

Universidad Pública de Navarra
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Nafarroako Unibertsitate Publikoa
NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA

**EVALUACIÓN DEL USO DE CICLODEXTRINAS PARA EL CONTROL DE LA
DIFUSIÓN DE COMPONENTES ACTIVOS DESDE PELÍCULAS COMESTIBLES A
SISTEMAS ALIMENTARIOS**

presentado por:

Andoni Eguinoa Gallo

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS
AGROALIMENTARIAS**

*TEKNOLOGIA ETA KALITATEA INDUSTRIA AGROALIMENTARIOAN MASTER
UNIBERSITARIOA*



**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

**NEKAZARITZAKO INGENIERARIEN
GOI MAILAKO ESCOLA TEKNIKOA**

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER de MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y
CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS

**EVALUACIÓN DEL USO DE CICLODEXTRINAS PARA EL CONTROL DE
LA DIFUSIÓN DE COMPONENTES ACTIVOS DESDE PELÍCULAS
COMESTIBLES A SISTEMAS ALIMENTARIOS**

Trabajo Fin de Máster presentado por **Andoni Eguinoa Gallo** con el objetivo de optar al título de Máster Universitario en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias, siendo sus directores Dr. Juan Ignacio Maté Caballero y Dra. Carmen Barba González-Albo, del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Pública de Navarra.

El director del Trabajo

La directora del Trabajo

El alumno

Dr. Juan Ignacio Maté Caballero Dra. Carmen Barba González-Albo Andoni Eguinoa Gallo

1. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS	1
Esquema: Objetivos y Plan de trabajo.....	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES	4
2.1.1. Recubrimientos comestibles.....	4
2.1.2. Recubrimientos comestibles activos.....	6
2.1.2.1. Compuestos antimicrobianos.....	6
2.1.2.2. Compuestos bioactivos y antioxidantes.....	7
2.1.2.3. Compuestos colorantes y estabilizantes.....	7
2.1.3. Liberación de compuestos activos en recubrimientos.....	7
2.2. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINA	8
2.2.1. Tecnologías de encapsulación.....	9
2.2.1.1. Complejos de inclusión con α -, β -, y γ -ciclodextrina.....	10
2.2.1.2. Spray-drying.....	11
2.2.1.3. Extrusión.....	12
2.2.1.4. Coacervación.....	13
2.2.2. Ventajas de la formación de complejos de inclusión con α -, β - y γ -ciclodextrina.....	14
2.2.2.1. Liberación controlada.....	14
2.2.2.2. Solubilidad y biodisponibilidad.....	15
2.2.2.3. Protección contra las altas temperaturas y luz ultravioleta.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	17
3.1.1. Preparación de recubrimientos de WPI con eugenol y carvacrol.....	17
3.1.2. Preparación de recubrimientos de WPI con complejos de inclusión de eugenol y carvacrol con β -ciclodextrina.....	19
3.1.3. Análisis de la liberación de compuestos activos en recubrimientos.....	20
3.2. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINA	24
3.2.1. Obtención de complejos de inclusión mediante métodos químicos.....	24
3.2.1.1. Agente encapsulante: α -, β - y γ -ciclodextrina.....	25
3.2.1.2. Agente activo: eugenol y carvacrol.....	26
3.2.2. Secado de complejos de inclusión mediante spray-drying.....	27
3.2.3. Análisis de la eficacia de la retención de los complejos de inclusión.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINA	31
4.1.1. Cálculo del rendimiento de secado mediante spray-drying.....	31
4.1.2. Cálculo de la eficacia de la retención del agente activo en ciclodextrina.....	34
4.2. FORMACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES	39
4.2.1. Caracterización de recubrimientos.....	39
4.2.2. Determinación de las cinéticas de liberación de compuestos activos.....	42
4.2.2.1. Liberación de eugenol y carvacrol en recubrimientos de WPI.....	43
4.2.2.2. Liberación de β -ciclodextrina: eugenol y β -ciclodextrina: carvacrol en recubrimientos de WPI.....	45
5. CONCLUSIONES	47
6. BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXO 1	50

1. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

El trabajo desarrollado durante el proyecto fin de máster, se enmarca dentro del desarrollo de nuevas películas y/o recubrimientos comestibles para la mejora de la calidad, así como de la vida útil de unos determinados alimentos.

En concreto, se han llevado a cabo **películas/recubrimientos** de proteína de suero de leche (WPI, *whey protein isolate*) que se caracterizan por sus buenas propiedades (transparentes, inodoros, insípidos) y ser excelentes barreras frente al oxígeno. Éstos se han empleado como soporte de aditivos antimicrobianos, en concreto de compuestos mayoritarios activos de aceites esenciales.

Los **aceites esenciales** están formados por lípidos simples y multitud de compuestos volátiles, que constan de numerosos compuestos con diferentes polaridades, concentraciones y volatilidades. Entre ellos, una parte importante lo forma la familia de los terpenos, en concreto monoterpenos, como eugenol y carvacrol. Para éstos la actividad antimicrobiana descrita en la bibliografía es elevada. Sin embargo, se descomponen con facilidad bajo la acción del aire, la luz y el calor. Éstos presentan una alta volatilidad, por lo que su captura y estabilidad es compleja. Además la difusión del recubrimiento al alimento debe ser optimizada, ya que ésta debe ser controlada y continua a lo largo del tiempo.

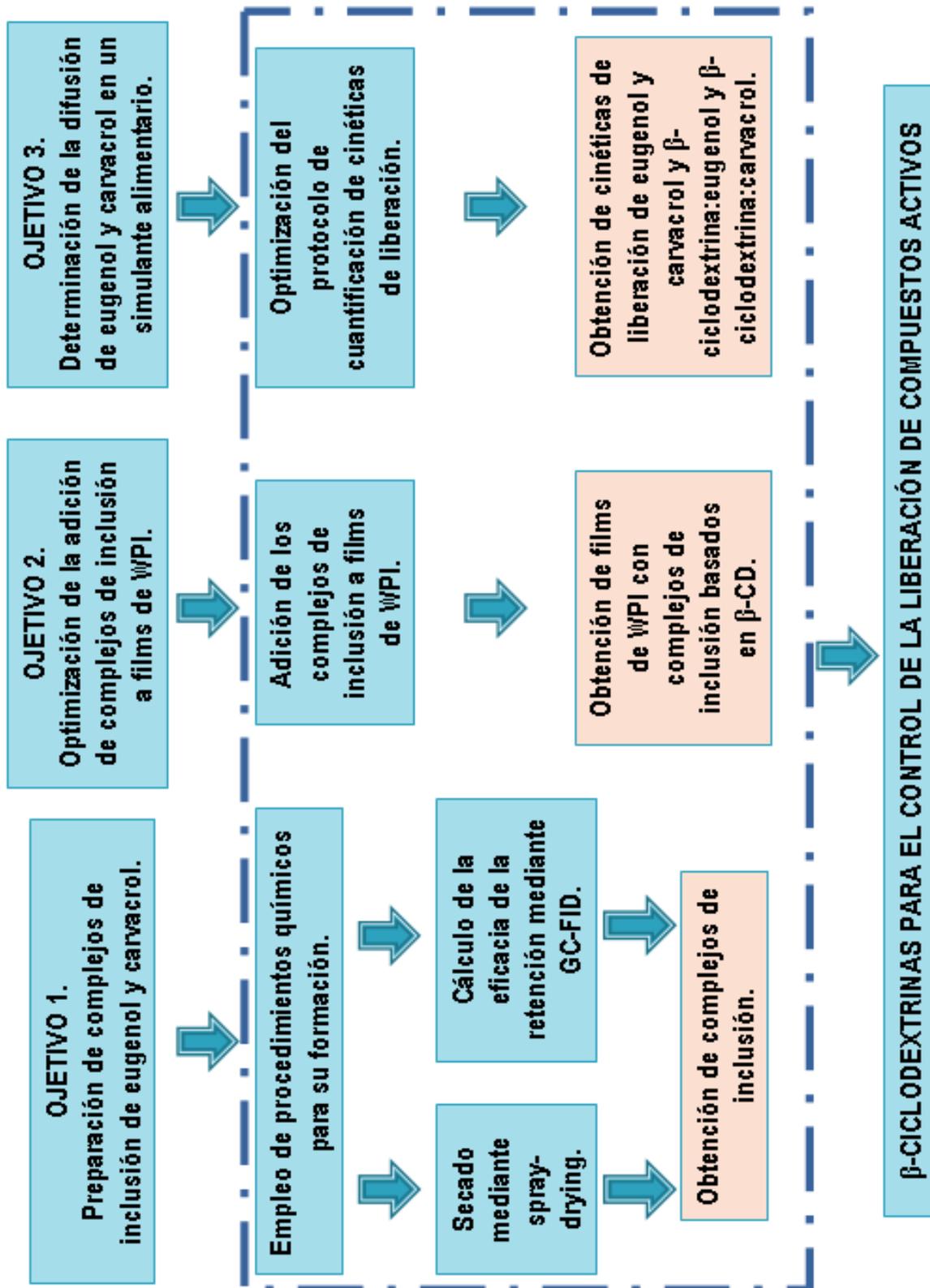
La **encapsulación** de compuestos activos para la posterior adición a recubrimientos permite actuar sobre la interacción entre el agente activo y el recubrimiento y, por tanto, entre el recubrimiento y el alimento. Una estrategia interesante para actuar sobre la difusión de los compuestos activos es la formación de **complejos de inclusión** con **ciclodextrinas**, debido a sus particulares características. Las ciclodextrinas son oligosacáridos formados por unidades de α -D-(+)-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces 1,4-glucosídicos. Dependiendo de si tienen seis, siete u ocho unidades se denominan α -, β - y γ - ciclodextrina, respectivamente. Se obtienen fácilmente por la acción de la amilasa de *Bacillus macerans* sobre el almidón. Tienen forma de toroide cónico con los grupos OH secundarios (correspondientes a los carbonos 2 y 3 de la glucosa) en la cara más ancha, los grupos OH primarios (correspondientes al carbono 6) en la cara opuesta y los H orientados hacia el interior de

la cavidad. Por tanto, tienen una cavidad hidrófoba y una parte externa hidrófila. Este hecho hace que sean capaces de formar complejos de inclusión con el eugenol y carvacrol, moléculas esencialmente apolares y de un tamaño idóneo, para la interacción denominada *host-guest*. Dicha interacción puede mejorar la estabilidad del carvacrol y eugenol. Además es capaz de actuar en el equilibrio *recubrimiento-aditivo*, ralentizando y controlando su difusión por el efecto, entre otros, de la diferente solubilidad de los encapsulados respecto al aditivo sin encapsular.

Bajo estas circunstancias, el **objetivo concreto** del trabajo es evaluar el empleo de las ciclodextrinas como agentes encapsulantes de compuestos activos para retardar su difusión en un determinado simulante alimentario. El **plan de trabajo** incluye: **a)** preparación de complejos de inclusión de eugenol y carvacrol en α -, β - y γ -ciclodextrina y cuantificación de la eficiencia de la retención; **b)** optimización de la adición de los complejos de inclusión en películas/recubrimientos comestibles de WPI; **c)** evaluación de la liberación de eugenol y carvacrol (encapsulado y sin encapsular) del recubrimiento de WPI a un simulante alimentario.

A continuación, se muestra un esquema con los objetivos y el plan de trabajo desarrollado.

Esquema: Objetivos y plan de trabajo



2. INTRODUCCIÓN

2.1. RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES

Los recubrimientos biodegradables y comestibles han sido empleados durante siglos para evitar la pérdida de ciertos alimentos como las frutas, creando películas de cera sobre su piel y evitando así la pérdida de agua o la podredumbre. Los términos recubrimiento y película se usan indistintamente para indicar que la superficie de un alimento está recubierta por una cubierta relativamente fina de un material de una determinada composición (Pavlath A.E., 2009).

2.1.1. Recubrimientos comestibles

Un recubrimiento comestible se puede definir como una fina capa de un material comestible que generalmente se distribuye sobre la superficie de un alimento para aportar una mejora en su calidad y/o aumentar su vida útil (Krochta y col., 1997).

Los materiales que se suelen emplear para formar películas o recubrimientos comestibles son biopolímeros. Generalmente están basados en proteínas (e.j.: colágeno, gelatina, zeína de maíz, gluten de trigo, proteína de soja, proteínas de la leche, etc.), y los basados en polisacáridos (e.j.: almidón, quitosano, celulosa, etc.). También se emplean lípidos, que aunque no son biopolímeros son capaces de formar una capa bien adherida con muchos alimentos o una mezcla de todos ellos (proteínas, polisacáridos y lípidos). En la **Figura 1a)** se muestran los materiales empleados para formar recubrimientos comestibles. Además, es muy frecuente añadir ciertos aditivos que aporten cohesión, adhesión o estabilidad a los recubrimientos o películas u otros compuestos que puedan aportar una funcionalidad añadida (**Figura 1b)** (Fernández-Pan I., Maté J., 2011).

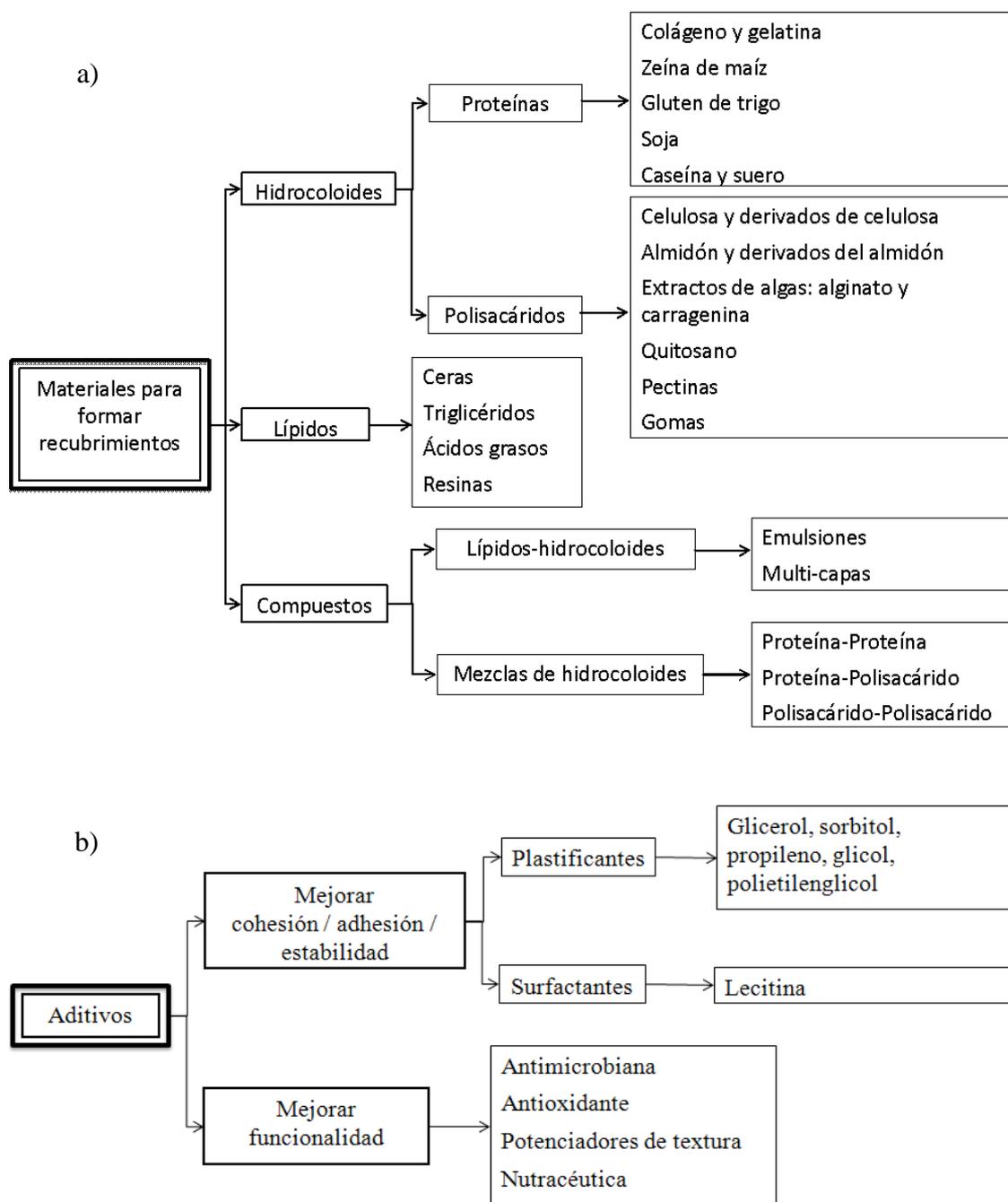


Figura 1. Materiales empleados para la elaboración de recubrimientos comestibles.

Hasta el momento, las aplicaciones de los recubrimientos comestibles en la industria alimentaria se han centrado principalmente en: controlar la transferencia de materia para, por ejemplo, evitar la deshidratación en la superficie de un alimento; ser

portador de ingredientes y/o aditivos como prebióticos o antioxidantes para dar un valor añadido al alimento; controlar la superficie de determinados alimentos con la adición de compuestos antimicrobianos para aumentar su vida útil; proteger física y mecánicamente de, por ejemplo, la presión o el impacto al alimento; así como provocar una mejora en el análisis sensorial, como, por ejemplo, con el empleo de ciertas ceras para aumentar el brillo de determinados alimentos (*Embuscado M.E. y col. 2009*).

2.1.2. Recubrimientos comestibles activos

Los recubrimientos comestibles activos son aquellos que además de las ventajas propias que aporta un determinado recubrimiento al alimento, permiten añadir ingredientes funcionales o aditivos para mejorar la calidad, estabilidad y seguridad del alimento (*Han J.H. y Col., 2005*). Estos ingredientes incluyen antioxidantes, antimicrobianos, nutraceuticos, probióticos, colorantes, aromas, etc.

Entre estos cabe destacar aquellos recubrimientos comestibles con agentes antimicrobianos que permiten aumentar la vida útil del alimento al protegerlo de la degradación por parte de los microorganismos y los niveles de toxinas que éstos pueden implicar en su desarrollo. También es frecuente el empleo de compuestos antioxidantes que evitan, por ejemplo, la degradación de ciertas proteínas por la acción del oxígeno. Sin embargo, en muchos casos los aditivos no poseen una única función sino que pueden actuar a la vez como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes y saborizantes.

2.1.2.1. Compuestos antimicrobianos

Los compuestos antimicrobianos para aplicaciones en recubrimientos más empleados son los aceites esenciales (canela, orégano, clavo, tomillo, etc.) y los ácidos orgánicos (ácido tartárico, ácido cítrico, etc.). Son compuestos que no actúan sobre el medio, sino que actúan principalmente sobre las células bacterianas de los microorganismos, dañando la membrana y desnaturalizando las proteínas de ésta. Esto ocasiona una alteración del medio interno de las células de los microorganismos y las mata o invalida, evitando el momento de crecimiento exponencial que poseen los microorganismos (*Rojas Graü M.A, y col. 2012*).

2.1.2.2. Compuestos bioactivos y antioxidantes

Son aquellos que actúan en beneficio de nuestro organismo una vez ingeridos (compuestos bioactivos) o evitan la degradación de ciertos compuestos en el alimento por efecto del oxígeno (compuestos antioxidantes). Dentro de este grupo los más empleados son los fenoles, los glucosinolatos y ciertos ácidos orgánicos con efecto antioxidante, como el ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico y ácido tartárico (*Rojas Graü M.A, y col. 2012*).

2.1.2.3. Compuestos colorantes y estabilizantes

Son aquellos que actúan sobre el alimento, provocando cambios de color al añadir unos pigmentos característicos o fijando el color (colorantes). Los estabilizantes interaccionan sobre la textura del alimento y proporcionan ciertos cambios a éste (gelificantes, espesantes y emulsionantes) o manteniendo la textura que ya poseé (estabilizantes). Dentro del grupo de los colorantes son muy empleados los carotenoides (pigmentos de color rojizo o amarillento ya empleados como colorantes). Los estabilizantes más empleado son los fosfatos, los cuales actúan evitando la pérdida de agua de los alimentos (*Rojas Graü M.A, y col. 2012*).

2.1.3. Liberación de compuestos activos en recubrimientos

Los recubrimientos comestibles intervienen en las propiedades de transporte entre la matriz que éstos forman y el alimento, por lo que pueden desempeñar un papel muy importante al reducir, mejorar, ralentizar o permitir el intercambio de determinadas sustancias al alimento (*Barbosa-Cánovas G.V., 2012*).

El hecho de que un compuesto sea añadido al alimento de forma directa (sin el empleo de recubrimientos), conlleva que dicha sustancia pueda ser neutralizada por el alimento (pH u otros factores como la humedad) o absorbida por éste (eliminando sus posibles beneficios para la salud o el alimento), además de poder aportar ciertos olores, sabores o matices indeseados al alimento, por estar dicho aditivo en una concentración excesiva sobre la superficie de éste. Por estas razones, el control de la liberación de determinados compuestos activos desde la matriz de un recubrimiento a un alimento, es algo de interés en la industria alimentaria.

El empleo de recubrimientos, hace que la liberación de los compuestos activos que se encuentran en la matriz de ésta sea en general más lenta, aportando así el aditivo de una forma más pausada y evitando los efectos no buscados que algunos aditivos pueden aportar al alimento.

Sin embargo, en ocasiones esta liberación más lenta no es suficiente por lo que una alternativa interesante es emplear recubrimientos con compuestos activos previamente encapsulados que intervienen en el equilibrio *recubrimiento-aditivo*, ralentizando y controlando la difusión.

2.2. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINA

A continuación se detallarán los diversos modos de encapsulación con biomoléculas. Es importante destacar que dependiendo del tipo de encapsulación se puede actuar sobre el mecanismo de liberación del compuesto activo. Por ejemplo, los diferentes mecanismos implicados pueden basarse en la difusión, la degradación o la disolución de la matriz, o las interacciones químicas (ver **Figura 2**). Para abordar el objetivo planteado en el trabajo de retardar la liberación de compuestos activos en un simulante alimentario, se escogió la posibilidad de formar complejos de inclusión de compuestos activos con ciclodextrina, en el que en la liberación intervendrán interacciones químicas y equilibrio químico.



Figura 2. Mecanismos de liberación: (a) enlace químico, disolución; (b) degradación, disolución, dispersión, adsorción; (c) adsorción físico/química, enlaces químicos, deposición capa a capa; (d) coacervación, encapsulación; (e) atrapamiento.

2.2.1. Tecnologías de encapsulación

De manera general, los procesos de encapsulación pueden llevarse a cabo usando los métodos que se muestran en la **Figura 3**, bien quedando incluidos en el interior (**Figura 3a**) de una matriz o quedando atrapados en una matriz polimérica (**Figura 3b**). Estos métodos de encapsulación se emplean para muchas aplicaciones (Zuidam N.J., y col., 2010). El sistema de protección de ambos métodos es muy diferente, con mucha más eficiencia como barrera de protección aquella que queda incluida en el interior de un material, sin embargo la otra tiene menos coste y la difusión es más rápida (**Figura 3c**). Así que en el trabajo llevado a cabo se ha empleado una mezcla de las dos, ya que se han encapsulado los compuestos activos en ciclodextrina para posteriormente atraparlos en una matriz polimérica de WPI (**Figura 3d**), con la intención de aunar los beneficios que cada una de ellas aporta.

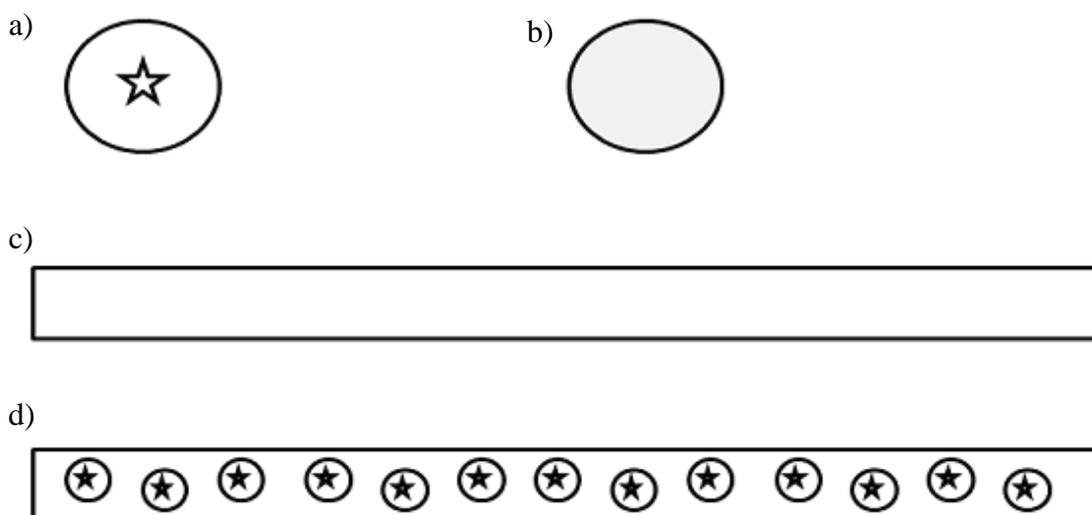


Figura 3. a) Encapsulación, b) matriz, c) recubrimiento de matriz y d) recubrimiento con compuestos encapsulados.

2.2.1.1. Complejos de inclusión con α -, β -, y γ -ciclodextrina

Como se mencionó en el apartado de **Presentación y Objetivos** Las ciclodextrinas son oligosacáridos formados por unidades de α -D-(+)-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces 1,4-glucosídicos, dependiendo de si tienen seis, siete u ocho unidades se denominan α -, β - y γ - ciclodextrina, respectivamente (**Figura 4**). Se obtienen fácilmente por la acción de la amilasa de *Bacillus macerans* sobre almidón. Tienen forma de toroide cónico con los grupos OH secundarios (correspondientes a los carbonos 2 y 3 de la glucosa) en la cara más ancha, los grupos OH primarios (correspondientes al carbono 6) en la cara opuesta y los H orientados hacia el interior de la cavidad. Por tanto, tienen una cavidad hidrófoba y una parte externa hidrófila. Este hecho hace que sean capaces de formar complejos de inclusión con moléculas esencialmente apolares y de un tamaño idóneo, para la interacción denominada *host-guest* (Martínez G., y col, 2007).

Por lo tanto como consecuencia de los grupos OH situados en el exterior de la superficie de los anillos, las ciclodextrinas son hidrófilas y solubles en agua; y su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos OH con el medio acuoso, siendo curiosamente mayor la solubilidad en agua para la γ -ciclodextrina y la α -ciclodextrina que para la β -ciclodextrina. De la misma forma, las ciclodextrinas son solubles en disolventes apróticos (sin enlaces O-H o N-H) fuertemente polares, como el di-metil-sulfóxido y la di-metil-formamida. Otras características son que son estables en disoluciones neutras y básicas, pero se degradan lentamente en pH ácido. Además, en estado sólido y por debajo de los 200°C no se degradan (Martínez G., y col, 2007).

Las ciclodextrinas son bien conocidas por su habilidad para formar los complejos de inclusión. Los complejos de inclusión son compuestos estables que se forman entre ciclodextrinas y ciertos compuestos que tanto por su tamaño como por su polaridad son estables en el interior de su cavidad, debido a que se favorecen las interacciones entre los H orientados hacia el interior de la cavidad. Por esta razón se han empleado para encapsular aromas u otros compuestos que se busca estabilizar, aumentar su biodisponibilidad, intervenir en la difusión o incluso enmascarar su olor. Por eso son muy empleadas tanto en la industria farmacéutica como alimentaria y tanto la α -, β - y γ -

ciclodextrina están aceptadas en el *codex alimentarius* y nombradas como E-457, E-458 y E-459 siguiendo el orden de las ciclodextrinas mencionadas (*GSFA online*).

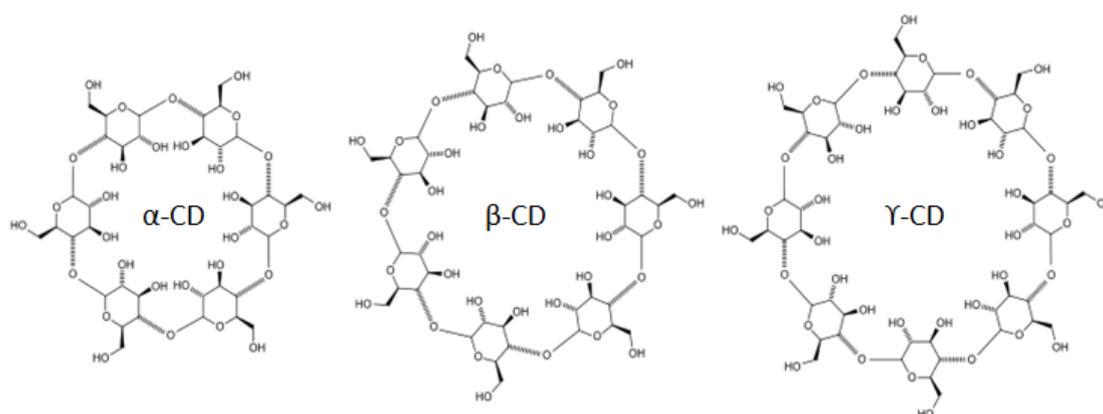


Figura 4. Estructura química de las diferentes ciclodextrinas.

2.2.1.2. Spray-drying

Es la técnica más empleada para encapsular en la industria. Generalmente, se lleva a cabo mediante el empleo del compuesto a encapsular (un 20% del peso seco), la matriz de encapsulación (un 80% del peso seco), y un solvente generalmente agua (un 50% del peso húmedo). La disolución o emulsión es atomizada encontrándose con una corriente de aire caliente por lo que se produce una evaporación de los compuestos más solubles en agua muy rápida (**Figura 5**), quedando atrapados en su interior aquellos que son menos solubles y, por tanto, formando cápsulas.

Los materiales más empleados para encapsular son, por ejemplo, maltodextrinas, jarabe de maíz, almidones modificados y goma acacia (*Reineccius G.A., 2009*).

No obstante, cabe destacar que como se resaltaré en el apartado de **Materiales y métodos**, en el trabajo desarrollado el proceso de spray-drying se emplea como método de secado, pero no de formación de compuestos encapsulados.

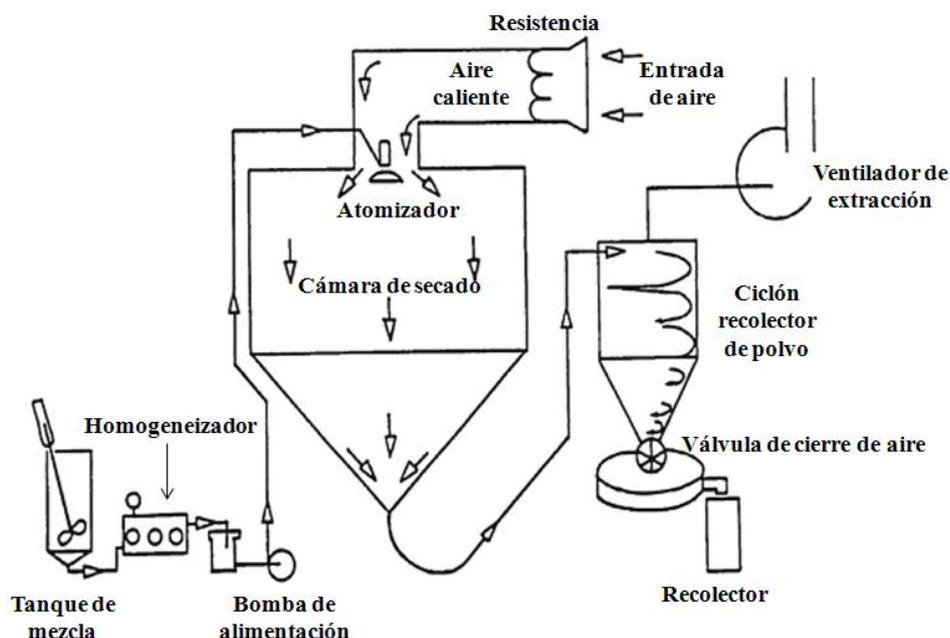


Figura 5. Procedimiento de encapsulación de spray-drying.

2.2.1.3. Extrusión

El proceso de extrusión consiste en una emulsión inicial elaborada con carbohidratos fundidos de baja humedad (alrededor de un 15%) y aditivos (10-20% de peso en base seca), para después extruir la masa fundida resultante a través de una boquilla a baja presión (**Figura 6**).

Los materiales de encapsulación empleados en estos procesos han de tener unas características y requerimientos semejantes a aquellos a utilizar en la tecnología del spray-drying. Es favorable para el proceso que la matriz de encapsulación sea soluble, incluso concentraciones elevadas de sólidos (>85%) y estable a altas temperaturas (superiores a 110°C) (*Reineccius G.A., 2009*).

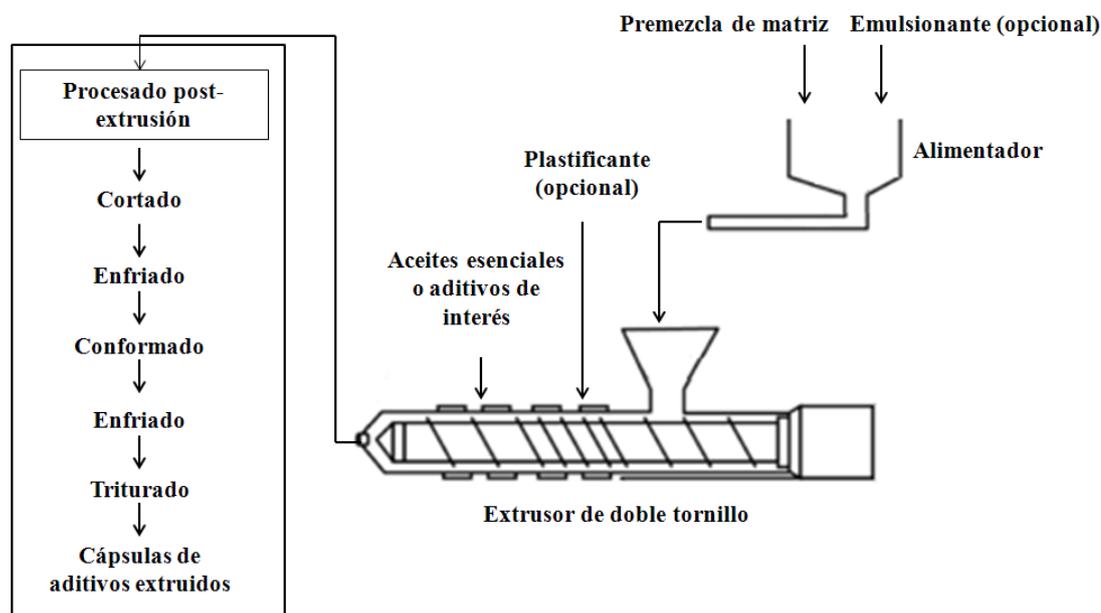


Figura 6. Procedimiento de encapsulación por extrusión.

2.2.1.4. Coacervación

La coacervación se basa en el empleo de hidrocoloides (uno poli-catiónico y otro poli-aniónico), los cuales interactúan entre sí a través de un enlace iónico para formar un complejo entre ellos. Este complejo se forma en la superficie de las gotas hidrofóbicas (que pueden ser aromas u otros aditivos), que actúan como una pared protectora o cápsula. En un primer paso, se disuelve uno de los hidrocoloides y los aditivos en agua, formándose una emulsión. En teoría las gotas de la emulsión son extremadamente pequeñas (nanométricas o micrométricas). Después se añade a la mezcla el segundo de los hidrocoloides. El sistema se ajustará a un pH para que los hidrocoloides tengan carga neta opuesta. Al enfriarse la emulsión, éste toma una textura semejante al gel (ver **Figura 7**). Es entonces cuando los hidrocoloides interactúan con enlaces iónicos para formar finalmente una pared que envuelven los aditivos añadidos, quedando encapsulados (*Reineccius G.A., 2009*).

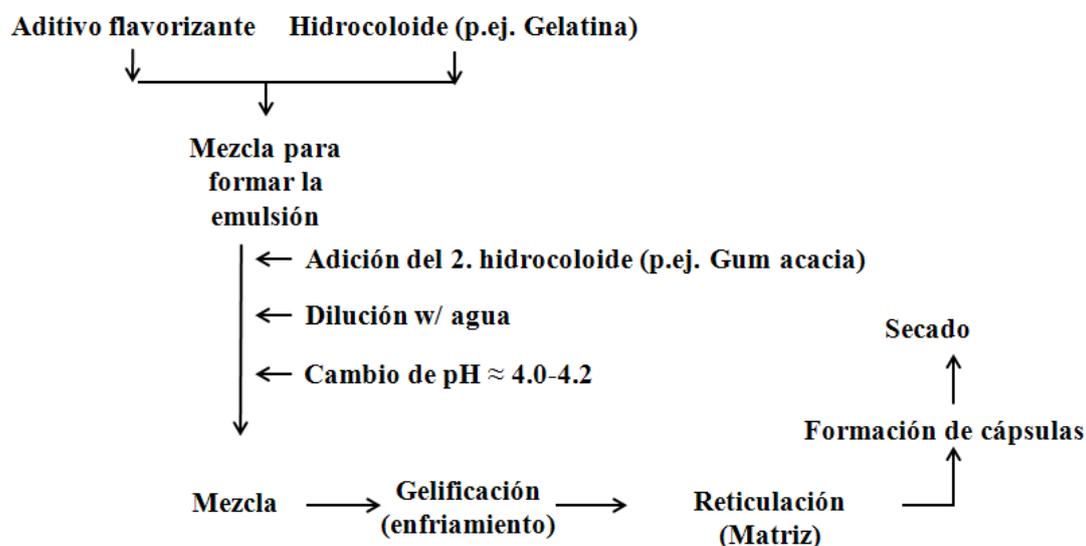


Figura 7. Procedimiento de encapsulación por coacervación.

2.2.2. Ventajas de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrina

Las ventajas más destacadas en la bibliografía del empleo de ciclodextrinas para formar complejos de inclusión se basan en la posibilidad que éstas ofrecen para aumentar la biodisponibilidad de algunos compuestos, intervenir en la liberación controlada de determinados analitos, aumentar su estabilidad e incluso evitar o enmascarar olores indeseables (Ayala Zavala J.Z., 2012).

2.2.2.1. Liberación controlada

Al entrar un complejo de inclusión en contacto con el agua, se da una debilitación de las interacciones entre el compuesto y la ciclodextrina que conlleva la liberación del aditivo al medio. A baja humedad, tiende a darse una baja liberación de los compuestos alimentarios, aunque depende en gran medida de la interacción *host-guest*, entre el aditivo y la ciclodextrina. El principal iniciador de la liberación puede ser la hidrofobicidad del compuesto activo, cuando el agua empieza a interactuar y penetrar al complejo, iniciando el huésped su migración hacia un medio más conveniente para sus características.

El control de la difusión de los aditivos alimentarios es una de las principales ventajas de encapsulación. Modificando parámetros como humedad, temperatura, cambios en pH y ruptura mecánica de la cápsula entre otros, puedes intervenir en la liberación controlada. Ello permite una mayor calidad y asegurar la inocuidad o funcionalidad del alimento (Ayala Zavala J.Z., 2012).

2.2.2.2. Solubilidad y biodisponibilidad

La solubilidad de los aditivos añadidos a un alimento depende del carácter hidrófilo/hidrófobo que tengan los aditivos, así como el alimento. A pesar de ello, el principal problema que poseen las industrias alimentarias a la hora de aplicar los aditivos, es la incompatibilidad entre la solubilidad de ciertos aditivos y determinados alimentos, lo cual llega a causar problemas como pueden serlo la aparición de grumos, precipitados y separaciones de fases entre el alimento y el aditivo (Ayala Zavala J.Z., 2012).

Otra de las aplicaciones de la encapsulación más empleada es la de mejorar la solubilización de los aditivos hidrófobos. Un gran número de aditivos alimentarios posee un carácter altamente hidrófobo, destacando dentro de este grupo los aceites esenciales o aditivos de origen lipídico, los cuales al ser añadidos a alimentos con alto contenido de agua tienden a formar una separación de fases. La aplicación de estos compuestos ya encapsulados permiten una mezcla de los aditivos en el alimento de manera efectiva, al aumentar la solubilidad de los aditivos en los compuestos hidrófilos o acuosos. La encapsulación también posibilita una solubilización contraria, mezclándose aditivos hidrófilos en alimentos aceitosos o hidrófobos (Ayala Zavala J.Z., 2012).

Por otro lado la biodisponibilidad es la parte del nutriente que el cuerpo digiere, absorbe y utiliza en sus funciones fisiológicas. Esta biodisponibilidad puede variar entre el 0% y el 100% por diversos factores: la concentración y el tipo de nutriente, la interacción de éste con los otros nutrientes presentes en la dieta, el estado nutricional de la persona y el estado del alimento con el cual se consume. Hoy en día se busca identificar alimentos, sustancias y aditivos donde la biodisponibilidad de sus nutrientes sea lo más alta posible para que las personas que los consuman tengan un máximo

aporte de los mismos (*CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical; ¿Qué es la biodisponibilidad?*).

Ciertos aditivos pueden ser destruidos fácilmente durante la ruta digestiva, por lo que llevar a cabo una encapsulación de dichos aditivos permite aumentar la biodisponibilidad de éstos (*CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical; ¿Qué es la biodisponibilidad?*).

2.2.2.3. Protección contra las altas temperaturas y luz ultravioleta

La mayoría de los aditivos alimentarios son sensibles a los tratamientos de secado, extrusión, horneado, pasteurización y almacenamiento por las altas temperaturas alcanzadas. Dichos tratamientos son necesarios en muchos procesos de la industria alimentaria, pero pueden degradar los aditivos o hacerles perder su capacidad funcional.

Ciertos aditivos como los aromas y saborizantes tienen alta volatilidad a temperatura ambiente (por ejemplo de los aceites esenciales). La encapsulación de los compuestos o aditivos en ciclodextrina, permite una protección de los compuestos aromatizantes en especial, manteniendo así éstos la estabilidad y con ello su capacidad funcional durante los tratamientos térmicos o el alcance de las temperaturas críticas.

Además de las temperaturas, ciertos aditivos son sensibles a la luz, destacando entre los compuestos más sensibles las vitaminas y los antioxidantes. La encapsulación de los aditivos permite ofrecer una matriz protectora frente a la luz ultravioleta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Para cuantificar la liberación de eugenol y carvacrol así como la liberación de los mismos compuestos encapsulados en β -ciclodextrina se realizaron films de WPI siguiendo los procedimientos parcialmente modificados previamente descritos por *McHugh y Krochta (1994)* y *Fernández-Pan y col. (2012)*.

3.1.1. Preparación de recubrimientos de WPI con eugenol y carvacrol

Para la formación de los recubrimientos de WPI con eugenol y carvacrol se emplearon los siguientes materiales: WPI (Davisco Food International, Le Sueur, MN, USA); glicerol (Panreac Química, Barcelona, Spain); agua destilada (obtenida con el equipo Wasserlab, Navarra, Spain); carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol, $C_{10}H_{14}O$; P_m , 150.22; punto de ebullición, 3 – 4°C; 98% pureza); eugenol (2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenol, $C_{10}H_{12}O_2$; P_m , 164.20; punto de ebullición, -12 - -10°C; 98% pureza).

La metodología que a continuación se detalla se llevó a cabo para formar films de eugenol o carvacrol. La solución para la formación de los films, se preparó con soluciones acuosas con un 10% (w/w) de WPI, un 5% (w/w) de glicerol como plastificante y un 5% (w/w) de compuesto activo. La mezcla se realizó en un matraz mediante la mezcla de la proteína (10 g), el glicerol (5 g) y el agua destilada (80 g), **(Figura 8)**.

La mezcla se agitó en una placa con agitador magnético, posteriormente se introdujo el matraz en un baño a 90°C con agitación (33 rpm) durante 30 minutos, provocando la desnaturalización de la proteína aislada de suero de leche. La adición del eugenol o carvacrol se realizó tras someterse a la desnaturalización, para evitar la degradación o desaparición de los compuestos activos debido a la alta volatilidad del eugenol y carvacrol.

Las mezclas se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de añadirles los compuestos activos (5 g) a cada matraz. El tiempo de enfriamiento fue breve, pues el glicerol favorece la solidificación de la mezcla en el matraz. Posteriormente, se

homogeneizó la mezcla mediante ultrasonidos (cámara Hielscher UP400S) a la máxima amplitud de onda y durante un periodo de 5 minutos. Las muestras se metieron en una bandeja con hielo para evitar el calentamiento de las mismas y la posible pérdida o degradación de los compuestos activos.

Después, se vertieron las mezclas formadoras de films sobre las placas petri de vidrio de 13,5 cm de diámetro (evitándose la presencia de burbujas de aire). La muestra añadida se pesó (14 g) para obtener el mismo grosor en todos los recubrimientos. Finalmente se dejaron sobre una superficie nivelada durante 24 horas y una humedad ambiental (próxima al 45%) para obtener finalmente los films.

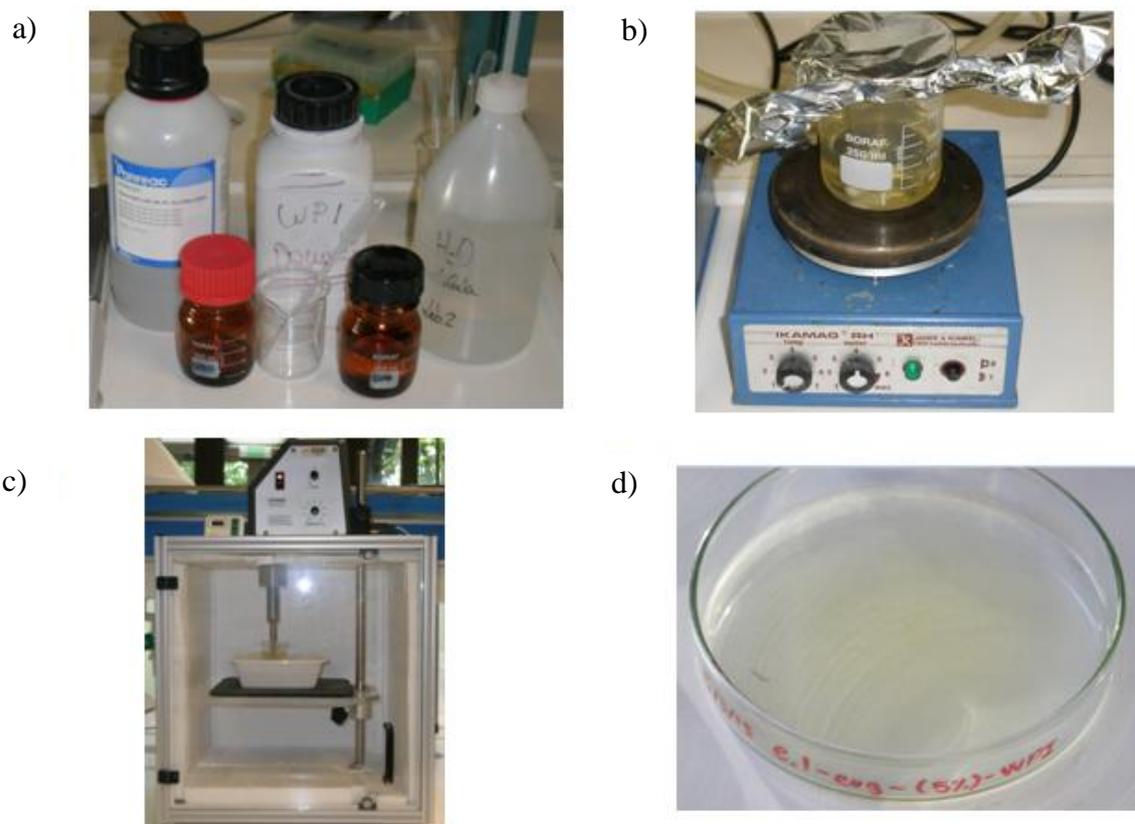


Figura 8. Imagen de: a) materiales empleados en la encapsulación de eugenol y carvacrol; b) mezcla previa a la desnaturalización; c) eliminación de aire y homogeneización mediante ultrasonidos; d) secado de los films.

3.1.2. Preparación de recubrimientos de WPI con complejos de inclusión de eugenol y carvacrol con β -ciclodextrina

Previo a la preparación de los films de WPI y eugenol o carvacrol encapsulados en ciclodextrina, se estudió la capacidad de encapsulación de tres ciclodextrinas diferentes, empleándose finalmente la β -ciclodextrina debido a que mostró la mayor eficiencia en la retención. Por esta razón se emplearon los complejos de inclusión β -ciclodextrina:eugenol y β -ciclodextrina:carvacrol preparados en el laboratorio.

Para la formación de los recubrimientos de WPI con complejos de inclusión de eugenol y carvacrol se emplearon los siguientes materiales: WPI (Davisco Food International, Le Sueur, MN, USA); glicerol (Panreac Química, Barcelona, Spain); agua destilada (obtenida con el equipo Wasserlab, Navarra, Spain); complejos de inclusión (elaborados en el laboratorio).

La metodología detallada a continuación se llevó a cabo para formar films de complejos de inclusión de eugenol o carvacrol. La solución para la formación de los films, se preparó con soluciones acuosas con un 10% (w/w) de WPI, un 5% (w/w) de glicerol como plastificante y un 8% (w/w) de compuesto activo encapsulado en β -ciclodextrina en el caso del eugenol, y un 5% (w/w) en el caso del carvacrol. La mezcla se realizó en un matraz mediante la mezcla de la proteína (10 g), el glicerol (5 g) y el agua destilada (77 g para eugenol y 80 g para carvacrol).

La mezcla se agitó en una placa con agitador magnético, posteriormente se introdujo el matraz en un baño a 90°C con agitación (33 rpm) durante 30 minutos, provocando la desnaturalización de la proteína aislada de suero de leche. Las mezclas se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de añadirles los compuestos activos β -ciclodextrina:eugenol (8 g) o β -ciclodextrina:carvacrol (5 g) a cada matraz. El tiempo de enfriamiento fue breve, pues el glicerol favorecía la solidificación de la mezcla en el matraz. Posteriormente, se eliminaron las burbujas de aire mediante vacío como se muestra en la **Figura 9**. Después, se vertieron las mezclas formadoras de films sobre las placas de petri de vidrio de 13,5 cm de diámetro (evitándose la presencia de burbujas de aire). La muestra añadida se pesó (14 g) para obtener el mismo grosor en los films.

Finalmente se dejaron sobre una superficie nivelada durante 24 horas y una humedad ambiental (próxima al 45%) para obtener finalmente los films.

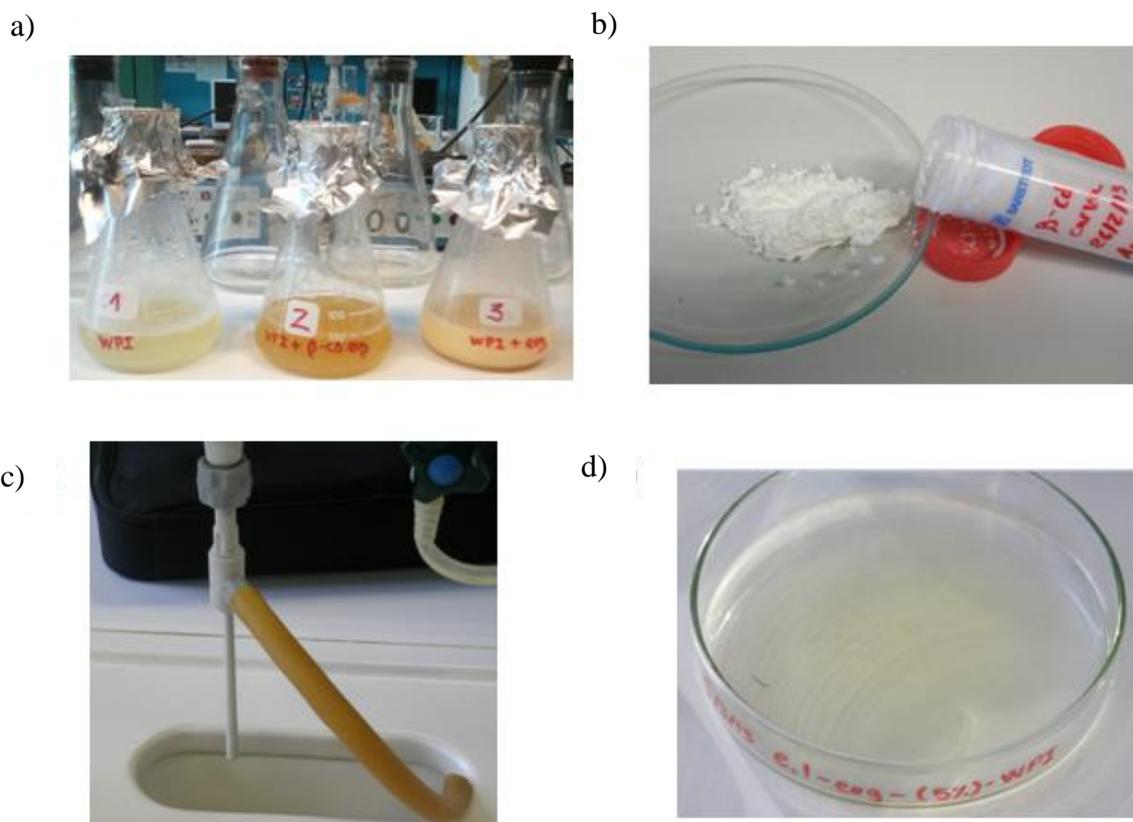


Figura 9. Imágenes de: a) mezclas tras la desnaturalización en el baño a 90°C; b) complejo de inclusión; c) sistema por trompa de vacío; d) secado de los films.

3.1.3. Análisis de la liberación de compuestos activos en recubrimientos

La elaboración de los recubrimientos permitió llevar a cabo el estudio de la difusión de los compuestos activos en una solución alimentaria determinada para estudiar la diferencia entre los recubrimientos con complejos de inclusión y aquellos films a los que se les había añadido el eugenol o carvacrol sin formar el complejo de inclusión. Para ello fue necesario conocer la concentración de eugenol y carvacrol liberada a diferentes tiempos (M_T) y también la concentración inicial de partida (M_0).

El estudio de la difusión de los compuestos activos de un recubrimiento se realizó en un simulante alimentario (Etanol/H₂O, 50/50). En dicho estudio se empleó etanol (Scharlab S.L., Barcelona, Spain); agua destilada (obtenida con el equipo Wasserlab, Navarra, Spain); recubrimientos de WPI elaborados con compuesto activo (eugenol o carvacrol); recubrimientos de WPI elaborados con complejos de inclusión con β -ciclodextrina (preparados en el laboratorio).

Los films preparados se cortaron con el sacabocados circunferencias de 17 mm de diámetro, se pesaron (aproximadamente 40 mg). Con el procedimiento de extracción (**Figura 10**) que se detalla a continuación, se realizó la extracción del compuesto activo del film de 17 mm para conocer el contenido de eugenol o carvacrol inicial (M_0).

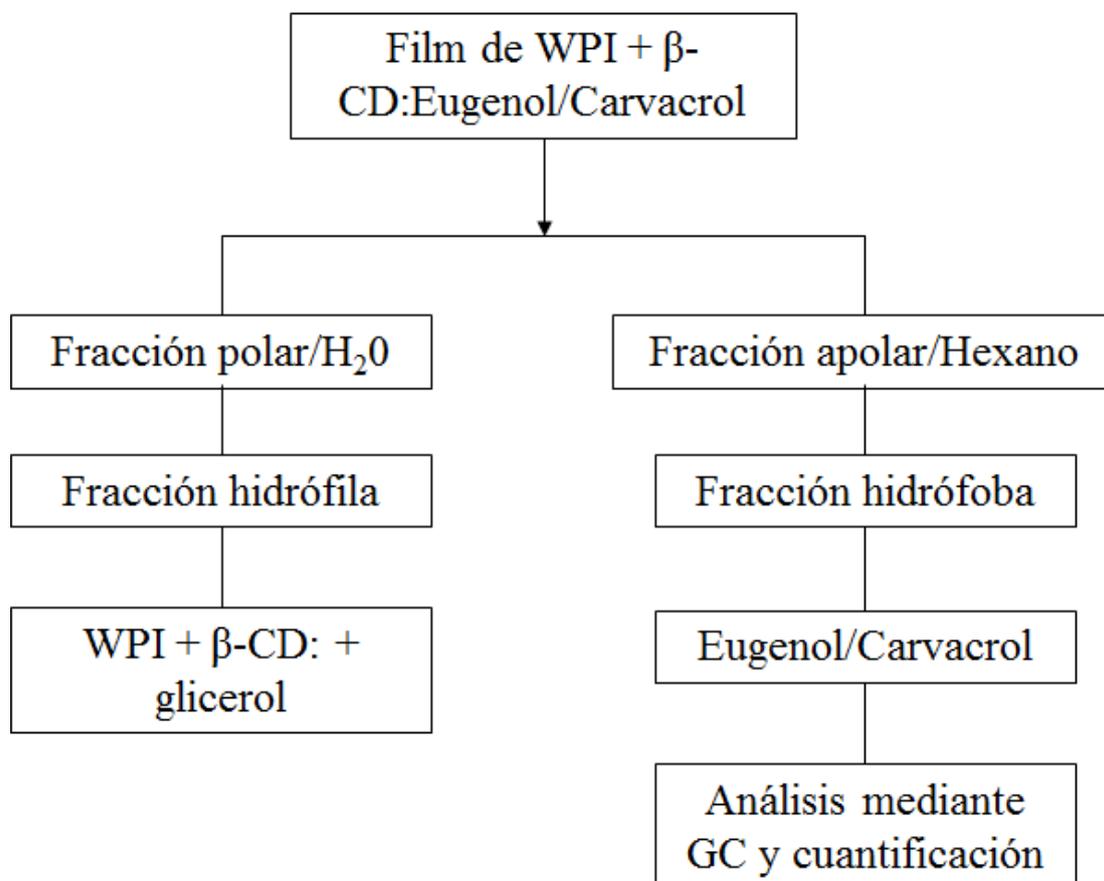
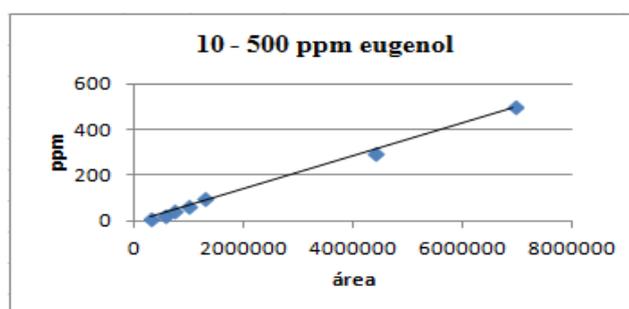


Figura 10. Extracción para el cálculo de M_0 de compuesto activo en los recubrimientos.

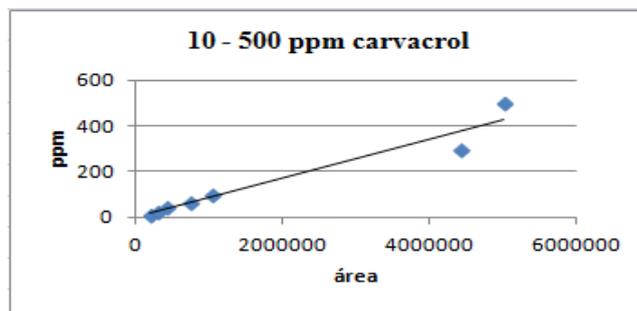
Por otra parte, con otro disco de film de 17 mm se realizó una cinética de liberación de eugenol en el simulante D₁ (Etanol/H₂O, 50/50) en un volumen total de 50 ml para los films con compuesto activo y en volumen total de 25 mL en el caso de films con compuesto activo encapsulado. Se sacaron muestras de 50 µL a ocho tiempos diferentes (1 min, 3 min, 5 min, 7 min, 9 min, 11 min, 13 min, 15 min, 17 min, 19 min, 27 min, 37 min, 47 min, 57 min, 67 min) a 20°C±1°C. Las muestras (0,5 µL) fueron inyectadas en el cromatógrafo de gases. Dicha experiencia se repitió con los films realizados con eugenol/carvacol encapsulados en β-ciclodextrina.

Se inyectó 0,5 µL de las disoluciones en el cromatógrafo de gases. Se empleó un equipo HP 5890 Series II con detector FID. Se realizaron los análisis en una columna de 30 m de longitud x 0,53 mm de diámetro interno recubierta con un espesor de película de 1,0 µm 100% polietilenglicol con fase entrecruzada y químicamente ligada (SupraWax-280, Supelco). El programa de temperaturas del horno comenzaba a 40°C y aumentaba a 2°C/min hasta 222°C durante 5 min. Conociendo el área del compuesto activo de cada muestra aportada por el cromatógrafo de gases, la variación de volumen del simulante alimentario y la recta patrón de cada compuesto activo (**Figura 11**, donde las rectas de calibrado relacionan el área de los picos del compuesto activo con la concentración de éste en una mezcla), se conoció la concentración de eugenol o carvacol en cada tiempo (**Mt**).



$$y = 7,19 \cdot 10^{-05} x - 3,541$$

$$R^2 = 0,9979$$



$$y = 8,543 \cdot 10^{-05} \cdot x + 4,015 \quad R^2 = 0,9412$$

Figura 11. Rectas de calibrado de eugenol y carvacrol.

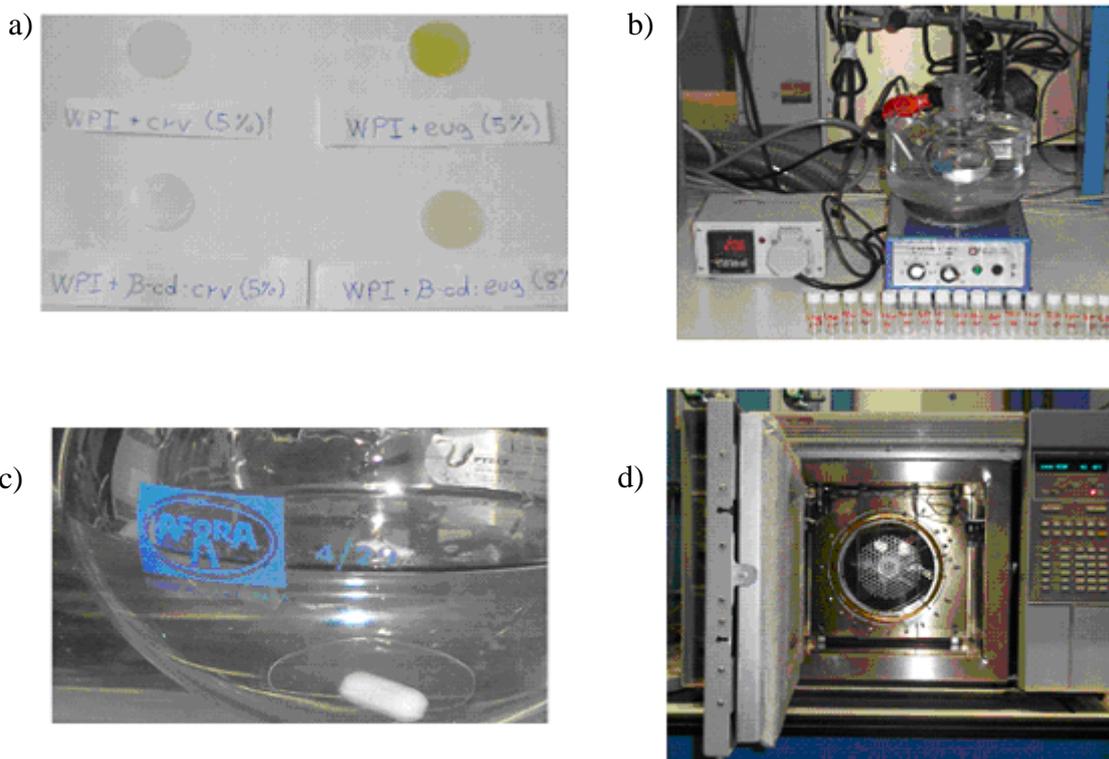


Figura 12. Imágenes de: a) Discos de film de 17 mm con y sin ciclodextrina; b) sistema para el estudio de la liberación de los compuestos activos; c) film de carvacrol en agitación con el simulante alimentario D1; d) cromatógrafo de gases con detector FID.

3.2. COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINA

3.2.1. Obtención de complejos de inclusión mediante métodos químicos

La obtención de los complejos de inclusión de las ciclodextrinas y los compuestos activos se logró mediante precipitación. Se pesaron 25 g de α -, β -, y γ -ciclodextrina y se añadió 250 mL de agua destilada con agitación durante 20 minutos para hidratar la ciclodextrina (**Figura 13**). Tras dicho tiempo, se añadió gota a gota el compuesto activo (eugenol o carvacrol) en una relación molar 1:1 con la ciclodextrina (**Tabla 1**). Una vez añadido, se mantuvo en agitación durante 24 horas en una placa de agitación.

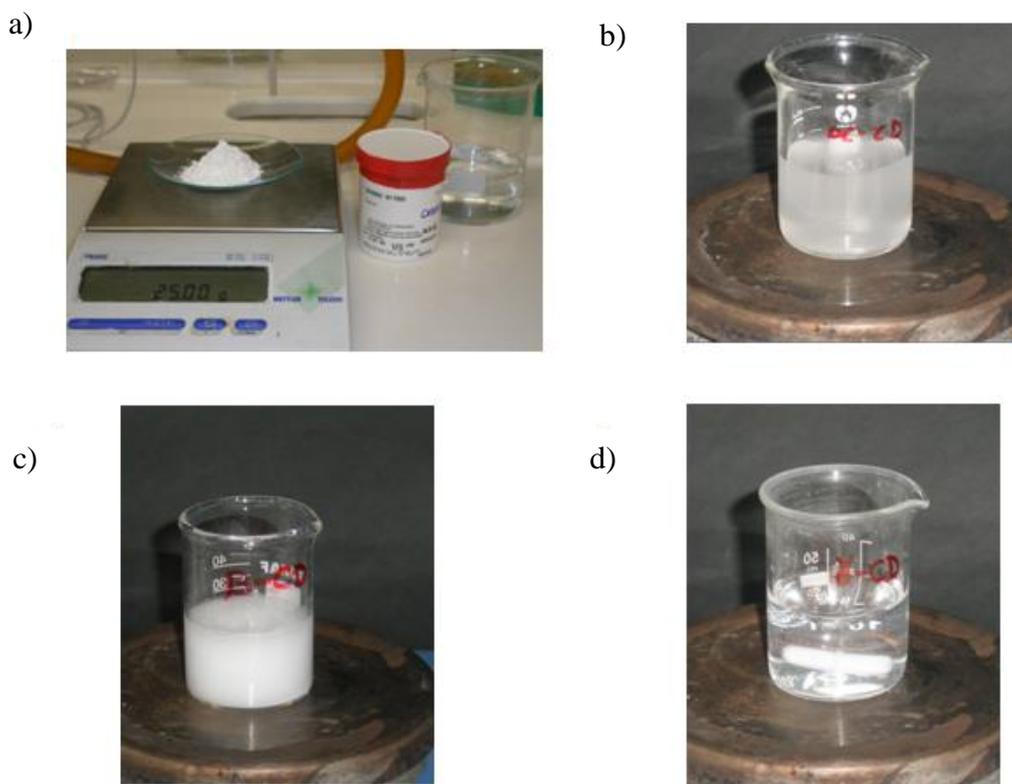


Figura 13. Imágenes de: a) ciclodextrina; b) disolución de H_2O y α -ciclodextrina tras 20 minutos de agitación; c) disolución de H_2O y β -ciclodextrina tras 20 minutos de agitación. d) disolución de H_2O y γ -ciclodextrina tras 20 minutos de agitación.

Tabla 1. Reactivos para la formación de los complejos de inclusión.

Relación molar 1:1	Ciclodextrinas		Eugenol		Carvacrol		H ₂ O
	g	mol	g	mL	g	mL	mL
α -Ciclodextrina	25	0,026	3,449	3,232	3,860	3,955	250
β -Ciclodextrina	25	0,022	2,956	2,771	3,309	3,390	250
γ -Ciclodextrina	25	0,020	2,624	2,459	2,936	3,008	250

3.2.1.1. Agente encapsulante: α - β - y γ -ciclodextrina

La variación del número de α -D-[1,4]-glucopiranosas, les aporta unas características diferentes a cada una de las ciclodextrinas (**Tabla 2**). Como ya se ha mencionado, las ciclodextrinas se emplean para enmascarar los olores y sabores de determinados aditivos, mantener durante un mayor periodo de tiempo las propiedades funcionales de éstos y otorgar la capacidad de tener una liberación controlada de dichos compuestos encapsulados al medio o alimento.

Tabla 2. Propiedades de α -, β - y γ -ciclodextrina

Propiedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de D(+)-glucopiranosas	6	7	8
Masa molar (g/mol)	973	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Temperatura de descomposición (°C)	250-260	255-265	240-245
Solubilidad en H ₂ O (g /100 mL a 25° C)	14,5	1,85	23,2
Profundidad de la cavidad (Å)	7,8	7,8	7,8
Diámetro de la periferia (Å)	14,6	15,3	16,9
Diámetro interno (Å)	5,7	7,8	9,5
Volumen aproximado de la cavidad:			
Por molécula (Å ³)	174	262	972
Por gramo (Å ³)	0,10	0,14	0,20
Moléculas de H ₂ O en el interior de la cavidad	8	11	17

3.2.1.2. Agente activo: eugenol y carvacrol

Los compuestos activos empleados en el estudio son eugenol y carvacrol (**Figura 14**), para ambos se ha descrito en la bibliografía su alta actividad antimicrobiana (royo y col 2010). En concreto estos compuestos son compuestos mayoritarios de aceites esenciales como el clavo y el orégano.

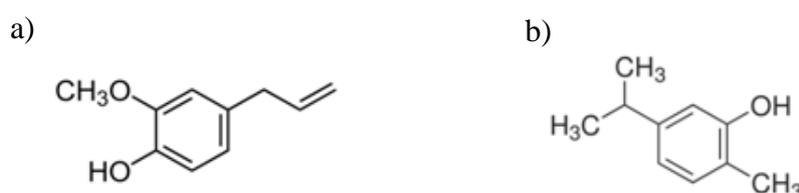


Figura 14. Estructura química: a) eugenol; b) carvacrol.

Debido a sus características apolares (**Tabla 3**) son compuestos útiles para la formación de complejos de inclusión mediante ciclodextrinas. Aunque sean muy insolubles en agua, hace que se vean atraídos por las cavidades apolares de las ciclodextrinas y se encapsulen con mayor facilidad que otros compuestos ligeramente más hidrofílicos (ej. vainillina, timol, aldehído cinámico, etc.).

Tabla 3. Propiedades del eugenol y carvacrol.

Propiedades	Eugenol	Carvacrol
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	C ₁₀ H ₁₄ O
Masa molar (g/mol)	134,22	150,22
Densidad (g/cm ³)	1,067	0,976
Temperatura de fusión (°C)	-12	3
Temperatura de ebullición (°C)	255	238
Solubilidad en H ₂ O (g /100 mL a 25° C)	0,246	Insoluble

3.2.2. Secado de complejos de inclusión mediante spray-drying

Tras la formación de los complejos de inclusión se secó la muestra y los complejos de inclusión se almacenaron. Éstos se prepararon en una emulsión de agua, por lo que dicha mezcla se llevó a secar mediante un atomizador Büchi Mini Spray Dryer B-191 (**Figura 15**). Cabe destacar que a pesar de ser un Spray Dryer, la función de éste fue únicamente la de llevar a cabo un secado de la muestra y no la encapsulación u obtención de los complejos de inclusión (dado que ya estaban formados). Las condiciones de partida fueron las descritas por *Reineccius y col. 2002*.

El secado de la muestra se obtuvo mediante una corriente de aire de entrada de 180°C y un flujo de emulsión de 15% (5 mL/min) para no obstruir el atomizador. El secado se realizaba en constante agitación de la muestra para que ésta fuese homogénea en todo momento y los complejos de inclusión no decantasen al fondo.

Tras la obtención de los complejos de inclusión (aquellas partículas que poseían un tamaño de entre 0,5-30 μm) y el cálculo de rendimiento de secado, se almacenaron en refrigeración a fin de evitar posible degradación o cambios mínimos en éste.

a)



b)



c)



Figura 15. Imágenes de: a) emulsión de agua y complejos de inclusión; b) atomizador Büchi Mini Spray Dryer B-191; c) complejo de inclusión obtenido tras el secado.

3.2.3. Análisis de la eficacia de la retención de los complejos de inclusión

Para el cálculo del contenido experimental (**Figura 16**), se pesaron 0,15 g de complejo de inclusión en un tubo de centrifuga de 50 mL. Se añadieron 10 mL de agua destilada y 5 mL de hexano. La mezcla fue agitada fuertemente durante 2 minutos antes de ser introducida en un baño termostático a 85°C, manteniéndose con agitación (33 rpm) durante 30 minutos. Las extracciones se realizaron por duplicado.

La fase apolar se recogió en un matraz aforado de 50 mL. Para favorecer la separación de fases, se llevaron las muestras a la centrifuga (25°C, 14000 rpm, 5 min). Dicha operación fue repetida dos veces más, recogándose en los tres casos totales la fase apolar en el matraz aforado de 50 mL. Finalmente se hizo una última extracción (con las mismas condiciones que en el resto de casos), recogándose esta vez la fase apolar en un matraz aforado de 25 mL para comprobar posteriormente en el cromatógrafo de gases que la extracción del compuesto activo de los complejos de inclusión había sido total en los casos anteriores (que quedaba menos de un 5% de los aceites esenciales encapsulado en las ciclodextrinas).

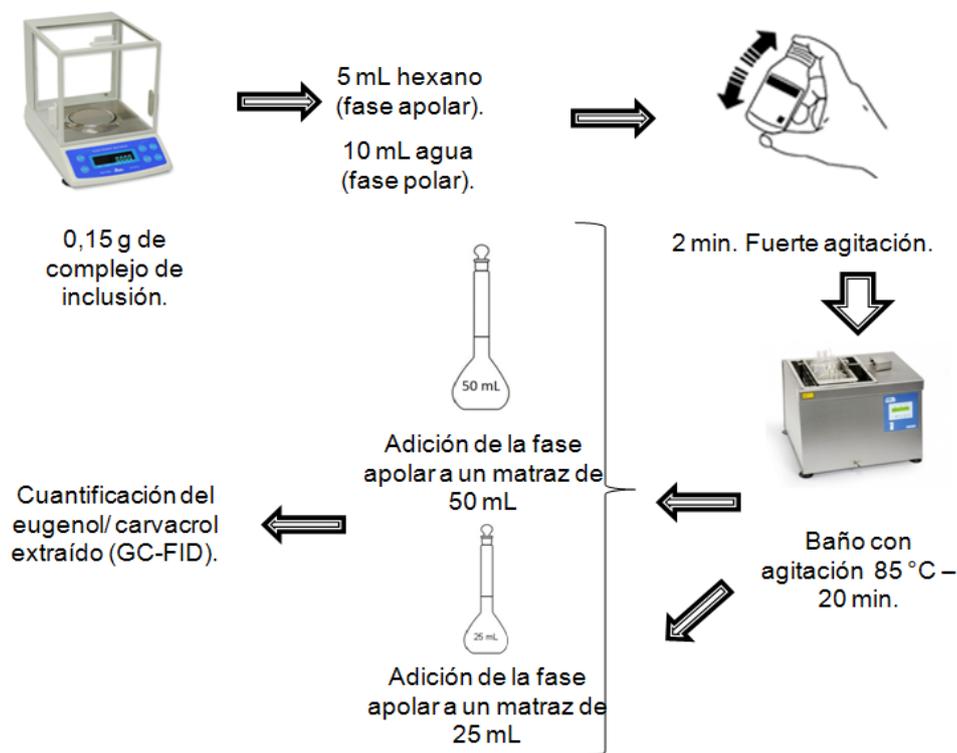


Figura 16. Esquema del proceso de extracción de los compuestos activos en los complejos de inclusión.

Para determinar la cantidad de compuesto activo, se hizo uso de un cromatógrafo de gases (HP 5890 Series II con detector FID), inyectándose 0,5 μL de las disoluciones de los matraces previamente aforados. El cromatógrafo trabajó en las mismas condiciones que se explicaron en el apartado 3.1.3. de la memoria.

Se tomaron los datos de tiempo, área, peso, amplitud y simetría para calcular el contenido de eugenol o carvacrol en cada complejo de inclusión formado.

a)

b)

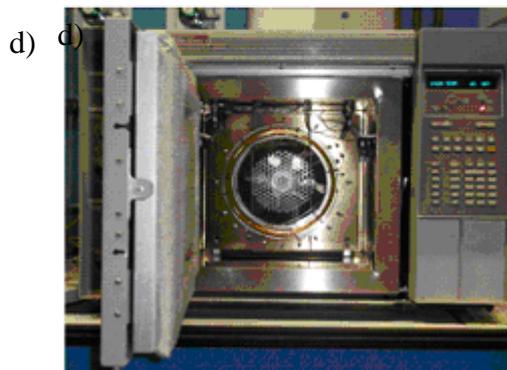
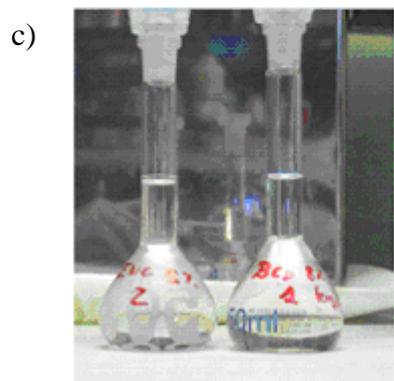


Figura 17. Imágenes de: a) materiales empleados en el análisis de la eficacia de retención de los films; b) pesado de la muestra; c) matraces de 50 mL aforados con hexano tras las tres extracciones; d) cromatógrafo HP 5890 Series II con detector FID.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la elaboración de los complejos de inclusión y los films, se realizó el estudio de los resultados obtenidos. Por un lado se determinó el rendimiento de secado y la eficacia de la retención de los complejos de inclusión con α -, β -, γ -ciclodextrina (**Objetivo 1** y **Objetivo 2**). Por otro lado, se realizaron las curvas de liberación de eugenol y carvacrol encapsulado en ciclodextrina y sin encapsular a un simulante alimentario, para evaluar su comportamiento (**Objetivo 3**).

4.1. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINA

El objeto de este apartado es el estudio de la diferente retención del eugenol y carvacrol con los distintos tipos de ciclodextrinas (**Objetivo 1**). Los compuestos eugenol y carvacrol aunque son parecidos molecularmente tienen diferente polaridad debido a los diferentes grupos funcionales que estos tienen. El carvacrol presenta un grupo OH y el eugenol presenta un grupo OCH₃ y OH, por lo que es más polar que el carvacrol. Esto es determinante para la formación de los complejos de inclusión, en los que la cavidad apolar de las mismas favorece la interacción con moléculas apolares (*Reinnecius T.A. y col. 2002*).

Según la bibliografía, la β -ciclodextrina es la más adecuada para la retención de este tipo de compuestos, principalmente por el diámetro de su cavidad. Sin embargo, se estudiaron también la α - y γ -ciclodextrina para conocer el comportamiento de las mismas en la retención de eugenol y carvacrol (*Reinnecius T.A. y col. 2002*).

4.1.1. Cálculo del rendimiento de secado mediante spray-drying

Aunque el spray-drying también es una técnica de encapsulación (*Reineccius G.A., 2009*), el uso más frecuente en la industria es el de secado. En este trabajo, las disoluciones acuosas preparadas con los complejos de inclusión con las diferentes ciclodextrinas y el eugenol o carvacrol se secaron para tener los complejos de inclusión en estado sólido. La elección de este método de secado se realizó por que previamente se había descrito en la bibliografía (*Reineccius T.A. y col., 2002*).

El cálculo del rendimiento de secado mediante el spray-drying se realizó mediante la **Ecuación 1**, la cual se muestra a continuación:

$$\text{Rdt (\%)} = \Delta C = [(C_I) / (C_D + C_A)] \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

ΔC : variación del contenido de materia seca (en peso) durante la elaboración de los complejos de inclusión (desde la realización de la solución acuosa hasta la obtención de los complejos de inclusión secos).

C_D : Cantidad de ciclodextrina (en peso) aportada a la solución acuosa al comienzo de la formación de los complejos de inclusión.

C_A : Cantidad de compuesto activo (en peso) aportado a la solución acuosa al comienzo de la formación de los complejos de inclusión.

C_I : Cantidad de complejo de inclusión (en peso) obtenido tras el secado de la solución acuosa mediante spray-drying.

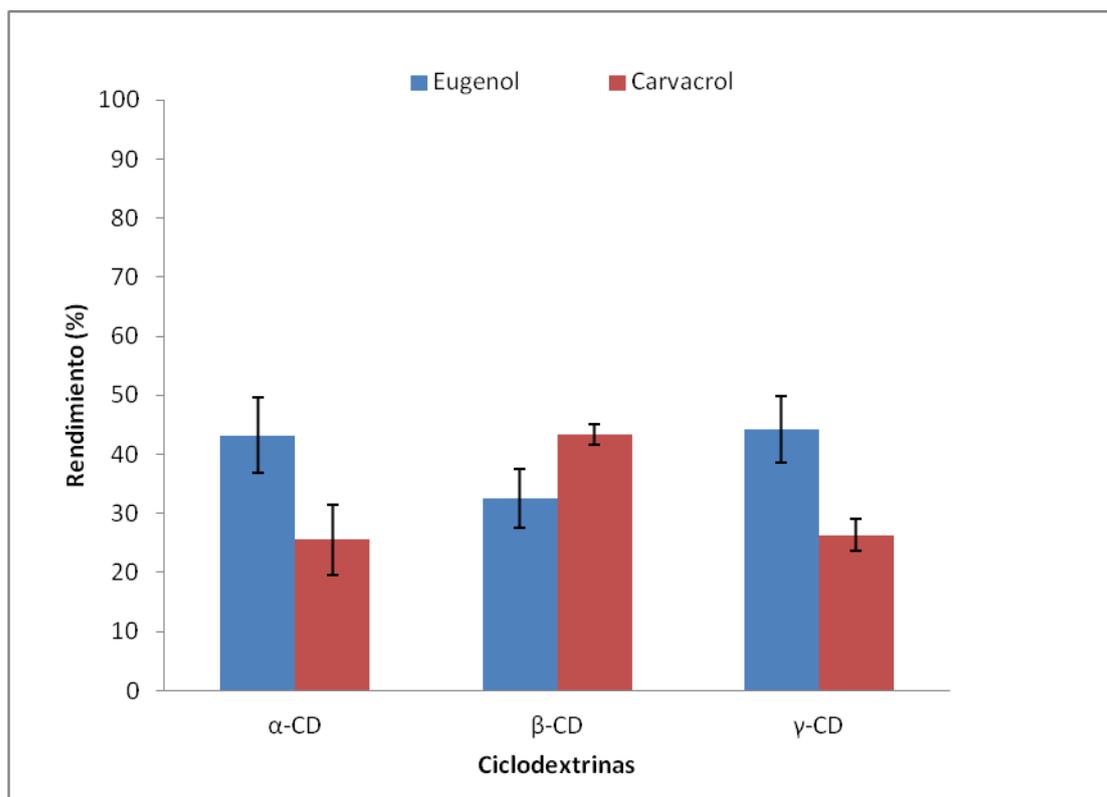


Figura 18. Rendimiento de secado obtenido con el spray-drying con α -, β -, γ -ciclodextrina (α -CD, β -CD, γ -CD) y eugenol o carvacrol.

Los resultados de rendimiento obtenidos se muestran en la **Figura 18**. Se observa en todos los casos los rendimientos fueron inferiores al 50%, por lo que se puede afirmar que los rendimientos no son muy elevados. A pesar de ello, el mayor rendimiento de secado promedio lo obtiene la γ -ciclodextrina: eugenol, seguido de la β -ciclodextrina:carvacrol. Pueden ser diversas las razones por las que los rendimientos son bajos, entre ellas se pueden destacar las siguientes. La alta volatilidad de los compuestos eugenol y carvacrol que puede favorecer su pérdida al someterla a las altas temperaturas en la que trabaja el spray-drying (180°C) aunque en principio la ciclodextrina podría actuar y proteger de este efecto térmico. Otra puede ser la pequeña cantidad introducida en el equipo de spray-drying (un volumen total de 250 mL y porcentaje de materia seca en torno al 11%) en la que siempre se produce una pérdida, ya que hay una parte que se queda inevitablemente pegada a las paredes del equipo.

Para comprobar la segunda hipótesis se realizó una experiencia duplicando la cantidad introducida en el equipo de spray-drying (volumen total de 500 mL y porcentaje de materia seca en torno al 11%). La experiencia se realizó con la β -ciclodextrina y ambos compuestos activos (primero el carvacrol y luego eugenol), obteniéndose rendimientos del 80% y el 78%, por lo que se puede afirmar que con la misma proporción de sólidos introduciendo una mayor cantidad de muestra en el equipo, las pérdidas eran menores debido a las inevitables pérdidas que se producen con la puesta en funcionamiento del equipo. Es interesante destacar que el procedimiento de secado de spray-drying se escogió para poder escalarlo a nivel industrial por lo que con el resultado obtenido podemos afirmar que al aumentar el volumen de secado se podrá aumentar el rendimiento del mismo.

4.2.1. Cálculo de la eficacia de retención del agente activo en ciclodextrina

El objetivo de estudio de este apartado es el cálculo de la eficacia de la retención de los complejos de inclusión preparados (**Objetivo 2**). Según la bibliografía, el trabajo con la relación molar 1:1 de compuesto activo:ciclodextrina favorece la formación de los complejos de inclusión, debido a que se fuerza las condiciones para formar el complejo (*Reineccius T.A. y col., 2006*). En exceso de compuesto activo provocaría que parte del compuesto activo quedara en superficie y no insertado en la ciclodextrina, y por lo tanto los resultados de liberación serían confusos. Otra posibilidad sería trabajar con exceso de ciclodextrina para forzar la inserción de compuesto activo y por tanto forzar la formación de complejos de inclusión, sin embargo además de los complejos de inclusión se podrían haber formado agregados que no es el objetivo.

En la **Figura 19** se muestra de manera ilustrativa los complejos de inclusión preparados en el laboratorio de manera equimolecular. En el caso de tomar dos muestras de complejos de inclusión con diferente rendimiento de secado, no implica que aquel que tenga un mayor rendimiento de secado tenga una mayor cantidad de compuesto activo, ya que puede que en el material recogido tras el proceso de spray-drying sean complejos de inclusión con compuestos activos encapsulados, mientras que otros sean únicamente ciclodextrinas con el anillo vacío.

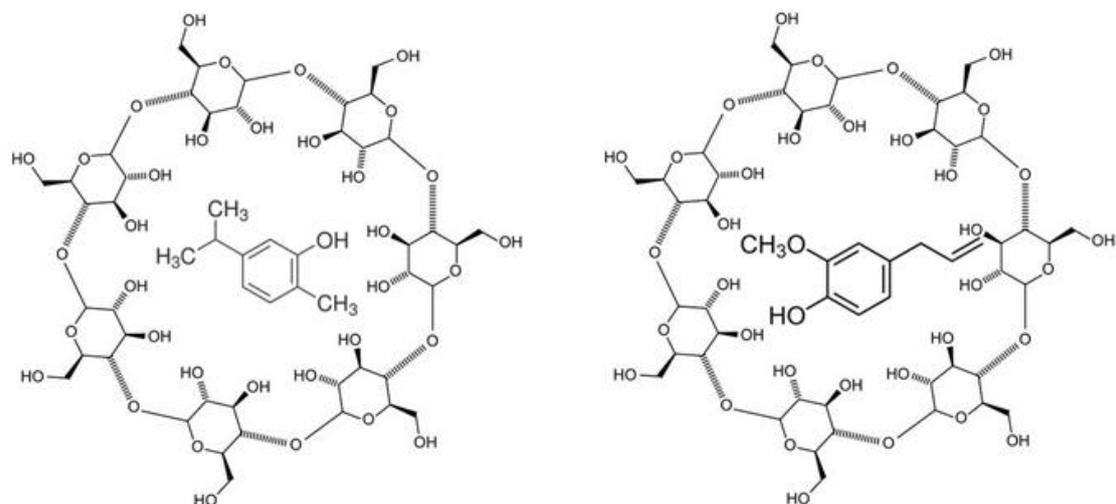


Figura 19. Complejos de inclusión de eugenol y carvacrol con β -ciclodextrina.

La eficacia de la retención (RE) se calculó mediante la **Ecuación 2** que es el cociente entre la cantidad obtenida tras la extracción de los compuestos activos de los complejos de inclusión y la cantidad teórica de compuesto activo en el complejo de inclusión (Durrieu V. y col. 2013).

$$RE = (A_{\text{exp}} / A_{\text{Teo}}) \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

RE = Eficacia de retención expresada en %.

A_{exp} = Agente activo obtenido en el complejo de inclusión (g).

A_{Teo} = Agente activo teórico en el complejo de inclusión (g).

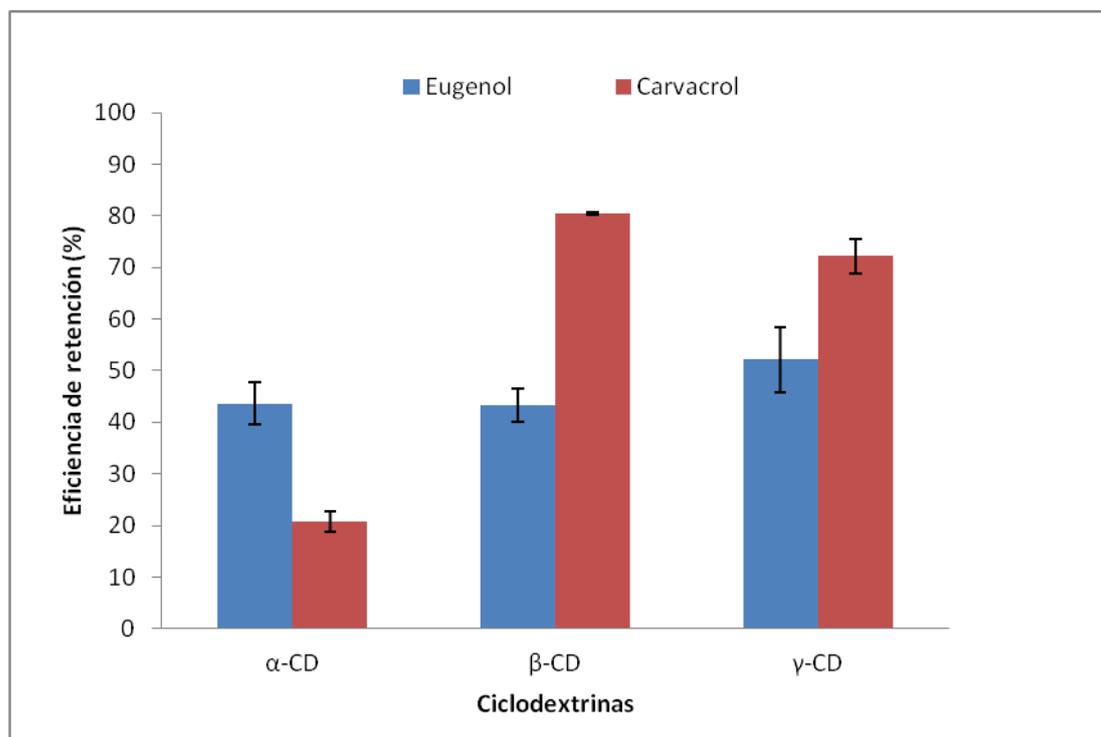


Figura 20. Eficacia de retención de las diferentes ciclodextrinas al encapsular eugenol y carvacrol.

Como se observa en la **Figura 20**, las mayores eficacias de retención se obtienen en la inclusión del carvacrol con el empleo de la β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, los cuales llegan hasta el 80% y 70%, con desviaciones estándar de 0.21 y 3.38 respectivamente (ver **Tabla 4**). Es de destacar que, en general, la apolaridad del carvacrol favorece la inserción en la cavidad de las ciclodextrinas.

Tabla 4. Eficacia de retención (RE)

Muestra	Eficacia promedio (%)	Desviación estándar (%)
α - CD:eugenol	43,66 ^(b)	4,19
α - CD:carvacrol	20,78 ^(a)	2,06
β - CD:eugenol	43,18 ^(b)	3,21
β - CD:carvacrol	80,49 ^(c)	0,21
γ - CD:eugenol	52,18 ^(b)	6,30
γ - CD:carvacrol	72,20 ^(c)	3,38

Una de las razones por las que se justifica la diferente eficacia de la retención obtenida en el caso de la α - y γ -ciclodextrina con carvacrol, podría deberse a una serie de factores en los que interviene la polaridad del compuesto activo, el tamaño de éste y el diferente diámetro de la cavidad en la α - y γ -ciclodextrina. La α -ciclodextrina tiene seis unidades de D(+)-glucopiranosas, siendo menor la cavidad apolar de las mismas y teniendo un diámetro interior de 5,7 Å. Sin embargo la γ -ciclodextrina posee ocho unidades de D(+)-glucopiranosas, siendo mayor la cavidad apolar de las mismas y teniendo un diámetro interior de 9,5 Å. Los resultados parecen indicar que la cavidad de la α -ciclodextrina es demasiado pequeña y se favorece la inserción en una cavidad más grande como se da en el caso de la β - y γ -ciclodextrina (7,8 y 9,5 Å respectivamente). Por otro lado, y coincidiendo con los datos de la bibliografía (Reineccius G.A., 2009) la eficacia de la retención es mayor en la β -ciclodextrina, esto se puede deber al tamaño de la molécula de carvacrol que le resulta más favorable las interacciones débiles en la cavidad, en concreto como se describe en la bibliografía por fuerzas de Van der Waals (Szejtli J., 1998).

Sin embargo, en el caso de la formación de complejos de inclusión con eugenol y en concreto con γ -ciclodextrina que destaca por ser la más soluble de todas, además tiene el mayor área interna para formar un mayor número de interacciones entre ellas,

uniéndose de forma específica mediante interacciones covalentes o no covalentes (Van der Waals) (Szejtli J., 1998). En el caso de la α - y β -ciclodextrina y eugenol, que presenta el 50% del compuesto activo retenido siendo su comportamiento muy parecido.

A la vista de los resultados de ER y Rdt (%) se escoge la β -ciclodextrina para realizar los experimentos con los films y la liberación de los compuestos activos de los mismos.

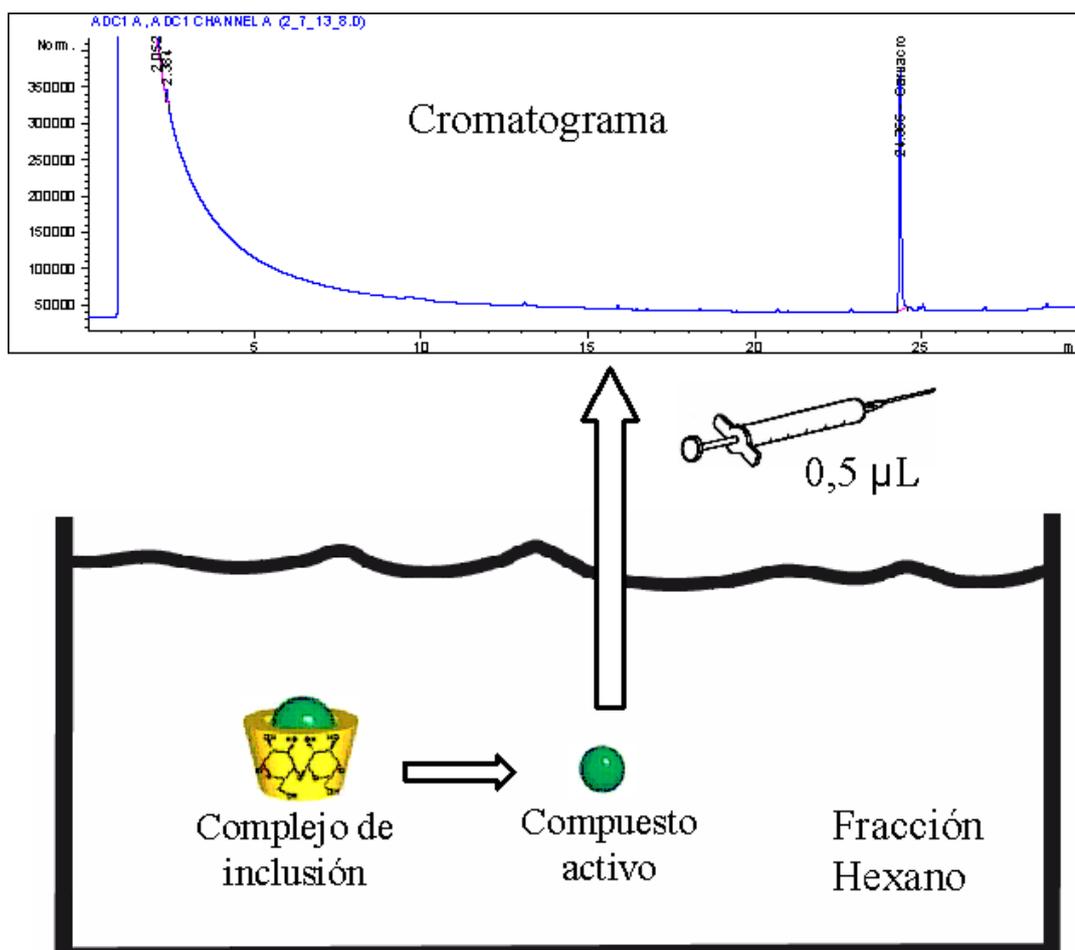


Figura 21. Extracción del compuesto activo mediante hexano, y analizado de dicha mezcla mediante cromatografía.

Por otra parte cabe destacar la diferencia entre la eficiencia de la retención y la estabilidad de los complejos inclusión. La estabilidad de los complejos se refiere a la estabilidad de estos complejos formados a lo largo del tiempo y a una determinada temperatura. Los complejos de inclusión tras secarse en el spray-dryer se almacenan en un refrigerador a -20°C. Se realizó una extracción pasados 100 días de almacenamiento y se comprobó que la eficacia de la retención (RE) era la misma, por lo que se puede afirmar que en esas condiciones se evita la salida del compuesto activo desde la cavidad de las ciclodextrinas, la volatilización del eugenol y el carvacrol, asegurándose con ello una cierta tendencia a la estabilidad.

Adjunto al trabajo en un **Anexo** se realiza un estudio estadístico de los resultados obtenidos de ER para comparar las diferencias significativas que hay entre los diferentes resultados obtenidos con los dos compuestos activos y los tres tipos de ciclodextrinas.

4.2. FORMACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

La elaboración de los recubrimientos se realiza para emplearlos posteriormente en el estudio de la liberación de los compuestos activos en un simulante alimentario (**Objetivo 3**). El estudio se centra en evaluar los recubrimientos con y sin complejos de inclusión (formados por eugenol o carvacrol y β -ciclodextrina).

Como ya se ha mencionado, para formar los films se han empleado complejos de inclusión con β -ciclodextrina, por los resultados obtenidos de rendimiento de secado y eficacia de retención.

4.2.1. Caracterización de recubrimientos.

Como se muestra en la **Figura 22** los films son homogéneos y estables. Esto se debe a la previa formación de una mezcla formadora de recubrimiento homogénea.

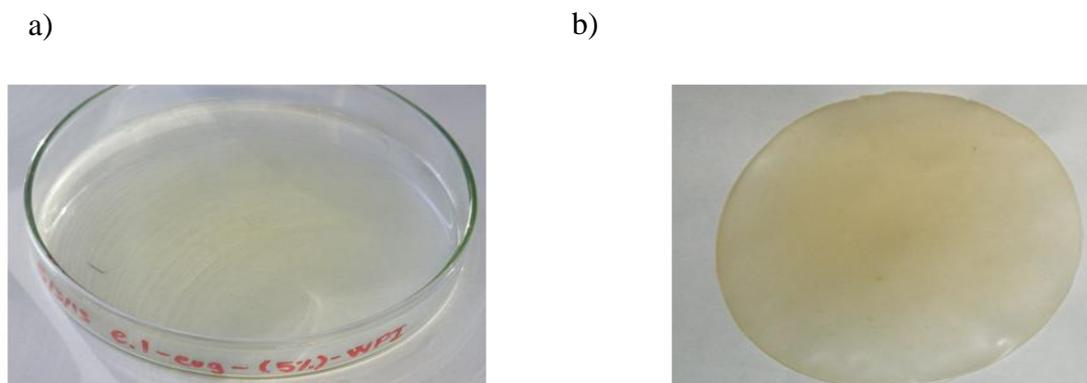


Figura 22. Imágenes de: a) film de WPI y 5% eugenol; b) film de WPI y 5% de eugenol seco.

Además para que su espesor fuera constante a lo largo de la superficie, durante el secado de los films, éstos se dejaron sobre una tabla que teóricamente no poseía ningún tipo de inclinación (comprobado mediante un inclinómetro de burbuja). Tras el secado de los recubrimientos, se empleó un medidor de espesor para demostrar la uniformidad del film en toda su superficie, poseyendo así un grosor homogéneo en cualquier punto de éste. Los espesores obtenidos están en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Características de los recubrimientos elaborados.

Recubrimiento	Espesor medio (mm)
Film A (WPI + 5% Eugenol)	0,113
Film B (WPI + 5% Carvacrol)	0,108
Film C WPI + 8% β -CD:Eugenol)	0,234
Film D (WPI + 5% β -CD:Carvacrol)	0,226

En general, los recubrimientos a los cuales se les habían añadido directamente los compuestos activos, fueron uniformes, transparentes y homogéneos, teniendo una superficie lisa. Destacaba entre dichos films el característico aroma de los compuestos activos aportados a cada uno de éstos. En algunas pruebas en las que se les aumenta la concentración de los compuestos activos añadidos a los films influye significativamente en las características de éstos tras las 24 horas de secado. Al añadir mayor cantidad de eugenol o carvacrol a la mezcla formadora de films, aumenta el color de los films, disminuye la transparencia, aumenta el olor característico que poseen los films. Además, el empleo de los distintos compuestos activos también influye en las características finales de los films de WPI preparados, para una misma concentración de compuesto activo, los films de eugenol eran menos transparentes que los de carvacrol y tenían un color amarillento más intenso, como se muestra en la **Figura 23**.

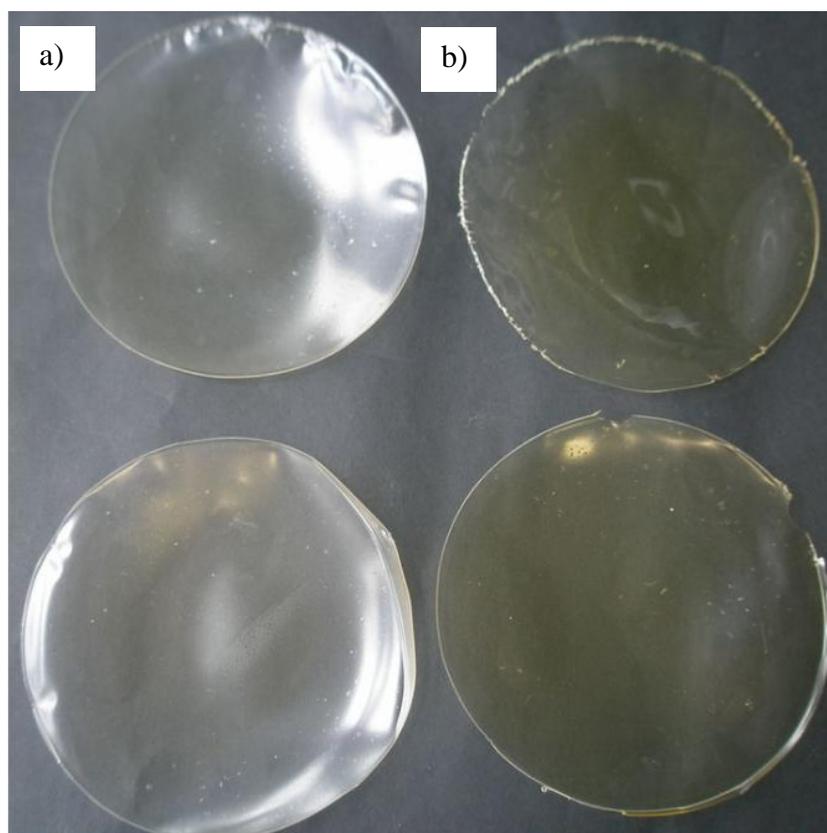


Figura 23. Imágenes de films de WPI con: a) 5% de carvacrol; b) 5% de eugenol.

Por el contrario, los films que contenían los compuestos activos con complejos de inclusión de β -ciclodextrina, mostraron características diferentes respecto a los recubrimientos de WPI con eugenol y carvacrol (**Figura 24**). Los films con complejos de inclusión añadidos fueron uniformes, sin brillo y homogéneos. Es de destacar que dichos recubrimientos presentaban menor olor quizá al uso de la β -ciclodextrina. Además el color variaba considerablemente, siendo más blanquecinos y menos amarillentos.

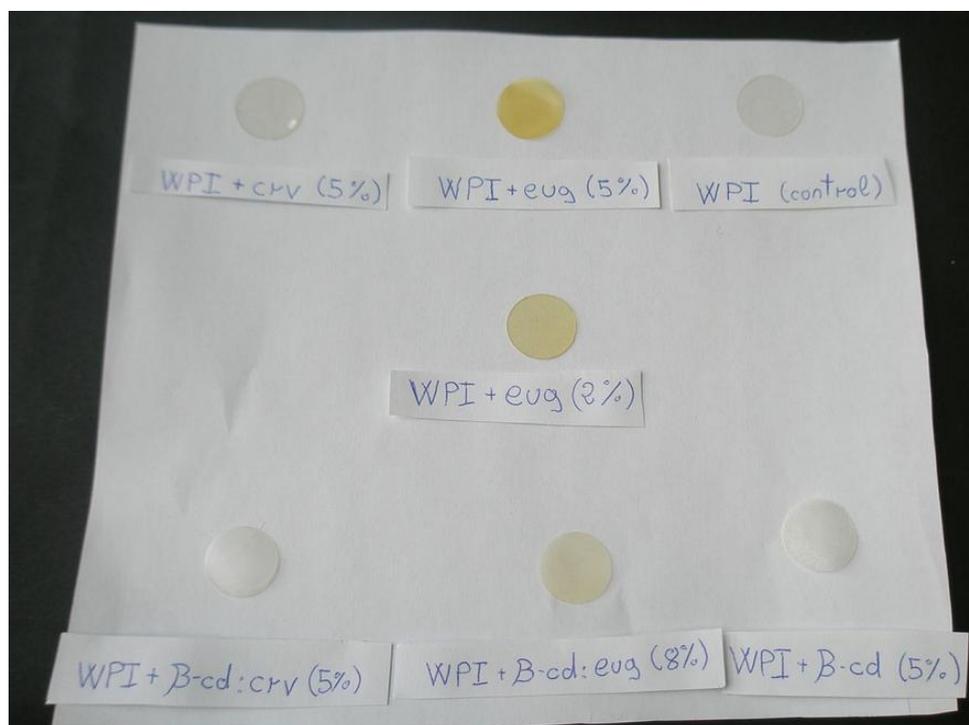


Figura 24. Imágenes de los recubrimientos de WPI preparados en el laboratorio.

4.2.2. Determinación de las cinéticas de liberación de compuestos activos.

El objeto de este apartado es el cálculo de las cinéticas de difusión de eugenol y carvacrol con y sin encapsular con β -ciclodextrina en films de WPI (**Objetivo 3**) en un simulante alimentario (D1: EtOH/H₂O). En la **Figura 25** se muestra de manera gráfica

la liberación que se produce de los compuestos activos, en este caso encapsulados, a lo largo del tiempo.

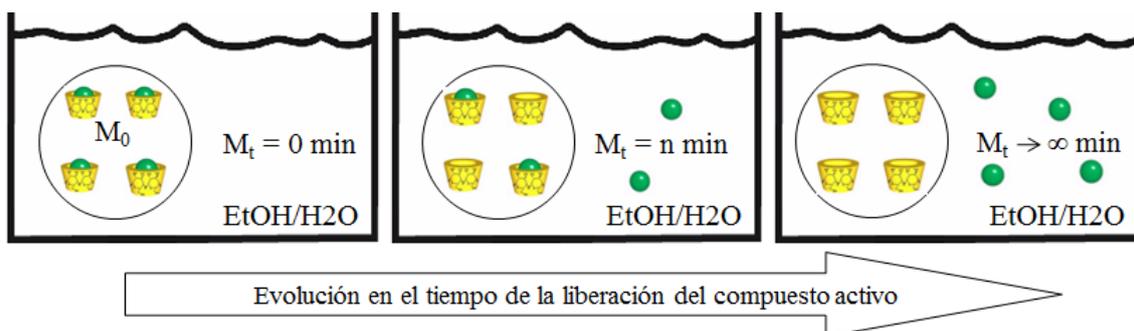


Figura 25. Imagen de la liberación de los compuestos activos en un simulante alimentario etanol/agua.

4.2.2.1. Liberación de eugenol y carvacrol en recubrimientos de WPI.

Como se observa en la **Figura 26** la liberación de los compuestos activos eugenol y carvacrol en el simulante alimentario D₁ se realiza rápido. A tiempos cortos los compuestos activos están casi en su totalidad liberados. En teoría el efecto de la matriz de WPI permite retardar su difusión (*Fabra M.J. y col. 2012*). Sin embargo, para estos compuestos y este simulante alimentario ese efecto no se parecía significativamente.

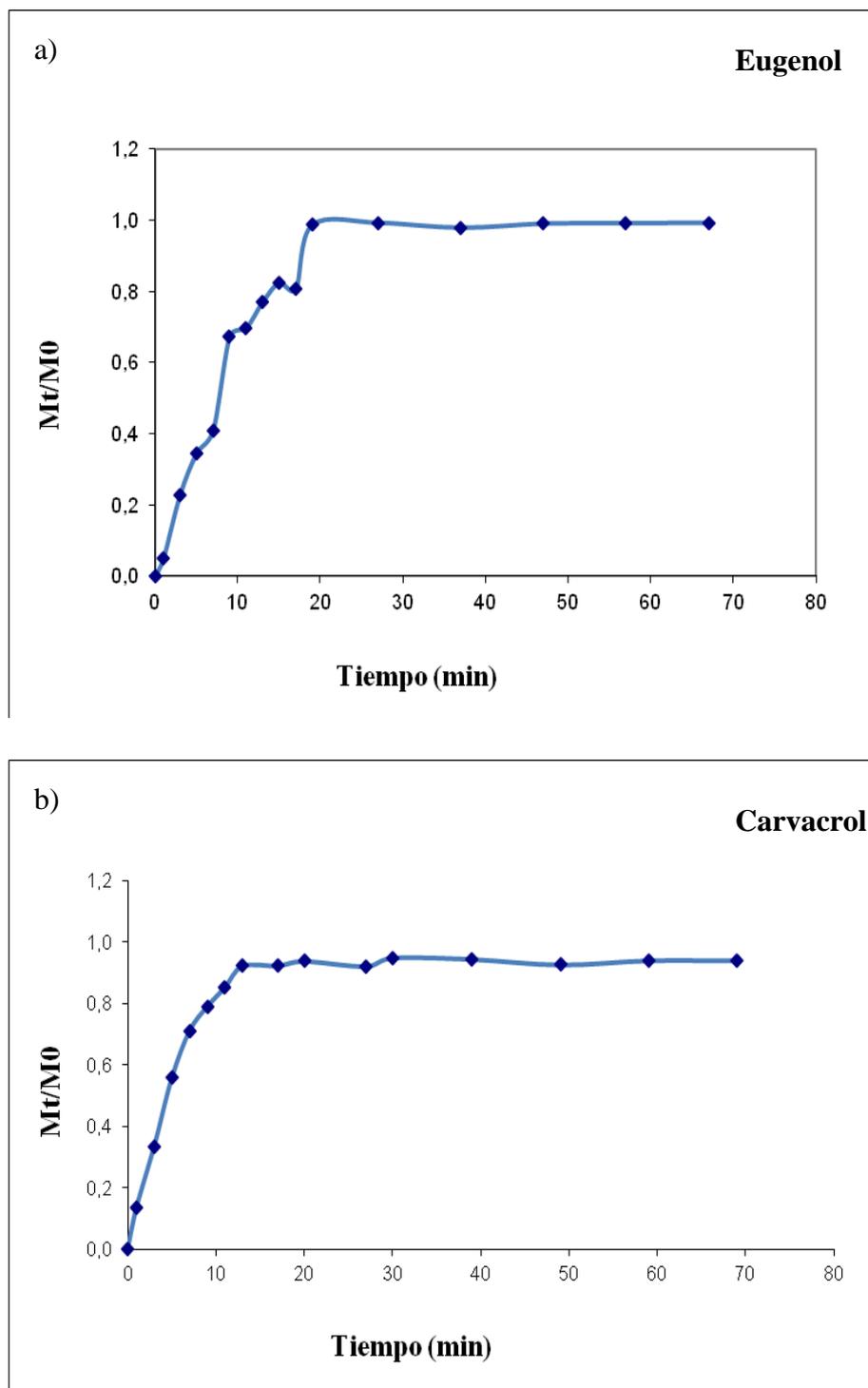


Figura 26. Liberación de a) eugenol y b) carvacrol a 22°C frente al tiempo en films de WPI.

4.2.2.2. Liberación de β -ciclodextrina: carvacrol en recubrimientos de WPI

Como se muestra en la **Figura 27** la formación de complejos de inclusión de eugenol y carvacrol con β -ciclodextrina, permite reducir el tiempo de difusión o liberación que se produce del film de WPI al simulante alimentario. Esto se puede deber al equilibrio e interacciones que se establecen entre el compuesto activo y la β -ciclodextrina que permite retrasar su liberación. Las ciclodextrinas se hidratan en contacto con el simulante alimentario y liberan dichos compuestos activos lentamente conforme son hidratadas.

La liberación se va más retardada en el caso de los complejos de inclusión formados con inclusión β -ciclodextrina:carvacrol. En principio, esto podría deberse a la mayor afinidad que tiene la β -ciclodextrina por el carvacrol tal y cómo se calculó con la eficacia de la retención que es de un 80% y 43% para el carvacrol y eugenol, respectivamente. De manera que el compuestos más retenido en la β -ciclodextrina, tendrá mayor afinidad por ellas y la liberación al simulante alimentario será más lenta respecto a aquellas que casi no se retengan. Esto podría tener especial interés para la liberación controlada de compuestos activos.

Es muy apreciable la gran diferencia en la velocidad de liberación de eugenol y carvacrol que se muestra entre aquellos recubrimientos que poseen únicamente los agentes activos en su matriz, respecto a los que poseen los complejos de inclusión en ésta (**Tabla 6**).

Tabla 6. Velocidad de liberación de los diferentes films. Tiempo para liberar el 50 % y el 90 % de la cantidad inicial del disco de film (M_0).

Velocidad de liberación de eugenol y carvacrol				
	WPI + eug	WPI + β -CD:eug	WPI + crv	WPI + β -CD:crv
50 %	7 min	11,8 min	4,5 min	10,1 min
90 %	18 min	29,7 min	13,6 min	34,8 min

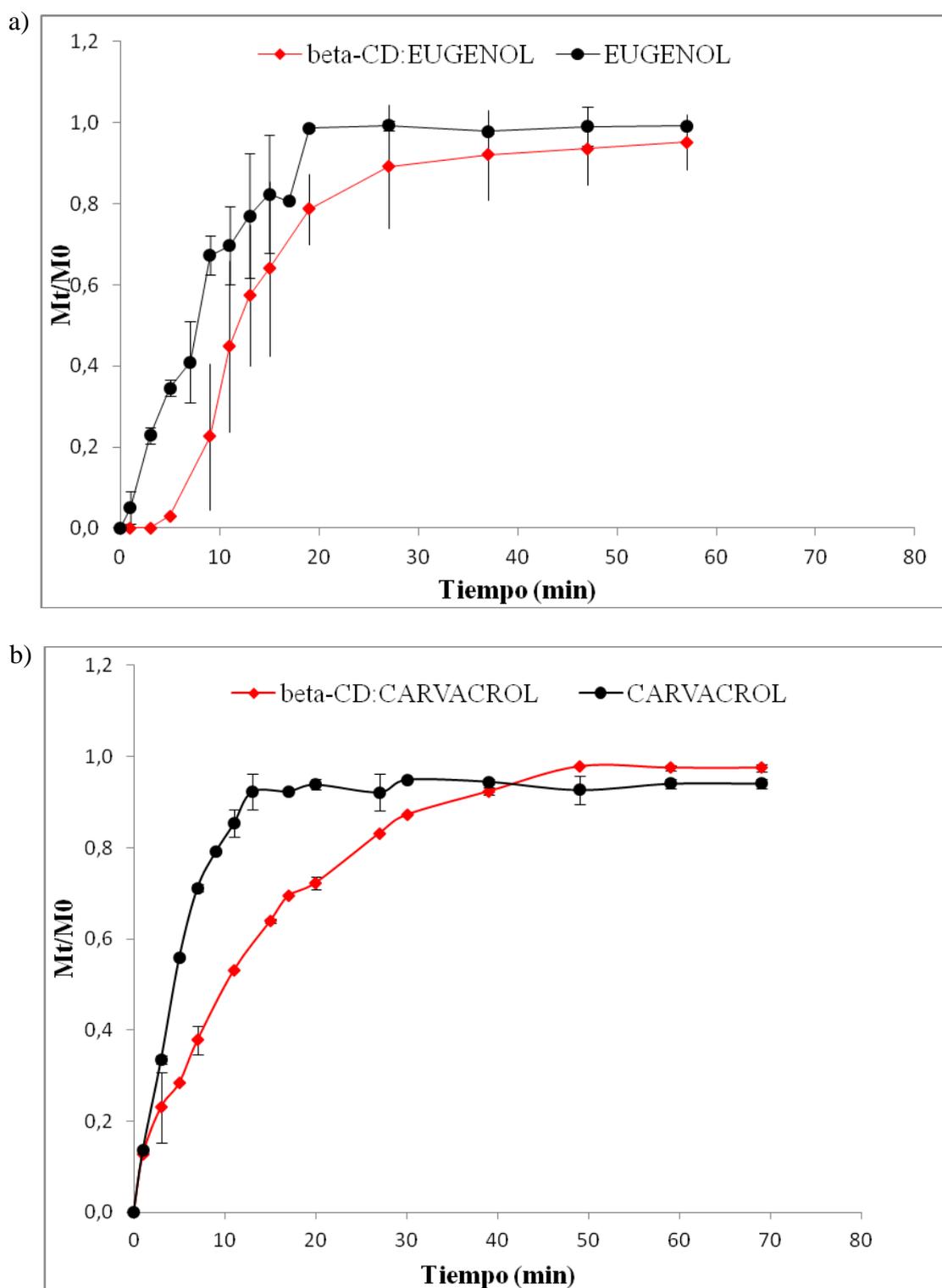


Figura 27. Diferencias en la liberación de a) eugenol y b) carvacrol a 22°C frente al tiempo en films de WPI y films de WPI y complejos de inclusión.

5. CONCLUSIONES

1. Los rendimientos de secado (RDT) de los complejos de inclusión α -, β -, γ -ciclodextrina son inferiores al 50%, en las condiciones de secado: 11% (w/w) de sólido y 180°C.
2. La eficacia en la retención (RE) en el caso de la β -ciclodextrina es del 80% y 45% en carvacrol y eugenol, respectivamente. Poniendo de manifiesto la notable incidencia de la polaridad en la RE.
3. El procedimiento de extracción para el cálculo de la RE es adecuado ya que la última extracción de los complejos de inclusión es inferior al RE<5% considerándose éste despreciable.
4. Los films preparados de WPI con adición de complejos de inclusión de β -ciclodextrina:eugenol y β -ciclodextrina:carvacrol son homogéneos y sin aglomerados.
5. Los complejos de inclusión con β -CD permiten retardar la difusión de eugenol y carvacrol en los films de WPI en el simulante alimentario D1.
6. El efecto de la β -CD es más pronunciado en el complejo de inclusión β -ciclodextrina:carvacrol que en β -ciclodextrina:eugenol sugiriendo que al ser mayor la ER los complejos son más estables y tarda más en difundir.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Albado M., Saez G. y Gabriel S., “*Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano (Origanum vulgare)*”. (17-19), Med hered, **2001**.

Ayala Zavala J.F., González Aguilar G.A., Álvarez Parrilla E., “*Encapsulación de aditivos alimentarios*”. Olivas Orozco G.I., Gonzalez-Aguilar G.A., Martín-Belloso O., y Soliva-Fortuny R., “*Películas y recubrimientos comestibles Propiedades y aplicaciones en alimentos*”. (269-293) Clave Editorial, **2012**.

Barbosa-Cánovas G.V., “*Capítulo 1: Películas y recubrimientos comestibles en contexto con otras tecnologías novedosas de conservación y procesado de alimentos*”. Olivas Orozco G.I., Gonzalez-Aguilar G.A., Martín-Belloso O., y Soliva-Fortuny R., “*Películas y recubrimientos comestibles Propiedades y aplicaciones en alimentos*”. (13-20) Clave Editorial, **2012**.

Cerisuelo J., Catalá R., Gavara R., Hernández-Muñoz P., “*Películas y recubrimientos comestibles. Fenómenos de transporte a través de películas y recubrimientos comestibles*”. Olivas Orozco G.I., Gonzalez-Aguilar G.A., Martín-Belloso O., y Soliva-Fortuny R., “*Películas y recubrimientos comestibles Propiedades y aplicaciones en alimentos*”. (59-95), Clave Editorial, **2012**.

CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical; ¿Qué es la biodisponibilidad?
http://www.agrosalud.org/descargas/poster_biodisponibilidad_julio_08.pdf

Durrieu V., Nesterenko A., Alric I., Violleau F., Silvestre F., “*A new way of valorizing biomaterials: The use of sunflower protein for α -tocopherol microencapsulation*” (115–124) Food Research International, **2013**.

Embuscado M.E., Huber K.C., “*Edible Films and Coatings for Food Applications*”. Springer, **2009**.

Fabra M.J., Chamblin O., Voilley A., Gay J.P., Debeaufort F., “*Influence of temperature and NaCl on the release in aqueous liquid media of aroma compounds encapsulated in edible films*”. (30-36) Journal of Food Engineering, **2012**.

Fernández-Pan I., Maté Caballero J.I., “*Chapter 11: Biopolymers for edible films and coatings in food applications*”. Plackett D., “*Biopolymers – New materials for sustainable films and coatings*”. (233-254) Wiley, **2011**.

GSFA Online.

<http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=347&lang=es>

Krochta J.M., y Mulder-Johnston C., “*Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities*”. (61-74), Food Technology, **1997**.

Han J.H., Gennadios A., “*Edible films and coatings: Overviews*”. Han J.H., “*Innovation in food packaging*”. (239-262) Elsevier Academic Press, **2005**.

Martínez G., y Gómez M.A., “*Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros*”. (300-312), Revista iberoamericana de polímeros, **2007**.

Olivas G.I., González-Aguilar G.A., Martín Belloso O., Soliva-Fortuny R., “*Películas y recubrimientos comestibles*”. Cerisuelo J., Catalá R., Gavara R., Hernández-Muñoz P., “*Fenómenos de transporte a través de películas y recubrimientos comestibles*”. (59-95), Clave **2012**.

Pavlati A.E., Orts W., “*Chapter 1. Edible Films and Coatings: Why, What, and How?*”. Embuscado M.E., Huber K.C., “*Edible Films and Coatings for Food Applications*”. (1-23), Springer, **2009**.

Reineccius G.A., “*Chapter 9. Edible Films and Coatings for Flavor Encapsulation*”. Embuscado M.E., Huber K.C., “*Edible Films and Coatings for Food Applications*”. (269-295), Springer, **2009**.

Reineccius T.A., Reineccius G.A., “*Encapsulation of Flavors using Cyclodextrins: Comparison of Flavor Retention in Alpha, Beta, and Gamma Types*”. Peppard, **2006**.

Reineccius T.A., Reineccius G.A., Peppard T.L., “*Encapsulation of Flavors using Cyclodextrins: Comparison of Flavor Retention in Alpha, Beta, and Gamma Types*”. (3271-3279) Food Chemistry and toxicology, **2002**.

Rodríguez G.M., “*Modificación de las propiedades físicas de films comestibles de almidón mediante la incorporación de plastificantes y surfactantes*”, **2003**.

Rojas Graü M.A., Soliva Fortuny R., y Martín Belloso O., “*Capítulo 13: Recubrimientos comestibles como portadores de sustancias activas*”. Olivas Orozco G.I., Gonzalez-Aguilar G.A., Martín-Belloso O., y Soliva-Fortuny R., “*Películas y recubrimientos comestibles Propiedades y aplicaciones en alimentos*”. (363-384) Clave Editorial, **2012**.

Royo M., Fernández-Pan I., Maté Caballero J.I.”*Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper*”. (1513-1519), Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010.

Szejtli J. “*Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*”. (1743-1753), Chem **1998**.

Zuidam N.J., y Shimoni E., “*Chapter 2: Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them*”. Zuidam N.J., Nedovic V., “*Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*”. (3-29) Hardcover, **2010**.

ANEXO 1

El estudio ANOVA llevado a cabo en este estudio ya demuestra que en absoluto los diferentes valores de las muestras estudiadas se parecen de forma significativa entre ellas. Debido a que el valor de significatividad es inferior al 5% ($\alpha = 0.05$), se desecha la hipótesis nula de que las medias de las diferentes muestras se asemejan entre ellas y pueden ser determinadas como iguales en análisis estadísticos. Debido a dicha diferencia, se lleva a cabo un estudio de la semejanza de las diferentes muestras estudiadas mediante un estudio post-hoc (ver **ANEXO Tabla 4**).

En la tabla mostrada se observa la separación llevada a cabo entre las diferentes muestras, siendo el subconjunto 1 el de menor eficacia (donde únicamente se encuentra el α -CD:carvacrol) y el subconjunto 3 el de mayor eficacia (el de mayor interés en nuestro caso).

Los compuestos activos (eugenol y carvacrol) poseen diferentes características de polaridad. Ello, unido al tamaño de partícula, simetría y otras características, hacen que para cada uno de los componentes a encapsular sea más adecuada una ciclodextrina u otra.

Al tener los estudios post-hoc del rendimiento de secado (**ANEXO Tabla 2**) y eficacia de retención (**ANEXO Tabla 4**) puede establecerse que combinaciones son las más eficientes. Estudiando dicho análisis post-hoc, puede apreciarse como la β -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina no son significativamente diferentes entre ellas. Con el carvacrol, las dos poseen una elevadísima eficacia de retención (considerándose iguales para una significatividad del 5%), y lo mismo sucede en el caso del eugenol, donde las tres ciclodextrinas forman un único grupo.

Viendo ello, podrían considerarse igual de buenas para llevar a cabo la encapsulación química de estos compuestos activos, pero consultándose el rendimiento de secado, se aprecia que la γ -ciclodextrina no está entre las más eficientes en el rendimiento de secado al encapsular carvacrol. Por el contrario, la β -ciclodextrina sí se encuentra en los subconjuntos más eficientes de ambos estudios, tanto al secar los complejos de inclusión formados por dicha ciclodextrina y cualquiera de los compuestos activos,

como al encapsular ambos (siendo con el carvacrol la más eficiente y con el eugenol no muestra diferencias significativas con las otras ciclodextrinas).

ANEXO Tabla 1. Estudio ANOVA del rendimiento de secado de los diferentes compuestos y ciclodextrinas empleados en el estudio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	771,971	5	154,394	6,364	,022
Intra-grupos	145,558	6	24,260		
Total	917,528	11			

ANEXO Tabla 2. Estudio Duncan post-hoc del rendimiento de secado de los diferentes compuestos y ciclodextrinas empleados en el estudio.

Complejo de inclusión	Subconjunto para alfa = 0.05	
	a	b
α -CD:carvacrol	25,5605	
γ -CD: carvacrol	26,3405	
β -CD:eugenol	32,5520	32,5520
α -CD:eugenol		43,2390
β -CD: carvacrol		43,2730
γ -CD:eugenol		44,1630
Sig.	,219	,067

ANEXO Tabla 3. Estudio ANOVA de la eficacia de retención de los diferentes compuestos y ciclodextrinas empleados en el estudio.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4683,888	5	936,778	46,286	,000
Intra-grupos	121,434	6	20,239		
Total	4805,322	11			

ANEXO Tabla 4. Estudio Duncan post-hoc de la eficacia de retención de los diferentes compuestos y ciclodextrinas empleados en el estudio.

Complejo de inclusión	Subconjunto para alfa = 0.05		
	a	b	c
α -CD: carvacrol	20,7750		
β -CD:eugenol		43,1800	
α -CD:eugenol		43,6550	
γ -CD:eugenol		52,1750	
γ -CD: carvacrol			72,1950
β -CD: carvacrol			80,4900
Sig.	1,000	,102	,115

β-CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES AS A CONTROLLED RELEASE TOOL IN ANTIMICROBIAL EDIBLE FILMS

C. Barba, A. Eguinoa and J.I. Maté
Universidad Pública de Navarra
Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona, Navarra, Spain



INTRODUCTION

The benefits of edible films or coatings placed on food surfaces for preservation or quality purposes have been widely documented (1). It is foreseen that in the next years the role of edible films or coatings on food will become increasingly important. This is because it is a low cost and environmental friendly option to extend food shelf-life.

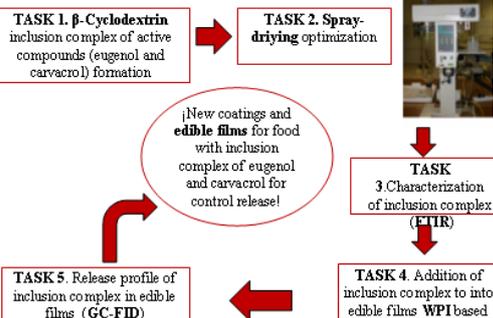
There is a specific growing demand of active edible films, that is, with functional ingredients/additives that could add a value to the food. These ingredients include antioxidants, colorants, probiotics, flavor, nutraceuticals and antimicrobials (2).

However, in some of these applications (e.g. antimicrobials compounds) it is necessary to control the release of the active compounds onto the food surface. Additive encapsulation provides a potential controlled release tool. Moreover, encapsulation can increase molecular stability and in some case, reduce off-flavors (3).

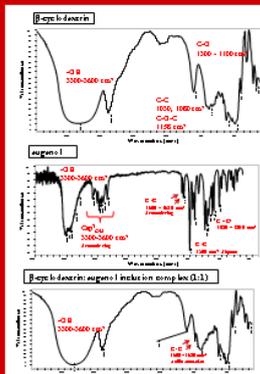
Specifically, cyclodextrins (CDs) are cyclic oligomers of α-D-glucose bonded through α-(1,4) linkages; depending on six, seven or eight glucopyranose units bonded, assigned as α-, β- or γ-CD. The shape of a CD molecule is similar to a truncated cone with a hydrophobic cavity and hydrophilic external surface. So they are able to build up host-guest complexes by inclusion of suitable hydrophobic molecules which would allow a release control potentially (4).

OBJECTIVE

In this work we propose β-cyclodextrin (β-CD) inclusion complexes of antimicrobial hydrophobic active compounds (eugenol and carvacrol) as a controlled release tool for edible films based on WPI (whey protein isolate).



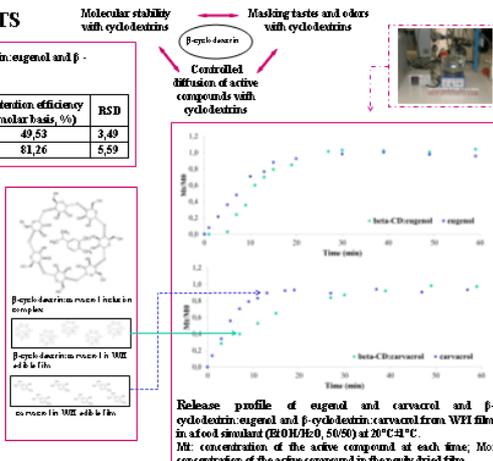
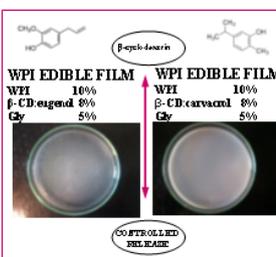
RESULTS



FTIR spectra of β-cyclodextrin:eugenol inclusion complex shows the characteristic transmission bands were shifted slightly compared to pure eugenol, suggesting the host-guest interactions between β-CD and eugenol.

Spray-drying yield and retention efficiency of β-cyclodextrin:eugenol and β-cyclodextrin:carvacrol calculated by GC-FID analysis

Compounds	Spray-drying yield (weight basis, %)	RSD	Retention efficiency (molar basis, %)	RSD
β-cyclodextrin:eugenol	32.19	1.86	49.53	3.49
β-cyclodextrin:carvacrol	43.27	4.49	81.26	5.59



CONCLUSIONS

- THE METHODOLOGY CARRIED OUT TO THE INCLUSION COMPLEX FORMATION (CO-PRECIPIATION AND SPRAY-DRYING) SHOWED THAT POLARITY HAD A SIGNIFICANT EFFECT ON THE RETENTION EFFICIENCY.
- β-CYCLODEXTRIN COMPLEXES OF EUGENOL AND CARVACROL WERE SUITABLE TO BE ADDED INTO WPI FILMS. THESE EDIBLE FILMS WERE FOUND TO BE HOMOGENEOUS AND STABLE. MOREOVER, COMPLEXES ALLOWED DECREASE THE RELEASE TIME INTO A FOOD SIMULANT. THIS MAY BE RELEVANT TO ANTIMICROBIAL FOOD APPLICATIONS.

REFERENCES

1. O. L. Ramos, J. C. Fernandes, S.I. Silva, M.E. Eirado, F. X. Malcata, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (2012)533- 552.
2. D. Badoletti, (Ed) *Biopolymers –New materials for sustainable films and coatings*. Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
3. M. J. Eshra, O. Charabin, A. Veilley, J. F. Gay, F. Debeaufort, *Journal of Food Engineering*, 108 (2012) 30-36.
4. T. A. Ramecna, G. A. Ramecna, T. L. Fegyard, *Journal of Food Science*, 66 (2003)1234-1239.

ACKNOWLEDGMENTS: To Universidad Pública de Navarra for the post-PhD contract (C.B.)

ANEXO Figura 1. Estudio del empleo de complejos de inclusión de β-ciclodextrine en el control de la difusión de compuestos antimicrobianos en films comestibles.