.4.1.19), la cual sintetiza moléculas de CDs usando como sustrato al almidón, posteriormente, las CDs son internalizadas al microorganismo a través de una proteína de unión específica, y una vez dentro, son degradadas hasta maltosa o glucosa por la enzima ciclomaltodextrinasa (EC 3.2.1.54) (Hashimoto, Yamamoto, Fujiwara, Takagi & Imanaka, 2001). Las CDs, también conocidas como cicloamilosas, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger, son oligosacáridos cíclicos que constan de seis (α CD), siete (β CD) u ocho (γ CD) unidades de glucopiranosas (Figura 5) unidas por enlaces α -(1,4) (Brewster & Loftsson, 2007; Palem, Chopparapu, Subrahmanyam & Yamsani, 2012; Kurkov & Loftsson, 2013).

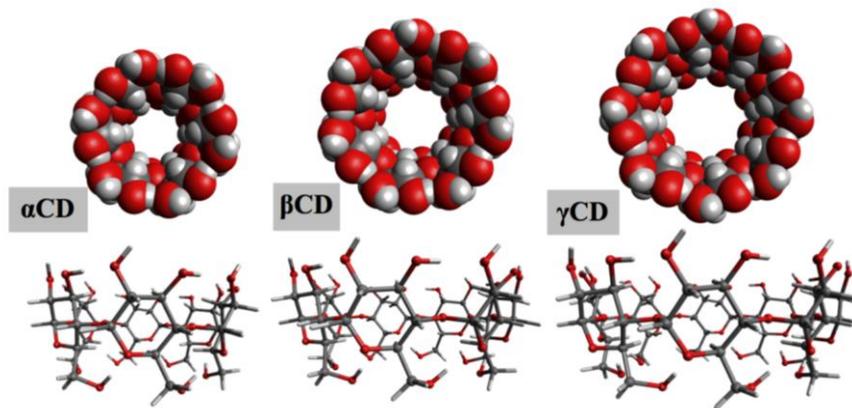


Figura 5. Estructura química de las alfa, beta y gama ciclodextrinas.

Estructuralmente, las CDs tienen forma de un cono truncado con una cavidad hidrofóbica mientras que la parte exterior es hidrofílica, originada por la conformación de

silla que presentan las unidades de las glucopiranosas. Además, poseen dos aberturas en los extremos de la molécula, donde una es más amplia que la otra debido a la disposición de los grupos hidroxilos primarios y secundarios (Vyas, Saraf & Saraf, 2008).

La disposición que presentan los hidroxilos primarios (hidroxilos unidos al carbono que no forma parte del anillo de glucosa) hace que tengan una rotación libre lo que ocasiona una reducción en el diámetro efectivo de la cavidad (Figura 6). Por otra parte, los hidroxilos secundarios (hidroxilos unidos al anillo de glucosa) permiten que se forme un mayor tamaño de la cavidad porque no tienen una rotación libre (Astray, Gonzalez-Barreiro, Mejuto, Rial-Otero & Simal-Gándara, 2009).

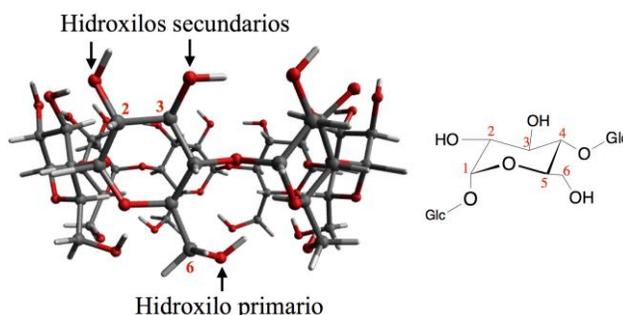


Figura 6. Disposición estructural de los hidroxilos primarios y secundarios en las ciclodextrinas.

En la cavidad más estrecha de la β CD, se pueden llegar a formar puentes de hidrógeno intramoleculares los cuales le confieren rigidez a la molécula, como es el caso del hidroxilo unido al carbono 2 de una unidad de glucopiranosas que puede formar un puente de hidrógeno con el hidroxilo del carbono 3 de la unidad de glucopiranosas adyacente, esto posiblemente da origen a la baja solubilidad de la β CD (Naidoo, Chen, Jansson, Widmalm & Maliniak, 2004). En la cavidad de la α CD los puentes de hidrógeno formados no son los suficientes para conferirle una rigidez como la presentada por las β CDs, esto se debe a que una unidad de glucopiranosas está en una posición distorsionada. Por lo anterior, únicamente se generan cuatro de los seis posibles puentes de hidrógeno que pueden formarse. Por su parte la γ CD cuenta con una estructura no coplanar, que le confiere más flexibilidad que las otras dos CDs, por lo que es la más soluble (Steed & Atwood, 2000).

Algunos estudios espectroscópicos han demostrado la distorsión de la

conformación molecular de las α CD y γ CD, y la simetría de la estructura de la β CD, tanto en solución acuosa como en el estado cristalino (Astray *et al.*, 2009). La solubilidad de las CDs es más baja con respecto a los azúcares acíclicos, debido a su entalpía de disolución desfavorable (más positiva) y a su entropía de disolución favorable (menos positiva) (Astray *et al.*, 2009). En la tabla 1 se enlistan algunas de las características fisicoquímica de las CDs naturales.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las ciclodextrinas.

Características	α CD	β CD	γ CD
Unidades de glucopiranososa	6	7	8
Masa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua (g/L)	20 °C	90	16.4
	25 °C	127	18.8
	35 °C	204	28.3
Diámetro exterior (Å)	14.6	15.4	17.5
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura del cono (Å)	7.9	7.9	7.9
Volumen de la cavidad (Å ³)	174	262	427
ΔH° de solución (kJ/mol)	32.1	34.7	32.2
ΔS° de solución (J/molK)	57.7	48.9	61.4
Agua (% en peso)	10.2	13.2-14.5	8.13-17.7
pK _a (método potenciométrico a 25 °C)	12.33	12.20	12.08

(Steed & Atwood, 2000; Del Valle, 2004; Cal & Centkowska, 2008)

Como puede observarse (Tabla 1), existe una relación directamente proporcional entre el número de unidades de glucopiranosas con el aumento del diámetro interno y externo, de la masa molar así como del volumen de la cavidad de las CDs. También hay variación en la ΔS° siendo mayor para la γ CD. La altura de las CDs es la misma para las tres; los valores de la ΔH° de solución y pK_a, son similares.

Respecto a la degradación en el organismo humano de las tres CDs naturales, se estableció que tanto la α CD como la β CD son metabolizadas mediante un proceso de fermentación en el colon por medio de *Bacteroides* (Antenucci & Palmer, 1984); y en el caso de la γ CD se degradada por acción de la α -amilasa pancreática de la saliva (John

Marshall & Miwa, 1981; Kurkov & Loftsson, 2013). Las CDs no son tóxicas y están consideradas como compuestos GRAS (de sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) (Steed & Atwood, 2000; Munin & Edwards-Lévy, 2011). Bellringer, Smith, Read, Gopinath & Olivier (1995) determinaron que el efecto tóxico de la β CD se presenta arriba de los 0.7-0.8 g/kg/día en ratas y aproximadamente 2 g/kg/día en perros.

La situación reglamentaria respecto a la inocuidad de las CDs difiere entre países, en los Estados Unidos las α CD, β CD y γ CD se consideran sustancias GRAS desde 1998; en Japón son reconocidas como productos naturales por lo que su comercialización en el sector de la alimentación está restringida sólo por su pureza. Otros países como Nueva Zelanda y Australia clasificaron a la α CD y la γ CD como alimentos nuevos, esto en los años 2003 y 2004, respectivamente (Cravotto, Binello, Baranelli, Carraro & Trotta, 2006).

La CD más utilizada en la industria alimentaria ha sido la β CD, para la cual la recomendación por parte de un comité mixto FAO-OMS fue de una ingesta de 5 mg/kg por día (Szente & Szejtli, 2004). Por otro lado, la Norma emitida por el Codex Alimentarius para la β CD establece que la cantidad máxima permitida en aperitivos a base de patatas y en bebidas a base de agua es de 500 mg/kg, en pastas o fideos precosidos no debe exceder 1 mg/kg, y finalmente, en gomas de mascar su incorporación no debe ser mayor de los 20 mg/kg (FAO, 2014). Para la α CD y la γ CD aún no se han establecido las normas correspondientes.

1.2.2. FORMACIÓN DE COMPLEJOS

Las CDs tienen la capacidad de formar complejos de inclusión (anfitrión-huésped) con una variedad de compuestos tanto sólidos, líquidos como gaseosos, tales como: alifáticos de cadena lineal o ramificada, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos, compuestos aromáticos, gases y compuestos polares tales como halógenos y aminas (Del Valle, 2004). La α CD por lo general sólo puede acomplejar moléculas de bajo peso molecular o compuestos con cadenas laterales alifáticas, la β CD forma complejos de manera preferente a compuestos aromáticos complejos y heterocíclicos, y la γ CD puede incluir en su cavidad moléculas más grandes tales como macrociclos y esteroides (Vyas, Saraf & Saraf, 2008).

Las CDs han sido utilizadas para mejorar la solubilidad de las moléculas huésped que generalmente son altamente insolubles, confiriéndoles también protección contra la oxidación, la luz visible o ultravioleta y al calor, control en la volatilidad y sublimación de las moléculas acomplejadas, también se han aplicado en separaciones cromatográficas, han sido útiles en el enmascaramiento de sabores o en la eliminación de olores desagradables así como en la liberación controlada de fármacos y sabores (Marques, 2010).

La capacidad de las CDs para acomplejar a la molécula huésped está en función de dos aspectos principalmente: *i*) factor estérico, el cual depende tanto del volumen de la cavidad de la CD como de la molécula huésped. Por ejemplo, en el caso de algunas moléculas de bajo peso molecular, puede suceder que más de una se inserte en la cavidad de la CD, pero que con moléculas más grandes solamente se acomplejen en una relación 1:1 o no se forme el complejo. En principio, sólo una porción de la molécula puede incluirse en la cavidad para formar el complejo, sin embargo, la inclusión no sigue un mismo patrón (Figura 7). *ii*) formación de interacciones no covalentes entre los diferentes componentes del sistema (CD, huésped y disolvente), para que el complejo se pueda generar debe haber interacciones energéticamente favorables que mantengan a la molécula huésped en la cavidad de la CD. Se ha observado que el acomplejamiento es temporal y está regido por enlaces no covalentes, tales como interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones ión-dipolo, dipolo-dipolo, así como por el reordenamiento de las moléculas de solvente que originalmente rodean tanto a la CD como al compuesto huésped (Castronuovo & Nicolli, 2006).

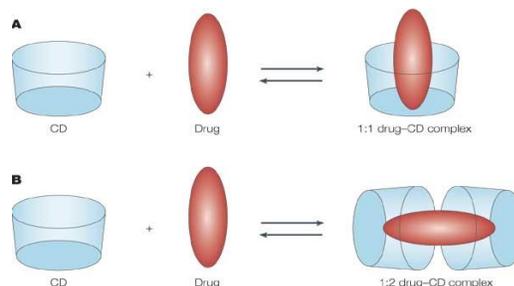


Figura 7. Posibles formas de inclusión de la molécula huésped en las ciclodextrinas (Rayner, Mackevica & Hansen, 2010).

En términos generales, hay cuatro aspectos que podrían dirigir el equilibrio hacia

la formación del complejo de inclusión (Brewster & Loftsson, 2007):

1. El desplazamiento de moléculas de agua desde la cavidad de la CD hacia el agua de bulto.
2. El aumento del número de puentes de hidrógeno formados entre la molécula huésped y las glucopiranosas de la CD, conforme el agua se desplazada hacia afuera de la molécula anfitriona.
3. Una reducción del área de contacto entre la molécula huésped hidrófoba y su entorno acuoso.
4. Un aumento de las interacciones hidrofóbicas entre la molécula huésped y el interior de la CD.

Por otro lado, también debe considerarse el tipo de disolvente utilizado porque a mayor solubilidad de las CDs más disponibles estarán para el proceso de acomplejamiento. Además, la molécula huésped debe ser capaz de sacar al disolvente de la cavidad de la CD. El agua es el disolvente generalmente utilizado para solubilizar a las CDs y es muy fácil de desplazar. De igual modo, es conveniente usar la cantidad de disolvente adecuada para garantizar la formación de complejo ya que se corre el riesgo de que cuando sea muy alta, las CDs y el analito estén tan diluidos que no entren en contacto con la misma facilidad con que lo harían en una solución más concentrada (Brewster & Loftsson, 2007).

Los compuestos que se suelen incluir en las CDs tienen baja solubilidad en disolventes acuosos, lo cual implica que la formación del complejo pudiera llevarse a cabo lentamente (Gonnet, Lethuaut & Boury, 2010). En tal caso, se recomienda disolver a la molécula en un disolvente orgánico que no genere interacciones con la cavidad de la CD, y de este modo facilitar la eliminación del mismo (Szejtli, 1998).

Con respecto a la estabilidad del complejo formado ésta tiende a aumentar conforme incrementa el carácter donador de electrones de las moléculas huésped, y la especie acomplejada puede lograr una permanencia en la cavidad proporcional a las interacciones no covalentes que se generen como resultado de la disposición espacial producida (Szente & Szemán, 2013).

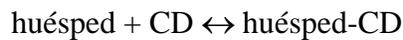
La inclusión de una molécula en la CD es un proceso estequiométrico donde se generan una variedad de fuerzas no covalentes, como ya se mencionó anteriormente, las

cuales son las responsables de la formación de un complejo estable (Castronuovo & Niccoli, 2013); dichas fuerzas pueden ser determinadas a partir de un análisis termodinámico, que incluye parámetros tales como la entalpía (ΔH_a), la entropía (ΔS_a) y la energía libre Gibbs (ΔG_a) del proceso de acomplejamiento. Esta última puede calcularse a partir de la constante de equilibrio de la formación del complejo (K_a), empleando la siguiente ecuación (Connors, 1997; Brewster & Loftsson, 2007).

$$\Delta G_a = -RT \ln K_a \quad \text{Ec. 2}$$

Donde R es la constante de los gases ideales y T la temperatura absoluta.

La K_a se puede determinar experimentalmente empleando técnicas tales como titulación fluorométrica y cromatografía electrocinética capilar, y se expresa en términos de las concentraciones de los reactivos (huésped y CD) y del producto (complejo huésped-CD), como se muestra en la siguiente ecuación (Loftsson, Masson & Brewster, 2004):



$$K_a = \frac{[\text{huésped-CD}]}{[\text{huésped}][\text{CD}]} \quad \text{Ec. 3}$$

La ecuación anterior evidencia que la K_a permite cuantificar la afinidad de la unión entre ambas moléculas, ya que el valor de dicha constante está asociado con la concentración de complejo formado (Klotz, 1997). Cabe señalar que la K_a depende del pH del medio, de la temperatura, fuerza iónica del medio y del solvente en el que se encuentre.

Como ya se mencionó, a partir de K_a puede calcularse el valor de la ΔG_a , el cual proporciona información cuantitativa respecto a la espontaneidad del proceso, es decir, si el acomplejamiento se puede llevar a cabo o no. Se sabe que la ΔG_a está gobernada por dos contribuciones principales que son la ΔH_a y la $T\Delta S_a$ (Ecuación 4) (Alberty, 1969).

$$\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a \quad \text{Ec. 4}$$

La ΔH_a mide la energía liberada o absorbida necesaria para la conversión de los reactivos en productos, mientras que la ΔS_a mide la disminución o aumento en los grados

de libertad de las moléculas que intervienen en el acomplejamiento (Klotz, 1997).

En base a estudios realizados con moléculas modelo (Klotz, 1997; Liu & Guo, 2002) se estableció que los cambios negativos en ΔH_a y $T\Delta S_a$ revelan que el proceso de acomplejamiento está entálpicamente dirigido y puede asociarse al incremento en los enlaces de puente de hidrógeno e interacciones de van der Waals. Por el contrario, si los cambios de ΔH_a y $T\Delta S_a$ son positivos, indican que el proceso de inclusión está controlado por la entropía, manifestando un posible incremento en las interacciones hidrofóbicas y de desolvatación, ya que la inclusión impide la rotación de la molécula así como el desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad de la CD al agua de bulto (Novotny, Bruccoleri, Davis & Sharp, 1997).

Es importante mencionar que la estequiometría de la reacción (n) juega un rol importante porque la unión entre una molécula huésped y un receptor no siempre se da en una relación 1:1 (Figura 7), lo que implica cambios en las interacciones e influye en los valores de los parámetros termodinámicos antes mencionados.

1.2.3. IMPORTANCIA DEL USO DE LAS α CD, β CD Y γ CD EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

El uso de las CDs en formulaciones de alimentos es amplio, por ejemplo, las γ CD pueden llegar a estabilizar y proteger a moléculas precursoras de color, sabor y olor durante el proceso de cocción o pasteurización, congelación, descongelación, etc. (Li *et al.*, 2007). Asimismo, con el objetivo de evitar el efecto de oxidación, se han incorporado CDs a los jugos, zumos de frutas y de verduras, por su capacidad de formar complejos de inclusión con la enzima polifenol oxidasa y con los compuesto que son susceptibles a la oxidación, como es el caso del ácido clorogénico (Astray, Mejuto, Morales, Rial-Otero & Simal-Gándara, 2010).

Por lo anterior, es importante conocer la afinidad de acomplejamiento entre las moléculas huésped y las CDs, por ello se han realizado experimentos para determinar la K_a . Astray *et al.* (2010) estudiaron el acomplejamiento de 14 saborizantes con la α CD y la β CD (Tabla 2), empleando la técnica de espectrofotometría de UV-Vis y el siguiente modelo matemático:

$$\frac{A_T - A_G}{A_{G-CD} - A_T} = K_s[CD] \quad \text{Ec. 5}$$

Donde (A_T) es la absorbancia total, (A_G) es la absorbancia en ausencia de la α CD o la β CD, (A_{G-CD}) la absorbancia cuando todo el sustrato se une a cada una de las CDs, $[CD]$ es la concentración de la α CD o la β CD, y K_s es la constante de acomplejamiento.

Tabla 2. Constantes de acomplejamiento de algunos saborizantes incluidos en las α CD y β CD.

Saborizante	λ (nm)	K_s (α CD)	K_s (β CD)
Maltol	230	0.4 ± 0.1	2.1 ± 0.5
4-Hidroxi-2,5-dimetil-3-furanona	285	1.1 ± 0.2	7 ± 1
Vainillina	300	1.6 ± 0.3	17 ± 3
Cinamato de metilo	391	4 ± 1	20 ± 4
Cineol	250	6 ± 1	29 ± 4
Citral	210	8 ± 2	31 ± 6
Mentol	530	10 ± 1	35 ± 7
Geraniol	240	9 ± 1	44 ± 9
Alcanfor	280	3 ± 1	19 ± 6
4- α ,5-Dimetil-1,2,3,4,4 α ,5,6,7-octahidro-7-ceto-3-isopropenilnaftaleno	254	7 ± 1	32 ± 5
Eugenol	210	5 ± 1	23 ± 4
<i>p</i> -Vinil guayacol	220	2.0 ± 0.5	17 ± 5
Limoneno	400	14 ± 3	55 ± 11

Astray *et al.*, 2010

Los resultados mostraron que para todos los saborizantes acomplejados las constantes de unión fueron mayores cuando se utilizó la β CD y, considerando que la formación del complejo es reversible, el tiempo de permanecía de la molécula huésped dentro de la cavidad de la CD también fue mayor conforme aumentó la afinidad, lo que podría repercutir en la protección y tiempo de liberación de las moléculas acomplejadas con la β CD con respecto a la α CD.

El acomplejamiento no solo sirve para conferir protección sino también para eliminar olores y sabores desagradables en los alimentos, por ejemplo, como en los zumos de cítricos el sabor astringente es la principal razón que limita la aceptación, por eso se han empleado CDs para acomplejar compuestos como la naringina en la toronja y

la hesperidina en la naranja (Konno & Miyawaki, 1982).

Se han realizado diversas investigaciones en las cuales buscan determinar la afinidad de compuestos que promueven un beneficio a la salud (antioxidantes, vitaminas y aceites esenciales) con las CDs, esto con la finalidad de que al ser incorporados los complejos en los alimentos, puedan soportar las condiciones de humedad, temperatura y oxidación. De esta manera al momento de ser ingeridos los complejos, dichos compuestos que aportan un beneficio a la salud se encuentren disponibles y viables para cumplir su función (Choi, Ruktanonchai, Min, Chun & Soottitantawat, 2010; Folch-Cano, Jullian, Speisky & Olea-Azar, 2010; Ponce Cevallos, Buera & Elizalde, 2010; Dos Santos, Buera, & Mazzobre, 2012; Fang, Comino & Bhandari, 2013).

Considerando el costo para la obtención de los tres tipos de CDs así como la variedad de moléculas con la cuales pueden llegar a complejarse, la α CD y la γ CD no son muy utilizadas, sin embargo, la β CD abarca el 97 % del mercado, y en el 2007 la comercialización de las CDs fue en el siguiente orden β CD > α CD > γ CD, con un precio en el mercado de 5, 45 y 80 \$US/kg, respectivamente (Li *et al.*, 2007). Para el 2014 el mercado de la α CD y la γ CD continua siendo el más pequeño debido a sus bajos rendimientos de producción y su precio elevado, y sigue la misma tendencia en su comercialización (Li, Chen, Gu, Chen & Wu, 2014).

1.2.4. MÉTODOS DE ACOMPLEJAMIENTO EMPLEANDO CICLODEXTRINAS

Existen varios métodos para obtener los complejos empleando las CDs, tales como el de co-precipitación que es el más utilizado, donde las CDs se disuelven en agua y con agitación constante se añade la molécula huésped poco a poco. En muchos casos, la solución de CD y el huésped debe ser enfriada mientras se agita hasta que se forme un precipitado, este se recoge por decantación, centrifugación o filtración. La principal desventaja de este método se presenta cuando se quiere escalar el proceso de acompleteamiento, debido a la solubilidad limitada de las CDs, se tienen que usar grandes cantidades de agua (Del Valle, 2004).

También existe el método de suspensión en el cual no es necesario disolver completamente a la CD para poder formar el complejo, debido a que las moléculas

huésped se incluirán en la cavidad de las CDs que se encuentran en solución. El complejo así formado saturará la fase acuosa, y el complejo puede ser recuperado del mismo modo que en el método de coprecipitación (Del Valle, 2004).

Otro método que se ha utilizado es el denominado pegado, el cual es una variación del método de suspensión, donde sólo una pequeña cantidad de agua es añadida para formar una pasta, la cual se mezcla con la CD utilizando un mortero, o en gran escala utilizando un amasador. La cantidad de tiempo requerido depende de la molécula huésped (Del Valle, 2004).

Finalmente, el método por extrusión se caracteriza por realizar el acomplejamiento en un sistema continuo, donde la CD, la molécula huésped y el agua pueden ser mezclados añadiéndolos a una prensa de extrusión. El grado de mezclado, la cantidad de calentamiento así como el tiempo pueden ser controlados en el equipo. Dependiendo de la cantidad de agua, el complejo extruido puede secarse mientras se enfría o empleando un horno (Del Valle, 2004).

1.2.5. TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON CICLODEXTRINAS

La caracterización de la formación de los complejos de inclusión entre las CDs y la molécula huésped se suele realizar empleando varias técnicas, las cuales brindan información sobre diferentes aspectos tales como la formación o ruptura de enlaces e interacciones químicas, la energética del proceso de acomplejamiento, el desplazamiento de las moléculas de disolvente de la cavidad de las CDs, así como la forma en que se incluyó la molécula huésped.

Los métodos más utilizados para estudiar los complejos con CDs son los siguientes de acuerdo a lo reportado por Singh, Bharti, Madan & Hiremath (2010):

- Para el análisis de la formación del complejo se suele emplear:
 - Espectroscopía infrarroja
 - Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)
 - Termogravimetría (TGA)
 - Diagramas de solubilidad de fases

- Para el análisis termodinámico del proceso de la formación del complejo se pueden utilizar:
 - Calorimetría de titulación isotérmica (CTI)
 - Espectroscopía de fluorescencia
 - Simulación computacional (*docking*)

A continuación se ahonda sobre las técnicas que se utilizaron en el presente trabajo para la caracterización del complejo de inclusión del AF con las CDs naturales.

1.2.5.1. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS

1.2.5.1.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La técnica de espectroscopía de infrarrojo (IR) se basa en la detección de la energía desprendida de los movimientos vibracionales de las moléculas, y en el caso de las orgánicas, pueden ser identificados los grupos funcionales que las conforman en la región del infrarrojo medio (MIR) (2500-25000 nm o de 4000-400 cm^{-1}) (Takahashi, Veiga & Ferraz, 2012). Esta técnica ha sido utilizada para corroborar la formación de complejos empleando CDs, a partir de un análisis comparativo entre los espectros correspondientes a la molécula huésped, la CD y del complejo huésped-CD (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis espectroscópico por IR de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas sintetizadas por vía enzimática y química.

Ciclodextrina	Molécula acomplexada	Principales cambios en los espectros de los complejos	Referencia
α CD β CD HE- β CD HP- β CD M- β CD	Ácido rosmarínico	La banda del enlace OH del fenol en 1200 cm^{-1} y la banda en 1500 cm^{-1} del grupo aromático del ácido rosmarínico desaparecieron en el espectro del complejo.	Celik, Ozyürek, Tufan, Güçlü & Apak, 2011
β CD HP- β CD M- β CD	Paracetamol	La banda en 3388 cm^{-1} del paracetamol cambió a 3402 cm^{-1} en el espectro del complejo.	El-Kemary, Sobhy, El-Daly & Abdel-Shafi, 2011
HP- β CD	Rifampicina	El espectro del complejo mostró diferencias muy marcadas con respecto a los espectros de la CD y la rifampicina.	He <i>et al.</i> , 2013

HE- β CD: Hidroxietil- β CD; HP- β CD: Hidroxipropil- β CD; M- β CD: Metil- β CD.

Cualquier cambio de posición, disminución o incluso desaparición de las bandas de los grupos funcionales que presente el espectro del complejo con respecto a las bandas en los espectros de las moléculas huésped y la CD, son indicativo de que se formó el complejo. La presencia de bandas sin cambios en el espectro del complejo se asocian a porciones de la molécula huésped que no fueron incluidas en la cavidad de la CD (Takahashi, Veiga & Ferraz, 2012).

1.2.5.1.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO Y TERMOGRAVIMETRÍA

Ambas técnicas se utilizan para medir las propiedades físicas de una sustancia en función de la temperatura, bajo una atmósfera controlada, proporcionando información sobre su comportamiento térmico, el cual es registrado en gráficas denominadas termogramas (Volonté & Quiroga, 2013).

La técnica de termogravimetría (TGA) indica la temperatura y la magnitud de los cambios de peso de una muestra, mientras que la calorimetría diferencial de barrido (CDB) mide los cambios de energía a través de transiciones entálpicas.

La técnica de CDB permite determinar si los cambios de energía se deben a un proceso endotérmico como la fusión, vaporización, sublimación o desorción, o bien a un proceso exotérmico como la cristalización, condensación, solidificación, adsorción o quimisorción (Clas, Dalton, & Hancock, 1999; Menczel & Prime, 2009). En los termogramas los picos endotérmicos representan el punto de fusión, esto en base a que en el estado final el cristal fundido tiene más energía que en su estado inicial; por lo contrario el proceso de cristalización está representado por los picos exotérmicos, debido a que el estado final (cristal) es menos energético que el inicial (sólido amorfo). A temperaturas muy altas tiene lugar la degradación de la muestra observándose caídas en las curvas de los termogramas (Mei & Lu, 2007). Los cambios observados por la técnica de TGA pueden corroborarse con los resultados obtenidos mediante CDB y viceversa, porque ambas técnicas monitorean las transiciones moleculares en función del incremento de la temperatura.

A continuación se muestran algunos estudios en los cuales se utilizaron las técnicas de CDB (Tabla 4) y TGA (Tabla 5), para confirmar la formación de complejos

empleando CDs.

Tabla 4. Análisis por calorimetría diferencial de barrido de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas sintetizadas por vía enzimática y química.

Ciclodextrina	Molécula acomplejada	Perfiles de CDB	Referencia
β CD	Timol Cinamaldehído	En el termograma del timol se observó un pico endotérmico a 50 °C el cual no se identificó en el termograma del complejo. De igual forma no se presentó un pico endotérmico en el termograma del complejo cinamaldehído- β CD.	Ponce <i>et al.</i> , 2010
β CD	Ácido clorogénico	El termograma del ácido clorogénico presentó un pico endotérmico a 191 °C, y el del cinamaldehído a -10 °C, los cuales no se observaron en los termogramas correspondientes a los complejos.	Zhao, Wang, Yang & Tao, 2010
β CD HP- β CD	α -Terpineol Ácido mirístico	El termograma del α -terpineol registró un pico endotérmico a 35 °C y el del ácido mirístico cercano a los 50 °C, los cuales ya no se observaron en los termogramas de los complejos.	Dos Santos, Buera & Mazzobre, 2012
HP- β CD	Rifampicina	El termograma de la rifampicina presentó un pico endotérmico a 259 °C el cual desapareció del termograma del complejo.	He <i>et al.</i> , 2013

HP- β CD: Hidroxipropil- β CD

Tabla 5. Análisis por termogravimetría de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas.

Ciclodextrina	Molécula acomplejada	Perfiles de TGA	Referencia
HP- β CD	β -lapacona	El complejo mostró diferencias del 5% en las pérdidas de peso con respecto a las moléculas sin acomplejar.	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2011
β CD Me- β CD	Sulfadiazina	El complejo mostró diferencias en las pérdidas de peso entre los 25 a 100 °C con respecto a las moléculas sin acomplejar	Delrivo, Zoppi & Longhi, 2012
β CD	Ácido gálico	El complejo mostró diferencias en los porcentajes de pérdidas de peso (13.8 y 10.6 %) a temperaturas más elevadas (100.6 y 254.7 °C) con respecto a las moléculas sin acomplejar.	da Rosa <i>et al.</i> , 2013

HP- β CD: Hidroxipropil- β CD; Me- β CD: Metil- β CD

Los perfiles de TGA de los complejos mostraron que sí se generó el acomplejamiento de las moléculas huésped proporcionándoles protección de los mismos, ambas afirmaciones son evidenciadas por las diferencias en las pérdidas de porcentaje de peso con respecto a las moléculas sin acomplejar.

Con lo que respecta a los cambios registrados en los termogramas de CDB correspondientes a los complejos se observó que el pico endotérmico, perteneciente al punto de fusión de los huéspedes puros, no se presentó al formarse los correspondientes complejos de inclusión.

Los resultados mostrados en la tabla 4 y 5, permitieron confirmar la formación del complejo huésped-CD, y establecer que tanto TGA como CDB son herramientas útiles para este tipo de estudio por la información generada.

1.2.5.1.3. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD DE FASES

La inclusión de moléculas huésped en CDs puede demostrarse mediante el análisis de diagramas de solubilidad de fases (Higuchi & Connors, 1965), que consiste en poner en contacto una solución de concentración alta de una molécula poco soluble en agua con una solución de CD preparada en un intervalo de concentraciones. A partir de dicho experimento se obtiene el diagrama de solubilidad de fases (Figura 8), el cual representa el incremento en la solubilidad de la molécula huésped en función de la concentración de CD agregada. Existen dos tipos de diagramas de solubilidad de fases en base al efecto que tiene la CD sobre la disolución del complejo formado: el tipo A y el B (Figura 8). El primero muestra la relación lineal que existe entre el aumento de la cantidad de molécula huésped solubilizada con respecto al aumento de la concentración de CD. El diagrama tipo A se subdivide en tres tipos dependiendo del orden de reacción de acomplejamiento: A_L (primer orden), A_P (segundo orden), y A_N si disminuye el acomplejamiento a causa del incremento en la concentración de CD. Por otro lado, el diagrama tipo B presenta un decrecimiento de la curva debido a que el complejo formado con la CD se torna insoluble, y se clasifica en dos tipos: B_I , el cual muestra que la formación del complejo es insoluble, generando una curva en forma de meseta; y B_S , en donde se observa un incremento parcial de la solubilidad (curva lineal) y posteriormente

una caída en la misma (curva tipo meseta).

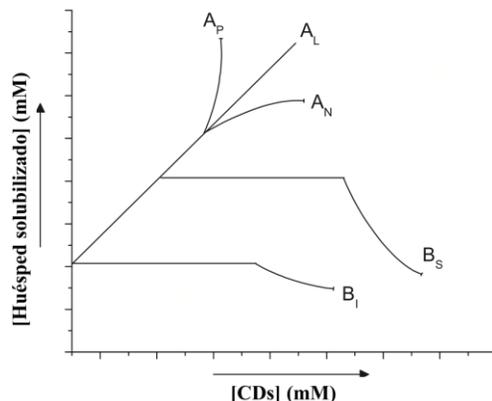


Figura 8. Tipología de los diagramas de solubilidad de fases. Aumento lineal de la solubilidad del huésped en función de la concentración de CD (A_L), aumento lineal con un orden de reacción 2 (A_P), aumento lineal con disminución del acomplejamiento (A_N), complejo insoluble (B_I) y complejo con solubilidad limitada (B_S) (Higuchi & Connors, 1965).

La constante de solubilidad del complejo K_s se obtiene a partir del ajuste de los datos experimentales utilizando la ecuación:

$$K_s = m/S_0(1-m) \quad \text{Ec. 6}$$

Donde S_0 es la solubilidad intrínseca de la molécula huésped en ausencia de CDs y m es la pendiente de la recta. A continuación se muestran algunos reportes de investigación (Tabla 6) en los cuales se evaluó el cambio en la solubilidad de moléculas poco solubles cuando fueron acomplejadas con CDs.

Tabla 6. Estudios de solubilidad de fases de algunos compuestos acomplejados con ciclodextrinas.

Ciclodextrina	Molécula acomplejada	Tipo de diagrama	K_s	Referencia
β CD		A_L	602	Jullian, Moyano, Yanez & Olea-Azar, 2007
HP- β CD	Quercetina	A_L	1419	
SBE- β CD		A_L	4032	
γ CD		A_L	ND	Mazzaferro <i>et al.</i> , 2011
HP- β CD	Docetaxel	A_L	ND	
SBE- β CD		A_P	ND	
Me- β CD		A_P	ND	

HP- β CD: Hidroxipropil- β CD; SBE- β CD: Sulfobutil éter- β CD; Me- β CD: Metil- β CD.

ND: No determinado.

En ambos estudios las moléculas acomplejadas tuvieron un aumento en su solubilidad por el acomplejamiento con las CDs. En el caso de la quercetina el aumento de la solubilidad fue directamente proporcional al aumento en la concentración de CD (diagrama tipo A_L), mostrando que el orden de afinidad para acomplejar a dicha molécula fue $SBE-\beta CD > HP-\beta CD > \beta CD$, en base a los valores obtenidos de la K_s . Los distintos tipos de CDs evaluadas en el acomplejamiento del docetaxel mostró que no se siguió un mismo comportamiento en el incremento de su solubilidad; el acomplejamiento con la $SBE-\beta CD$ y la $Me-\beta CD$ generó un diagrama de solubilidad de fases tipo A_P mientras que con la $HP-\beta CD$ y la βCD los diagramas fueron tipo A_L , lo cual evidencio que el acomplejamiento no sigue un patrón común. En dicho estudio no reportaron el valor de la K_s .

1.2.5.2. ANÁLISIS TERMODINÁMICO DEL PROCESO EN LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS

1.2.5.2.1. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA

La técnica de calorimetría de titulación isotérmica (CTI) se basa en la medición del calor liberado o absorbido generado por la interacción entre dos moléculas. A partir de dicha medición de calor se obtienen las constantes de acomplejamiento o de estabilidad (K_a) y los parámetros termodinámicos que caracterizan el fenómeno de reconocimiento molecular que ocurre entre dos moléculas (huésped-anfitrión). La técnica de CTI es muy sensible de tal manera que permite caracterizar complejos que presenten constantes de acomplejamiento bajas (menores a $10 M^{-1}$) y altas (superiores a $10^7 M^{-1}$). La caracterización de la energética de unión se puede realizar en un solo experimento de titulación, en la que se obtiene simultáneamente la K_a y la entalpía de unión (ΔH_a), además a partir de dichos parámetros se puede calcular la energía de Gibbs (ΔG_a) y la entropía de unión (ΔS_a) (Jelesarov & Bosshard, 1999; Bouchemal & Mazzaferro, 2012).

En contraste, para la estimación de la K_a , ΔH_a , ΔG_a , y ΔS_a utilizando técnicas no calorimétricas se requiere de varios experimentos evaluando el acomplejamiento a diferentes temperaturas, y de un posterior análisis de la dependencia de la K_a con respecto a la temperatura. Por lo anterior, la técnica de CTI es única porque proporciona una determinación directa de los parámetros termodinámicos (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros termodinámicos obtenidos por CTI del proceso de acomplejamiento entre algunos compuestos con las ciclodextrinas naturales.

Ciclodextrina	Molécula acomplejada	Parámetros termodinámicos			Referencia
		ΔH_a (kJ·mol ⁻¹)	ΔS_a (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG_a (kJ·mol ⁻¹)	
β CD	Catequina	-35.1	-12.6	-22.5	Kríz, Koca, Imberty, Charlot & Auzély-Velty, 2003
β CD	Valsartan	-24.90	-0.041	-12.45	de Matos Jensen <i>et al.</i> , 2010
β CD	Ácido clorogénico	-12.9	7.45	-14.93	Álvarez-Parrilla <i>et al.</i> , 2010
α CD	Resveratrol	-27.18	-10.38	-16.80	
β CD	Resveratrol	-26.16	-9.16	-17.00	Li, Xu, Liu, Sun & Li, 2010
γ CD	Resveratrol	-1.50	25.19	-26.69	

Como se pudo observar, la CD más utilizada en los reportes ha sido la β CD. La formación del complejo se llevó a cabo con la liberación de energía (ΔH_a negativo), fueron procesos espontáneos (ΔG_a negativo) y en su mayoría fueron entálpicamente dirigidos a excepción del acomplejamiento del resveratrol con la γ CD, que mostró estar entrópicamente dirigido.

1.2.5.2.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La técnica de espectroscopía de fluorescencia se puede utilizar primeramente para comprobar la formación de complejos, en base a los cambios en la polaridad del ambiente que rodea al fluoróforo presente en el receptor o en la molécula huésped, cuando se forma el complejo. Este cambio en la polaridad produce un corrimiento en la longitud de onda de emisión, que se determina comparando los espectros de emisión de las moléculas libres y acomplejadas a través de los valores de sus centros de masa espectral (CME). De igual modo, el aumento o disminución en la intensidades de fluorescencia (IF) observados durante las titulaciones fluorométricas proporciona información sobre la

formación del complejo entre las moléculas analizadas (Lakowicz & Masters, 2008).

La IF emitida por un fluoróforo depende de la polaridad del medio en que se encuentra inmerso, siendo mayor cuando ésta disminuye por el efecto de relajación del disolvente, lo que implica un corrimiento adicional al desplazamiento de Stokes del fluoróforo. En el caso específico del acomplejamiento con CDs en solución acuosa, la inclusión de una molécula fluorescente en su cavidad hidrófoba provoca un aumento en la IF (Wagner & Fitzpatrick, 2000; Lakowicz & Masters, 2008).

Si los cambios en la intensidad de fluorescencia se miden en función de la concentración de CD, se puede determinar la K_a a partir del ajuste de los datos experimentales empleando un modelo matemático, tratando en la medida de lo posible que la mayoría de las moléculas huésped estén acomplejadas con las CDs (saturación), con lo que la variación en la señal de IF puede ser considerada como constante, lo cual permitirá tener un buen ajuste y que la K_a represente adecuadamente el acomplejamiento entre las moléculas estudiadas (Lakowicz & Masters, 2008).

La información de la tabla 8 muestra que para el acomplejamiento de moléculas se ha utilizado a la β CD principalmente, también se han usado CDs modificadas y en menor medida la α CD. Por otra parte, se pudo corroborar mediante los valores negativos de la ΔG_a , que el acomplejamiento fue un proceso espontáneo. Además, a partir de los datos de la K_a se observó que las CDs modificadas químicamente tuvieron una mayor afinidad por los compuestos con respecto a las sintetizadas enzimáticamente, esto debido posiblemente a la formación de un mayor número de enlaces no covalentes.

Así mismo, el efecto de las interacciones en el acomplejamiento del (E)-3-(4-metilaminofenil) se pudo asociar a las micropolaridades generadas por el contacto entre la molécula y la cavidad de la α CD promoviendo un mejor ajuste que con la β CD.

Tabla 8. Análisis por espectroscopía de fluorescencia de la formación de complejos entre algunos compuestos con ciclodextrinas sintetizadas por vía enzimática y química.

Ciclodextrina	Molécula a complejada	Parámetros termodinámicos		Referencia
		K_a (M ⁻¹)	ΔG_a (kJ·mol ⁻¹)	
βCD	Catequina	3000	-20.16	Folch-Cano <i>et al.</i> , 2010
	Galato de epigallocatequina	7470	-22.46	
	Galocatequina galato	15500	-24.30	
βCD	Serotonina	126.06	-12	Chaudhuri, Chakraborty & Sengupta, 2010
SHP-βCD		461.62	-15.2	
αCD	Ácido rosmarínico	82	-10.92	Celik <i>et al.</i> , 2011
βCD		164	-12.64	
HE-βCD		168	-12.70	
HP-βCD		267	-13.84	
Me-βCD		328	-14.35	
αCD	(E)-3-(4-Metilaminofenil)	3400	-26.16	Ghosh, Jana, & Guchhait, 2011
βCD		530	-20.189	
αCD	Vainillilamina	235	-13.73	Sivasankar, Antony Muthu Prabhu, Karthick & Rajendiran, 2012
βCD		365	-14.86	
HP-αCD		297	-14.34	
HP-βCD		440	-15.33	

SHP-βCD: Succinil-(2-hidroxiopropil)-βCD; HE-βCD: Hidroxietil-βCD; HP-βCD: Hidroxiopropil-βCD; Me-βCD: Metil-βCD.

1.2.5.3. EFECTO DEL ESTADO DE PROTONACIÓN EN EL ACOMPLEJAMIENTO CON CICLODEXTRINAS

1.2.5.3.1. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL (*DOCKING*)

La herramienta computacional denominada *docking* es ampliamente utilizada en áreas como la bioinformática, la química y la farmacéutica, porque puede simular la unión entre un receptor y un ligando. Uno de los programas que se utilizan para realizar el análisis por *docking* es MOE (Molecular Operating Environment), por medio del cual se identifican, utilizando algoritmos matemáticos, las posibles orientaciones estructurales de cómo la molécula huésped se une en algunos sitios de una macromolécula particular.

Para determinar la posible colocación del huésped en la molécula anfitrión se utilizan distintos algoritmos matemáticos de colocación, afinidades y campos de fuerza; para el primero se puede utilizar el método tipo triángulo alfa, el cual asigna un contorno

esférico a la molécula huésped y posteriormente se generan las superposiciones del mismo. Respecto a las afinidades existen distintas funciones tales como la Affinity DG y London DG, la primera se usa para estimar la contribución entálpica a la energía libre de Gibbs usando una función lineal que considera las interacciones hidrofóbicas, iónicas, puentes de hidrógeno y las condiciones de ligación de metal, la segunda permite calcular la energía libre de Gibbs del huésped en base a la libertad de movimiento de sus enlaces, los puentes de hidrógeno formados y la desolvatación. Finalmente, los campos de fuerza que se pueden utilizar son MMFF94x y AMBER99, el primer campo de fuerza se emplea regularmente en simulaciones con moléculas orgánicas pequeñas, el segundo se usa en el estudio de simulación con biomoléculas. Al término de la simulación se obtienen los valores de ΔG_a del acomplejamiento, considerando que entre menor sea éste indicará una mayor afinidad, también se generan las posibles estructuras en 3D de los mismos (Halperin, Ma, Wolfson & Nussinov, 2002).

Estudios previos del acomplejamiento del trolox y el resveratrol con la HP- β CD emplearon el programa MOE para hacer un análisis computacional de *docking*. Los resultados mostraron que los valores de ΔG_a fueron -14.98 y -19.52 kcal/mol para trolox y el resveratrol, respectivamente, sugiriendo una mayor afinidad de HP- β CD por el resveratrol (Sapino^a *et al.*, 2008; Sapino^b, Carlotti, Caron, Ugazio & Cavalli, 2008).

II. ESTADO DEL ARTE

En este apartado se presentan las técnicas empleadas hasta el momento para el análisis de la obtención de los complejos del AF con las CDs naturales y obtenidas por síntesis química, para el estudio de la energética de su proceso de acomplejamiento así como su elucidación estructural (Tabla 9).

Tabla 9. Técnicas utilizadas para el estudio de las propiedades termodinámicas y estructurales de los complejos formados entre el ácido ferúlico con las CDs naturales y sintetizadas químicamente.

Ciclodextrina	Técnica utilizada	Propiedad determinada	Referencia
α CD, β CD, γ CD, la mono [6 (2-amino aminoetile-)-6-desoxi]- β -ciclodextrina y la mono [6 (5-amino-3-azapentilamino)-6-desoxi]- β -ciclodextrina	Fluorescencia	K_a	Qi, Li & Liu, 2003
γ CD	CTI y titulaciones potenciométricas	ΔH_a y K_a	Casolaro, Anselmi & Picciocchi, 2005
γ CD	Calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y RMN	Estructura	Anselmi <i>et al.</i> , 2004
α CD	RMN	Estructura	Anselmi <i>et al.</i> , 2008
β CD Hidroxipropil- β CD	UV-vis, Fluorescencia y RMN	K_a y estructura	Zhang <i>et al.</i> , 2009
α CD	HPLC	K_a	Monti <i>et al.</i> , 2011
Hidroxipropil- β CD	UV-vis, IR y CDB	K_a y estructura	Wang, Zhong, Xue & Fu, 2011
α CD, β CD y γ CD	Cromatografía electrónica capilar	K_a	Zhang, Cheung, Shanguan & Zheng, 2012

Como se puede apreciar, las técnicas utilizadas solamente han permitido determinar la K_a , a partir de la cual se ha llegado a calcular ΔG_a empleando una ecuación matemática. También se observa el marcado interés por la elucidación estructural de los complejos AF-CD estudiados. A continuación se presenta el análisis de los trabajos referidos en la tabla 9.

2.1. FORMACIÓN DEL COMPLEJO ÁCIDO FERÚLICO-CICLODEXTRINA Y SU ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Para el estudio de la capacidad de unión del AF con la γ CD Anselmi *et al.* (2004) obtuvieron el complejo AF- γ CD sólido y fue caracterizado utilizando las técnicas de calorimetría de barrido diferencial (CDB), difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN ^1H) y modelado molecular. Los autores obtuvieron el complejo AF- γ CD mezclando en una relación 1:1 ambas moléculas (0.038 mol) en 500 mL de agua, con agitación constante durante una hora, a temperatura ambiente y en completa oscuridad; bajo estas condiciones obtuvieron el complejo precipitado. El análisis comparativo de los perfiles térmicos del complejo mostró la desaparición del pico de fusión del AF libre (175.2 °C) y el ensanchamiento de bandas características de la γ CD (269.7-269.7 y 93.7-85.7 °C) comparado con la molécula pura (288.3 °C). Por otro lado, el análisis mediante rayos X sugirió la formación del complejo a partir de las diferencias en el espacio interplanar, tanto de los picos relativos así como los ángulos de difracción. Los análisis por RMN ^1H mostraron que la porción del anillo de benceno y del etileno del AF quedaron dentro de la cavidad de la γ CD, además que sus grupos -COOH, el hidroxilo del fenol y el metoxilo se encontraron cercanos a la abertura más ancha de la molécula de la CD, y orientados hacia el exterior de esta, lo cual fue apoyado con sus resultados del modelado molecular, los cuales les permitió concluir que el AF sí fue acomplejado con la γ CD.

Anselmi *et al.* (2008), también caracterizaron el acomplejamiento del AF con la α CD, a dos relaciones molares (1:1 y 2:1) por el método de co-precipitación, mezclando una solución de metanol de AF con las CDs disueltas en agua, con agitación constante en completa oscuridad por 24 h, a temperatura ambiente. La formación del complejo fue corroborada con CDB y difractometría de rayos X. Utilizaron las técnicas de RMN ^1H y modelado molecular para la elucidación estructural del complejo. La inclusión del AF en la cavidad de la CD comprendió básicamente al grupo -COOH, a los grupos α , β -insaturados y parte de su fracción aromática. El grupo fenol y metoxilo de la molécula del AF se encontraron ubicados en el plano del borde más amplio de la cavidad de la α CD.

Para el análisis comparativo de la formación del complejo entre el AF y la β CD modificada (HP- β CD) y sin modificar Zhang *et al.* (2009) obtuvieron los diagramas de

solubilidad de fases (Higuichi & Connors, 1965), así como los espectros de absorbancia en la región del UV, además de la estructura de los complejos por RMN ^1H y un modelado molecular. Para la técnica de UV-vis se usaron soluciones 1×10^{-3} M de AF disuelto en agua, y 1×10^{-2} M de cada una de las CDs disueltas en amortiguador de fosfatos, no especificaron la concentración del amortiguador ni del pH. A partir del diagrama de solubilidad de fases determinaron que la solubilidad del AF aumentó al doble cuando se acomplejo con la HP- β CD comparado con el complejo AF- β CD, pero no dieron el valor de K_s . Los resultados que obtuvieron con los espectros de absorción en el UV mostraron una disminución de la señal con respecto al aumento de la concentración de β CD y HP- β CD, con este último complejo además observaron un corrimiento de la longitud de onda de 290 a 315 nm, lo que les dió indicio de que el AF fue acomplejado por esta CD. Finalmente, a partir del análisis de los datos de RMN y el modelado molecular concluyeron que en ambas CDs el anillo aromático y la cadena lateral del etileno del AF fueron incorporados en la cavidad de las CDs, dejando a los grupos más polares hacia fuera de la cavidad.

En un trabajo reportado (Monti *et al.*, 2011) utilizaron el complejo AF- α CD para la preparación de diferentes formulaciones cosméticas, porque se obtiene un complejo más estable con esta CD de acuerdo a lo reportado por Anselmi *et al.*, (2008). El complejo utilizado por Monti *et al.* (2011), fue obtenido por el método de coprecipitación, utilizando una relación molar 1:1; el AF fue disuelto en metanol y la α CD en agua, ambas soluciones fueron mezcladas durante 24 h en la oscuridad y a temperatura ambiente. Para la caracterización del complejo se utilizaron las técnicas de rayos X y RMN. En este trabajo mostraron que la molécula del AF no fue afectada por el pH de los diferentes tipos de formulaciones cosméticas estudiadas, lo cual fue atribuido a la forma como se incluye el AF en la cavidad de la α CD.

A pesar de que el complejo AF-HP- β CD, fue previamente caracterizado (Zhang *et al.*, 2009), Wang *et al.* (2011), obtuvieron dicho complejo a una relación molar 1:1, mezclando 0.06 M de AF y de CD, en 50 mL de agua. Posteriormente, la mezcla fue filtrada para remover el exceso de AF y la solución resultante fue liofilizada a -80°C , con el objetivo de minimizar la degradación del AF. El análisis de la formación del complejo se realizó con las espectroscopías de UV-vis (200 a los 400 nm), de infrarrojo de

Transformada de Fourier (IR-TF), CDB, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido; además determinaron la solubilidad de fases (Higuchi & Connors, 1965). Cada técnica fue realizada usando el complejo AF-HP- β CD así como cada una de las moléculas por separado y mezcladas (mezcla física). A partir de los resultados que obtuvieron mostraron que con el método empleado para obtener al complejo lograron tener un rendimiento del $60.16 \pm 0.23\%$ de recuperación. Del análisis comparativo de los espectros de UV para el AF libre, acomplexado con la HP- β CD y en la mezcla, obtuvieron tres espectros parecidos los cuales mostraron longitudes de onda máxima a los 217, 286 y 310 nm; la mayor señal fue para el AF libre, seguido del contenido en la mezcla y finalmente el AF acomplexado con la CD, este último mostro un corrimiento a 291 y 313 nm, posiblemente debido a un ligero desplazamiento de los electrones del cromóforo cuando se incluyó en la cavidad de la CD. A partir de los resultados del resto de las espectroscopías utilizadas también pudieron constatar el acomplexamiento del AF con la HP- β CD, tomando como base las diferencias que mostraron los espectros correspondientes entre el AF libre, en la mezcla y el acomplexado. Por último, la constante de estabilidad calculada para el complejo AF-HP- β CD fue 166.3 M^{-1} , lo que indicó una fuerte asociación entre ambas moléculas, además de un incremento de la solubilidad de 15 veces con respecto a la del AF libre.

2.2. ANÁLISIS DE LA ENERGÉTICA DEL PROCESO DE ACOMPLEJAMIENTO DEL ÁCIDO FERÚLICO CON LAS CICLODEXTRINAS

El primer reporte en este tema (Qi, Li & Liu, 2003), tuvo como objetivo analizar el acomplexamiento con las α CD, β CD y γ CD además de dos derivadas de la β CD, con cuatro moléculas importantes dentro de la medicina tradicional china, entre las cuales se encontró al AF. Para obtener los valores de K_a , referida por los autores como constante de estabilidad (K_s), utilizaron la técnica de titulación fluorométrica del AF con las CDs a 25 °C, y a partir de dichos datos calcularon ΔG_a . El AF fue disuelto en metanol a una concentración de 0.002 M, y de esta solución se hizo una dilución 1:200 en amortiguador de fosfatos pH 7.2, para tener una concentración final de 0.01 mM. Las CDs fueron disueltas en el mismo amortiguador y las concentraciones alcanzadas en la celda de

reacción fueron de 0 a 2.0 mM. Además, supusieron una estequiometria 1:1 del acomplejamiento del AF con las CDs. Para obtener el valor de K_s utilizaron una ecuación no lineal para ajustar los datos experimentales de la curva de titulación. Los resultados mostraron que el acomplejamiento del AF con las tres CDs naturales generó un aumento en la intensidad de fluorescencia el cual fue proporcional al incremento en la concentración de las CDs en la celda de reacción, efecto contrario a lo observado con las dos CDs modificadas, lo cual pudo deberse al cambio del microambiente de la cavidad de estas últimas siendo más hidrófobo, ya que se ha reportado que la intensidad de fluorescencia aumenta cuando el fluoróforo pasa de la solución acuosa polar a la cavidad hidrófoba de la CD. Por otro lado, en todos los casos el valor de ΔG_a fue negativo, y los valores de K_s con las CDs naturales fueron en el siguiente orden $\beta\text{CD} > \alpha\text{CD} > \gamma\text{CD}$. La posible explicación que dieron a esto fue que por el tamaño pequeño de la molécula del AF solo pudo incluirse parcialmente en la cavidad de la γCD lo cual condujo a una interacción débil en comparación con las que se generaron con las otras dos CDs.

La técnica de calorimetría de titulación fue utilizada para determinar la energética de la protonación del AF libre y acomplejado con la γCD (Casolaro, Anselmi & Picciocchi, 2005). En este reporte las constantes de basicidad del AF y del complejo AF- γCD fueron obtenidas mediante potenciometría. El complejo usado fue un compuesto comercial denominado FerudexTM, proporcionado por la empresa japonesa Tsuno Rice Chemical Co. Ltd. Los valores de las constantes de basicidad determinadas para el AF fueron $\log K_1 = 8.94 \pm 1$ y $\log K_2 = 4.48 \pm 1$, y para el complejo AF- γCD fueron $\log K_1 = 8.69 \pm 1$ y $\log K_2 = 4.47 \pm 1$. La protonación del grupo hidroxilo del AF fue asociada al valor de $\log K_1$, siendo el más básico, mientras que $\log K_2$ se relacionó con la del anión carboxilato. El ΔH de protonación fue obtenido mediante la técnica de CTI a 25 °C, la ΔG fue calculada utilizando los valores de las constantes de basicidad, y ΔS fue determinada mediante la ecuación:

$$\Delta S = \left(\frac{\Delta H - \Delta G}{T} \right) \quad \text{Ec. 7}$$

Los resultados revelaron para el grupo carboxilo del AF del FerudexTM una mayor entalpía de protonación (5.4 veces) y una menor entropía (3.2 veces) con respecto al AF

libre. Según los autores, lo anterior pudo deberse a una mayor protección de la carga negativa conferida por la γ CD al grupo metoxilo de la molécula del AF.

Anselmi *et al.* (2008), determinaron el valor de la K_a del AF acomplejado con la α CD mediante experimentos de espectroscopía de efecto Overhauser nuclear de marco rotatorio (ROESY). El complejo sólido fue obtenido por el método de co-precipitación, mezclando una solución de metanol de AF con la α CD disuelta en agua (1:1), con agitación constante y en completa oscuridad por 24 h, a temperatura ambiente. Con sus resultados corroboraron que la estequiometría del acomplejamiento se llevó a cabo en una proporción 1:1, y el valor de K_a fue $1162 \pm 410 \text{ M}^{-1}$.

El efecto del estado de protonación del AF sobre el valor de la K_a , al acomplejarse con la β CD modificada (HP- β CD) y sin modificar fue evaluado por Zhang *et al.*, (2009). Para esto utilizaron la técnica de fluorescencia empleando soluciones $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de AF disuelto en agua, y $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ de cada una de las CDs disueltas en amortiguador de fosfatos, no especificaron la concentración del amortiguador ni del pH. Los valores de K_a fueron generados ajustando los inversos de los datos experimentales con un modelo matemático lineal. En la evaluación del efecto de protonación del AF en la K_a por la técnica de fluorescencia, se usaron soluciones de AF a pH de 3.05, 7.5 y 10.53, en este caso no mencionaron los amortiguadores utilizados ni la concentración de los mismos. Cabe señalar, que no se describió la temperatura a la cual se realizaron los experimentos. Los espectros mostraron un aumento en la señal de la intensidad de fluorescencia con el incremento de la concentración de las CDs, lo que fue atribuido a una mayor protección del AF del apagamiento de fluorescencia y de otros procesos que ocurren en el disolvente. Respecto a los valores de K_a , fue mayor para la HP- β CD (98 M^{-1}) que para la β CD (87 M^{-1}) probablemente por un incremento en el tamaño e hidrofobicidad de la cavidad de la CD modificada. En cuanto al efecto del estado de ionización del AF en la K_a , el orden en la afinidad de acomplejamiento con HP- β CD fue $\text{AF}^{1-} > \text{AF}^0 > \text{AF}^{2-}$, con respecto al complejo AF- β CD no determinaron el valor de la K_a al pH de 10.53. Concluyeron que sí existe una interacción selectiva de las CDs con los diferentes estados de protonación del AF. Empleando la técnica de cromatografía electrocinética capilar se estudió el efecto que tienen las CDs naturales así como la concentración de cada una de ellas, en la separación de los componentes de una mezcla metanólica de polifenoles a una concentración de 100

$\mu\text{g mL}^{-1}$, entre los que se encontró el AF (Zhang *et al.*, 2012). Las CDs fueron disueltas en tetraborato de sodio 20 mM, pH 9.4, a las concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mM. El estudio se realizó a cuatro temperaturas diferentes: 15, 20, 25 y 30 °C. Los datos del cambio de movilidad electroforética con respecto al incremento de la concentración de la CD, permitieron calcular las constantes de acomplejamiento para cada polifenol, empleando tanto una ecuación lineal como una no lineal. También se determinaron los parámetros termodinámicos ΔG_a ; ΔH_a (utilizando la ecuación de van't Hoff), así como ΔS_a . Los electrocromatogramas obtenidos mostraron que sin la presencia de CD la migración de los compuestos se basa únicamente en su relación carga/masa, además que tanto el tipo de CDs como su concentración, influyeron en la separación de los componentes de la mezcla de los polifenoles, teniéndose los mejores resultados con la β CD a las concentraciones de 2 y 3 mM. Los valores de K_a obtenidos con la regresión lineal para el AF fueron $61 \pm 18 \text{ M}^{-1}$ (α CD) y $81 \pm 25 \text{ M}^{-1}$ (β CD); y con la regresión no lineal $36 \pm 9 \text{ M}^{-1}$ (α CD) y $36 \pm 9 \text{ M}^{-1}$ (β CD). No se logró formar el complejo AF- γ CD debido al mayor tamaño de la cavidad de esta con respecto a las otras dos CDs, según los autores. La K_a a diferentes temperaturas se determinó únicamente con la β CD porque es con la que se obtuvieron los mayores valores de afinidad, y en el caso del AF los valores fueron $121 \pm 18 \text{ M}^{-1}$ (15 °C), $66 \pm 23 \text{ M}^{-1}$ (20 °C), $81 \pm 25 \text{ M}^{-1}$ (25 °C) y $127 \pm 33 \text{ M}^{-1}$ (30 °C). Los parámetros termodinámicos (ΔG_a , ΔH_a y ΔS_a) únicamente fueron calculados a 25 °C; y en el caso del AF solamente se reportó el valor de ΔG_a ($-10.9 \text{ kJ mol}^{-1}$), pero no el de los otros parámetros, posiblemente por que la K_a no mostró una tendencia inversamente proporcional al incremento de la temperatura, lo cual si fue observado con otros polifenoles.

III. JUSTIFICACIÓN

La importancia del AF en la industria de alimentos es como precursor para la síntesis de vainillina y como antioxidante natural en la formulación de alimentos funcionales. Sin embargo, su uso está limitado por su baja solubilidad en disolventes acuosos e inestabilidad de la molécula (sensibilidad a la luz y al calor), así como por su sabor astringente y amargo. El acomplejamiento de la molécula del AF con las α CD, β CD y γ CD es una alternativa para mejorar los inconvenientes mencionados.

Debido a que la inclusión de los compuestos en la cavidad de las CDs no sigue un patrón común, es necesario analizar los factores que juegan un papel importante en la geometría de inclusión tales como el tamaño de la cavidad de la CD, la formación de enlaces no covalentes y el reordenamiento de las moléculas del disolvente que originalmente rodean tanto a las CDs como al AF, y en base a esto determinar cuál o cuáles CDs son las más recomendadas para acomplejar al AF.

Respecto a la energética del acomplejamiento del AF con CD, a la fecha existen valores de ΔG_a calculados a partir de datos de K_a , pero no hay reportes de las contribuciones entálpicas y entrópicas a este parámetro termodinámico, lo que no ha permitido establecer las posibles fuerzas moleculares que se generan por el proceso de inclusión del AF en la cavidad de la α CD, β CD y γ CD.

A diferencia de otras técnicas la de CTI permite determinar en un solo experimento y de manera directa los valores de ΔH_a , K_a , y la estequiometría del acomplejamiento (n), a partir de los cuales, y mediante ecuaciones matemáticas, se pueden obtener los valores de ΔG_a y ΔS_a . Cabe señalar, que hasta el momento no se ha utilizado CTI para obtener los parámetros termodinámicos del acomplejamiento AF-CD por lo que en el presente trabajo de investigación se utilizó para el análisis comparativo de la energética del proceso de acomplejamiento del AF con la α CD, β CD y γ CD.

Por otro lado, se sabe que el estado de protonación del AF es importante en el proceso de acomplejamiento con las CDs, motivo por el cual se estudió este efecto con la α CD, β CD y γ CD, empleando la técnica de espectroscopía de fluorescencia y realizando un análisis computacional de *docking*.

Por último, es importante señalar, que las moléculas de AF y las tres CDs fueron

disueltas empleando un mismo disolvente, a diferencia de otros trabajos en los cuales solubilizaron al AF primeramente en metanol y después realizaron una dilución en agua o en amortiguador de fosfatos, la cual fue utilizada en sus trabajos de investigación. Para comprobar que bajo estas condiciones de disolvente el AF puede formar complejos con la α CD, β CD y γ CD se utilizaron en el estudio comparativo las técnicas de CDB, IR, TGA y diagramas de solubilidad de fases. Las tres últimas técnicas no se han utilizado para el análisis del complejo AF-CD.

IV. HIPÓTESIS

1. El uso de un mismo disolvente para preparar soluciones homogéneas de concentración igual o mayor a 1 mM, tanto del AF como de las CDs naturales, permitirá minimizar los calores de dilución y por lo tanto utilizar de manera confiable la técnica de CTI.

2. Bajo las condiciones experimentales establecidas todas las CDs naturales acomplejarán al AF con diferentes afinidades, porque el proceso de inclusión estará limitado por el tamaño de su cavidad, y el acomplejamiento será favorecido entrópicamente por la salida de moléculas de disolvente de dicha cavidad hidrofóbica hacia el agua de bulto.

3. El estado de protonación del AF, y por lo tanto la carga eléctrica que tenga, influirá en el tipo de interacciones anfitrión-huésped que se establezcan y consecuentemente en la estabilidad del complejo.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener complejos de ácido ferúlico con la α CD, β CD, y γ CD, y analizar la termodinámica del proceso de acomplejamiento.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones para disolver a homogeneidad al AF y a las α CD, β CD, y γ CD, empleando un mismo disolvente.
2. Confirmar la formación de los complejos AF-CD, a partir del análisis de los espectros de IR, termogramas de CDB y TGA, así como de diagramas de solubilidad de fases.
3. Hacer el análisis comparativo de la energética del proceso de acomplejamiento del AF con la α CD, β CD, y γ CD, empleando la técnica de CTI para obtener los parámetros termodinámicos correspondientes.
4. Realizar un análisis comparativo de los valores de la K_a y ΔG_a del proceso de inclusión del AF en las α CD, β CD, y γ CD, obtenidos por las técnicas de CTI y titulación fluorométrica.
5. Estudiar el efecto del estado de protonación del AF en el proceso de acomplejamiento con la α CD, β CD, y γ CD, empleando la técnica de titulación fluorométrica y a partir de una simulación computacional (*docking*).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se llevó a cabo para analizar la formación de los complejos AF-CD así como de la energética del proceso del acomplejamiento, se esquematiza en la figura 9.

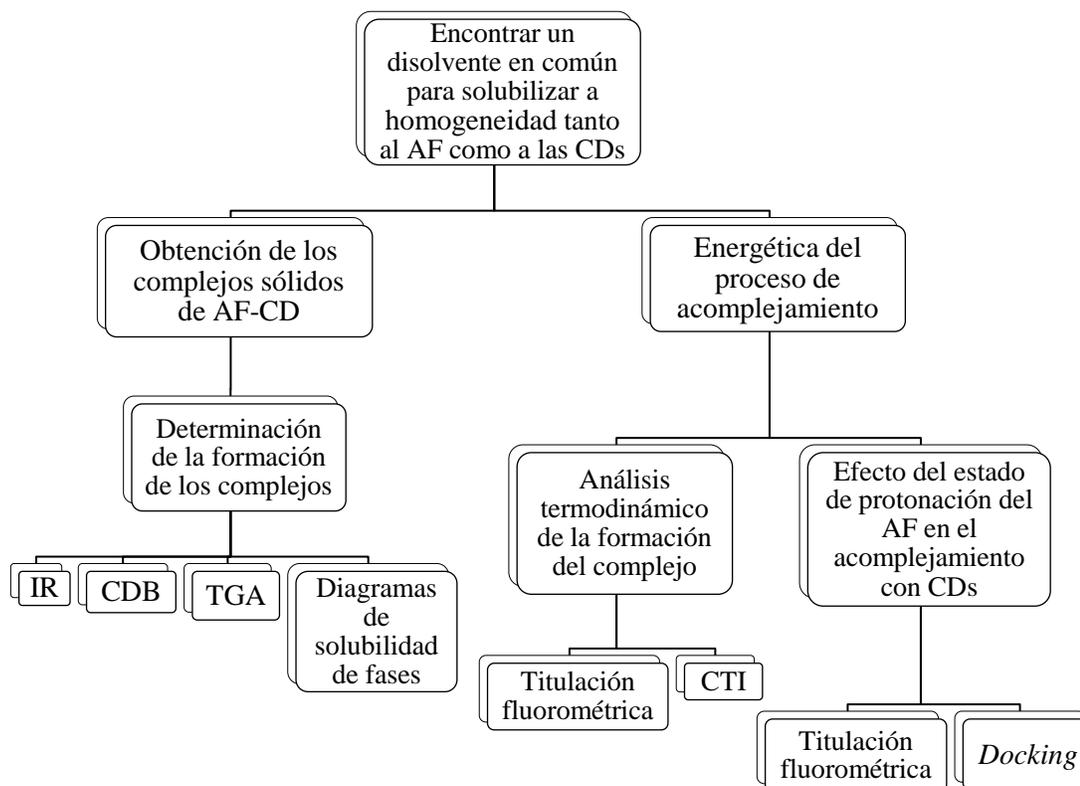


Figura 9. Metodología realizada para el análisis de la formación de los complejos AF-CD así como de la energética del proceso de su acomplejamiento.

Materiales

La α CD, β CD y γ CD grado alimenticio fueron donadas por la empresa WACKER Mexicana S.A de C.V. Los solventes metanol y etanol fueron grado reactivo JTBaker, el AF con un grado de pureza del 99% fue adquirido con Sigma Aldrich. Todas las sales de los diferentes reactivos utilizados fueron de la marca JTBaker.

6.1. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE ÁCIDO FERÚLICO Y DE LAS CICLODEXTRINAS, EMPLEANDO UN MISMO DISOLVENTE

Como se mencionó anteriormente el disolvente recomendado para solubilizar a

homogeneidad al AF es el metanol y para las CDs es el agua, estos disolventes reaccionan exotérmicamente al mezclarse y el calor es perceptible al tacto. Por lo anterior, la primera actividad del presente trabajo fue establecer un mismo disolvente para preparar las disoluciones de AF y de cada una de las CD, debido a que el uso de la técnica de CTI requiere que las soluciones de las moléculas analizadas sean homogéneas, de concentraciones en el orden milimolar y que la mezcla de los disolventes en los cuales se encuentran los compuestos no genere efectos de calor que puedan ser detectados por el calorímetro o que no sean mayores a los registrados por el proceso de acomplejamiento. Los disolventes evaluados fueron los siguientes:

Alcoholes. Se utilizó metanol (50 y 100%) para disolver a las CDs, mientras que el etanol (60, 70 y 100%) se uso para solubilizar al AF y a las CDs naturales, considerando que está permitido en las formulaciones para alimentos. Los distintos porcentajes de los solventes se establecieron con la finalidad de poder determinar su concentración mínima requerida en la preparación de las soluciones mencionadas.

Hidróxido de sodio. De acuerdo a lo reportado para la solubilización de moléculas con estructura química similar a la del AF, donde se recomienda el uso de disoluciones de hidróxido de sodio al 10% (McMurry, 2001), se utilizaron soluciones de NaOH al 0.5% (pH 9.1) y 10% (pH 12.0), como disolventes de las moléculas estudiadas. El potenciómetro utilizado fue de la marca HANNA modelo pH 211.

Solución de fosfatos. Se ha reportado que es el disolvente que se recomienda usar en la técnica de CTI (Bouchemal & Mazzaferro, 2012), por lo que se evaluó esta solución a una concentración de 50 mM a pH de 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 y 12.0, con la finalidad de determinar cual podría disolver a homogeneidad al AF.

Todos los disolventes fueron filtrados pasándolos a través de un acrodisco de 13 mm con membrana de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm , previo a la incorporación del AF y las CDs.

Las concentraciones de la solución de AF (3.5 mM) así como de las diferentes CDs naturales (130, 16.5 y 197.3 mM, para αCD , βCD y γCD , respectivamente), se establecieron en base a las concentraciones máximas requeridas en las diferentes técnicas utilizadas en el presente trabajo.

Las muestras fueron disueltas a homogeneidad con agitación constante empleando

un vortex marca IKA modelo Genius 3, a temperatura ambiente por treinta minutos. Seguido, se midió nuevamente el pH para constatar que no varió. La concentración de la solución de AF fue verificada por un método espectrofotométrico, midiendo la absorbancia a 307 nm y usando el coeficiente de absortividad $\epsilon = \log 4.18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Graf, 1992), se empleó un espectrofotómetro HACH modelo DR500. El uso de este coeficiente previamente fue corroborado midiendo la $A_{307\text{nm}}$ de varias soluciones de AF de concentración conocida gravimétricamente, y empleando la ecuación de Lambert-Beer.

6.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS SÓLIDOS DE ÁCIDO FERÚLICO-CICLODEXTRINA

En un frasco ámbar se mezclaron en una relación molar 1:1, 3.5 mmol de AF y de la CD en turno, se disolvieron con 50 mL de una solución de fosfatos (50 mM a pH 9.0), la mezcla se mantuvo con agitación constante por 24 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó por calentamiento en una estufa (Felisa modelo FE-292AD) a 45 °C por 6 horas y de esta manera se pudo recuperar al complejo en estado sólido. Después el complejo se colocó en una membrana de nylon de 10 cm, con tamaño de poro de 0.45 μm , y fue lavado dos veces con 3 mL de una solución de fosfatos pH 9.0 con la finalidad de remover al AF y las CDs que no se acomplejaron. El sólido seco se guardó en un desecador hasta que fue analizado por las técnicas de IR, TGA y CDB.

6.3. DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE ÁCIDO FERÚLICO-CICLODEXTRINA

6.3.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Se obtuvieron los espectros de IR de las moléculas sin acomplejar del AF así como de la αCD , βCD y γCD , también de una mezcla física (AF+CD) y de los respectivos complejos (AF- αCD , AF- βCD y AF- γCD). Se realizaron las mediciones por separado empleando 30 mg de cada una de las muestras analizadas. Para la preparación de la mezcla física 1:1 se combinaron 15 mg de AF y de la CD en turno, y posteriormente se generaron los espectros de IR. Las determinaciones se hicieron en un

espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker, en el cual se midieron las señales de transmitancia en un intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} , el espectro final fue el resultado de un promedio de 24 barridos.

6.3.2. TERMOGRAVIMETRÍA Y CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Empleando un equipo NETZSCH STA 409 PC/PG, se obtuvieron de manera simultánea los termogramas de CDB y TGA a partir de la medición del flujo de calor y de la pérdida de peso en el intervalo de temperatura de 0 a 300 °C, tanto para el AF, las α CD, β CD y γ CD, así como los complejos (AF-CD). Se trabajó en una atmósfera controlada de nitrógeno, con un tamaño de muestra de 5 a 10 mg de cada una de los compuestos mencionados.

6.3.3. DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DE FASES AF-CD

Los diagramas de solubilidad de fases se obtuvieron de acuerdo al método reportado por Higuchi y Connors (1965). Se prepararon soluciones de AF (3.5 mM) y de las α CD, β CD y γ CD utilizando como disolvente agua destilada. La solución de la CD en turno fue incorporada a la del AF en las siguientes relaciones molares 1:0, 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6, 1:0.8 y 1:1. La reacción de acomplejamiento se llevó a cabo en tubos de ensaye, con agitación constante empleando un vortex a su máxima velocidad, por 30 minutos y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras fueron filtradas utilizando acrodiscos de 13 mm de nylon de 0.45 μm . Del filtrado se preparó una dilución 1:50 empleando agua destilada, para determinar la concentración de AF por el método espectrofotométrico antes descrito. Se generaron los diagramas de solubilidad de fases graficando la concentración de AF disuelto contra la concentración de CD utilizada; se ajustó la ecuación de una recta a los datos experimentales utilizando la ecuación 6.

6.4. ENERGÉTICA DEL PROCESO DE ACOMPLEJAMIENTO DEL ÁCIDO FERÚLICO CON CICLODEXTRINAS

6.4.1. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA

Se utilizó un calorímetro de titulación isotérmica MicroCal iTC200, que consta de

un sistema de inyecciones automático, una celda de muestra de 200 μL y una pipeta de inyección de 40 μL . Para llevar a cabo la titulación calorimétrica tanto el AF como las CDs fueron disueltas en solución de fosfatos 50 mM, pH 9.0. En la celda del equipo fueron colocados 200 μL de la solución del AF a una concentración de 3.5 mM, la cual fue establecida en experimentos previos con la finalidad de poder obtener mediciones de calor por encima del límite de detección del calorímetro. Las soluciones que se utilizaron fueron desgasificadas previamente a una presión de 460 mmHg, con agitación moderada, durante 5 minutos a 25 °C. El programa de titulación usado consistió de 20 inyecciones, el volumen de la primera inyección fue de 0.4 μL y las 19 subsecuentes de 2 μL , con un intervalo de tiempo entre cada inyección de 180 s. Las condiciones en el equipo fueron: temperatura de 25.0 °C, velocidad de agitación de 1000 rpm y una señal de referencia de 11.4 $\mu\text{cal/s}$. Una vez finalizada la titulación calorimétrica se midió el pH de las soluciones para determinar algún cambio. Las soluciones fueron preparadas al momento de su uso. El volumen total de la solución de CDs con el que se tituló a la del AF fue de 38.4 μL a una concentración de 130.0, 16.5 y 197.3 mM de la αCD , βCD y γCD , respectivamente. También se midió el calor de dilución, para lo cual se tituló amortiguador con cada una de las CDs bajo las condiciones experimentales ya mencionadas.

Mediante el software del calorímetro se realizó la integración del área bajo la curva de cada pico, tanto de la reacción de acomplejamiento como la del calor de dilución, a los calores de reacción se les restó el calor de dilución, obteniendo de este modo el valor que fue graficado generando la curva de titulación; se realizó una regresión no lineal con los datos experimentales y de esta manera se obtuvieron los valores de la K_a , de la ΔH_a así como de la estequiometría de unión (n). Posteriormente se calculó la ΔG_a y la ΔS_a a partir de los parámetros anteriores, con las ecuaciones 2 y 7.

6.4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Se empleó un espectrofluorímetro marca ISS, modelo K2 Champaign, IL, E.U.A. para obtener los cambios en la intensidad de fluorescencia por la formación del complejo AF-CD. El AF (3.5 mM) y las αCD (130.0 mM), βCD (16.5 mM) y γCD (197.3 mM) fueron disueltas, por separado, en solución de fosfatos 50 mM a pH 9.0. Para la solución

del AF las longitudes de onda máximas de excitación y de emisión, fueron 340 y 445 nm, respectivamente. La intensidad de fluorescencia del AF para cada adición de CD durante la titulación, fue el valor promedio de cinéticas con una duración de 114 s. El volumen inicial de AF en la celda fue de 2500 μL a una concentración de 0.020 mM. El número y volumen de cada una de las inyecciones de la solución de CD se estableció en base a la saturación requerida. Los datos de intensidades de fluorescencia inicial y de cada concentración del complejo AF-CD fueron corregidos restándole el valor promedio de la señal de fluorescencia del amortiguador.

La intensidad de fluorescencia del AF fue medida al inicio (IF_i) y después de cada adición de CD (IF_f). El cambio de la IF se determinó empleando la ecuación 8, para la titulación con αCD , y la ecuación 9 para el caso de βCD y γCD .

$$Y = (IF_f / IF_i) - 1 \quad \text{Ec. 8}$$

$$Y = 1 - (IF_f / IF_i) \quad \text{Ec. 9}$$

Donde Y representa la intensidad de fluorescencia que la molécula de AF perdió por su inclusión en la cavidad de la CD. El valor de Y fue graficado contra la concentración de CD correspondiente, y se ajustó con la ecuación 10 mediante una regresión no lineal.

$$Y = \frac{a}{2A_T} (A_T + K_d + X \pm \sqrt{(A_T + K_d + X)^2 - 4A_T X}) \quad \text{Ec. 10}$$

Donde

A_T : concentración del AF alcanzada en cada adición de titulante.

K_d : constante de disociación del complejo.

X: concentración de la CD alcanzada en cada adición de titulante

a: constante de apagamiento

Del valor inverso de la K_d se obtuvo el dato de la K_a , tomando como base que la reacción de la formación de complejo es reversible $\text{AF} + \text{CD} \rightleftharpoons \text{AF-CD}$. A partir de K_a se calculó la ΔG_a (Ecuación 2).

Adicionalmente, se registraron los espectros de emisión generados de cada

titulación del AF con la CD, a partir de los cuales se calcularon los centros de masas espectrales (CME), utilizando la siguiente ecuación:

$$CME = \frac{\sum \lambda_i IF_i}{\sum IF_i} \quad \text{Ec. 11}$$

Donde IF_i es la intensidad de fluorescencia que corresponde a cada longitud de onda λ_i , del espectro de emisión (350-500 nm). La λ de excitación fue 340 nm. El análisis de los datos de los CME permitió determinar si el acomplejamiento del AF con CD promovió desplazamientos en su máxima longitud de onda, lo cual proporciona información de cambios en la polaridad del medio que rodea a la molécula del fluoróforo (AF).

6.5. EFECTO DEL ESTADO DE PROTONACIÓN DEL AF EN EL PROCESO DE ACOMPLEJAMIENTO CON CICLODEXTRINAS

6.5.1. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para analizar el efecto de la carga del AF (0, 1⁻ y 2⁻) en la K_a durante el proceso de acomplejamiento con las CDs, se realizaron titulaciones fluorométricas siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.4.2., a tres diferentes pHs: 4.0 (amortiguador de citratos), 7.0 (amortiguador de fosfatos) y 9.0 (amortiguador de boratos), todos a una concentración de 50 mM. Las longitudes de onda de excitación y de emisión máximas usadas para el AF fueron: a pH 4.0 de 340 y 435 nm; a pH 7.0 de 310 y 400 nm, y por último a pH 9.0 de 340 y 445 nm.

6.5.2. SIMULACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR (*DOCKING*)

Para obtener información teórica a nivel molecular del efecto del estado de protonación del AF sobre la afinidad en el proceso de su acomplejamiento con CDs, se realizó un análisis computacional (*docking*) empleando el programa Molecular Operating Environment (MOE), de la molécula de AF únicamente con carga 0 y 1⁻, considerando que experimentalmente fueron los estados de protonación con mayor afinidad.

Se hizo un análisis de puntuación de ΔG_a de la formación del complejo del AF

con la α CD, la β CD y la γ CD, además se obtuvieron las estructuras en 3D de cada uno de los complejos. Las estructuras cristalográficas correspondientes a las α CD, β CD y γ CD fueron tomadas de la base de datos Protein Data Bank (2014), y en el caso de la estructura de la molécula de AF fue construida con MOE.

Para realizar la simulación del acomplejamiento se utilizó una orientación tipo triángulo alfa para la colocación del AF dentro de las cavidades de las CDs, se asignaron las funciones Affinity DG y London DG, así como los campos de fuerza MMFF94x y AMBER99. Al parámetro dieléctrico se le asignó un valor de 4 porque la formación del complejo se llevó a cabo en un sistema acuoso.

Una vez construidas y parametrizadas las moléculas, se realizó la minimización de energía y se inició el proceso de acoplamiento (*docking*). Se generaron 100 conformeros del modo en que el AF se puede llegar a introducir en la cavidad de las CDs. Estos conformeros fueron registrados y enlistados en orden descendente, en base a la puntuación de ΔG_a , comenzando por los valores más negativos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección los resultados y discusión se presentan en cuatro apartados: *i)* el disolvente y las condiciones que se establecieron para solubilizar a homogeneidad tanto al AF como a las CDs; *ii)* la confirmación de la formación del complejo mediante el análisis y discusión de los espectros de IR, de los termogramas de CDB y TGA, así como de diagramas de solubilidad de fases; *iii)* el estudio de la energética del proceso de acomplejamiento entre el AF y las CDs a partir de los datos generados por CTI, además del análisis comparativo de la K_a y ΔG_a obtenidos mediante CTI y titulación fluorométrica; y *iv)* el efecto del estado de protonación del AF sobre la afinidad de acomplejamiento con cada una de las CDs, realizado por titulación fluorométrica y modelado molecular (*docking*).

7.1. SOLUBILIZACIÓN A HOMOGENEIDAD DEL ÁCIDO FERÚLICO Y DE LAS CICLODEXTRINAS, EN UN DISOLVENTE COMÚN

Los resultados de las pruebas de solubilidad para el AF y las CDs se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Solubilidad del AF y las CDs empleando diferentes disolventes. Se llevó a cabo con agitación constante, a temperatura ambiente por 30 min y sin exposición a la luz.

Disolvente		Ácido ferúlico (mM)		Ciclodextrinas (mM)		
		1	3.5	Alfa	Beta	Gama
		1	3.5	130	16.5	197.3
Metanol	50 %	H	H	NH	NH	NH
	100%	H	H	NH	NH	NH
Etanol	60 %	H	H	NH	NH	NH
	70 %	H	H	NH	NH	NH
	100 %	H	H	NH	NH	NH
NaOH	0.5 %	H	H	H	H	H
	10 %	H	H	H	H	H
Fosfatos, 50 mM	pH 7.0	H	NH	H	H	H
	pH 8.0	H	NH	H	H	H
	pH 9.0	H	H	H	H	H
	pH 10.0	H	H	H	H	H
	pH 11.0	H	H	H	H	H
	pH 12.0	H	H	H	H	H

H: Solución homogénea. NH: Solución no homogénea.

Estos resultados mostraron que no se obtuvieron soluciones homogéneas cuando se utilizó al etanol en ninguno de los porcentajes ensayados, y que las tres CDs fueron insolubles en metanol. Los disolventes con los cuales se lograron obtener soluciones homogéneas tanto del AF (1 mM) como de las CDs fueron el NaOH (0.5 y 10 %) y la solución de fosfatos en el intervalo de pH ensayado; para la concentración 3.5 mM de AF solamente se obtuvieron soluciones homogéneas a partir del pH 9.0. De lo anterior, se decidió trabajar con la solución de fosfatos 50 mM a pH 9.0, sin embargo, de acuerdo con los valores de pK_a (2.14, 7.19 y 12.35), a pH 9.0 no funciona como amortiguador, y debido a que hasta el momento se desconocía si el proceso de acomplejamiento entre AF y las CDs generaría cambios en el pH del medio de reacción, se decidió utilizar también como disolvente una solución de boratos 50 mM, pH 9.0 (pK_a 9.23), con el que se lograron obtener, de la misma forma soluciones homogéneas.

7.2. CONFIRMACIÓN DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO AF-CD

A continuación se muestran los resultados generados con cada una de las técnicas utilizadas, a partir de los cuales se pudo confirmar la formación del complejo sólido entre el AF con cada una de las CDs.

7.2.1. ESPECTROS DE INFRAROJO

Se realizó el análisis de los espectros de IR de los compuestos puros, la mezcla física (AF+CD) y de los complejos correspondientes: AF- α CD (Figura 10), AF- β CD y AF- γ CD. Comparando los espectros de las moléculas sin acomplejar con los espectros de las mezclas físicas no se observaron modificaciones en la longitud de onda de la vibración atribuida a los grupos funcionales principales. Las CDs del complejo mostraron un cambio a 1641 cm^{-1} y en el caso de la α CD se observó además a los 997 cm^{-1} , con respecto a las moléculas libres. En lo tocante al AF, en la tabla 11 se muestra de manera comparativa los números de onda de las vibraciones de sus grupos funcionales característicos, contra los obtenidos de cada uno de los complejos. Se presentaron ligeros cambios en la forma e intensidad de las vibraciones de los complejos en relación a las bandas correspondientes del AF libre.

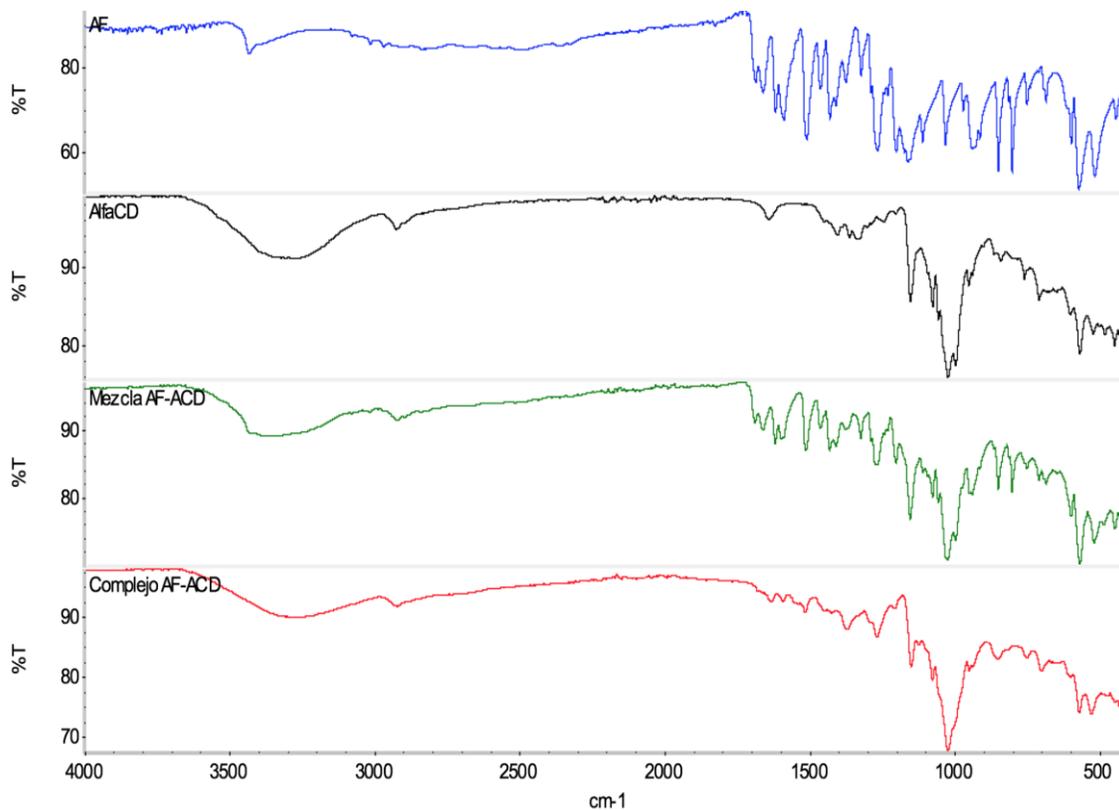


Figura 10. Comparación de los espectros de IR. Ácido ferúlico (línea azul), α CD (línea negra), mezcla física de AF con α CD (AF-ACD) (línea verde) y el complejo entre el AF con α CD (AF-ACD) (línea roja).

Tabla 11. Permanencia o desaparición de las bandas características del AF libre y acomplejado con la α CD, β CD y γ CD.

Enlace	AF (cm^{-1})	AF- α CD	AF- β CD	AF- γ CD
O-H _{ácido carboxílico}	3431	P	P	P
C-H _{Metilo}	2839	NP	NP	NP
C=O _{ácido carboxílico}	1687	NP	NP	NP
C=C _{aromático}	1661	NP	NP	NP
C=C _{aromático}	1617	NP	NP	NP
C=C _{aromático}	1589	NP	NP	NP
C=C _{aromático}	1509	NP	NP	P
-CH ₃	1430	NP	NP	P
O-H _{fenol}	1265	P	P	P
C-H _{aromático (para-)}	850	NP	NP	NP
C-H _{aromático (para-)}	801	NP	NP	NP
C-H _{aromático (meta-)}	751	NP	P	P
C-H _{aromático (meta-)}	685	NP	P	P

P: Permanece; NP: No permanece.

Frecuencias asignadas en base a lo reportado por Schrader (2008).

Las bandas de los dobles enlaces del anillo bencénico del AF (1661 a 1509 cm^{-1}) ya no se observaron en el espectro del complejo formado con cada una de las CDs. Por otro lado, las bandas correspondientes al O-H del ácido carboxílico (3431 cm^{-1}) y del fenol (1265 cm^{-1}) ambos grupos de la molécula del AF, en el espectro de los complejos con la α CD, β CD y la γ CD permanecieron, lo que indicaría que tanto la sección del ácido carboxílico como la del fenol se encuentran fuera de la cavidad de las CDs. Con respecto al enlace metilo de la estructura del AF (1430 cm^{-1}), en el caso de las α CD y β CD no permaneció lo cual implicaría que quedó al interior de la cavidad, caso contrario se observó cuando el AF fue acomplejado con la γ CD ya que la banda de este enlace se mantuvo.

Las diferencias en los espectros de IR entre las moléculas de AF y CDs libres y formando el complejo AF-CD, indicaron que el AF fue acomplejado con la α CD, β CD y la γ CD; los cambios observados en las bandas de algunos de los enlaces característicos de las moléculas del AF y las CDs, revelaron que el AF se introdujo parcialmente en la cavidad de las CDs estudiadas.

Hasta el momento, no se ha reportado el uso de espectroscopía de infrarrojo para analizar la formación de los complejos AF- α CD, AF- β CD, AF- γ CD. Wang *et al.* (2011) utilizaron esta técnica para confirmar la inclusión del AF en la HP- β CD, comparando los espectros del complejo con el de las moléculas sin acomplejar y de una mezcla física (AF + HP- β CD). No observaron cambios en los espectros de IR de las moléculas libres con el de la mezcla física, sin embargo, sí mostraron diferencias con respecto al del complejo, tales como el desplazamiento y decremento en intensidad de algunas bandas correspondientes al anillo aromático (1620 - 1205 cm^{-1}), mientras que otras desaparecieron totalmente: 2836 cm^{-1} (C-H del grupo metilo), 1431 cm^{-1} (núcleo aromático) y 804 cm^{-1} (átomos de hidrógeno del anillo fenilo del AF). También observaron el aumento de la intensidad de la banda alrededor de los 3415 cm^{-1} , debido al incremento en el número de grupos hidroxilo. Los autores concluyeron que el AF se incluyó en la cavidad de la HP- β CD sugiriendo además que el anillo aromático se encuentra dentro de la CD y que la parte polar (ácido carboxílico) de la molécula del AF quedó hacia afuera de esta. Los resultados reportados por Wang *et al.* (2011) concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo con los complejos AF- α CD, AF- β CD, AF- γ CD, lo que implicaría que el modo de

inclusión del AF en las CDs naturales fue similar al que se llevó a cabo con la ciclodextrina modificada.

7.2.2. TERMOGRAMAS DE TERMOGRAVIMETRÍA Y CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Al comparar los termogramas de TGA correspondientes a las moléculas del AF, la α CD, la β CD, la γ CD así como de los complejos AF- α CD (Figura 11), AF- β CD y AF- γ CD, revelaron diferencias en las temperaturas y en el porcentaje de pérdida de peso (Tabla 12).

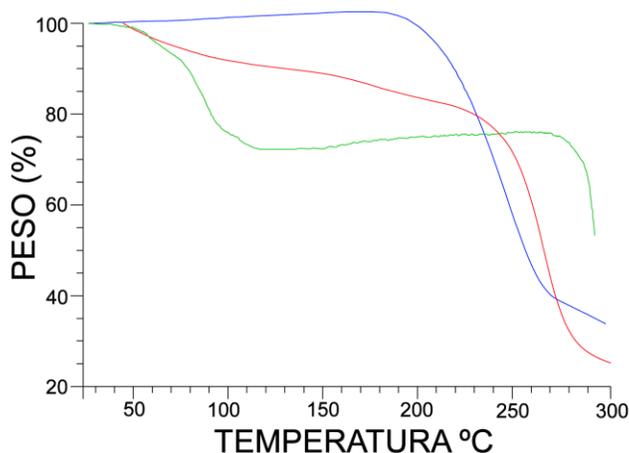


Figura 11. Comparación de los termogramas de TGA. Ácido ferúlico (línea azul), α CD (línea verde) y el complejo AF- α CD (línea roja).

Tabla 12. Temperaturas y porcentajes de pérdidas de peso obtenidos a partir de los termogramas de TGA del AF, la α CD, β CD y γ CD así como de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD.

Ácido ferúlico									
Temperatura (°C)	299.3								
Pérdida de peso (%)	73.73								
	α CD				β CD			γ CD	
Temperatura (°C)	56	98	141	298.9	130	299.4	142	298.9	
Pérdida de peso (%)	0.58	6.26	1.07	5.53	10.98	4.80	6.30	6.50	
	AF- α CD			AF- β CD			AF- γ CD		
Temperatura (°C)	130	247	395	162	227	376	120	226	387
Pérdida de peso (%)	7.02	5.35	44.12	7.61	3.65	44.87	9.91	3.98	45.58

En el gráfico del AF (Figura 11) se observó que al incrementarse la temperatura el peso se mantuvo constante (10.2 mg), sin embargo, a partir de los 180°C se formó una meseta con una caída del 73.73% del peso al llegar a 299.3°C, es decir, se perdieron 7.52 mg y se recuperaron del experimento 2.68 mg del peso, lo que sugiere una descomposición de la molécula de AF. Respecto a las CDs, todas tuvieron pérdida de peso (4.8-6.5%) aproximadamente a los 299 °C (Tabla 12). En los termogramas de α CD se presentaron varios hombros a diferencia de la β CD y la γ CD; a los 40 °C se apreció un pequeño decaimiento del peso (0.58%) y alrededor de 56 °C se observó otra pendiente mas pronunciada debida a un segundo cambio de masa, mientras que a los 98 °C se presentó una tercer caída mucho mas suave y pequeña. Al continuar el incremento en temperatura no se apreciaron cambios en la estructura hasta llegar a los 270 °C aprox. donde se originó un hombro con una pendiente pronunciada, indicando un proceso de descomposición de la estructura orgánica. En el caso de las β CD y γ CD, el porcentaje de pérdida entre una temperatura y otra solamente fue del 2.2 y 0.96 %, respectivamente (Tabla 12). La pérdida de peso de 130 a 142 °C en las CDs pudo ser debida al desprendimiento de moléculas de agua.

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 12, los tres complejos estudiados mostraron pérdidas de peso en los siguientes porcentajes 7.02-9.91, 3.65-5.35 y 44.12-45.58, en los intervalos de temperatura de 120-162 °C, 226-247 °C y 376-395°C, respectivamente. Del análisis anterior, podemos proponer que los cambios observados pueden deberse a la inclusión del AF en la cavidad de las CDs naturales.

da Rosa *et al.* (2013) usaron TGA para analizar la formación del complejo entre ácido gálico (AG) y la β CD; el termograma del AG presentó una pérdida del 8.3 y 10 % (101 y 225.6 °C, respectivamente), y para el AG- β CD fue del 10 y 13.2 % (85 y 245.2 °C, respectivamente), comprobando de esta manera la formación del complejo entre el AG y la β CD. Esta información concuerda con los resultados que se encontraron en el presente estudio, porque la pérdida de peso para el complejo fue hasta del 45 % a los 400 °C aprox., comparado con el 73 % a los 300 °C para el AF libre. Hasta el momento no se han reportado estudios de TGA para la determinación de la formación del complejo AF-CD.

Respecto a las curvas de CDB (Figura 12), se debe mencionar que en el termograma del AF destacó un pico endotérmico a 177 °C, correspondiente a la temperatura de fusión de dicha molécula. Así mismo, se observaron transiciones conformacionales a 45.4 y 252.8 °C, la última temperatura posiblemente corresponde a la degradación de la molécula. Por otro lado, el pico endotérmico del AF en 177 °C prácticamente desapareció en los termogramas de los complejos, por lo que se puede decir que posiblemente la cavidad de las CDs le confirió protección al AF. Además, el punto de fusión de cada una de las CDs fue menor a los 300 °C, y mayor que este valor para los complejos correspondientes (Tabla 13). En el gráfico del complejo se observó un pico exotérmico el cual está relacionado posiblemente con un proceso de descomposición, es decir, se liberó la energía acumulada de los procesos de fusión de cada molécula implícita en el complejo.

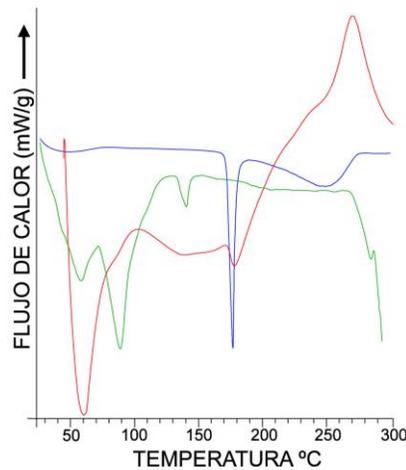


Figura 12. Comparación de los termogramas de CDB. Ácido ferúlico (línea azul), α CD (línea verde) y el complejo AF- α CD (línea roja).

Tabla 13. Temperaturas de las transiciones conformacionales obtenidas a partir de los termogramas de CDB del AF, la α CD, β CD y γ CD, así como de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD.

Temperaturas de las transiciones conformacionales (°C)										
Ácido ferúlico										
45.4 177 252.8										
α CD			β CD				γ CD			
56.2	88.8	141.3	289.5	86.7	221.3	299.4	70.7	122	286.4	295.6
AF- α CD			AF- β CD				AF- γ CD			
46.60	202.4	323.2	51.0	209.4	326	50.0	201.2	320.6		

En el 2004 Anselmi *et al.* mediante la técnica de CDB analizaron la formación del complejo AF- γ CD, comparando los termogramas del AF, de la γ CD y del complejo. Observaron la desaparición del pico del punto de fusión del AF a 175.2 °C, también hubo un desplazamiento y la ampliación de dos bandas características de la γ CD (288.3 a 269.7 °C y de 93.7 a 85.7 °C), lo cual fue indicativo de una interacción entre el AF y la CD. Los cambios en los termogramas de CDB concuerdan con lo observado en el presente estudio, respecto a la desaparición de la banda característica del punto de fusión del AF y al corrimiento de la banda con la formación del complejo AF- γ CD.

7.2.3. DIAGRAMA DE SOLUBILIDAD DE FASES

La capacidad que tienen la α CD, la β CD y la γ CD para incrementar la solubilidad al AF se demostró con el diagrama de solubilidad de fases (Figura 13), donde se observó un aumento directamente proporcional a la concentración de cada una de las CDs, en el siguiente orden β CD > γ CD > α CD (Tabla 14).

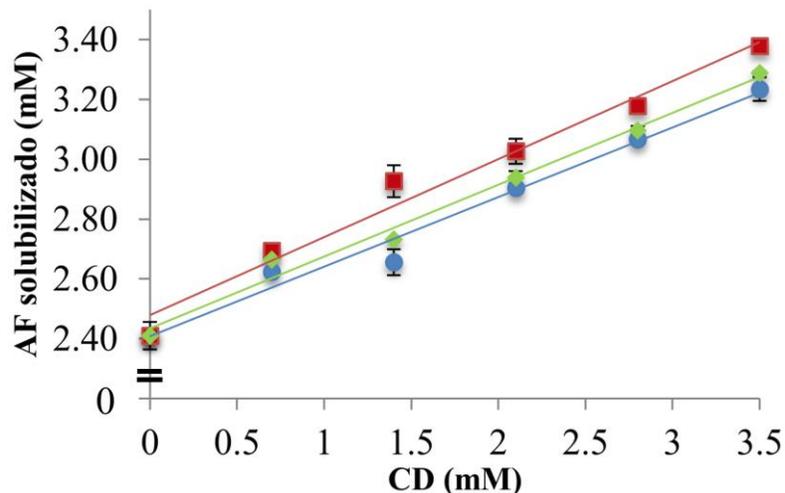


Figura 13. Diagrama de solubilidad de fases del ácido ferúlico en presencia de α CD (\bullet), β CD (\blacksquare) y γ CD (\blacklozenge). Las concentraciones utilizadas de CDs fueron 0.7, 1.4, 2.1, 2.8 y 3.5, para el AF fue de 3.5 mM. El disolvente fue agua destilada pH 6.7 y 25 °C.

Tabla 14. Cálculo de la K_s para el acomplejamiento del AF con las CDs naturales. El valor de la pendiente se obtuvo a partir del ajuste de los datos experimentales con la ecuación de la recta.

Ciclodextrina	αCD	βCD	γCD
Pendiente (m)	0.2327	0.2609	0.2403
R^2	0.9809	0.9770	0.9874
K_s (M^{-1})	125.84	146.47	131.25

El diagrama de solubilidad de fases mostró un aumento de la solubilidad del AF conforme se incrementó la concentración de cada una de las CDs, y el orden de reacción fue 1, por lo que se concluyó que el diagrama de solubilidad de fases en los tres casos fue del tipo A_L (Higuchi & Connors, 1965).

La solubilidad del AF a una concentración de 3.5 mM, se incrementó 1.40, 1.36 y 1.34 veces cuando se incorporó la β CD, la γ CD y la α CD, respectivamente. Zhang *et al.* (2009) reportaron un aumento de seis veces la solubilidad del AF cuando se utilizó la HP- β CD, y 3 veces cuando se utilizó 10 mM de la β CD, cuyo valor fue el doble al determinado en el presente estudio, sin embargo, utilizaron una concentración 3 veces mayor de la CD. Por otro lado, Wang *et al.* (2011) reportaron la una K_s 166.3 M^{-1} cuando el AF se acomplejó con 8.4 mM HP- β CD, registrando un incremento de 15 veces en la solubilidad del AF. Marques, Hadgraft & Kellaway, (1990), llevaron a cabo un estudio comparativo de solubilidad de fases para el acomplejamiento del salbutamol con la α CD, β CD y γ CD, observando un incremento en la solubilidad del compuesto en el siguiente orden β CD> γ CD> α CD, comportamiento similar al del presente trabajo.

7.3. ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO

7.3.1. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA

En la figura 14 se muestran los gráficos correspondientes a las curvas de titulación del AF con cada una de las CDs, en solución de fosfatos 50 mM pH 9.0. A partir del ajuste de la curva de titulación calorimétrica, tanto en solución de fosfatos como en amortiguador de boratos, se calcularon los valores de los parámetros termodinámicos para el proceso de acomplejamiento de dichas moléculas y se reporta el promedio de tres experimentos (Tabla 15).

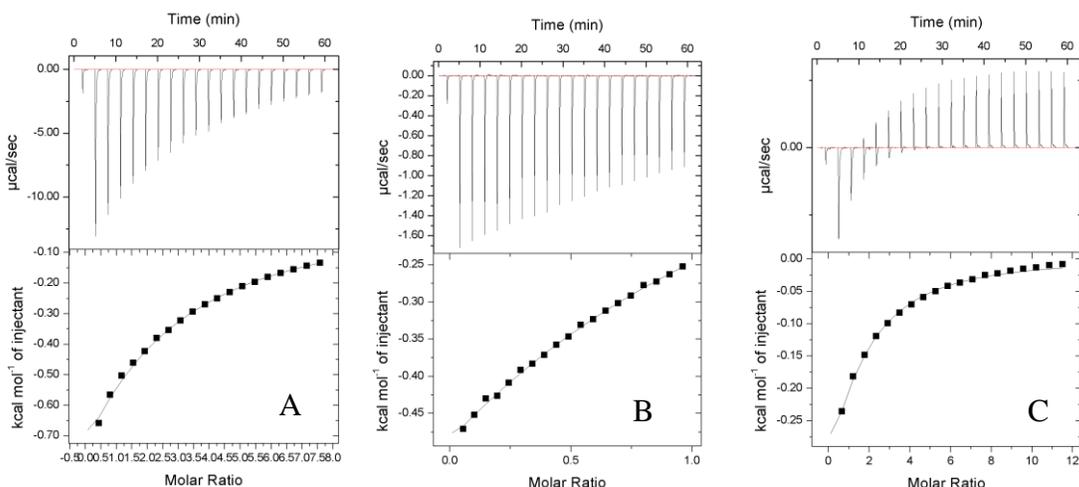


Figura 14. Titulaciones calorimétricas isotérmicas del AF con α CD (A), β CD (B) y γ CD (C). Se utilizó como disolvente una solución de fosfatos 50 mM, pH 9.0 y 25 °C. La concentración de AF fue de 3.5 mM y 130, 16.5 y 197.3 mM para las α CD, β CD y γ CD, respectivamente.

Tabla 15. Parámetros termodinámicos de la formación de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD obtenidos por CTI. Las moléculas fueron disueltas en soluciones de fosfatos y boratos (50 mM, pH 9.0) a 25 °C.

DISOLVENTE	COMPLEJO	K_a (M^{-1})	ΔH_a (kJ/mol)	$T\Delta S_a$ (kJ/mol)	ΔG_a (kJ/mol)
FOSFATOS	AF- α CD	53.10 ± 2.67	-18.32 ± 1.00	-8.48 ± 0.00	-9.84 ± 0.13
	AF- β CD	90.23 ± 17.12	-9.43 ± 2.00	1.70 ± 0.01	-11.13 ± 0.45
	AF- γ CD	81.35 ± 39.10	-4.95 ± 1.09	5.80 ± 0.01	-10.75 ± 1.24
BORATOS	AF- α CD	53.20 ± 3.41	-18.00 ± 0.75	-8.15 ± 0.00	-9.85 ± 0.16
	AF- β CD	176.50 ± 4.95	-6.36 ± 0.47	6.46 ± 0.00	-12.82 ± 0.07
	AF- γ CD	19.37 ± 0.40	-11.27 ± 0.36	-3.92 ± 0.00	-7.35 ± 0.05

El análisis comparativo de los parámetros ΔG_a , ΔH_a y $T\Delta S_a$ con la difetentes CDs (tabla 15), se ilustra en el gráfico 1, donde podemos observar que los valores de ΔG_a revelaron que el proceso de acomplejamiento del AF con las tres CDs naturales se lleva a cabo de manera espontánea debido a una entalpía favorable, tanto en solución de fosfatos como en boratos. En el caso de la β CD (fosfatos y boratos) y la γ CD (fosfatos), el proceso de acomplejamiento también fue entrópicamente favorecido.

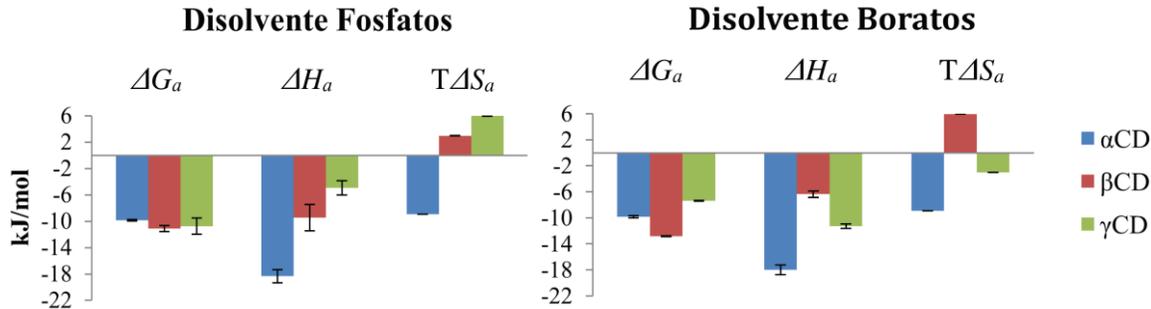


Gráfico 1. Parámetros termodinámicos de la formación de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD obtenidos por CTI. Las moléculas fueron disueltas en soluciones de fosfatos y boratos (50 mM, pH 9.0) a 25 °C.

Empleando ambos disolventes, las entalpías obtenidas indicaron una liberación de energía en el proceso de formación de los complejos y posiblemente la generación de interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno entre el AF y la cavidad de la CD; la α CD fue la que mostró un valor mayor de entalpía. Además, en fosfatos la entropía obtenida para los complejos AF- β CD y AF- γ CD fue positiva, lo que puede asociarse con la liberación de moléculas de disolvente de la cavidad de la CD para la formación del complejo (desolvatación); mientras que el valor negativo para α CD puede ser debido a una disminución en la libertad de movimiento de la molécula del AF una vez que se introdujo en su cavidad.

Se observó que el cambio de disolvente influyó en los valores de los parámetros termodinámicos de la formación de los complejos AF- β CD y AF- γ CD, lo cual no ocurrió cuando se realizó el acomplejamiento con la α CD. Este hecho fue observado también con la técnica de fluorescencia.

El análisis comparativo del valor de la K_a y la ΔG_a mostró que a 25 °C y pH 9.0 la afinidad para acomplejar el AF cambió conforme al uso de disolvente, cuando se utilizó como disolvente fosfatos el orden fue β CD > γ CD > α CD, mientras que cuando se usó boratos el orden fue β CD > α CD > γ CD (Gráfico 2). El uso de fosfatos como disolvente generó el mismo orden de afinidad con las dos técnicas, por lo que se concluye que fue el mejor disolvente para el análisis comparativo de los parámetros termodinámicos del proceso de acomplejamiento del AF con las CDs.

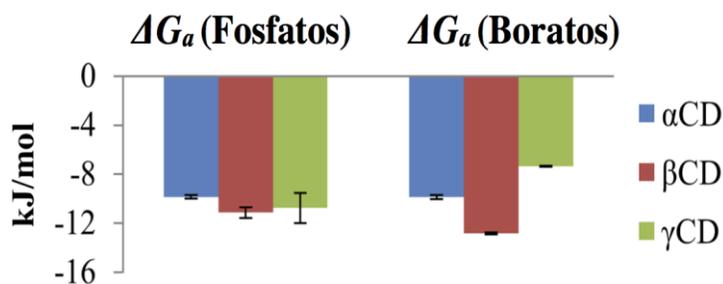


Gráfico 2. Comparativo de las ΔG_a obtenidas mediante CTI. Las moléculas fueron disueltas en soluciones de fosfatos y boratos (50 mM, pH 9.0) a 25 °C.

Hasta el momento no se ha realizado el estudio de la energética del proceso de acomplejamiento entre AF y las α CD, β CD y γ CD utilizando CTI, sin embargo, en el 2010 Álvarez-Parrilla *et al.* estudiaron la inclusión del ácido clorogénico en la β CD empleando ésta técnica a pH 5 y 25 °C. Los resultados mostraron que para que se llevara a cabo la introducción del ácido clorogénico en la cavidad de la β CD se tuvieron que haber generado fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno, ya que los parámetros termodinámicos obtenidos fueron negativos para la entalpía y positivos para la entropía; lo cual coincide con lo observado en el presente estudio. El valor de la ΔG_a que presentó el acomplejamiento del ácido clorogénico con la β CD es negativo, lo que indicó que el proceso se llevó a cabo de manera espontánea al igual que la inclusión del AF en la cavidad de la α CD, β CD y γ CD.

Por otro lado, en un estudio del acomplejamiento del resveratrol con las tres CDs naturales se observó que la unión de esta molécula con α CD generó el valor mayor de la entalpía (Li *et al.*, 2010) al igual que el presente estudio. Con respecto al complejo resveratrol- β CD su formación fue favorecida entálpica y entrópicamente, generando posiblemente interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno, así como la desolvatación de moléculas de agua de la cavidad de la CD, un comportamiento similar a lo observado en la formación de complejo AF- β CD.

7.3.2. TITULACIÓN FLUOROMÉTRICA

El acomplejamiento del AF con la α CD generó un incremento en la intensidad de fluorescencia, mientras que la unión con la β CD y la γ CD mostraron un descenso de la misma (Figura 15). Este comportamiento fue observado tanto con la solución de fosfatos

como en la de boratos. Como anteriormente se expuso, estos cambios están asociados a la formación del complejo.

El incremento observado en la intensidad de fluorescencia por el acomplejamiento con la α CD pudo ser generado por un cambio en la polaridad del ambiente que rodea al AF, pasando de uno polar, como lo es el amortiguador, a uno menos polar, como lo es la cavidad de la CD. Este aumento en la intensidad de fluorescencia es el esperado en un proceso de acomplejamiento de un fluoróforo. Sin embargo, se observó un comportamiento inusual en el cambio de la intensidad de fluorescencia cuando se acomplejó el AF con la β CD y γ CD, presentándose un descenso de la misma.

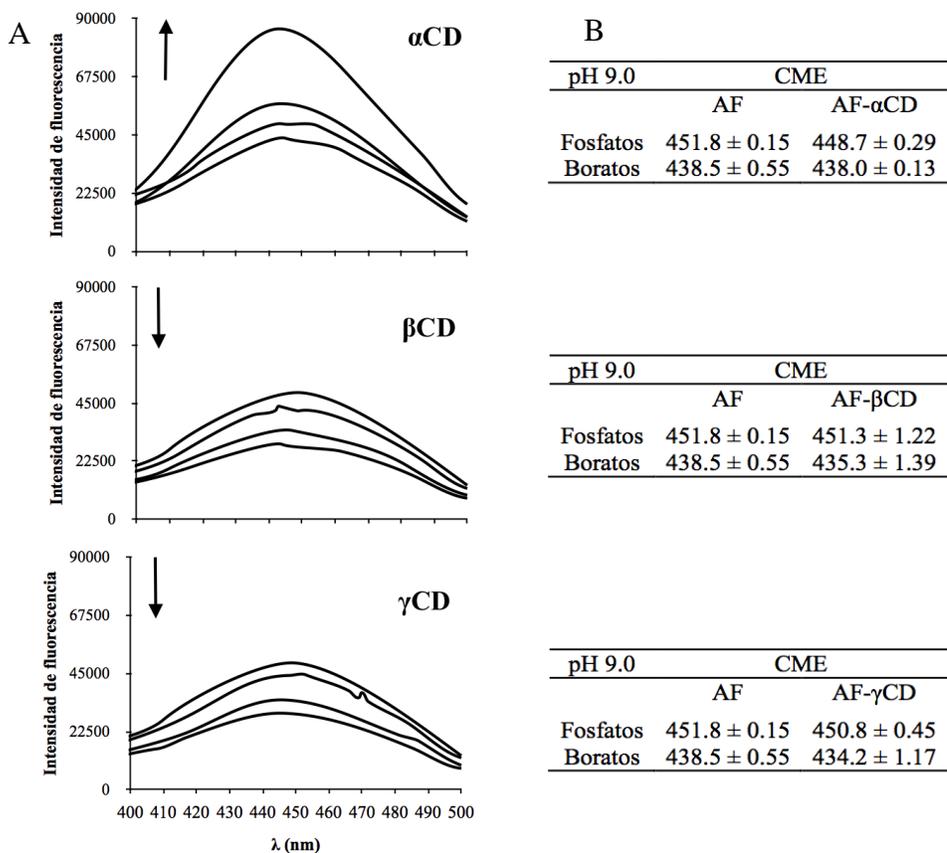


Figura 15. (A) Espectros de emisión de fluorescencia del AF (0.020 mM) durante la titulación fluorométrica con α CD (0-18.7 mM), β CD (0-0.9 mM) y γ CD (0-5.9 mM) a pH 9.0. (B) CME del AF al inicio y al final de la titulación fluorométrica con la α CD, β CD y γ CD. Las moléculas fueron disueltas en soluciones de fosfatos y boratos (50 mM, pH 9.0) a 25 °C.

Tomando en cuenta que el AF a pH 9.0 se encuentra con carga 2^- debido a la formación del carboxilato y el fenolato, se pudo haber generado un mayor número de puentes de hidrógeno en las cavidades de las β CD y γ CD provocando un fenómeno de apagamiento, es decir, que la energía del estado excitado se perdió por contacto del AF con la cavidad de la CD. Cabe señalar que la formación de puentes de hidrógeno para el caso de los complejos β CD y γ CD, fue determinado a partir del análisis de la energética mediante CTI. Por otro lado, utilizando como disolvente fosfatos, el CME para el AF mostró un corrimiento al azul de 3.1 nm al formar el complejo con la α CD, lo que indicó que el AF pasó de un medio polar a uno no polar, lo cual concuerda con el aumento en la intensidad de fluorescencia. Los CME obtenidos del acomplejamiento con la β CD y γ CD utilizando como disolvente fosfatos no mostraron un cambio mayor a 1 nm, por lo que se puede deducir que el acomplejamiento no estuvo regido por el cambio en la polaridad del medio si no por las interacciones generadas entre las dos moléculas, lo que se vió reflejado en el descenso en la intensidad de fluorescencia.

Cuando se utilizó como disolvente el amortiguador de boratos también se observó una disminución en los valores de CME de 0.5, 3.2 y 4.3 nm para α CD, β CD y γ CD, respectivamente (Figura 15), indicando que el AF pasó de un entorno polar a uno no polar. Además de la formación de puentes de hidrógeno entre el AF con la β CD y la γ CD, lo que posiblemente generó el apagamiento de fluorescencia, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, los complejos en 3D obtenidos por *docking*, mostraron que la introducción del AF en la cavidad de la α CD fue total mientras que en las cavidades la β CD y la γ CD fue parcial, quedando el ácido carboxílico más expuesto en la abertura amplia de las CDs, posiblemente por la formación de puentes de hidrógeno, lo cual pudo haber generado el fenómeno de apagamiento de fluorescencia.

Los resultados obtenidos por Zhang *et al.* (2009) mostraron un incremento en la intensidad de fluorescencia cuando se acomplejó el AF con la β CD, sin embargo, en ninguno de estos estudios se mencionó el pH en el que se llevó a cabo la titulación fluorométrica.

El acomplejamiento con CDs de moléculas como la vainillilamina, la serotonina y las catequinas, mostraron un aumento en la intensidad de fluorescencia, lo que sólo

concuenda con lo observado en el acomplejamiento con la α CD y no con las otras dos CDs, cabe mencionar que en estos estudios las moléculas fueron disueltas en soluciones metanol/agua o etanol/agua para favorecer su solubilidad. Esto pudo influir en los cambios de intensidad de fluorescencia (Sivasankar *et al.*, 2012; Chaudhuri, Chakraborty & Sengupta, 2010; Folch-Cano *et al.*, 2010).

De las curvas de titulación fluorométricas (Figura 16) se determinó la concentración requerida de CD para acomplejar a la mayor cantidad de moléculas de AF en solución, es decir que se alcance la saturación. La CD con la cual se necesitó la mayor concentración fue la α CD, seguida de la γ CD, y por último la β CD, en base a lo anterior se pudo concluir que el orden en la afinidad para la formación del complejo con el AF fue β CD > γ CD > α CD.

A partir de los ajustes mostrados en la figura 15, se obtuvieron los valores de K_a y de ΔG_a para cada complejo formado (Tabla 16).

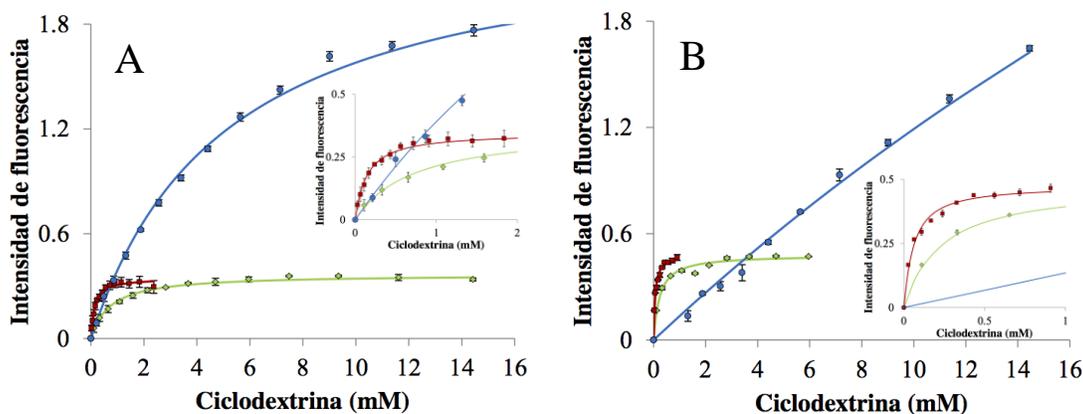


Figura 16. Curvas de titulación fluorométrica del AF con la α CD (\bullet), β CD (\blacksquare) y γ CD (\blacklozenge) a pH 9.0. Las moléculas fueron disueltas en las soluciones de fosfatos (A) y de boratos (B), ambos a una concentración de 50 mM, pH 9.0 y 25.0 °C. El inserto muestra una ampliación de las curvas de titulación en la gráfica A y B en la escala de la intensidad de fluorescencia (0 a 0.5), y de la concentración de CD ($0-2 \times 10^{-3}$ M).

Tabla 16. Valores de K_a obtenidos por titulación fluorométrica para los complejos α CD-AF, β CD-AF y γ CD-AF. Las moléculas fueron disueltas en las soluciones de fosfatos y de boratos, ambos a una concentración 50 mM, pH 9.0 y 25.0 °C.

DISOLVENTE	COMPLEJO	K_a (M^{-1})	ΔG_a (kJ/mol)
FOSFATOS	AF- α CD	131.88 \pm 29.63	-12.07 \pm 0.56
	AF- β CD	7,596.15 \pm 141.40	-22.15 \pm 0.05
	AF- γ CD	1,417.44 \pm 116.86	-17.98 \pm 0.20
BORATOS	AF- α CD	23.58 \pm 4.40	-7.81 \pm 0.47
	AF- β CD	22,882.31 \pm 1555.83	-24.88 \pm 0.17
	AF- γ CD	4,623.18 \pm 553.91	-20.91 \pm 0.30

El análisis termodinámico del proceso de acomplejamiento por fluorescencia mostró que la mayor afinidad para acomplejar al AF corresponde a la β CD, seguida de la γ CD y la de menor afinidad fue la α CD, lo que concuerda con los resultados obtenidos por la técnica de CTI (Gráfico 3).

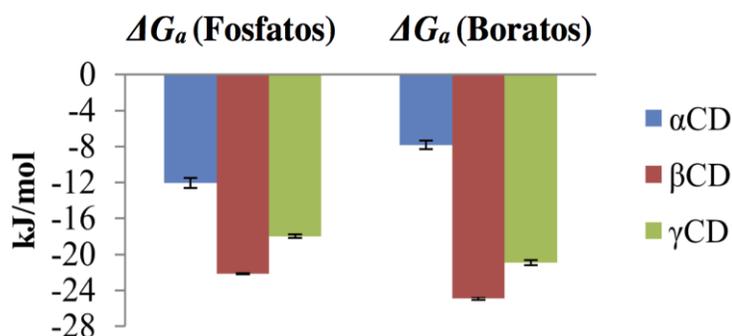


Gráfico 3. Comparativo de las ΔG_a obtenidas mediante la técnica de titulación fluorométrica. Se utilizaron como disolventes fosfatos y boratos (50 mM) a pH 9.0 y 25.0 °C.

7.4. EFECTO DEL ESTADO DE PROTONACIÓN DEL AF SOBRE LA AFINIDAD DE ACOMPLEJAMIENTO

7.4.1. TITULACIÓN FLUOROMÉTRICA

El acomplejamiento del AF con carga 1⁻ con cada una de las CDs naturales, presentó un comportamiento inusual ya que la intensidad de fluorescencia disminuyó, debido tal vez a la generación de un mayor número de interacciones con la α CD, la β CD

y la γ CD, de tal manera que se hizo presente el fenómeno de apagamiento en todos los casos de acomplejamiento (Figura 17).

La intensidad de la fluorescencia del AF con carga 0 (pH 4.0) y 2⁻ (pH 9.0), acomplejado con la α CD mostró un aumento, mientras que la introducción del AF en las cavidades de la β CD y la γ CD generó un descenso de la misma, lo que pudo deberse como ya se mencionó a un fenómeno de apagamiento generado por las interacciones entre el AF y la CD. Mientras que el acomplejamiento del AF por la α CD solo se vió afectado por el cambio en la polaridad del ambiente que lo rodea mostrando un incremento en la intensidad de fluorescencia.

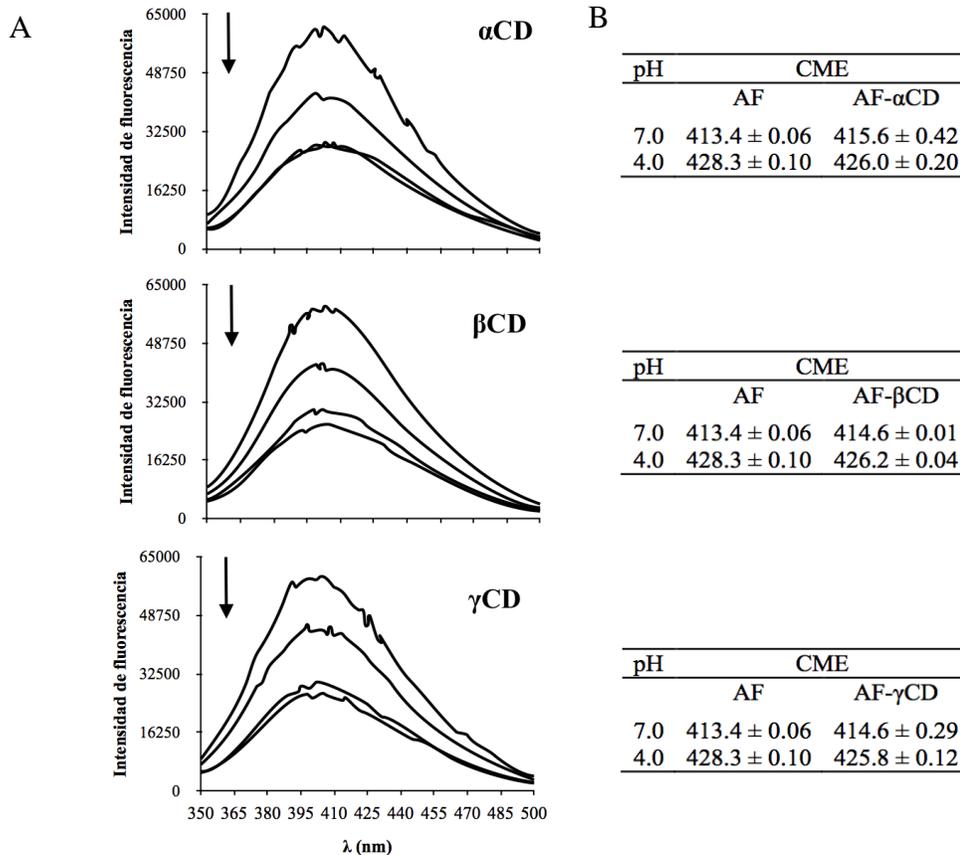


Figura 17. (A) Espectros de emisión de fluorescencia del AF (0.020 mM) con carga 1⁻ durante la titulación fluorométrica con α CD (0-0.4 mM), β CD (0-0.08 mM) y γ CD (0-0.4 mM) a pH 7.0. (B) CME del AF al inicio y al final de la titulación fluorométrica con la α CD, β CD y γ CD a los pHs 7.0 y 4.0. Las moléculas fueron disueltas en amortiguador de fosfatos y citratos a pH 7 y 4 respectivamente ambos a 50 mM y 25 °C.

Cuando se realizaron las titulaciones a pH 7.0 se observó un aumento en los valores de CME de 2.2 nm para α CD, y de 1.2 nm para β CD y γ CD (Figura 17), lo cual indicó que en el acomplejamiento ocurrió un cambio en la polaridad del ambiente que rodea al AF, pasando a uno más polar. Los CME obtenidos a pH 4.0 mostraron un corrimiento en la longitud de onda de emisión máxima de 2.3, 2.1 y 2.5 nm cuando se formó el complejo con la α CD, la β CD y la γ CD, respectivamente, lo que indicó que el AF paso de un medio polar a uno no polar, lo cual concuerda con el aumento en la intensidad de fluorescencia observado en el caso de la α CD, pero no para las otras dos CDs.

Qi, Li y Liu (2003) no reportaron ningún comportamiento inusual en la intensidad de fluorescencia por el acomplejamiento del AF con la α CD, la β CD y la γ CD, sin embargo, cabe señalar que el AF fue disuelto en metanol/agua, lo cual pudo tener inferencia sobre el efecto en el incremento en la intensidad de fluorescencia.

No obstante, se tiene la evidencia del comportamiento inusual en el cambio de la intensidad de fluorescencia en otros trabajos, por ejemplo, la titulación de la cumarina 334 con la β CD (Chandrasekaran & Enoch, 2013), mostró una disminución en la intensidad de fluorescencia a causa del acomplejamiento, dando la posible explicación de que la generación de un catión en la cumarina 334 por efecto del pH pudo haber provocado la formación de puentes de hidrógeno con los hidroxilos de la β CD, y de ésta manera se originó el fenómeno de apagamiento de la fluorescencia. También Wang *et al.* (2011) observaron que el acomplejamiento de una molécula (adamantano carboxilato o deoxicolato) con tres CDs modificadas fluorescentes no siguió un patrón común en el cambio de intensidad de fluorescencia. La posible explicación que dieron fue que la benzamida (estructura que confiere fluorescencia a las CDs) no se desplazó totalmente fuera de la cavidad de la CD, por la formación de puentes de hidrógeno con los hidroxilos de la misma y el contacto con las moléculas de agua del disolvente, generando el fenómeno de apagamiento de fluorescencia.

Por otro lado, en las curvas de las titulaciones fluorométricas del AF con carga 1^- y 0 (pH 7.0 y 4.0, respectivamente), se observó que la afinidad de acomplejamiento del AF está en función de la concentración de CD como ya se mencionó antes (Figura 17).

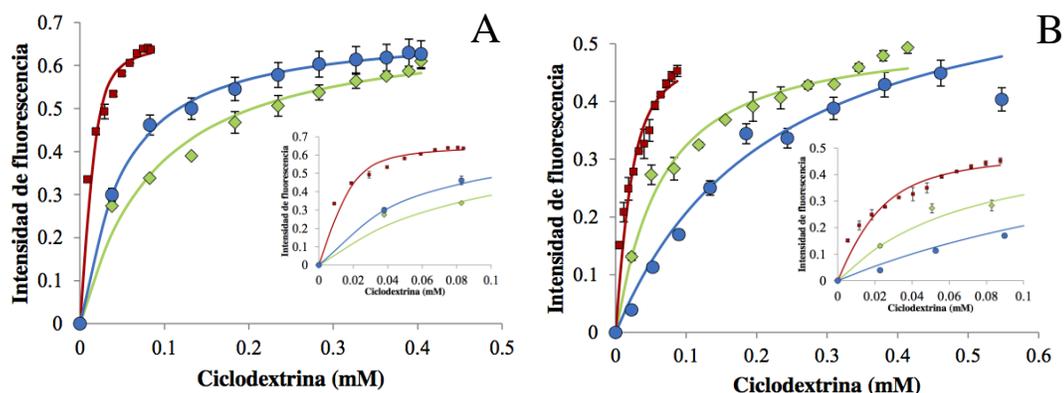


Figura 18. Curvas de titulación fluorométrica del AF con la α CD (\bullet), β CD (\blacksquare) y γ CD (\blacklozenge) pH 7.0 (A) y pH 4.0 (B). Las moléculas fueron disueltas en amortiguador de fosfatos (A) y de citratos (B), ambos a una concentración de 50 mM, pH 7.0 y 4.0 a 25 °C respectivamente. El inserto muestra una ampliación de las curvas de titulación en la gráfica A y B en la escala de la intensidad de fluorescencia (0 a 0.5), y de la concentración de CD (0 a 0.1 mM).

Tabla 17. Valores de la K_a y de la ΔG_a obtenidos por titulación fluorométrica de la formación de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD a pH 9.0, 7.0 y 4.0. Se utilizaron los amortiguadores de fosfatos (pH 7.0), boratos (pH 9.0) y citratos (pH 4.0), todos a una concentración de 50 mM y 25 °C.

DISOLVENTE	COMPLEJO	K_a (M^{-1})	ΔG_a (kJ/mol)
Fosfatos 50 mM, pH 9.0	AF- α CD	131.9 ± 29.6	-12.07 ± 0.56
	AF- β CD	$7,596 \pm 141$	-22.15 ± 0.05
	AF- γ CD	$1,417 \pm 117$	-17.98 ± 0.20
Boratos 50 mM, pH 9.0	AF- α CD	23.58 ± 4.40	-7.81 ± 0.47
	AF- β CD	$22,882 \pm 1,555$	-24.88 ± 0.17
	AF- γ CD	$4,623 \pm 554$	-20.91 ± 0.30
Fosfatos 50 mM, pH 7.0	AF- α CD	$50,717 \pm 1,157$	-26.86 ± 0.06
	AF- β CD	$1,548,000 \pm 581,000$	-35.24 ± 0.95
	AF- γ CD	$4,514 \pm 642$	-20.85 ± 0.35
Citratos 50 mM, pH 4.0	AF- α CD	$3,791.9 \pm 47.4$	-20.43 ± 0.03
	AF- β CD	$135,995 \pm 27,150$	-29.28 ± 0.50
	AF- γ CD	$24,459 \pm 3,492$	-25.04 ± 0.36

Las curvas de titulación fluorométricas mostraron que de las tres CDs la que requiere menor concentración para acomplejar a la mayoría de las moléculas de AF fue la β CD seguida de la γ CD, y por último la α CD. Por lo que se observó en la figura 18, se puede deducir que el orden en la afinidad para acomplejar al AF fue β CD > γ CD > α CD.

A partir de los ajustes de las curvas de titulación fluorométricas a pH 9.0, 7.0 y 4.0 mostrados en las figuras 16 y 18, se obtuvieron los valores de K_a para cada complejo formado (Tabla 17).

El orden de afinidad por el AF con carga 0 y 2⁻ fue $\beta\text{CD} > \gamma\text{CD} > \alpha\text{CD}$, mientras que con carga 1⁻ el orden fue $\beta\text{CD} > \alpha\text{CD} > \gamma\text{CD}$. Como se pudo observar, la βCD fue la que presentó mayor afinidad por el AF independientemente de la carga. El acomplejamiento del AF con carga 1⁻ por la βCD generó valores de K_a 204 (fosfatos) y 68 (boratos) veces mayores, en comparación con la obtenida por la unión del AF con carga 2⁻, y 25 veces mayor con respecto a la unión observada del AF con carga 0. Además, es importante mencionar que el acomplejamiento del AF con carga 2⁻ con las tres CDs generó los valores de ΔG_a más bajos, usando como disolventes fosfatos y boratos (Gráfico 4).

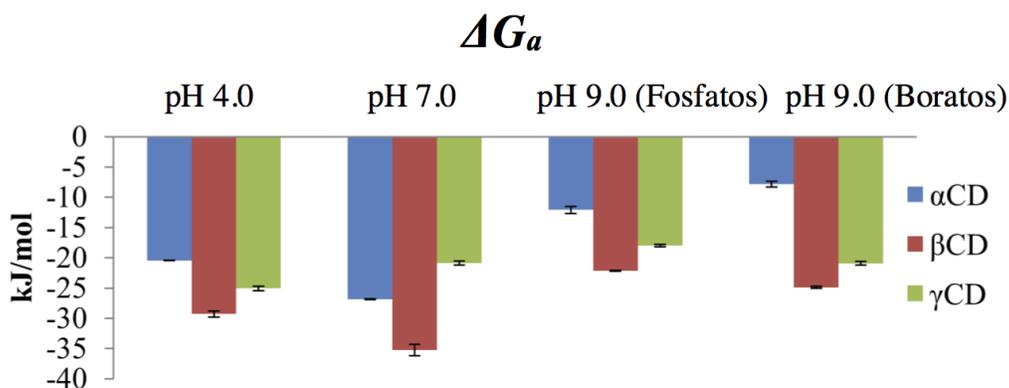


Gráfico 4. Comparación de los valores de la ΔG_a a pH de 4.0, 7.0 y 9.0. Se utilizaron los amortiguadores de fosfatos (pH 7.0), boratos (pH 9.0) y citratos (pH 4.0), todos a una concentración de 50 mM y 25 °C

El orden de afinidad por el AF que se observó a pH 7.0 concuerda con lo reportado por Qi, Li y Liu (2003), quienes determinaron la K_a por la técnica de titulación fluorométrica, empleando una solución de AF 10 mM disuelto en metanol/agua (0.5/99.5) a 25 °C. Sin embargo, los valores de la K_a fueron menores comparados con los obtenidos en el presente trabajo: 24, 76 y 19 veces para αCD , βCD y γCD , respectivamente.

Zhang *et al.*, en el 2009 obtuvieron las K_a utilizando espectroscopía de fluorescencia para el sistema AF- βCD a tres diferentes pH (3.05, 7.5 y 10.53) donde el AF (10 μm) fue disuelto en agua. Los valores de las K_a mostraron una mayor afinidad a

pH 7.5, seguido por el pH 3.05; lo anterior concuerda con la tendencia de los valores de las constantes a pH 7.0 y 4.0, sin embargo, para pH alcalino estos autores no reportaron ningún valor, y no indicaron si no se hizo el ensayo a ese pH o no se pudo obtener experimentalmente el dato de la K_a .

7.4.2. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL (*DOCKING*)

Las ΔG_a obtenidas mediante la función de puntaje Affinity DG (Tabla 18), mostraron que la afinidad por el AF con carga 0 y 1⁻ por las α CD, β CD y γ CD fue similar, puesto que el valor de ΔG_a no fue mayor a 0.5 kcal/mol. Los datos de las ΔG_a tampoco presentaron una variación mayor a 0.5 kcal/mol al evaluar los campos de fuerza MMFF94X y AMBER 99.

Tabla 18. Puntuaciones de ΔG_a de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD a distintos estados de protonación del AF (0 y 1⁻). Se utilizaron dos campos de fuerza (MMFF94X y AMBER 99) y dos funciones de puntaje (Affinity DG y London DG).

Complejo	Campo de fuerza	ΔG_a (kcal/mol)			
		Función de puntaje			
		Affinity DG (AF carga 0)	Affinity DG (AF carga 1 ⁻)	London DG (AF carga 0)	London DG (AF carga 1 ⁻)
AF- α CD	MMFF94X	-2.1621	-2.1416	-7.2228	-6.5532
	AMBER 99	-2.7761	-2.3701	-8.0587	-8.4088
AF- β CD	MMFF94X	-1.8154	-1.7931	-8.2667	-8.3642
	AMBER 99	-2.2939	-2.1630	-8.3954	-7.751
AF- γ CD	MMFF94X	-1.8508	-1.7391	-10.2723	-7.7436
	AMBER 99	-1.8508	-1.7391	-10.2686	-7.7647

Al evaluar el *docking* del AF con carga 0 y 1⁻ en las cavidades de la α CD y la β CD, utilizando la función de puntaje London DG y los dos campos de fuerza mencionados anteriormente, no se observaron cambios mayores a 0.5 kcal/mol en la ΔG_a , sin embargo, cuando se determinó el acomplejamiento del AF con carga 0 con la γ CD se observó una diferencia de 2.53 kcal/mol con respecto a su acomplejamiento con carga 1⁻, lo cual indicó que la carga 0 en el AF predispone a una mayor afinidad para formar el complejo.

Se realizaron estudios de *docking* de los sistemas resveratrol-HP- β CD (Sapino^a *et al.*, 2008) y trolox-HP- β CD (Sapino^b *et al.*, 2008), y a partir de los resultados obtenidos

podieron hacer un comparación de la estabilidad de los complejos. Encontraron que la puntuación del ΔG_a cuando se acomplejo el resveratrol fue de -19.52 kcal/mol, siendo mayor 4 kcal/mol en comparación cuando se acomplejo el trolox, esto mostró la diferencia de afinidades entre dos ligandos con un mismo receptor. El *docking* de los complejos AF- α CD, AF- β CD y AF- γ CD en los cuales el ligando es el mismo y las moléculas anfitriones no, se observó una diferencia mayor a 2.53 kcal/mol en los valores obtenidos de ΔG_a , por lo que se puede deducir que se tiene interacciones similares en la formación de los tres complejos. En resumen, la simulación computacional mostró que la carga del AF no fue un factor que contribuya a un aumento o disminución en la afinidad de acomplejamiento, esto quedó evidenciado por la similitud de los valores de las ΔG_a , lo cual discrepo con los resultados experimentales obtenidos por espectroscopía de fluorescencia a distinto pH, tal vez porque en la simulación computacional no se toman en cuenta varios factores como el efecto del disolvente sobre las interacciones entre las dos moléculas, las cuales fueron clave en el acomplejamiento del AF con las CDs de acuerdo a los resultados del análisis de la energética realizados en el presente trabajo.

También se obtuvieron las posibles representaciones tridimensionales de los complejos entre AF con la α CD, la β CD y la γ CD (Figura 19).

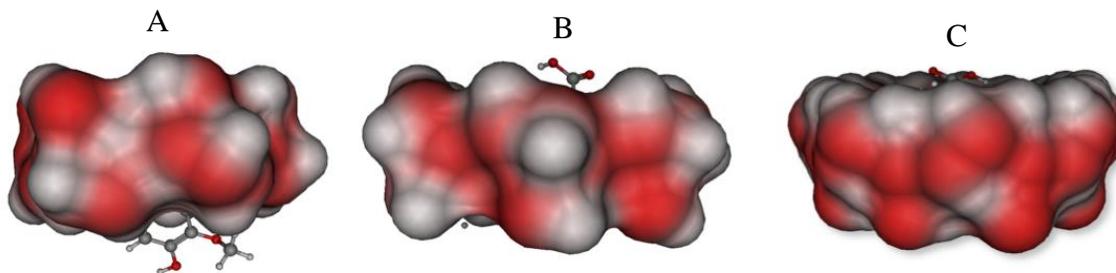


Figura 19. Estructuras en 3D de los complejos AF- α CD (A), AF- β CD (B) y AF- γ CD (C).

En el caso del acomplejamiento con la α CD la molécula de AF quedo más expuesta al disolvente por la parte del anillo de benceno y el grupo metoxilo, con respecto a las otras dos CDs, además se pudo observar que la molécula del AF se introdujo con la misma orientación en la cavidad de la tres CDs, mostrando que el ácido carboxílico de la molécula esta interaccionando con la entrada más ancha de las CD, el anillo del benceno

se ubicó en el centro de las cavidades de las mismas, el alcohol y metoxilo del AF se encontró en contacto con la entrada más estrecha de las CDs. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos de la simulación computacionalmente utilizando el programa AMBER para el complejo AF- γ CD (Anselmi *et al.*, 2008).

A partir de las estructuras tridimensionales se observó que la disposición de los grupos hidroxilos del AF (-OH del ácido carboxílico y -OH del fenol) están en la periferia de las cavidades de las CDs teniendo mayor contacto con el disolvente. Esta orientación de los grupos hidroxilos esta apoyada con la investigación que realizó Casolaro, Anselmi & Picciocchi (2005), donde los resultados mostraron que el acomplejamiento del AF con la γ CD no afectó la protonación o desprotonación del mismo, siendo los valores de las constantes de basicidad similares.

VIII. CONCLUSIONES

8.1. Soluciones homogéneas de AF y ciclodextrinas

1.- Se obtuvieron soluciones homogéneas de AF y las distintas CDs estudiadas, empleando como disolvente fosfatos y amortiguador de boratos, 50 mM a pH 9.0.

8.2. Se pudo corroborar la formación del complejo entre el AF y las α CD, β CD y γ CD, en base a:

1.- Los cambios o desaparición de bandas características de algunos grupos funcionales en los espectros de IR que presenta el AF puro con respecto al acomplexado.

2.- La desaparición del pico endotérmico que corresponde al punto de fusión del AF, observada en los termogramas de CDB de los complejos.

3.- Las altas temperaturas de descomposición de los complejos con respecto a la presentada por el AF sin acomplexar, registradas en los termogramas de TGA.

4.- El incremento en la solubilidad del AF como resultado del acomplexamiento, determinado a partir del diagrama de solubilidad de fases, siendo mayor cuando se usó la β CD.

8.3. Se determinaron las contribuciones termodinámicas al proceso del acomplexamiento, empleando la técnica de CTI:

1.- Los valores negativos obtenidos para ΔH_a y ΔG_a indicaron que la formación de los complejos AF-CD fue exotérmica y espontánea.

2.- El acomplexamiento fue entrópicamente favorecido para la β CD y la γ CD, pero no para la α CD.

3.- La afinidad por el AF en base a la ΔG_a obtenida por CTI fue β CD $>$ γ CD $>$ α CD, lo cual se corroboró por espectroscopía de fluorescencia utilizando como disolvente tanto fosfatos y boratos. Cuando se usó este último disolvente en la CTI el orden de afinidad fue β CD $>$ α CD $>$ γ CD. Dado que el uso de fosfatos como disolvente generó el mismo orden de afinidad con las dos técnicas se concluye que fue el mejor disolvente para el análisis comparativo de los parámetros termodinámicos del proceso de acomplexamiento del AF con las CDs.

8.4. Se determinó el efecto del estado de protonación del AF en la afinidad de acomplejamiento:

- 1.- Las cargas del AF generaron cambios en los valores de K_a y ΔG_a obtenidos.
- 2.- El AF con carga 1^- mostró un ΔG_a más negativos para las tres CDs estudiadas, con respecto a los otros dos estados de protonación (0 y 2^-).
- 3.- La CD con mayor afinidad para acomplejar al AF con carga 0 , 1^- y 2^- fue la β CD, presentando los siguientes ordenes de afinidad, con carga 1^- : β CD > α CD > γ CD, con carga 0 y 2^- : β CD > γ CD > α CD. El acomplejamiento del AF con carga 2^- presentó los valores más bajos de la K_a para los sistemas AF- β CD y AF- γ CD.
- 4.- La simulación computacional evidenció que la carga del AF no es un factor que contribuya a un aumento o disminución en la afinidad de acomplejamiento, esto fue evidenciado por la similitud de los valores de las ΔG_a . Las estructuras en 3D obtenidas por *docking* mostraron que el AF se introdujo en las tres CDs con la misma orientación, en donde el anillo del benceno se ubicó en el centro de la cavidad, el ácido carboxílico interaccionó con la entrada más ancha de la CD, mientras que el alcohol y el metoxilo se encontraron en contacto con la entrada más estrecha. En el caso del acomplejamiento con la α CD la molécula de AF quedó más expuesta al disolvente por la parte del anillo de benceno y el grupo metoxilo, con respecto a las otras dos CDs.

En base a los resultados obtenidos, la CD más recomendada para acomplejar el AF es la β CD seguido por la γ CD y por último la α CD.

IX. PERSPECTIVAS

1. Elucidación estructural de los complejos AF-CD mediante la técnica de RMN.

Los resultados preliminares de la elucidación estructural mediante la técnica de RMN, de los complejos del AF con la α CD, β CD y γ CD, mostraron interferencias en la señal con la molécula TSP (Ácido trimetilsilil propanoico) utilizada como referencia cero de los desplazamientos químicos, probablemente por una competencia en el acomplejamiento con la molécula de AF. En base a lo anterior, se sugiere establecer condiciones experimentales aumentando la concentración del AF así como de las CDs, para eliminar dicha interferencia y poder tener reproducibilidad en la elucidación estructural de los complejos AF-CD mediante RMN.

2. Evaluación de los efectos de protonación del ácido ferúlico en el proceso de acomplejamiento con CDs.

El calor detectado por la técnica de CTI puede no asociarse únicamente al acomplejamiento entre el AF con la CD, por lo tanto, sería conveniente demostrarse que no tuvo inferencia algún otro proceso como la protonación o desprotonación del AF. Hasta el momento se han realizado dos titulaciones calorimétricas isotérmicas empleando los amortiguadores de glicina y boratos a pH 9.0, ambos con distintas entalpías de ionización, a partir de las cuales se obtuvieron dos puntos en el gráfico de cambio en la entalpia aparente, y no son suficientes para afirmar si ocurre una protonación o desprotonación del AF durante el proceso de acomplejamiento, lo cual puede contribuir al calor detectado por CTI. Es por eso que se deberán realizar más titulaciones calorimétricas a pH 9.0, utilizando amortiguadores que tengan distintas entalpias de ionización a la de boratos y de glicina para completar el gráfico de cambio en la entalpia aparente ($\Delta H_{aparente}$ vs $\Delta H_{ionización}$), mediante el cual se obtendrá el número de protones (n) transferidos del AF hacia el amortiguador en el proceso de acomplejamiento utilizando la siguiente ecuación $\Delta H_{aparente} = \Delta H + n \Delta H_{ionización}$.

3. Llevar a cabo un estudio de simulación computacional para obtener más información sobre el acomplejamiento del AF con CDs.

4. Realizar estudios con microscopia electrónica de barrido para obtener información de la morfología del sólido formado por los complejos en comparación con los sólidos puros.

5. Realizar estudios con rayos X de polvos para adquirir información sobre la estructura y el orden tridimensional de la arquitectura atómica de los complejos en comparación con los sólidos puros.

6. Se ha evidenciado las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del AF (Heinonen *et al.*, 1998; Lattanzio *et al.*, 1994), y dado que el acomplejamiento con CDs mejora su solubilidad y brinda protección a la molécula, se podrían evaluar los cambios en dichas propiedades por efecto del acomplejamiento con la α CD, β CD y γ CD.

X. REFERENCIAS

- Alberty, R. A. (1969). Standard Gibbs free energy, enthalpy, and entropy changes as a function of pH and pMg for several reactions involving adenosine phosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 244(12), 3290-3302.
- Ali Asaff Torres, Mayra De La Torre Martinez, Antonino Berrondo Mir & Roberto Miguel Macias Ochoa. Process of production of vanillin with immobilized microorganisms. Estados Unidos CN103060392 A (435/147; C12P724), 19 Abr. 2007, 18 Oct. 2008.
- Álvarez-Parrilla, E., Palos, R., Rosa, L. A., Frontana-Uribe, B. A., González-Aguilar, G. A., Machi, L. & Ayala-Zavala, J. F. (2010). Formation of Two 1:1 Chlorogenic Acid: β -cyclodextrin Complexes at pH 5: Spectroscopic, Thermodynamic and Voltammetric study. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 54(2), 103-110.
- Anselmi, C., Centini, M., Andreassi, M., Buonocore, A., Rosa, C. L., Facino, R. M., & Tsuno, F. (2004). Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(5), 1241-1249. doi: 10.1016/j.jpba.2004.04.008
- Anselmi, C., Centini, M., Maggiore, M., Gaggelli, N., Andreassi, M., Buonocore, A., & Facino, R. M. (2008). Non-covalent inclusion of ferulic acid with α -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(4), 645-652. doi:10.1016/j.jpba.2007.11.037.
- Antenucci, R. N., & Palmer, J. K. (1984). Enzymic degradation of α - and β -cyclodextrins by Bacteroides of the human colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(6), 1316-1321. doi: 10.1021/jf00126a025
- Asaff, T. A. (2010). Transformando riesgos en oportunidades: del nejayote a la vainillina. Ciencia, Tecnología e innovación para el desarrollo de México. Año 3, No. 60.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1631-1640. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.001
- Astray, G., Mejuto, J. C., Morales, J., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2010). Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Research International*, 43(4), 1212-1218. doi: 10.1016/j.foodres.2010.02.017
- Atsushi Suzuki, Ryuji Ochiai & Ichiro Tokimitsu. Use of ferulic acid for treating hypertension. Alemania, EP1090635 B1(A61K31/192, A61P9/10, A61K45/06,

A61K9/00, A61P9/12, A23L1/30, A61K9/48, A61P9/00), 22 Sep. 2000, 15 de Mar.2006.

- Atsushi Suzuki, Ryuji Ochiai & Ichiro Tokimitsu. Caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid, and esters or salts, and one or more of central nervous system stimulating components, food fibers, extracts of plants, organic acids or sugar alcohols. Estados unidos US7351436 B2 (424/756, 424/760), 25 Jul. 2003, 1 Abr. 2008.
- Bellringer, M. E., Smith, T. G., Read, R., Gopinath, C., & Olivier, P. (1995). β -Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. *Food and Chemical Toxicology*, 33 (5), 367-376. doi: 10.1016/0278-6915(94)00149-I
- Birošová, L., Mikulášová, M., & Vaverková, Š. (2005). Antimutagenic effect of phenolic acids. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149 (2), 489-91.
- Bouchemal, K., & Mazzaferro, S. (2012). How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. *Drug Discovery Today*, 17(11-12), 623-9. doi:10.1016/j.drudis.2012.01.023
- Bourne, L. C., & Rice-Evans, C. A. (1999). [9] Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: Pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Methods in Enzymology*, 299, 91-106. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99012-2
- Brewster, M. E., & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (7), 645-666. doi:10.1016/j.addr.2007.05.012
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2009). Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. *Food Chemistry*, 115(4), 1542-1548. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.059
- Cal, K., & Centkowska, K. (2008). Use of cyclodextrins in topical formulations: practical aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 467-478. doi:10.1016/j.ejpb.2007.08.002
- Casolaro, M., Anselmi, C., & Picciocchi, G. (2005). The protonation thermodynamics of ferulic acid/ γ -cyclodextrin inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 425 (1), 143-147. doi: 10.1016/j.tca.2004.06.016
- Castronuovo, G., & Niccoli, M. (2006). Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with propranolol in aqueous solution at 298K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(11), 3883-3887. doi: 10.1016/j.bmc.2006.01.052

- Castronuovo, G., & Niccoli, M. (2013). Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with acetylsalicylic acid and ibuprofen in aqueous solution at 298K. *Thermochimica Acta*, 557, 44-49. doi:10.1016/j.tca.2013.01.037.
- Cavalcanti, I. M. F., Mendonça, E. a M., Lira, M. C. B., Honrato, S. B., Camara, C. a, Amorim, R. V. S., & Santos-Magalhães, N. S. (2011). The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 44 (3), 332-40. doi:10.1016/j.ejps.2011.08.011
- Celik, S. E., Ozyürek, M., Tufan, A. N., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(5), 1615–24. doi:10.1016/j.saa.2011.02.017
- Chandrasekaran, S., & Enoch, I. V. (2013). Binding of Coumarin 334 with β -Cyclodextrin and with C-Hexylpyrogallol [4] arene : Opposite Fluorescence Behavior, *Journal of Spectroscopy*, 2013, 13, ID 408506. doi: 10.1155/2013/408506
- Charalampopoulos Dimitris. (5 March 2014). Production of ferulic acid from wheat bran. marzo 2014, de HGCA Sitio web: <http://www.hgca.com/publications/2014/march/05/production-of-ferulic-acid-from-wheat-bran.aspx>
- Chaudhuri, S., Chakraborty, S., & Sengupta, P. K. (2010). Encapsulation of serotonin in β -cyclodextrin nano-cavities: Fluorescence spectroscopic and molecular modeling studies. *Journal of Molecular Structure*, 975(1-3), 160-165. doi:10.1016/j.molstruc.2010.04.014
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- Choi, M. J., Ruktanonchai, U., Min, S. G., Chun, J. Y., & Soottitantawat, A. (2010). Physical characteristics of fish oil encapsulated by β -cyclodextrin using an aggregation method or polycaprolactone using an emulsion–diffusion method. *Food Chemistry*, 119(4), 1694-1703. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.052
- Clas, S. D., Dalton, C. R., & Hancock, B. C. (1999). Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(8), 311-320. doi: 10.1016/S1461-5347(99)00181-9
- Connors, K. A. (1997). The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Reviews*, 97 (5), 1325-1358. doi: 10.1021/cr960371r

- Cravotto, G., Binello, A., Baranelli, E., Carraro, P., & Trotta, F. (2006). Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Current Nutrition & Food Science*, 2, 343-350. doi: 10.2174/157340106778699485
- da Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiazzi, R. C., Nunes, M. R., Benvenuti, E. V., Luz, S. R. Da, & Rutz, J. K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46, 138-146. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.053
- de Matos Jensen, C. E., Dos Santos, R. A. S., Denadai, A. M. L., Santos, C. F. F., Braga, A. N. G., & Sinisterra, R. D. (2010). Pharmaceutical composition of valsartan: β -Cyclodextrin: physico-chemical characterization and anti-hypertensive evaluation. *Molecules*, 15(6), 4067-4084. doi:10.3390/molecules15064067.
- Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9
- Delrivo, A., Zoppi, A., & Longhi, M. R. (2012). Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 1980-1988. doi:10.1016/j.carbpol.2011.10.025
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons. 122-123
- Dos Santos, C., Buera, M. P., & Mazzobre, M. F. (2012). Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. *Food Chemistry*, 132(4), 2030-2036. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.044
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International Journal of Food science & Technology*, 44(12), 2512-2518. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x
- El-Kemary, M., Sobhy, S., El-Daly, S., & Abdel-Shafi, A. (2011). Inclusion of Paracetamol into β -cyclodextrin nanocavities in solution and in the solid state. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(5), 1904-8. doi:10.1016/j.saa.2011.05.084
- Fang, Z., Comino, P. R., & Bhandari, B. (2013). Effect of encapsulation of d-limonene on the moisture adsorption property of β -cyclodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 164-169. doi: 10.1016/j.lwt.2012.09.016
- FAO, (2014) Base de datos en línea de la norma general del codex para los aditivos alimentarios (GSFA) <http://www.codexalimentarius.net/gfsaonline/additives/details.html?id=289>. 13 de agosto 2014

- Folch-Cano, C., Jullian, C., Speisky, H., & Olea-Azar, C. (2010). Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β -cyclodextrins by ORAC assays. *Food Research International*, 43(8), 2039-2044. doi:10.1016/j.foodres.2010.06.006
- Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2101-2110. doi:10.1021/jf990489j
- Fujita, A., Sasaki, H., Doi, A., Okamoto, K., Matsuno, S., Furuta, H., & Nanjo, K. (2008). Ferulic acid prevents pathological and functional abnormalities of the kidney in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 79(1), 11-17. doi:10.1016/j.diabres.2007.08.009
- Funk, C., & Brodelius, P. E. (1992). Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. IV. Induction of vanillic acid formation. *Plant Physiology*, 99(1), 256-262.
- Ghosh, S., Jana, S., & Guchhait, N. (2011). Constrained photophysics of partially and fully encapsulated charge transfer probe (E)-3-(4-Methylaminophenyl) acrylic acid methyl ester inside cyclodextrin nano-cavities: evidence of cyclodextrins cavity dependent complex stoichiometry. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 84(1), 249-55. doi:10.1016/j.saa.2011.09.038
- Goldberg, R. N., Lang, B. E., Selig, M. J., & Decker, S. R. (2011). A calorimetric and equilibrium investigation of the reaction {methyl ferulate(aq)+H₂O(l)=methanol(aq)+ferulic acid(aq)}. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43(3), 235-239. doi:10.1016/j.jct.2010.09.002
- Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290. doi:10.1016/j.jconrel.2010.01.037
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 435-448.
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 47(4), 409-43. doi:10.1002/prot.10115
- Harris, P. J., & Trethewey, J. A. (2010). The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 19-33. doi:10.1007/s11101-009-9146-4
- Hashimoto, Y., Yamamoto, T., Fujiwara, S., Takagi, M., & Imanaka, T. (2001). Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain

B1001. *Journal of Bacteriology*, 183(17), 5050-5057. doi: 10.1128/JB.183.17.5050-5057.2001

He, D., Deng, P., Yang, L., Tan, Q., Liu, J., Yang, M., & Zhang, J. (2013). Molecular encapsulation of rifampicin as an inclusion complex of hydroxypropyl- β -cyclodextrin: design; characterization and in vitro dissolution. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 103, 580-5. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.062

Heinonen, M., Rein, D., Satué-Gracia, M. T., Huang, S. W., German, J. B., & Frankel, E. N. (1998). Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 917-922. doi: 10.1021/jf970826t

Higuchi T. & Connors, K. A. (1965). Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*. 4, 117.

Jelesarov, I., & Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, 12(1), 3-18. doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199901/02)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6

John Marshall, J., & Miwa, I. (1981). Kinetic difference between hydrolyses of γ -cyclodextrin by human salivary and pancreatic α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 661(1), 142-147. doi: 10.1016/0005-2744(81)90093-0

Jullian, C., Moyano, L., Yanez, C., & Olea-Azar, C. (2007). Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(1), 230-234. doi: 10.1016/j.saa.2006.07.006

Karshikoff, A. (2006). *Non-covalent interactions in proteins* (p. 1). London: Imperial College Press. 68-69

Kikugawa, M., Tsuchiyama, M., Kai, K., & Sakamoto, T. (2012). Synthesis of highly water-soluble feruloyl diglycerols by esterification of an *Aspergillus niger* feruloyl esterase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 615-622. doi:10.1007/s00253-012-4056-6

Klotz, I. M. (1997). *Ligand-receptor energetics: a guide for the perplexed*. John Wiley & Sons.

Konno, A., & Miyawaki, M. U.S. Citrus food containing a cyclodextrin. Patent No. 4,332,825. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 1982

- Kríz, Z., Koca, J., Imberty, A., Charlot, A., & Auzély-Velty, R. (2003). Investigation of the complexation of (+)-catechin by beta-cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 1(14), 2590-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12956082>
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Structural elucidation and molecular docking of ferulic acid from *Parthenium hysterophorus* possessing COX-2 inhibition activity. *3 Biotechnology*, 1-11. Doi: 10.1007/s13205-014-0253-6
- Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 167-180. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.055
- Lakowicz, J. R., & Masters, B. R. (2008). Principles of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 13(2), 9901. doi: 10.1117/1.2904580
- Lattanzio, V., De Cicco, V., De Venere, D., Lima, G., & Salerno, M. (1994). Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Italian Journal of Food Science*, 6(1), 23-30.
- Li, H., Xu, X., Liu, M., Sun, D. & Li, L. (2010). Microcalorimetric and spectrographic studies on host-guest interactions of α -, β -, γ - and M β -cyclodextrin with resveratrol. *Thermochimica Acta*, 510(1-2), 168-172. doi:10.1016/j.tca.2010.07.011
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J., & Chen, J. (2007). γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), 245-255. doi:10.1007/s00253-007-1166-7
- Li, Z., Chen, S., Gu, Z., Chen, J., & Wu, J. (2014). Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 35(2), 151-160. doi:10.1016/j.tifs.2013.11.005
- Liu, L., & Guo, Q. X. (2002). The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 42(1-2), 1-14. Doi: 10.1023/A:1014520830813
- Loftsson, T., Masson, M., & Brewster, M. E. (2004). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(5), 1091-1099. doi: 10.1002/jps.20047
- López, A. R. Ramírez de Lara, C. Rivero, L. Ruiz, A. E., Torres, Z. C. T. & Vicente, U. R. (2012). Aplicación de una nueva FAE en la liberación químico-enzimática de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha. *Ciencias agronómicas*, Revista XIX año 12, 21-25.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S.
- Marques, H. M., Hadgraft, J., & Kellaway, I. W. (1990). Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *International Journal of Pharmaceutics*, 63(3), 259-266. doi: 10.1016/0378-5173(90)90132-N
- Marques, H. M. C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313-326. doi: 10.1002/ffj.2019
- Mazzaferro, S., Bouchemal, K., Gallard, J.-F., Iorga, B. I., Cheron, M., Gueutin, C., & Ponchel, G. (2011). Bivalent sequential binding of docetaxel to methyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 171-80. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.06.034
- McMurry, J. (2001). Química Orgánica, 5ª. Edición, México, Ed. *International Thomson Editores, S.A. de C.V.* 127-131
- Mei, Q. S., & Lu, K. (2007). Melting and superheating of crystalline solids: from bulk to nanocrystals. *Progress in Materials Science*, 52(8), 1175-1262. doi: 10.1016/j.pmatsci.2007.01.001
- Menczel, J. D., & Prime, R. B. (2009). *Thermal analysis of polymers, fundamentals and applications*. John Wiley & Sons. 350-359
- Monti, D., Tampucci, S., Chetoni, P., Burgalassi, S., Saino, V., Centini, M. & Anselmi, C. (2011). Permeation and distribution of ferulic acid and its α -cyclodextrin complex from different formulations in hairless rat skin. *Aaps Pharmaceutics Science Technology*, 12(2), 514-20. doi:10.1208/s12249-011-9609-y
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds: a review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793-829. doi: 10.3390/pharmaceutics3040793
- Naidoo, K. J., Chen, J. Y. J., Jansson, J. L., Widmalm, G., & Maliniak, A. (2004). Molecular properties related to the anomalous solubility of β -cyclodextrin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(14), 4236-4238. doi: 10.1021/jp037704q
- Nirmal, N. P., & Benjakul, S. (2009). Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chemistry*, 116(1), 323-331. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.054

- Novotny, J., Bruccoleri, R. E., Davis, M., & Sharp, K. A. (1997). Empirical free energy calculations: a blind test and further improvements to the method. *Journal of Molecular Biology*, 268(2), 401-411. doi: 10.1006/jmbi.1997.0961
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269. doi:10.1002/jsfa.1873
- Ou, S., Luo, Y., Xue, F., Huang, C., Zhang, N., & Liu, Z. (2007). Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1298-1304. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.12.037
- Overhage, J., Steinbüchel, A., & Priefert, H. (2003). Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6569-6576. doi:10.1128/AEM.69.11.6569
- Palem, C. R., Chopparapu, K. S. C., Subrahmanyam, P. V. R. S., & Yamsani, M. R. (2012). Cyclodextrins and their derivatives in drug delivery: a review. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 6(3), 255-279. doi:ISSN 097-8916
- Ponce Cevallos, P. A., Buera, M. P., & Elizalde, B. E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 70-75. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.039
- Priefert, H., Rabenhorst, J., & Steinbüchel, A. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 296-314. doi: 10.1007/s002530100687
- Protein Data Bank. (2014). De RCSB Sitio web: <http://www.rcsb.org>
- Qi, A. D., Li, L., & Liu, Y. (2003). Molecular Binding Ability and Selectivity of Natural α -, β -, γ -Cyclodextrins and Oligo (ethylenediamino) Modified β -Cyclodextrins with Chinese Traditional Medicines. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 45(1-2), 69-72. doi: 10.1023/A:1023090109157
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (3), 289-304. doi:10.1002/1097-0010(200002)80:3
- Ramar, M., Manikandan, B., Raman, T., Priyadarsini, A., Palanisamy, S., Velayudam, M., & Vaseeharan, B. (2012). Protective effect of ferulic acid and resveratrol against

alloxan-induced diabetes in mice. *European Journal of Pharmacology*, 690(1), 226-235. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.05.019

Rayner, T. A., Mackevica, A., & Hansen, P. M. P. (2010). *Cyclodextrin and Bile Salt Interactions Using Isothermal Titration Calorimetry* (Doctoral dissertation).

Rosazza, J. P. N., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T., & Rousseau, B. (1995). Review: biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(6), 457-471. doi: 10.1007/BF01570016

Rui Zhou, Mohammad Wadud Bhuiya, Xianpeng Cai, Xiaodan Yu & Robert G. Eilerman. Methods of making vanillin via microbial fermentation utilizing ferulic acid provided by a modified caffeic acid 3-o-methyltransferase. Francia, PCT/US2013/078328 (C12P724), 3 Dic. 2013, 3 Jul. 2014.

Sapino^a, S., Trotta, M., Ermondi, G., Caron, G., Cavalli, R., & Carlotti, M. E. (2008). On the complexation of Trolox with methyl- β -cyclodextrin: characterization, molecular modelling and photostabilizing properties. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 62(1-2), 179-186. doi:10.1007/s10847-008-9454-0

Sapino^b, S., Carlotti, M. E., Caron, G., Ugazio, E., & Cavalli, R. (2008). In silico design, photostability and biological properties of the complex resveratrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63(1-2), 171-180. doi:10.1007/s10847-008-9504-7

Saulnier, L., & Thibault, J. F. (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 396-402. Doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<396

Satya Prakash & Jasmine Bhatena. Bioproduction of ferulic acid and uses thereof. Francia WO2008116319 A1 (A21D2/00, A61K38/46, A23L3/3463, C12N11/02, D21C9/10, C12G1/022, C12N9/16, A61K8/66, A61P31/00, C12P7/42, A23K1/165, C02F11/02), 27 Mar. 2007, 2 Oct. 2008.

Schrader, B. (Ed.). (2008). *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. John Wiley & Sons. 267-280

Singh, R., Bharti, N., Madan, J., & Hiremath, S. N. (2010). Characterization of cyclodextrin inclusion complexes-a review. *Journal Pharmaceutics Science Technology*, 2(3), 171-183.

Sivasankar, T., Antony Muthu Prabhu, A., Karthick, M., & Rajendiran, N. (2012). Encapsulation of vanillylamine by native and modified cyclodextrins: Spectral and computational studies. *Journal of Molecular Structure*, 1028, 57-67. doi:10.1016/j.molstruc.2012.06.025

- Steed, J. W., & Atwood, J. L. (2000). *Supramolecular Chemistry*. John Wiley & Sons. 321-334
- Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical reviews*, 98(5), 1743-1754.
- Szente, L., & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3), 137-142. doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.019
- Szente, L., & Szemán, J. (2013). Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host–Guest Type Molecular Recognition. *Analytical Chemistry*, 85(17), 8024-8030. doi: 10.1021/ac400639y
- Tada, Y., Tayama, K., & Aoki, N. (1999). Acute oral toxicity of ferulic acid, natural food additive, in rats. *Ann Rep Tokyo Metr Lab PH*, 50, 311-313.
- Takahashi, A. I., Veiga, F. J. B., & Ferraz, H. G. (2012). A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization-part ii: x-ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research*, 12(1). 16.
- Tsuchiyama, M., Sakamoto, T., Fujita, T., Murata, S., & Kawasaki, H. (2006). Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(7), 1071-1079. doi:10.1016/j.bbagen.2006.03.022
- Urbaniak, A., Szeląg, M., & Molski, M. (2013). Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1012, 33-40. doi:10.1016/j.comptc.2013.02.018
- Volonté, M. G., & Quiroga, P. (2013). Análisis farmacéutico. sedici.unlp.edu.ar
- Vyas, A., Saraf, S., & Saraf, S. (2008). Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 62(1-2), 23-42. doi: 10.1007/s10847-008-9456-y
- Wagner, B. D., & Fitzpatrick, S. J. (2000). A comparison of the host–guest inclusion complexes of 1, 8-ANS and 2, 6-ANS in parent and modified cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 38(1-4), 467-478. doi: 10.1023/A:1008198825835
- Wang, L., Zhong, C., Xue, P., & Fu, E. (2011). Fluorescent β -Cyclodextrins Modified by Isomeric Aminobenzamides: Synthesis, Conformational Analysis, and Fluorescent Behaviors. *The Journal of Organic Chemistry*, 76(12), 4874-4883. doi:10.1021/jo2007829

- Westcott, R. J., Cheetham, P. S. J., & Barraclough, A. J. (1993). Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the production of natural vanillin. *Phytochemistry*, 35(1), 135-138. doi: 10.1016/S0031-9422(00)90521-1
- Xiros, C., Moukouli, M., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2009). Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system. *Bioresource Technology*, 100(23), 5917-5921. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.018
- Zhang, M., Li, J., Jia, W., Chao, J., & Zhang, L. (2009). Theoretical and experimental study of the inclusion complexes of ferulic acid with cyclodextrins. *Supramolecular Chemistry*, 21(7), 597-602. doi:10.1080/10610270802596403
- Zhang, Q. F., Cheung, H. Y., Shanguan, X., & Zheng, G. (2012). Structure selective complexation of cyclodextrins with five polyphenols investigated by capillary electrokinetic chromatography. *Journal of separation science*, 35(23), 3347-3353. doi: 10.1002/jssc.201200528
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.039
- Zhao, M., Wang, H., Yang, B., & Tao, H. (2010). Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 120(4), 1138-1142. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.044