UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Encapsulación de Compuestos de Ajo (*Allium sativum*) para la Liberación Controlada de Componentes Antimicrobianos en Atmósferas con Alta Humedad Relativa

Trabajo de graduación presentado por Erick Danilo Donis González para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Ciencias de Alimentos

Diciembre

2013

Encapsulación de Compuestos de Ajo (*Allium sativum*) para la Liberación Controlada de Componentes Antimicrobianos en Atmósferas con Alta Humedad Relativa

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

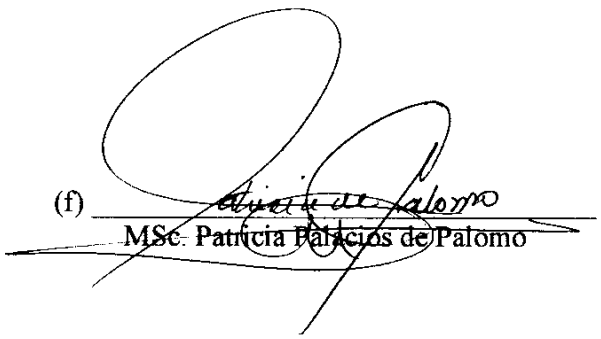
Encapsulación de Compuestos de Ajo (*Allium sativum*) para la Liberación Controlada de Componentes Antimicrobianos en Atmósferas con Alta Humedad Relativa

Trabajo de graduación presentado por Erick Danilo Donis González para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Ciencias de Alimentos

Diciembre

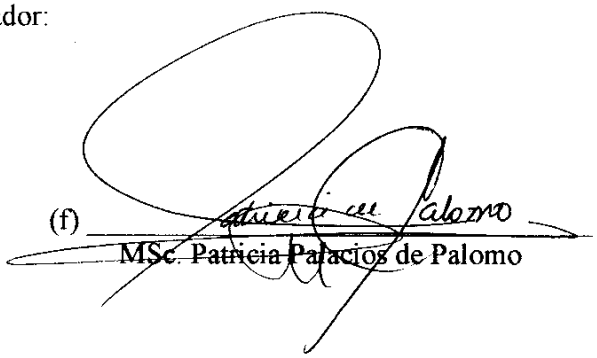
2013

Vo. Bo.:



(f) _____
MSc. Patricia Palacios de Palomo

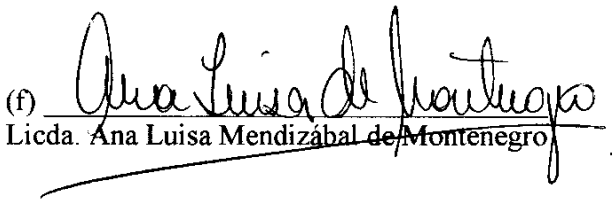
Tribunal Examinador:



(f) _____
MSc. Patricia Palacios de Palomo



(f) _____
MSc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz



(f) _____
Licda. Ana Luisa Mendizábal de Montenegro

Fecha de Aprobación: Guatemala, 6 de Diciembre del 2013

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS ..... **VII**

LISTA DE FIGURAS ..... **VIII**

LISTA DE FOTOGRAFÍAS ..... **IX**

LISTA DE CROMATOGRÁMAS ..... **X**

RESUMEN ..... **XI**

I. INTRODUCCIÓN **1**

II. OBJETIVOS **2**

A. GENERALES 2

B. ESPECÍFICOS 2

III. JUSTIFICACIÓN **3**

IV. MARCO TEÓRICO **4**

A. NANOTECNOLOGÍA 4

1. Nanotecnología en alimentos *5*

B. TECNOLOGÍA DE MICROENCAPSULACIÓN EN ALIMENTOS 9

1. Técnicas de microencapsulación *11*

2. Materiales para microencapsulación. *16*

C. CICLODEXTRINAS 18

1. Historia *18*

2. Tipos y estructura *19*

3. Características y propiedades *21*

4. Complejos de inclusión *23*

D. TECNOLOGÍA DE EMPAQUES ACTIVOS 30

1. Definición *30*

2. Ventajas *31*

3. Presentaciones de empaques activos *31*

4. Liberación controlada *32*

E. AJO (ALLIUM SATIVUM) 32

2. Descripción *33*

3. Orígen *35*

4. Composición bioquímica y química *36*

5. Actividad antimicrobiana *37*

F. HUMEDAD RELATIVA 42

1. Definición *42*

2. Humedad relativa en empaques ... *43*
3. Efecto de la humedad relativa en características microbiológicas ... *43*
4. Efecto de la humedad relativa en inclusiones de ciclodextrina ... *43*
G. CROMATOGRAFÍA DE GASES ... 44
1. Definición general ... *44*
2. Cromatografía de gases ... *45*
3. Cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS). ... *46*
V. METODOLOGÍA ... 48
A. INCLUSIÓN MOLECULAR DE ACEITE DE AJO ... 48
1. Procedimiento (Método de coprecipitación) ... *48*
B. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES ... 49
1. Aceite esencial de ajo ... *49*
2. Inclusiones moleculares ... *49*
C. LIBERACIÓN CONTROLADA EN AMBIENTE CON ALTA HUMEDAD RELATIVA ... 50
1. Cámara ... *50*
VI. RESULTADOS ... 52
VII. DISCUSIÓN ... 60
VIII. CONCLUSIONES ... 77
IX. RECOMENDACIONES ... 78
X. FUENTES BIBLIOGRÁFICAS ... 79
XI. ANEXO I ... 82
XII. ANEXO II ... 90

LISTA DE TABLAS

Tabla # 1: Lista de las técnicas de encapsulamiento y sus pasos respectivos. 15

Tabla # 2: Lista de materiales de microencapsulado y métodos comúnmente utilizados. 17

Tabla # 3: Características de tipos de ciclodextrina 22

Tabla # 4: Composición química característica del ajo 36

Tabla # 5: Compuestos azufrados presentes en ajo y cebolla 40

Tabla # 6: Soluciones saturadas de sales 51

Tabla # 7: Compuestos importantes detectados en mayor proporción (de mayor a menor) en aceite de ajo 52

Tabla # 8: Compuestos volátiles importantes detectados en mayor proporción (de mayor a menor) en aroma de aceite de ajo 52

Tabla # 9: Compuestos volátiles importantes de aceite de ajo detectados en comprobación de inclusiones moleculares 53

Tabla # 10: Compuestos detectados (de mayor a menor) en pruebas de aroma de cápsulas 53

Tabla # 11: Compuesto volátil importante de aceite de ajo detectado en prueba de cámara con alta humedad relativa 53

Tabla # 12: Fórmula molecular, peso molecular y estructura química de compuestos detectados en análisis 58

Tabla # 13: Razón de liberación de compuestos en cámara (en relación a los otros compuestos presentes) 58

Tabla # 14: Porcentajes de humedad de cápsulas elaboradas 58

Tabla # 15: Humedad perdida por proceso de liofilizado 59

Tabla # 16: Rendimiento de proceso 59

LISTA DE FIGURAS

Figura # 1: Matriz de aplicaciones de la nanotecnología en la Ciencia de Alimentos..... 7

Figura # 2: Microcápsula con un solo núcleo y una pared (estructura de partícula única)..... 10

Figura # 3: Microcápsula con un solo núcleo y varias paredes (recubrimientos)..... 10

Figura # 4: Microcápsula con varios núcleos (estructura agregada)..... 10

Figura # 5: Estructuras químicas de ciclodextrinas..... 20

Figura # 6: Estructura de bolas de ciclodextrinas..... 20

Figura # 7: Esquema de cono truncado..... 21

Figura # 8: Esquema de tamaños moleculares de ciclodextrinas..... 21

Figura # 9: Inclusión completa..... 25

Figura # 10: (a) Inclusión parcial por tamaño de sustrato. (b) Inclusión parcial por afinidad de partes del sustrato..... 26

Figura # 11: Inclusión axial..... 26

Figura # 12: (a) Estequiometria 1:2. (b) Estequiometria 2:1 con sustrato simétrico. (c) Estequiometria 2:1 con sustrato asimétrico. (d) Estequiometria 2:2. (e) Estequiometria superior..... 27

Figura # 13: Esquema de formación de complejos de inclusión..... 28

Figura # 14: Esquemas representativos de planta de ajo..... 35

Figura # 15: Formación de Aliicina..... 39

Figura # 16: Diagrama de reacción de inclusiones moleculares frente a alta humedad relativa..... 44

Figura # 17: Diseño de propuesta de empaque..... 76

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía # 1: Cromatrógrafo de gases y detector de masas 60

Fotografía # 2: Solución de ciclodextrina, agua y etanol sin calentar 63

Fotografía # 3: Solución de ciclodextrina, agua y etanol luego del calentamiento..... 64

Fotografía # 4: Aceite de ajo y etanol 64

Fotografía # 5: Adición de aceite a solución de ciclodextrina 65

Fotografía # 6: Adición de aceite a solución de ciclodextrina 65

Fotografía # 7: Agitación por 4 horas 65

Fotografía # 8: Solución de ciclodextrina y aceite..... 65

Fotografía # 9: Inclusiones moleculares luego de refrigeración 66

Fotografía # 10: Inclusiones moleculares luego de refrigeración 66

Fotografía # 11: Inclusiones moleculares luego de filtrado al vacío 67

Fotografía # 12: Liofilizador..... 67

Fotografía # 13: Válvulas de vacío 68

Fotografía # 14: Válvulas de vacío, frasco de vidrio y empaque de hule 68

Fotografía # 15: Muestra de inclusiones moleculares liofilizándose 69

Fotografía # 16: Muestra de inclusiones moleculares..... 69

Fotografía # 17: Tubo de análisis de cabeza de aire 70

Fotografía # 18: Sistema de cámara de vidrio y sensor de humedad y temperatura..... 72

Fotografía # 19: Sensor de humedad y temperatura y empaques de hule..... 73

Fotografía # 20: Bolsa de inclusiones moleculares..... 73

Fotografía # 21: Vista lateral de sistema de cámara 73

LISTA DE CROMATOGRÁMAS

Cromatograma # 1: Cromatograma de aceite de ajo 54

Cromatograma # 2: Cromatograma de aroma de aceite de ajo 55

Cromatograma # 3: Cromatograma de tubo de análisis de cabeza de aire (comprobación de inclusiones moleculares) 56

Cromatograma # 4: Cromatograma de aire ambiental de atmósfera circundante 57

RESUMEN

Para la encapsulación de los compuestos antimicrobianos del aceite de ajo se utilizó el método de inclusión molecular, utilizando β-Ciclodextrina, y el método de coprecipitación (proporción (12:88) utilizada en el estudio de Ayala-Zavala) con una solución 1:2 de etanol absoluto:agua para la disolución de la ciclodextrina. Una vez obtenidas las cápsulas se utilizó papel filtro (marca Whatman, número 4) para su filtrado y un liofilizador (marca FreeZone, Modelo Serie 78060) de laboratorio para su secado final. Para la comprobación del encapsulado se realizó una prueba de hidratación directa con agua, dentro de un tubo de análisis de espacio de cabeza de una capacidad de 50 ml (1 gramo de cápsulas con 10 mililitros de agua por 10 minutos). Para el análisis de cámara se elaboró una cámara hermética de vidrio con atmósfera interna modificada (98 % de humedad relativa con solución saturada de Sulfato de Potasio y agua y una temperatura entre 21 y 25 °C) y un sensor de humedad y temperatura (marca Omega). Para el empaque de las cápsulas se elaboró una bolsa utilizando papel Kimwipe, se midió 1 gramo de cápsulas y se empacaron dentro de la bolsa elaborada. Para el análisis del aceite de ajo y compuestos liberados por cápsulas se utilizó el método de Cromatografía de Gases con un Cromatógrafo (marca Agilent Technologies) con columna especial para aceites esenciales (DB-WAX, marca Agilent J&W, largo de 60 m, diámetro de 0.250 mm, film de 0.25 μm, límite de temperatura 20-260 °C) conectado a un sistema de Detección de Espectro de Masas (marca Agilent Technologies), tomando como compuestos indicadores el 3,3-Tiobis 1-Propeno y el Alil Metil Sulfuro.

Finalmente se comprobó que fue posible la implementación del método de inclusión molecular, utilizando β-Ciclodextrina, para la microencapsulación de compuestos azufrados antimicrobianos del aceite de ajo. Los resultados de esta prueba comprueban que la encapsulación de compuestos antimicrobianos del ajo se llevó a cabo satisfactoriamente con el procedimiento elaborado. Así mismo comprueban que, al contacto con agua, las cápsulas se ven inmediatamente activadas liberando así su contenido. De la misma manera, fue posible la liberación controlada de compuestos microencapsulados del aceite de ajo, en ambientes con alta humedad relativa. Los resultados obtenidos demuestran que una alta humedad relativa genera una liberación controlada de los compuestos encapsulados por la ciclodextrina.

I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un enfoque de la ciencia, relativamente moderno, que involucra los conocimientos de una gran variedad de ramas como la ingeniería, biología, medicina y electrónica, para la manipulación de partículas en unidades nanométricas. A medida que la tecnología fue evolucionando, el entendimiento de las propiedades de partículas y materiales en la nanoescala fue incrementando, lo que causó que científicos incursionaran en un área, aunque desconocida, llena de oportunidades.

El siguiente trabajo tiene como propósito la implementación del método de inclusión molecular, utilizando β-Ciclodextrina, para la microencapsulación de compuestos azufrados antimicrobianos del aceite de ajo, su liberación controlada en ambientes con alta humedad relativa. Este trabajo se basa en el hecho que existen estudios previamente elaborados y publicados en donde se muestra que la microencapsulación de compuestos hidrofóbicos, por medio del uso del compuestos cíclicos llamados ciclodextrinas, es una técnica viable para la liberación controlada de compuestos antimicrobianos en empaques activos.

II. OBJETIVOS

A. Generales

1. Implementar el método de inclusión molecular, utilizando β-Ciclodextrina, para la microencapsulación de compuestos azufrados antimicrobianos del aceite de ajo.

B. Específicos

1. Liberar en forma controlada los compuestos microencapsulados del aceite de ajo, en ambientes con alta humedad relativa.

2. Comprobar la liberación controlada de compuestos microencapsulados del aceite de ajo, en ambientes con alta humedad relativa, utilizando el método de Cromatografía de Gases con Espectrómetro de Masas.

3. Elaborar una propuesta de diseño para el empaque de alimentos y la liberación controlada de los compuestos encapsulados.

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la nanotecnología ha tenido un desarrollo considerable en el área de ingeniería y ciencia de alimentos. Inicialmente ahondo en la investigación de los polímeros y su mejora, seguido de atmósferas modificadas y por último en la tecnología de liberación controlada. Esta última tuvo sus inicios en la química farmacéutica, en donde la protección y dosificación de compuestos médicos era su primordial objetivo. A medida que los científicos empezaron a ver sus beneficios, inició la encapsulación de ingredientes funcionales a nivel micro y finalmente a nivel molecular. Esta tecnología relativamente nueva en esta área se implementa ahora en la tecnología de empaques activos, en donde la liberación se da por causa de agentes e impulsos externos y el efecto puede llegar a ser muy considerable. La microencapsulación de compuestos antibacteriales naturales, obtenidos de aceites esenciales de plantas ha tenido un impacto significativo y sobresaliente, debido a efecto positivo en la preservación de alimentos y al hecho que es un compuesto natural que no presenta mayor riesgo a la salud del consumidor.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Nanotecnología

La nanotecnología se enfoca en la caracterización, fabricación y manipulación de estructuras biológicas y no biológicas menores a 100 nm. Las estructuras en esta escala han demostrado poseer propiedades funcionales únicas y novedosas. Consecuentemente, el interés y las actividades en la investigación en esta área han incrementado considerablemente en los años pasados. Según la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (2006), "La nanotecnología es el entendimiento y control de la materia en dimensiones de apenas 1 a 100 nm, donde fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas. Abarcando la ciencia en nanoescala, ingeniería y tecnología, la nanotecnología involucra proyecciones de imagen, medición, modelado y manipulación de materia a esta longitud de escala". (Weiss, Jochen; Takhistov, Paul; McClements, Julian.; 2006)

Con el incremento de oportunidades financiadas e interés en este campo, el término "nano" es más frecuente y usualmente utilizado deliberadamente, lo cual ha llevado a cierto criticismo dentro de la comunidad científica. Ya sea justificado o no, debe ser entendido que el campo entero de la nanociencia es esencialmente un derivativo ecléctico de disciplinas establecidas como química, ciencia interfacial, tecnologías de microfabricación y muchas más. Sin embargo, el uso del término "nano" permite a los investigadores resaltar el hecho que procesos o estructuras materiales son diseñadas y optimizadas para utilizar propiedades y comportamientos específicos en longitudes de 10^{-7} a 10^{-9} m. (Weiss, Jochen; Takhistov, Paul; McClements, Julian.; 2006)

Los beneficios potenciales de la nanotecnología han sido reconocidos por varias industrias, y productos comerciales están siendo manufacturados, como en las industrias de microelectrónica, aeroespacio y farmacéutica. Desarrollos en estas industrias son

impulsados por investigación fundamental y aplicada en física, química, biología, ingeniería y ciencia de materiales. En contraste, las aplicaciones de la nanotecnología dentro de la industria alimenticia son más bien limitadas. Sin embargo, los logros y descubrimientos en nanotecnología han empezado a impactar la industria alimenticia y las industrias asociadas; esto afecta aspectos importantes de seguridad alimentaria hasta la síntesis molecular de productos e ingredientes alimenticios nuevos. El hecho que sistemas con características estructurales en la nanoescala posean propiedades físicas, químicas y biológicas sustancialmente diferentes de sus contrapartes macroscópicas está cambiando el entendimiento de fenómenos biológicos y físicos en sistemas alimenticios. Debido a que los alimentos son sistemas biológicos complejos que son gobernados por muchos de los mismos mecanismos y principios básicos que biólogos y bioquímicos estudian, es de esperar que los descubrimientos hechos en nanotecnología también puedan impactar eventualmente en la industria alimenticia. Sin embargo, los alimentos sufren una gran variedad de modificaciones inducidas durante la post-cosecha y procesamiento que afectan la funcionalidad biológica y bioquímica del sistema. La nanotecnología permite a los científicos medir, controlar y manipular materia en el nivel de nanoescala para cambiar esas propiedades y funciones de una manera beneficiosa. (Weiss, Jochen; Takhistov, Paul; McClements, Julian.; 2006)

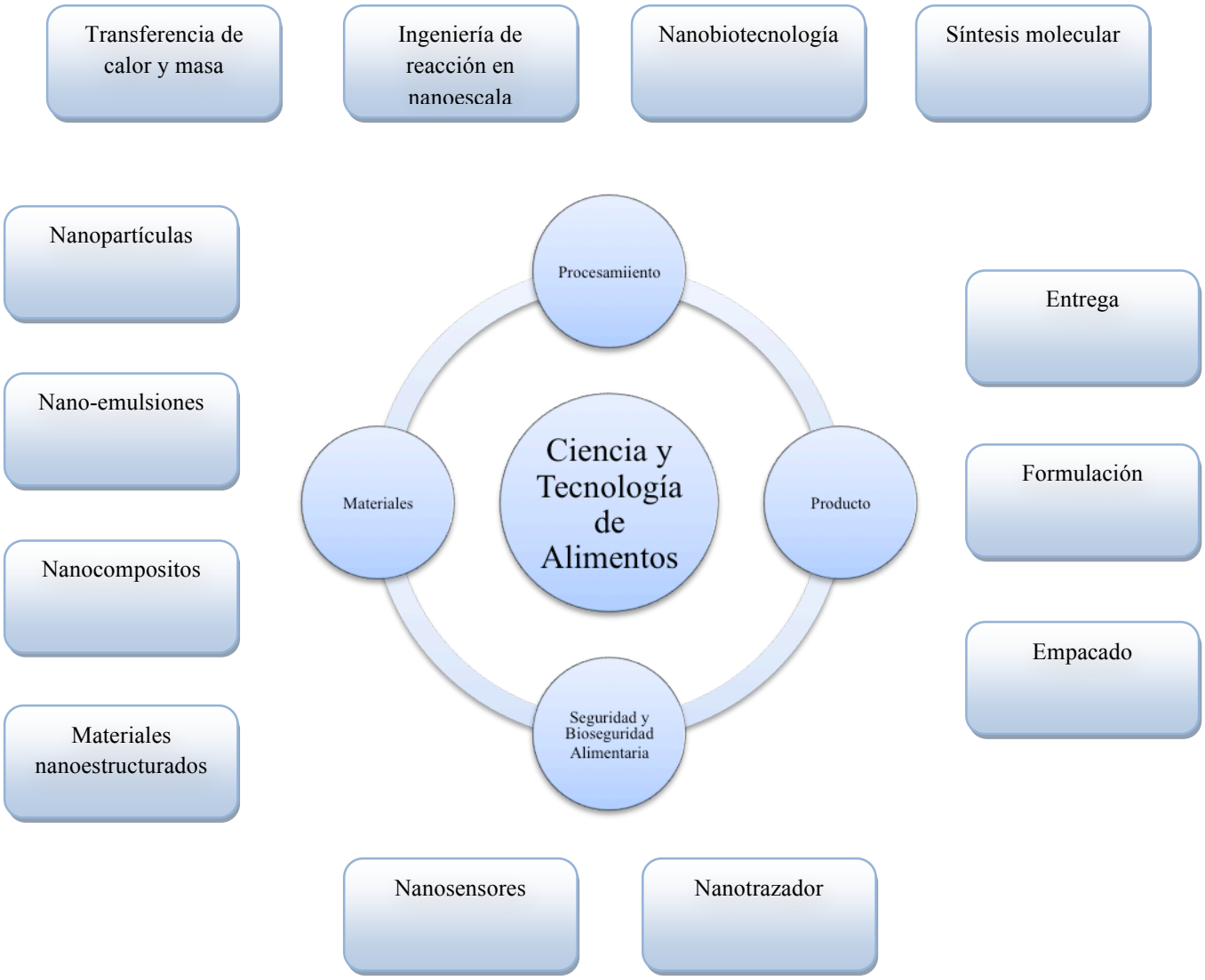
1. Nanotecnología en alimentos. La nanotecnología tiene el potencial de impactar muchos aspectos de sistemas alimenticios y agrícolas. Seguridad alimenticia, métodos de entrega de tratamientos de enfermedades, nuevas herramientas para biología molecular y celular, nuevos materiales para la detección de patógenos y protección del ambiente son ejemplos de los enlaces importantes de la nanotecnología a la ciencia e ingeniería de sistemas agrícolas y alimenticios. Ejemplos de la nanotecnología como una herramienta para lograr avances posteriores en la industria alimenticia se muestran a continuación:

- Seguridad incrementada en la manufactura, procesamiento y envío de productos alimenticios a través de sensores para la detección de patógenos y contaminantes.

- Dispositivos para mantener records históricos ambientales de un producto en particular y rastreo de envíos individuales.
- Sistemas que provean integración de detección, localización, reporte y control remoto de productos alimenticios (sistemas inteligentes) y que puedan incrementar la eficacia y seguridad de procesamiento y transporte de alimentos.
- Encapsulación y sistemas de entrega que acarreen, protejan y entreguen ingredientes alimenticios funcionales al sitio específico de acción.

La mayoría de investigación nanotecnológica se enfoca en el desarrollo de aplicaciones en biociencias e ingeniería. Las estrategias para aplicar la nanociencia a la industria alimenticia son diferentes a las aplicaciones de nanotecnología más tradicionales. El procesamiento de alimentos es una industria multitecnológica manufacturadora que involucra una amplia variedad de materiales crudos, altos requerimientos de bioseguridad y procesos tecnológicos bien regulados. Cuatro grandes áreas en producción de alimentos pueden verse beneficiadas de la nanotecnología: Desarrollo de nuevos materiales funcionales, procesamiento en micro y nanoescala, desarrollo de productos y diseño de métodos e instrumentación para mejorar la seguridad y bioseguridad de alimentos. La figura que se muestra a continuación muestra las posibles aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimenticia. (Weiss, Jochen; Takhistov, Paul; McClements, Julian.; 2006)

Figura # 1: Matriz de aplicaciones de la nanotecnología en la Ciencia de Alimentos



(Weiss, Jochen; Takhistov, Paul; McClements, Julian.; 2006)

De manera general, existe un gran número de aplicaciones potenciales de la nanotecnología dentro de la industria alimenticia; sin embargo, muchas de estas pueden ser comercialmente adoptadas con dificultad debido a que son muy caras o muy imprácticas para ser implementadas en una escala industrial. Las aplicaciones limitadas de la nanotecnología a la industria alimenticia cambiarán a medida que las tecnologías de nanofabricación se vuelvan más rentables. A continuación se muestra una lista de las aplicaciones de la nanotecnología que pueden poseer potencial comercial en un futuro cercano.

- Nanodispersiones y nanocápsulas.
- Coloides asociados.
- Nano-emulsiones.
- Emulsiones múltiples nanoestructuradas.
- Emulsiones multicapa nanoestructuradas.
- Nanopartículas biopoliméricas.
- Nanolaminados.
- Nanocompositos.
- Nanofibras.
- Nanotubos.
- Innovación de productos alimenticios.

(Weiss, Jochen; Takhistov, Paul; McClements, Julian.; 2006)

B. Tecnología de microencapsulación en alimentos

La microencapsulación es definida como una tecnología de empacado de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en cápsulas miniaturas selladas que pueden liberar su contenido en razones controladas bajo condiciones específicas. La tecnología de microencapsulación ha sido utilizada por la industria alimenticia por más de 60 años. En un sentido extenso, la tecnología de encapsulación en procesamiento de alimentos incluye el recubrimiento de partículas diminutas de ingredientes (acidulantes, grasas y sabores) como también ingredientes completos (pasas, nueces y productos de confitería), lo cual puede ser logrado por medio de técnicas de microencapsulado y macro-revestimiento. Específicamente, la microcápsula tiene la capacidad de preservar una sustancia en fino estado de división y liberarla a medida que la ocasión lo demande. Estas microcápsulas pueden poseer un rango de tamaño desde submicrómetros hasta varios milímetros y poseer múltiples formas, dependiendo en los materiales y métodos utilizados para prepararlas. La industria de alimentos aplica el proceso de microencapsulación por una variedad de razones: (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

- El atrapado por encapsulación puede proteger el material del núcleo por degradación reduciendo su reactividad a su ambiente externo (calor, humedad, aire y luz).
- La razón de evaporación o transferencia del material del núcleo al ambiente exterior es reducida/retardada.
- Las características físicas del material original pueden ser modificadas y facilitar su manipulación.
- El producto puede ser diseñado para liberarse lentamente a través del tiempo o a en un punto en específico (para controlar la liberación del material del núcleo para alcanzar el retraso apropiado hasta el estímulo correcto.
- El sabor del material del núcleo puede ser enmascarado.
- El material del núcleo puede ser diluido cuando solamente pequeñas cantidades son requeridas y aun así obtener una dispersión adecuada en el material hospedador.

- Puede ser empleado para separar componentes dentro de una mezcla que de otra manera reaccionarían con otros.

Varias propiedades de las microcápsulas que pueden ser cambiadas para adaptarse a las aplicaciones específicas de los ingredientes incluyen la composición, mecanismo de liberación, tamaño de partícula, forma física final y costo. La arquitectura de las microcápsulas es generalmente dividida en varias clasificaciones: (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

Figura # 2: Microcápsula con un solo núcleo y una pared (estructura de partícula única).

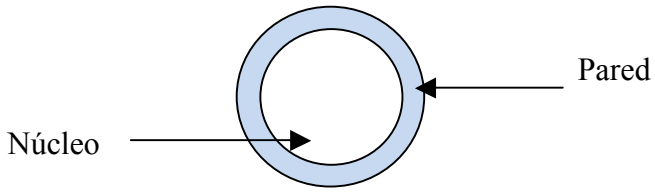


Figura # 3: Microcápsula con un solo núcleo y varias paredes (recubrimientos).

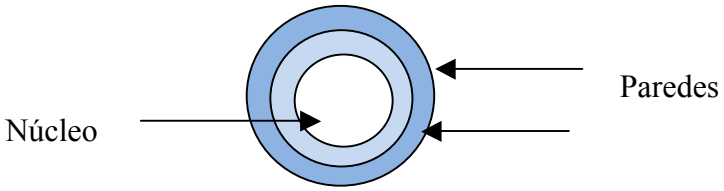
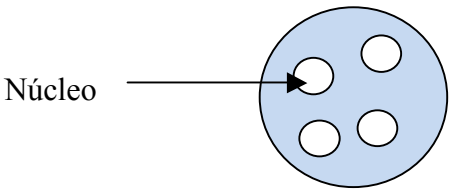


Figura # 4: Microcápsula con varios núcleos (estructura agregada).



La estructura más simple es aquella con un solo núcleo y una pared. En esta, una esfera (núcleo) se encuentra rodeada por una pared o membrana de grosor uniforme, simulando la estructura de un huevo. En este diseño es posible variar la profundidad del núcleo al variar el grosor de la pared. Este tipo de diseño posee el nombre de estructura

de partícula única. También es posible diseñar microcápsulas que posean varios núcleos distintos dentro de la misma microcápsula o varias partículas con núcleos dentro de una matriz continua de material de pared. Este tipo de diseño posee el nombre de estructura agregada. Con el objetivo de mejorar las propiedades de ingredientes de alimentos, la inmovilización de ingredientes alimenticios dentro de una polímero adecuado o la adición de agentes antimicrobianos son prácticas comunes en las industrias de alimentos. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

1. Técnicas de microencapsulación. La encapsulación de ingredientes alimenticios puede ser lograda por varios métodos. La selección del proceso de microencapsulación es gobernado por las propiedades (físicas y químicas) de los materiales del núcleo y revestimiento y de la aplicación destinada del ingrediente utilizado. A continuación se presenta una explicación breve de cada una de las técnicas existentes. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

a. Secado por aspersión (Spray-Drying): Este método de encapsulación ha sido utilizado en la industria de alimentos desde finales de 1950 para proveer cierta protección a aceites saborizantes contra la degradación/oxidación y para convertir líquidos a polvos. Esta es la técnica más ampliamente utilizada y es típicamente utilizada para la preparación de aditivos y sabores alimenticios secos y estables. Así mismo, este es uno de los procesos más económicos y flexibles y tiene la capacidad de producir partículas de buena calidad. De manera general, en este método se utiliza un atomizador para dispersar las partículas en una cámara con temperaturas elevadas y flujo de aire específico. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

b. Enfriado o congelado por aspersión: En este método, las mezclas de los núcleos y paredes son atomizadas dentro del aire enfriado o congelado, lo que causa que la pared se solidifique alrededor del núcleo. A diferencia del secado por aspersión, este método no incluye la evaporación del agua. Así mismo, el material de revestimiento es típicamente alguna forma de aceite vegetal o sus derivados. Las microcápsulas

preparadas por este método son insolubles en agua debido al recubrimiento lipídico. Por esta razón, estas técnicas tienden a ser utilizadas para encapsular materiales de núcleo solubles en agua, como minerales, vitaminas solubles en agua, enzimas, acidulantes y ciertos sabores. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

c. Recubrimiento en cama fluidizada: Originalmente desarrollado como una técnica farmacéutica, este método es actualmente cada vez más aplicado a la industria de alimentos para afinar el efecto de ingredientes y aditivos funcionales. Este método fue desarrollado por D.E. Wurster en los ’50, de aquí que se le conozca con el nombre de “Proceso Wurster”. En este método las partículas sólidas son suspendidas, utilizando aire con grandes velocidades, en una cámara con temperatura y humedad controlada donde el material revestidor es atomizado. Existen tres variaciones de este método: (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

1) Aspersión Superior (Top-Spray)
2) Aspersión Inferior (Bottom-Spray) (Conocido también como “Sistema Wurster”)
3) Aspersión Tangencial (Tangential-Spray)

d. Extrusión: El encapsulado de ingredientes alimenticios por este método es un proceso relativamente nuevo comparado con el de secado por aspersión. La palabra extrusión utilizada en este contexto no posee el mismo significado que la utilizada en el proceso de extrusión utilizado para cocinar y texturizar productos a base de cereales. Actualmente, este método de encapsulación aplicado para la encapsulación de sabores, es un método atrapador de temperaturas relativamente bajas, que involucra el forzado del material del núcleo en una masa de carbohidrato derretido a través de una serie de tintes hacia un baño de líquido deshidratándose. El material revestidor se endurece en contacto con los líquidos, formando un matriz encapsuladora para atrapar el material del núcleo. Luego los filamentos extruídos son separados del baño líquido, secados y finalmente clasificados por tamaño. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

e. Extrusión centrífuga: Este método consiste en un proceso de coextrusión líquido que utiliza boquillas que consisten en orificios concéntricos localizados en la circunferencia externa de un cilindro rotativo (cabeza). El cilindro encapsulador o cabeza consiste en un tubo alimentador concéntrico a través del cual los materiales de revestimiento y del núcleo son bombeados separadamente hacia las múltiples boquillas montadas en la superficie externa del dispositivo. A medida que el material del núcleo pasa a través del centro del tubo, el material revestidor fluye a través del tubo exterior. Este dispositivo entero se encuentra unido a un eje rotatorio de manera que la cabeza rota sobre su eje vertical durante el proceso. Esta fuerza centrífuga impulsa el material hacia los extremos, causando que se rompa y se formen así pequeñas partículas. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

f. Liofilización: La liofilización, o secado por congelación, es un proceso utilizado para la deshidratación de la mayoría de todos los materiales y aromas sensibles al calor. A excepción del largo periodo de deshidratación requerido (comúnmente 20 h) este es una técnica relativamente simple, en donde el material se congela para luego aplicar calor y vacío para así sublimar el agua congelada. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

g. Coacervación: Este método involucra la separación de una fase líquida de material revestidor de una solución polimérica seguido del recubrimiento de esa fase como una capa uniforme alrededor de las partículas de núcleo suspendidas. Finalmente, el recubrimiento es solidificado. Esta técnica consta de tres pasos: (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

1) Formación de una fase de tres químicos inmiscibles (líquido vehículo, material de núcleo y material recubridor)
2) Deposición del revestimiento
3) Solidificación del revestimiento

h. Separación de suspensión centrífuga: Este es un proceso reciente que involucra el mezclado de los materiales del núcleo y pared y su posterior adición a un disco rotatorio. Los materiales del núcleo abandonan el disco con un revestimiento de líquido residual y las microcápsulas obtenidas son finalmente secadas o congeladas. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

i. Cocristalización: Este es un proceso nuevo de encapsulación que utiliza sacarosa como una matriz para la incorporación de materiales de núcleo. El sirope de sacarosa es concentrado hasta el estado supersaturado y mantenido a una temperatura suficientemente alta para prevenir la cristalización. Una cantidad predeterminada de material de núcleo es agregada a este sirope con una agitación mecánica vigorosa, la cual provee puntos de nucleación para que la mezcla sacarosa/ingrediente cristalice. Los productos encapsulados son finalmente secados hasta la humedad deseada y clasificados por tamaño. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

j. Atrapamiento en liposomas: Los liposomas consisten de una fase acuosa o lipídica que se encuentra completamente rodeada por una membrana fosfolipídica, creada por medio de la utilización de emulsificantes y la aplicación de agitación mecánica y posiblemente calor. Estos consisten de una o más capas de lípidos no tóxicos, por lo que la permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad puede ser variada a través de la variación del tamaño y la composición de los lípidos utilizados. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

k. Goteo: Esta técnica consiste en la extrusión de gotas, de una solución de material de núcleo, desde una boquilla (usualmente de una jeringa) en condiciones tranquilas. Las gotas generadas pueden ser solidificadas por enfriamiento o por gelificación, utilizando una solución solidificadora. Esta es una de las técnicas más utilizadas debido a su facilidad, bajo costo y rapidez, aunque su baja productividad la hace poco rentable en ciertos casos. (Poncelet, Denis; Picot, Arnaud; El Mafadi, Samira; Capsulæ.; 2001)

l. Complejos de inclusión: La inclusión molecular es otro medio para lograr la encapsulación. A diferencia de todos los métodos de encapsulación previamente descritos, esta técnica tiene lugar a un nivel molecular, en donde la β-Ciclodextrina es el medio encapsulador típicamente utilizado. En este método, las moléculas de β-Ciclodextrina forman complejos inclusivos con compuestos que caben dimensionalmente dentro de su cavidad central. Este método será explicado con mayor detenimiento en una sección posterior específicamente dedicada a esta técnica. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

A continuación se presenta una tabla con una lista de las técnicas de encapsulamiento y sus pasos respectivos.

Tabla # 1: Lista de las técnicas de encapsulamiento y sus pasos respectivos.

TÉCNICA	**PASOS**
Secado por aspersión (Spray-Drying)	**1.** Preparación de la dispersión **2.** Homogenización de la dispersión **3.** Atomización de la dispersión **4.** Deshidratación de las partículas atomizadas
Enfriado por aspersión (Spray-Cooling)	**1.** Preparación de la dispersión **2.** Homogenización de la dispersión **3.** Atomización de la dispersión
Congelado por aspersión (Spray-Chilling)	**1.** Preparación de la dispersión **2.** Homogenización de la dispersión **3.** Atomización de la dispersión
Recubrimiento en cama fluidizada	**1.** Preparación de la solución recubridora **2.** Fluidización de las partículas de núcleo **3.** Recubrimiento de partículas de núcleo
Extrusión	**1.** Preparación de la solución recubridora derretida **2.** Dispersión del núcleo dentro del polímero derretido **3.** Enfriado o pasado de mezcla núcleo/recubrimiento a través de líquido deshidratador
Extrusión centrífuga	**1.** Preparación de la solución de núcleo **4.** Preparación de la solución del material recubridor **2.** Coextrusión del núcleo y solución recubridora a través de boquillas
Liofilización	**1.** Mezcla del núcleo en solución recubridora **2.** Congelado-Secado de la mezcla
Coaservación	**1.** Formación de fases de tres químicos insolubles **2.** Deposición del recubrimiento **3.** Solidificación del recubrimiento
Separación de suspensión centrífuga	**1.** Mezcla del núcleo en material recubridor **2.** Vertido de mezcla sobre disco rotatorio para obtención de partículas pequeñas encapsuladas **3.** Secado

Continuación de Tabla # 1

Cocristalización	**1.** Preparación de solución supersaturada de sacarosa **2.** Adición de núcleo a solución supersaturada **3.** Emisión de calor sustancial luego que la solución alcanza la temperatura de cristalización de la sacarosa
Atrapamiento en liposomas	**1.** Microfluidización **2.** Ultrasonificación **3.** Evaporación de fase reversa
Goteo	**1.** Preparación de solución de núcleo **2.** Preparación de solución solidificadora **3.** Goteo de solución de núcleo dentro de solución solidificadora
Complejos de inclusión	**1.** Preparación de los complejos por medio de mezcla, molienda o secado por aspersión

(Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

2. Materiales para microencapsulación. En general, el recubrimiento ideal para el proceso de microencapsulamiento debe poseer las siguientes características: (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

- Buenas propiedades reológicas en concentraciones elevadas y fácil manejo durante la encapsulación.
- La habilidad de dispersar o emulsificar el material activo y estabilizar la emulsión producida.
- No presentar reacción con el material a encapsular, durante el procesamiento ni durante el almacenamiento prolongado.
- La habilidad de sellar y mantener el material activo dentro de su estructura durante el procesamiento o almacenamiento.
- La habilidad de liberar completamente el solvente u otros materiales utilizados durante el proceso de encapsulación, por medio del secado u otras condiciones de desolventización.
- La habilidad de proveer máxima protección al material activo contra las condiciones ambientales (oxígeno, calor, luz, humedad).
- Solubilidad en solventes aceptados en la industria de alimentos.
- No presentar reacción química con los materiales activos del núcleo.
- Ser barato y poseer grado alimenticio.

A continuación se presenta una tabla con una lista de los materiales de microencapsulado utilizados y el método en los cuales son comúnmente utilizados.

Tabla # 2: Lista de materiales de microencapsulado y métodos comúnmente utilizados.

CATEGORÍA	MATERIAL DE ENCAPSULADO	MÉTODOS
Carbohidrato	• Almidón • Maltodextrinas • Chitosan • Sólidos de jarabe de maíz • Dextrano • Almidón modificado • Ciclodextrinas	• Secado por aspersión y congelación • Extrusión • Coaservación • Complejos de inclusión
Celulosa	• Carboximetilcelulosa • Metilcelulosa • Etilcelulosa • Ftalato de acetato de celulosa • Ftalato de acetato de celulosa Butilato	• Coaservación • Secado por aspersión • Films comibles
Gomas	• Goma acacia • Goma guar • Alginato de sodio • Carragenina	• Secado por aspersión • Goteo (cápsulas de gel)
Lípidos	• Cera • Parafina • Cera de abeja • Diacilgliceroles • Aceites • Grasas	• Emulsión • Liposomas • Formación de films
Proteínas	• Gluten • Caseína • Gelatina • Albumina • Péptidos	• Emulsión • Secado por aspersión

(Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

C. Ciclodextrinas

1. Historia. El descubrimiento de un nuevo oligosacárido a partir de la degradación enzimática del almidón en 1891 por Villiers marcó el inició de este tipo de compuestos, inicialmente fueron llamados celulosita, dextrinas de Schärdinger, cicloamilosas o ciclomalto-oligosacáridos, hasta que finalmente obtuvieron el nombre de ciclodextrinas. Fue Schärdinger el que primero describió los detalles para su preparación, identificando la enzima responsable (*Bacillus macerans)* y su separación en 1904. También fue el primero en identificar la estructura cíclica de estos oligómeros de glucosa, aunque la estructura química correcta de las ciclodextrinas no fue publicada hasta 1938 por Freudenberg, quien caracterizó el enlace α-1,4-glucosídico entre las unidades de glucosa. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

Desde el momento en el que los pesos moleculares de las tres ciclodextrinas más importantes fueron determinados, quedaron sentadas las bases de la "Química de las Ciclodextrinas". Fue entonces cuando surgió, en 1953, la primera patente referida a las ciclodextrinas y, más importante, a sus complejos de inclusión, cubriendo casi todos sus aspectos. Sin embargo, por esa época, dos hechos hicieron que estas prometedoras moléculas no pasaran de ser una curiosidad científica, "cápsulas científicas" de tamaño molecular, sin ninguna utilidad aparente, estos fueron: (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

- Proceso de obtención demasiado complicado y costoso, debido a que el precio de las ciclodextrinas se encontraba en los 2000 dolares/kg.
- Las ciclodextrinas eran consideradas altamente tóxicas.

Sin embargo, esta situación cambió radicalmente cuando la siguiente década arrojó que cualquier indicio de toxicidad atribuido a las ciclodextrinas no existía, sino más bien era debido a impurezas, a inadecuadas formas de administración, al empleo de dosis extremas y por consecuente a hechos no inherentes a las propias ciclodextrinas. A esto se le unieron las investigaciones intensivas y los avances en la tecnología de enzimas que originaron una disminución del precio de estas hasta ser de varios dólares por

kilogramo. En la actualidad, las ciclodextrinas se producen industrialmente en grandes cantidades a partir de cepas de bacilo modificadas genéticamente, de forma tal que se obtiene selectivamente solamente una de las ciclodextrinas. Este método evita los procesos de separación de mezclas y hace más rentable el proceso, obteniéndose las ciclodextrinas como reactivos con pureza superior al 99 %. De este modo, se revertieron los dos aspectos inhibidores e hizo que las ciclodextrinas se vieran como cápsulas moleculares con innumerables aplicaciones, lo que provocó un claro aumento en el número de publicaciones referidas a las ciclodextrinas. Hechos que comprueban este desarrollo son que en 1988 se publicaron aproximadamente 700 artículos y patentes sobre estos compuestos y en 1995 se duplicaron los mismos. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

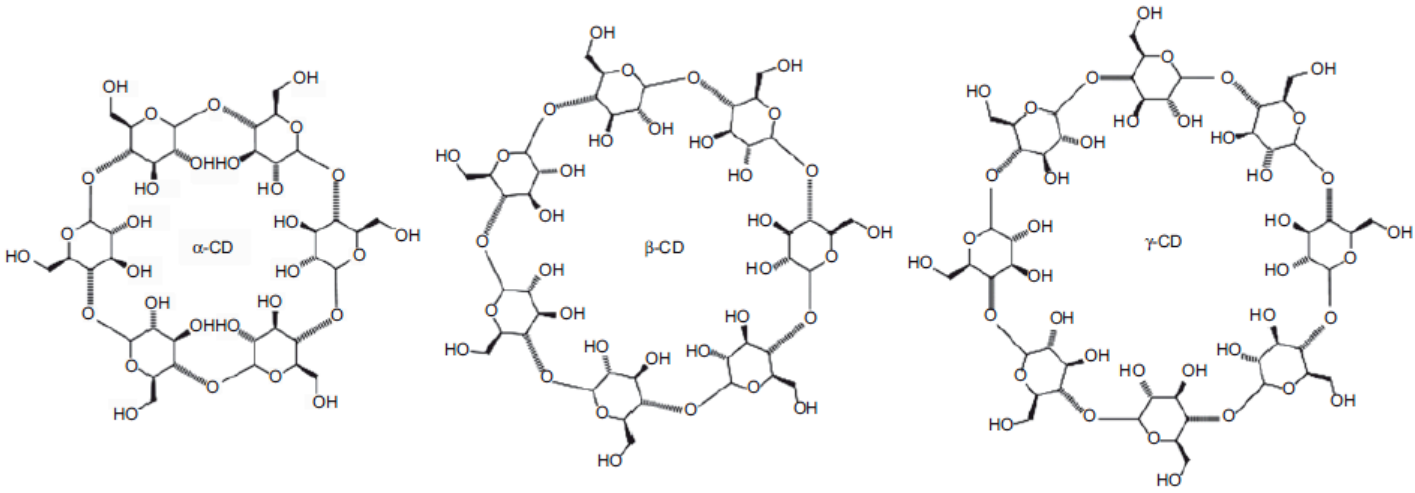
2. Tipos y estructura. Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos naturales no reductores, constituídos por 6, 7 u 8 unidades de D(+)-glucopiranosa unidas por enlaces α(1→4) glicosídicos, que se denominan α-, β- y γ-ciclodextrinas, abreviadas como α-CD, β-CD y γ-CD. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

La estructura de las ciclodextrinas ha sido determinada a partir de estudios de difracción de rayos X y de neutrones. Como resultado de la conformación de silla C_1 de las unidades glucopiranósicas, las ciclodextrinas presentan una forma tridimensional de cono anular truncado. Los grupos hidroxilo primarios enlazados al carbono-6 de cada unidad glucopiranósica quedan orientados hacia el borde más estrecho del cono, ya que su rotación reduce el diámetro efectivo, mientras que los hidroxilos secundarios situados en los carbonos 2 y 3 quedan dirigidos hacia el borde más ancho del cono anular. Así, todos los grupos hidrófilos se ubican alrededor de las aberturas de la cavidad y orientados hacia el exterior. De esta forma, la ciclodextrina presenta un revestimiento externo de naturaleza altamente hidrófila. Los átomos de hidrógeno de los carbonos 3 y 5, así como los pares electrónicos de los enlaces glicosídicos quedan orientados hacia el interior de la cavidad, dándole un carácter marcadamente hidrófobo y apolar. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

Los grupos hidróxilo primarios pueden rotar libremente, bloqueando parcialmente la cavidad, mientras que los grupos hidroxilo secundarios se encuentran en posiciones relativamente rígidas y no pueden rotar. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

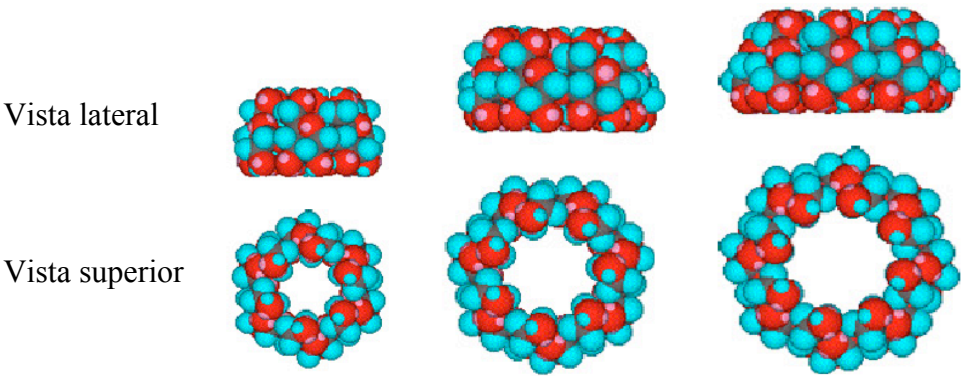
A continuación se presentan una serie de figuras en donde se muestran las estructuras respectivas de las ciclodextrinas.

Figura # 5: Estructuras químicas de ciclodextrinas



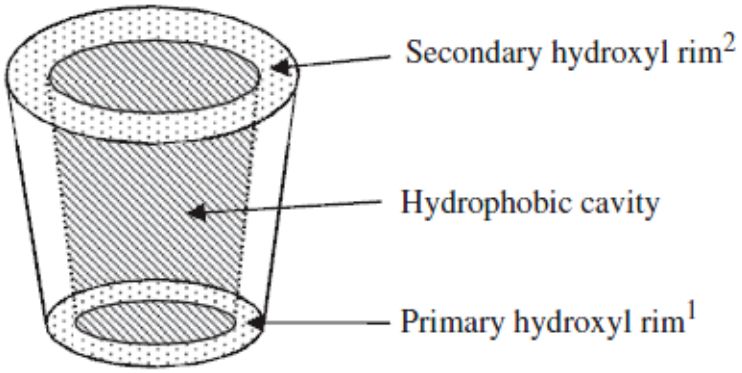
(Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

Figura # 6: Estructura de bolas de ciclodextrinas



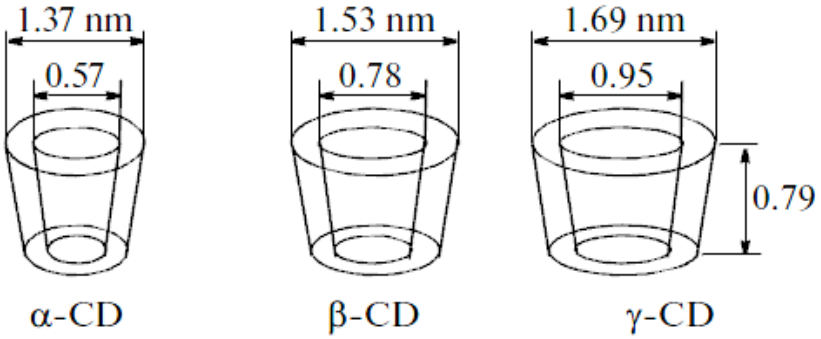
(Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

Figura # 7: Esquema de cono truncado



(Seo, Eun-Ju; Min, Sang-Gi; Choi, Mi-Jung; 2010)

Figura # 8: Esquema de tamaños moleculares de ciclodextrinas



(Chernykh, E.V.; Brichkin, S. B.; 2010)

3. Características y propiedades. Las ciclodextrinas son sólidos cristalinos incoloros. Su hidrólisis ácida parcial produce una mezcla de glucosa y una serie de oligosacáridos lineales. Este proceso transcurre a través de una cinética de pseudo-primer orden. Las principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas dependen del número de unidades de D(+)-glucopiranosa presentes en la molécula. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes de las ciclodextrinas es su solubilidad. Son solubles en agua y en disolventes polares apróticos como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la dimetilformamida (DMF) y prácticamente insolubles en la

mayoría de los disolventes orgánicos comunes (alcohol, acetona, etc). (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

En la molécula de ciclodextrina, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de C-2 de una unidad glucopiranósica forma un enlace de hidrógeno con el protón del grupo hidroxilo del C-3 de la unidad adyacente. En el caso de la β-CD, los siete enlaces de hidrógeno forman un cinturón en la cara secundaria con una geometría tal que origina una estructura sustancialmente rígida, estable y difícil de solvatar, lo que explica su menor solubilidad en agua. En la α- y γ-CD este cinturón esta distorsionado por razones geométricas, lo cual hace más débiles los enlaces de hidrógeno que lo forman y, por tanto, son más fáciles de solvatar, aumentando su solubilidad en agua con respecto a la β-CD. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

A continuación se presenta una tabla con el resumen de todas las principales características y propiedades de las ciclodextrinas.

Tabla # 3: Características de tipos de ciclodextrina

CARACTERÍSTICA	**TIPO DE CICLODEXTRINA**		
	α-CD	**β-CD**	**γ-CD**
Número de unidades de glucopiranosa	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25ºC (g/100 mL)	14.5	1.85	23.3
Temperatura de descomposición (ºC)	250-260	255-265	240-245
$[\alpha]_D$ 25ºC	150 ± 5	162.5 ± 5	177.4 ± 5
Diámetro interno (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diámetro externo (Å)	14.6	15.4	17.5
Altura (Å)	7.9	7.9	7.9
Volumen de la cavidad ($Å^3$)	174	262	427
Volumen de la cavidad aproximado en 1 mol de CD (mL)	104	157	256

(Antelo Queijo, Álvaro; 2008)
(Hu, Jie; Tao, Zhen; Li, Songjun; Liu, Bailing.; 2005)
(Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

4. Complejos de inclusión. Los complejos de inclusión son partículas conjuntas de moléculas de ciclodextrina con otras de carácter comúnmente apolar. La estructura cíclica de las ciclodextrinas define una cavidad apolar (que actúa como hospedador) que les permite la inclusión de moléculas huéspedes (huésped), preferentemente apolares, en el interior de la misma mediante interacciones no covalentes. Este tipo de ensamblaje forma estructuras más o menos estables, que pueden ser aisladas en fase sólida. La inclusión de este tipo de sustratos apenas afecta a la estructura y a la funcionalidad de los mismos, aunque puede provocar una ligera deformación del receptor. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008) (Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

A pesar que existe una gran variedad de estudios realizados acerca de la capacidad complejante de las ciclodextrinas, todos los autores coinciden en que se trata de un fenómeno huésped-hospedador. Pringsheim, en 1920, descubrió esta propiedad en las ciclodextrinas y lo denominó "coordinación" y al producto formado "complejo". La terminología actual es de "complejo de inclusión", propuesta por Schlenk 30 años más tarde. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008) (Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

a. Interacciones en complejos de inclusión. A pesar que la naturaleza y contribución de las diferentes interacciones que toman parte en la formación de los complejos de inclusión no son enteramente conocidas, la mayoría de los autores consideran como más importantes las siguientes: (Antelo Queijo, Álvaro; 2008) (Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

- Interacciones hidrófobas.
- Formación de enlaces de hidrógeno entre los centros apolares de las moléculas.
- Interacciones de Van de Waals.
- Liberación de energía por sustitución o desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad por el huésped apolar.

- Energía liberada por cambios formacionales.
- Interacciones dipolares conformacionales.
- Interacciones dipolares y dispersivas.
- Interacciones electrostáticas.

El proceso de reconocimiento molecular de huéspedes por las ciclodextrinas requiere que el hospedador y el huésped sean compatibles en cuanto a su tamaño y su forma. Si el huésped posee grupos polares capaces de formar enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo, la interacción será más fuerte y, por tanto, la estructura será más estable. Las contribuciones de cada una de estas fuerzas dependen de la naturaleza del huésped incluido. Lo más usual es que los factores termodinámicos que resultan de esta interacción sean consecuencia de una ponderación de estos factores, maximizando el proceso de selectividad, lo que permite el desarrollo de nuevos receptores moleculares. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008) (Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

El proceso de formación de complejos de inclusión provoca variaciones reversibles en las propiedades fisicoquímicas de la molécula huésped. Por ejemplo, muchas especies insolubles en agua pueden ser solubilizadas si, previamente, forman un complejo de inclusión con la ciclodextrina, permitiendo el surgimiento de una tecnología que puede usar cualquier industria que requiera un incremento de solubilidad acuosa. Mediante este proceso de encapsulamiento molecular, medicamentos poco solubles, saborizantes que se deterioran rápidamente, fragancias volátiles, pesticidas tóxicos, explosivos peligrosos, incluso gases, pueden ser atrapados y luego ser liberados cuando se requiera. Además los complejos con ciclodextrinas normalmente tienen una presión de vapor baja, lo que reduce la volatilidad, permitiendo aprovechar las ciclodextrinas como dosificadoras de liberación lenta para sustancias volátiles. Por el contrario, también es posible que una especie soluble pueda precipitar a partir de una disolución acuosa al generar un complejo. (Antelo Queijo, Álvaro; 2008)

b. Tipos de complejos de inclusión. El complejo más frecuente de inclusión molecular posee una estequiometría 1:1 y es descrito mediante la ecuación 1, donde se tiene en cuenta que esta complejación provoca una reestructuración sustancial del agua de solvatación tanto de la ciclodextrina como del sustrato, junto con la expulsión del agua incluida en la cavidad de la ciclodextrina:

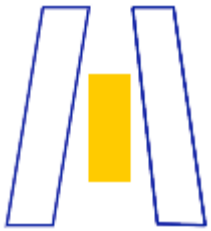
$$H \cdot hH_2O + CD \cdot gH_2O \rightleftharpoons H-CD \cdot (g+h-i)H_2O + iH_2O \qquad K = \frac{[H-CD]}{[H][CD]}$$

Donde: H = Molécula huésped
CD = Ciclodextrina
H-CD = Complejo de inclusión
K = Constante de equilibrio

Los principales tipos de compuestos de inclusión que se observan entre las ciclodextrinas y diferentes huéspedes se muestran a continuación: (Antelo Queijo, Álvaro; 2008) (Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

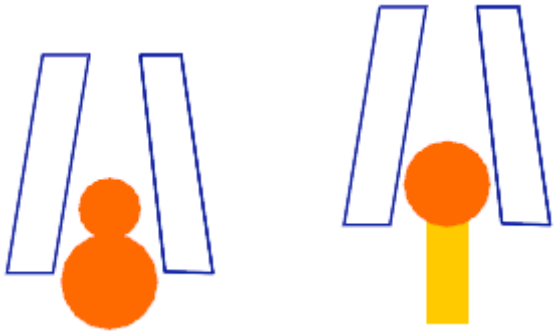
1) Completa: Inclusión total del huésped en la cavidad de la ciclodextrina. Este tipo de inclusión ocurre cuando una pequeña molécula huésped es de dimensiones adecuadas y cabe dentro de la cavidad. Si el huésped posee grupos polares, estos generalmente quedan orientados hacia el exterior de la cavidad. De este modo los grupos polares pueden interactuar con los grupos OH periféricos de las ciclodextrinas mediante enlaces de hidrógeno.

Figura # 9: Inclusión completa



2) Parcial: Inclusión parcial del huésped en la cavidad de la ciclodextrina. Este tipo de inclusión ocurre si la molécula huésped es de dimensiones muy grandes con respecto a la ciclodextrina o parte del sustrato presenta poca afinidad a la cavidad. En este caso, el proceso de inclusión se lleva a cabo solo por una parte del huésped que se incluye.

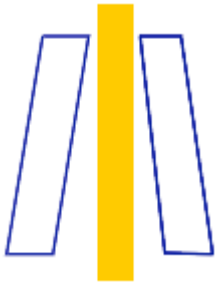
Figura # 10: (a) Inclusión parcial por tamaño de sustrato. (b) Inclusión parcial por afinidad de partes del sustrato



(a) (b)

3) Axial: Inclusión del huésped en la cavidad de la ciclodextrina que ocurre cuando la molécula huésped es larga y estrecha y se extiende a lo largo del eje de la CD.

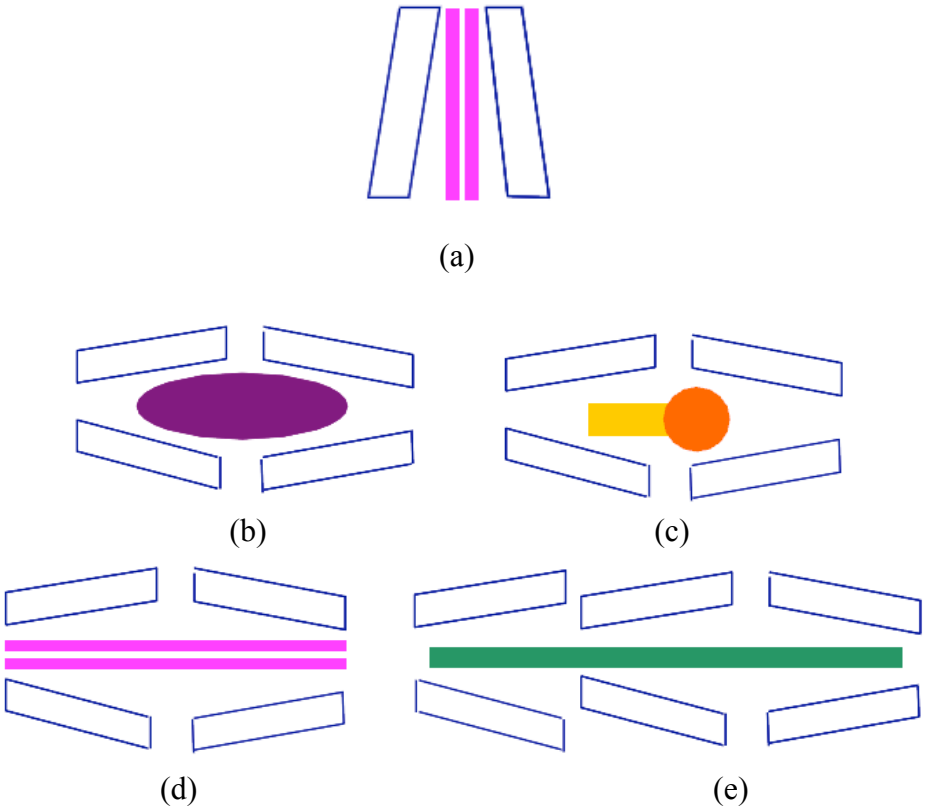
Figura # 11: Inclusión axial



4) Complejos con estequiometría superior: Inclusión total o parcial de uno o varios huéspedes en la cavidad de una o varias moléculas de ciclodextrina. Tanto en disolución como en estado sólido pueden formarse complejos de inclusión de

estequiometría superior, 1:2 (Hospedador-Huésped) si el sustrato es de pequeñas dimensiones, o 2:1 (Hospedador-Huésped) si el sustrato es mucho mayor que la cavidad.

Figura # 12: (a) Estequiometria 1:2. (b) Estequiometria 2:1 con sustrato simétrico. (c) Estequiometria 2:1 con sustrato asimétrico. (d) Estequiometria 2:2. (e) Estequiometria superior



c. Estructura y estabilidad de complejos de inclusión. La estructura y la estabilidad de los complejos de inclusión dependen de dos parámetros fundamentales: (Antelo Queijo, Álvaro; 2008) (Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P.; 2010)

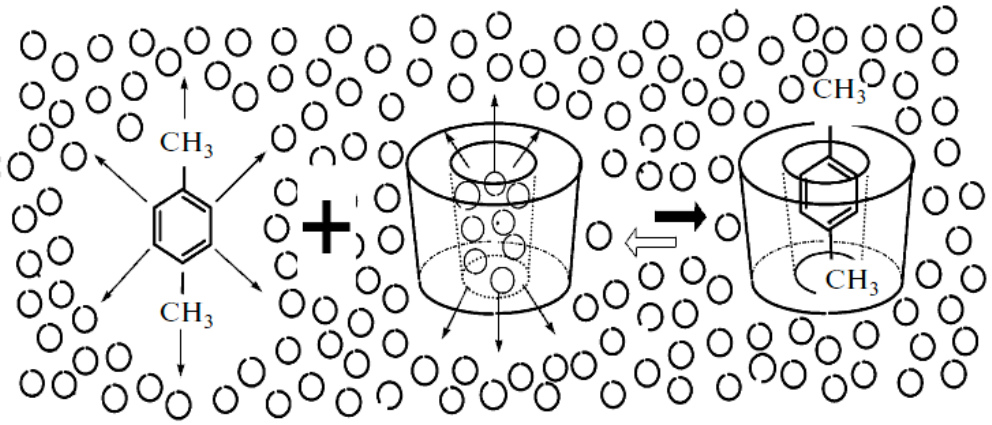
1) Polaridad del huésped: La estabilidad de los complejos de inclusión está en función del carácter hidrófobo del huésped.

2) Compatibilidad geométrica: La estabilidad de los complejos de inclusión también depende del tamaño y forma geométrica del huésped con respecto a las dimensiones de la cavidad de la ciclodextrina.

d. Mecanismo de formación de complejos. La formación del complejo de inclusión conlleva una serie de pasos determinados, los cuales pueden ser explicados sencillamente como se muestra a continuación.

1) Acercamiento de la molécula huésped a la molécula de ciclodextrina.
2) Salida de moléculas de agua de la cavidad de la molécula de ciclodextrina.
3) Entrada de la molécula huésped a la cavidad de la ciclodextrina.
4) Formación del complejo de inclusión.

Figura # 13: Esquema de formación de complejos de inclusión



(Chernykh, E.V.; Brichkin, S. B.; 2010)

e. Métodos de preparación de complejos de inclusión. Dos son los métodos de preparación de complejos de inclusión. A continuación se explican brevemente cada uno de ellos. (Chernykh, E.V.; Brichkin, S. B.; 2010)

1) Coprecipitación: En este método una solución acuosa de ciclodextrina (fría o tibia, neutra o acida) es preparada y una solución con la molécula huésped es incorporada con agitación constante. En caso sea necesario, la utilización de más de un solvente es posible.

2) Mezclado en seco: En este método la ciclodextrina no es disuelta en ningún disolvente. En cambio, la ciclodextrina es mezclada y molida con una pequeña cantidad de agua y el huésped es incorporado sin la adición de solventes. Este método no es efectivo para la preparación de complejos de inclusión debido a que el mezclado y formación puede llevar demasiado tiempo.

Es importante mencionar que en cada caso de preparación existen diferencias en el producto elaborado. Se ha notado que la estructura de los complejos de inclusión formados en seco difiere sustancialmente de la estructura en solución. En soluciones, las moléculas huéspedes localizadas en la cavidad y el complejo entero se encuentran rodeados por moléculas de agua. Por el contrario, en el estado seco (cristalino) las moléculas del huésped se encuentran no solo en la cavidad, pero también en las cavidades intermoleculares formadas por el enrejado de cristal, mientras que ciertas moléculas de ciclodextrina se encuentran inocupadas o poseen agua dentro de su cavidad. (Chernykh, E.V.; Brichkin, S. B.; 2010)

f. Complejos supramoleculares. Los complejos supramoleculares o también llamados “collares moleculares” son estructuras largas formadas por el hilado de moléculas cíclicas, particularmente ciclodextrinas, alrededor de un polímero grande. (Chernykh, E.V.; Brichkin, S. B.; 2010)

A pesar que este tipo de complejos son formados también por ciclodextrinas, no son considerados o estudiados dentro del área de inclusión o microencapsulación de compuestos en sí. Se explica brevemente su definición con el objetivo de establecer una diferencia marcada con los complejos de inclusión mencionados en esta investigación, pero no se onda más en el tema debido a que no es parte ni interés del estudio.

D. Tecnología de empaques activos

1. Definición. Un empaque activo es aquel que interacciona directamente con el producto y/o con su entorno para mejorar uno o más aspectos de su calidad o seguridad. Así mismo, también puede ser definido como un sistema alimento-envase-entorno que actúa de forma coordinada para mejorar la salubridad y la calidad del alimento envasado y aumentar su vida útil. (Avendaño Cetina, Grace Lady.; 2009)

Con un envase activo se logra aumentar la vida útil del alimento, lo cual puede ser sinónimo de protección contra agentes responsables de alteración, ya sea ésta física, química, enzimática o microbiológica. Con el envasado tradicional se mantienen estáticos los niveles de los parámetros causantes de procesos de degradación, sin embargo, en este tipo de envasado se introduce un dinamismo, incremento o disminución de variables, el cual actuara a favor del alimento empacado. Las interacciones beneficiosas creadas entre alimento y envase pueden basarse en la regulación del contenido en gases (oxígeno, dióxido de carbono, etileno, etc.); en el control de la humedad (aditivos, absorbentes, etc.); en la acción de diversas enzimas (control del colesterol y la lactosa) o en la liberación de sustancias antimicrobianas (etanol, agentes quelantes, ácidos orgánicos, dióxido de azufre o de cloro, antibióticos, bacteriocinas, fungicidas, etc.) (Avendaño Cetina, Grace Lady.; 2009)

Es muy importante mencionar que un empaque activo es diferente a un empaque inteligente. La diferencia radica en que el primero interacciona con el alimento y reacciona a los cambios sin indicar acción; en cambio el empaque inteligente puede o no ser activo pero provee información al consumidor e indica si ha existido algún tipo de adulteración.

2. Ventajas. Muchas son las ventajas que presentan los empaques activos sobre los comúnmente utilizados. A continuación se muestra una lista de algunas de las más relevantes e importantes.

- Capacidad de respuesta del envase frente a los cambios que en él se producen.
- Realización de operaciones como calentamientos, enfriamiento, o fermentaciones, que se pueden ya realizar dentro del mismo envase.
- Reducción del empleo de aditivos o conservantes.
- Reducción de costos en envasado bajo técnicas de atmósfera modificada, ejerciendo un control de ésta en productos individuales.

(Avendaño Cetina, Grace Lady.; 2009)

3. Presentaciones de empaques activos. Un empaque activo puede ser presentado de múltiples formas y maneras, las hay desde las más simples hasta las más complejas, cada una con sus propias características y beneficios. A continuación se presenta una breve lista de las presentaciones más comunes.

- Sobres.
- Películas plásticas antimicrobianas.
- Películas antimicrobianas comestibles.
- Empaques y recubrimientos con actividad antimicrobiana adicionados con bacteriocinas.

(Avendaño Cetina, Grace Lady.; 2009)

4. Liberación controlada. La liberación controlada puede ser definida como un método por el cual uno o más agentes o ingredientes activos son hechos disponibles en un sitio y tiempo deseado a una razón específica. Con la aparición de la tecnología de liberación controlada, varios aditivos sensibles al calor, temperatura o pH pueden ser utilizados convenientemente en sistemas alimenticios. Estos aditivos son introducidos dentro del sistema alimenticio mayormente en forma de microcápsulas. El aditivo presente en la microcápsula es liberado bajo la influencia de un estímulo específico en una etapa específica. (Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun.; 2005)

E. Ajo (Allium sativum)

1. Taxonomía y morfología

a. Taxonomía

1) Reino: Plantae
2) Subreino: Viridaeplantae
3) Infrareino: Streptophyta
4) División: Tracheophyta
5) Subdivisión: Spermatophytina
6) Infradivisión: Angiospermae
7) Clase: Magnoliopsida
8) Superorden: Lilianae
9) Orden: Asparagales
10) Familia: Liliaceae (Amaryllidaceae)
11) Subfamilia: Allioideae
12) Género: Allium
13) Especie: sativum
14) Nombre Científico: *Allium sativum*

(ITIS Report, 2013)

(García Alonso, Carlos Román.; 1998)

b. Morfología

1) Tallos: Son fuertes, de crecimiento determinado cuando se trata de tallos rastreros que dan a la planta un porte abierto, o de crecimiento indeterminado cuando son erguidos y erectos, pudiendo alcanzar hasta 2-3 metros de altura. Dependiendo del marco de plantación, se suelen dejar de 2 a 4 tallos por planta. Los tallos secundarios brotan de las axilas de las hojas.

2) Hoja: Radicales, largas, alternas, comprimidas y sin nervios aparentes.

3) Tallo: Se encuentra por el centro de las hojas. Es hueco, muy rollizo y lampiño y crece desde 40 cm a más de 55, terminando por las flores.

4) Flores: Se encuentran contenidas en una espata membranosa que se abre longitudinalmente en el momento de la floración y permanece marchita debajo de las flores. Se agrupan en umbelas. Cada flor presenta 6 pétalos, 6 estambres y un pistilo.

(InfoAgro, 2013)

2. Descripción. El ajo pertenece a la clase de las monocotiledóneas. Es una planta herbácea, anual, vivaz por su bulbo subterráneo, desprovista de tallo, con las hojas de color verde grisáceo muy estrechas, largas, glabras y planas, que salen directamente del bulbo y alcanzan entre los 40 y 60 cm. Tiene un olor muy fuerte, típico. (Universidad Politécnica de Madrid (UPM), 2013)

El bulbo o "cabeza de ajo" está formado por una quincena de bulbillos (o "dientes"), con el extremo superior puntiagudo. Los bulbillos están dispuestos en dos círculos concéntricos sobre el mismo plano y rodeados por un envoltorio de hojas delgadas (túnicas) blancas, rosa pálido, moradas, rojo vino o rojo violáceo (según las variedades), que se vuelven escariosas al envejecer. Los bulbillos nacen a partir de yemas axilares situadas en la base de las vainas de las hojas aéreas de la planta madre. (Universidad Politécnica de Madrid (UPM), 2013)

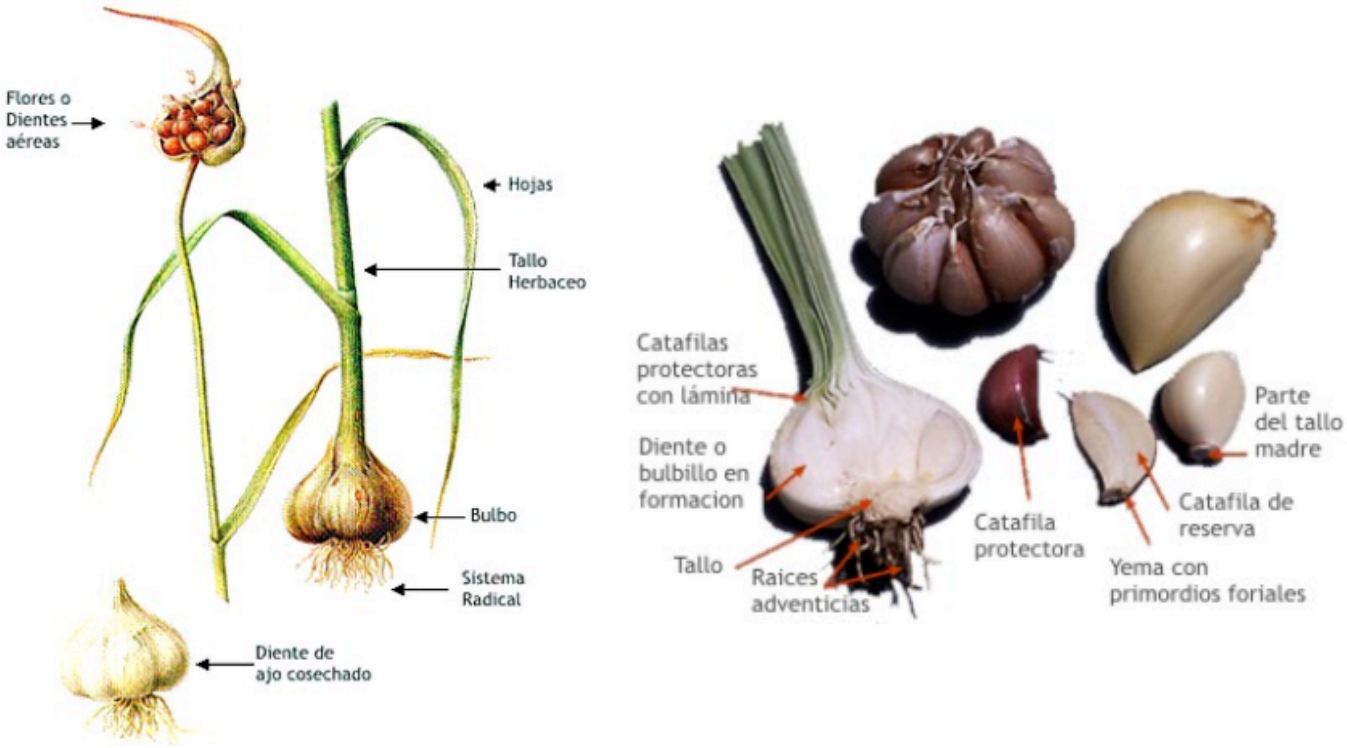
El bulbillo es un órgano bulboso, formado por una sola vaina foliar carnosa, que aloja la yema terminal rodeada por algunas brácteas foliares superpuestas las unas a las otras. Está envuelto por una o dos vainas foliares, secas y coriáceas que desempeñan un papel protector. Cuando el bulbillo se desarrolla, nace una planta. (Universidad Politécnica de Madrid (UPM), 2013)

Las raíces, plegadas en acordeón, son contráctiles. Se desarrollan en el suelo y tiran del bulbo hacia abajo permitiendo un sólido anclaje. (Universidad Politécnica de Madrid (UPM), 2013)

Las hojas están dispuestas en espiral sobre la base. Son largas, embutidas las unas en las otras hasta media altura. La parte superior es plana, lineal y lisa, provista de un nervio medio muy marcado. Cuando existe, el escapo floral es cilíndrico y macizo, de 80 a 100 cm de altura y terminado en una umbela de 4 a 5 cm de diámetro. Ésta, a menudo está compuesta a la vez de flores y de bulbillos. El conjunto está protegido por una espata membranosa bivalva, terminada en punta. Al principio de su crecimiento, el escapo floral es doblado, después se endereza definitivamente. La floración se produce en mayo-junio. (Universidad Politécnica de Madrid (UPM), 2013)

Las flores son blancas o rojizas, completas, trímeras (3 sépalos, 3 pétalos, 2 círculos de 3 estambres, 3 carpelos en el centro) y regulares (flores actinomorfas). Los sépalos y los pétalos no se diferencian y forman los tépalos petaloideos. El perianto es corto y deja escapar un ramo de seis estambres, de longitudes desiguales. Sus anteras, de color gris verdoso o violáceas, son introrsas. El gineceo (pistilo) comprende tres carpelos soldados. El ovario, unilocular, súpero, se prolonga en un largo estilo. Las flores se desecan rápidamente y producen semillas encerradas en cápsulas poricidas (abertura por poros). Las semillas están desprovistas de embrión la mayor parte del tiempo. (Universidad Politécnica de Madrid (UPM), 2013)

Figura # 14: Esquemas representativos de planta de ajo



(Giménez, Antonio. Empacadores Frutihortícolas; 2013)

3. Orígen. El ajo es procedente del centro y sur de Asia desde donde se propagó al área mediterránea y de ahí al resto del mundo. Este se cultiva desde hace miles de años y se cree que hace unos 3,000 años a. C., ya se consumía en la India y en Egipto y a finales del siglo XV los españoles lo introdujeron en el continente americano. (InfoAgro, 2013)

4. Composición bioquímica y química. La composición bioquímica característica del ajo viene representada por glúcidos condensados del tipo de los fructosanos y los glutamil dipéptidos con radicales de azufre. El ajo posee un contenido de agua de aproximadamente el 65 %, este porcentaje re relativamente bajo en comparación con la mayoría de frutas y vegetales los cuales se encuentran en el 80.90 %. La masa del peso seco se encuentra compuesta por carbohidratos de fructosa, seguido por compuestos azufrados, proteínas y aminoácidos. En general, más del 90 % de las investigaciones acerca de los componentes del ajo se han concentrado en los compuestos azufrados. La razón de este interés es el alto contenido inusual de compuestos azufrados en comparación con otras plantas y su alta actividad antimicrobiana. (García Alonso, Carlos Román.; 1998) (Verma S. K.; Jain V.; Verma D.; 2008)

A continuación se presenta una tabla con la composición química característica del Ajo. Los valores presentados en rango son debido a los resultados obtenidos por parte de las distintas investigaciones realizadas.

Tabla # 4: Composición química característica del ajo

CARACTERÍSTICA	CONTENIDO
Agua (g)	59-65
Lípidos (g)	0.1-0.5
Carbohidratos (g)	2.9-33.07
Proteínas (g)	3.33-6.7
Fibra (g)	0.83-2.1
Manganeso (mg)	1672
Potasio (mg)	401-540
Azufre (mg)	70
Calcio (mg)	10-181
Hierro (mg)	1.7-2.3
Fósforo (mg)	40-195
Magnesio (mg)	25-32
Sodio (mg)	17
Selenio (ppm)	9
Vitamina B (Tiamina) (mg)	0.18-0.20
Vitamina B2 (Riboflavina) (mg)	0.08-0.11
Vitamina B6 (mg)	1235
Vitamina C (mg)	9-31
Ácido Nicotínico (Niacina)	0.6-0.7
Acido Glutámico (g)	0.805
Argenina (g)	0.634
Ácido Aspártico (g)	0.489
Leucina (g)	0.308
Lisina (g)	0.273

(García Alonso, Carlos Román.; 1998)
(Botanical-Online, 2013)

5. Actividad antimicrobiana. Dentro de las características del ajo se encuentra la actividad anti-microbiana, anti-helmíntica, anti-protozarios, anti-fungica, insecticida, antitumor, anti-trombótico, anti-cancer, antiartrítico, hipolipidémico e hipogliémico. Muchos son los estudios elaborados en base a las capacidades antimicrobianas del ajo, pero todos concluyen en que son los compuestos azufrados los responsables de esta característica. Los compuestos orgánicos que contienen nitrógeno o azufre son comúnmente encontrados en el aceite de ajo, cebolla y puerro, los cuales han demostrado actividad antimicrobiana contra una gran variedad de microorganismos. (Shafiur Rahman, M., *et al*.; 2006) (Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

A través de varios estudios se han logrado demostrar los microorganimos los cuales son afectados por los compuestos del ajo. A continuación se presenta una lista con varios de ellos.

- E. aerogenes
- E. coli
- Salmonella sp.
- L. monocitogenes
- Y. enterocolitica
- B. cereus
- Shigella spp.
- Vibrio parahaemoliticus
- S. enterica serovars
- Enteritidis
- Infantis
- Typhimurium
- B. subtilus
- E. faecalis
- S. faecalis

- A. alternata
- Staphylococcus aureus
- Lactobacillus plantarum
- Clostridium botulinum tipo B (pero no tipo E)
- Salmonella typhi
- Bacillus subtilis
- Pseudomonas pyocyaneus
- Candida albicans
- Helicobacter pylori
- Una gran variedad de hongos y levaduras

(Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

(Shafiur Rahman, M., *et al*.; 2006)

(McNulty, C.A.M. *et al.*; 2001)

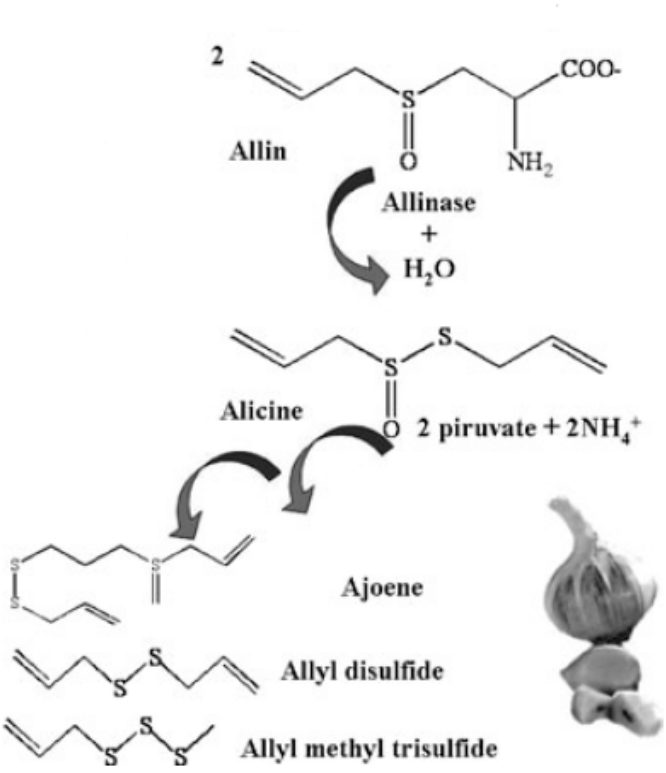
(O'Gara, E.A. *et al.*; 2007)

A pesar que todos los compuestos azufrados presentan esta actividad, en el caso del ajo, el compuesto azufrado al cual se le atribuyó inicialmente la principal característica antimicrobiana es la Aliicina. (Verma S. K.; Jain V.; Verma D.; 2008)

a. Aliicina. Fue en 1944 cuando Cavallito y trabajadores isolaron e identificaron la actividad antibacterial de ajo triturado como un compuesto oxigenado azufrado que poseía el olor de ajo fresco cortado, el cual nombraron Aliicina. Varios años después del descubrimiento de la Aliicina, Stoll y Seebeck isolaron, identificaron y sintetizaron un aminoácido oxigenado azufrado del ajo, el cual nombraron Aliina y el cual encontraron que era el precursor de la Aliicina. Ellos también encontraron que la Aliina no poseía actividad antibacterial a menos que fuera convertida a Aliicina por la enzima Aliinasa. (Verma S. K.; Jain V.; Verma D.; 2008)

La Aliicina (2-propenil-2-propenetiol sulfuro), también llamado Tiosulfinato de Dialilo, es formada catalíticamente cuando los dientes de ajo son triturados o macerados y la enzima Aliinasa liberada por esta acción se mezcla con el sustrato Aliina, el cual es liberado por las células. Una vez formada la Aliicina, esta se convierte en diferentes sulfuros y disulfuros de metilo y alilo, característicos compuestos volátiles del ajo. (Shafiur Rahman, M., *et al*.; 2006) (Badui Dergal, Salvador; 2006)

Figura # 15: Formación de Aliicina



(Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

b. Compuestos azufrados. Por años se sospechaba que los compuestos causantes del olor del ajo eran debido al azufre. La primera vez que esto fue científicamente demostrado fue hace 150 años por el científico alemán Wertheim en los años 1844 a 1845, quien también determinó que estos compuestos poseían la fórmula básica $C_6H_{10}S$. Tomó casi 50 años antes que Semmler fraccionalmente destilara en 1892 este tipo de aceite e identificara los compuestos específicos. El descubrió que el aceite contenía aproximadamente un 60 % de dialil disulfuro, 20 % de dialil trisulfuro, 10 % de dialil tetrasulfuro y 6 % de alil propil disulfuro. Años después se comprobó que el alil propil disulfuro no se encontraba en ajos enteros o triturados, sino se producía durante la destilación de vapor y durante el almacenamiento de ajo triturado. (Verma S. K.; Jain V.; Verma D.; 2008)

A continuación se presenta una tabla con los compuestos azufrados presentes en el ajo y la cebolla.

Tabla # 5: Compuestos azufrados presentes en ajo y cebolla

MONOAZUFRADOS	DISULFUROS	TRISULFUROS
• Metil-alilsulfuro • 3-alil tio-ácido propiónico • Metanetiol • Tiazolidina • 3-3-tio bis,1-propeno • 2,5-dimetil-tiofeno • 2,5-dimetil-tiazolio • 3,3-tienil-2-ácido propenóico	• Dimetil disulfuro • Metil-propil-disulfuro • Metil-etil-disulfuro • 1,3 ditiano • 1,3-propan ditiol • 2-propenil disulfuro • Dialil disulfuro • 2-propenil-metil-disulfuro	• Trimetil disulfuro • 2-propenil-metil-trisulfuro • 2-propenil-trisulfuro • Dipropil-trisulfuro • 1,2,4-tritiolano-3,5-dietil

(Badui Dergal, Salvador; 2006)

A pesar que existe una gran variedad de compuestos azufrados en el ajo, son tres los que se pueden considerar principales. (Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

1) Alil disulfuro.
2) Alil trisulfuro.
3) Alil tetrasulfuro.

c. Aceite esencial. Un aceite esencial es un líquido concentrado hidrofóbico, que contiene una mezcla de componentes aromáticos volátiles antimicrobianos comúnmente derivados de los tejidos de plantas. Estos son llamados "esenciales" en el sentido que poseen un olor distintivo de la planta y son generalmente extraídos por destilación de vapor y otros procesos como maceración, presión en frío o extracción por solventes. Los compuestos aromáticos de los aceites esenciales conocidos son constituidos en su mayoría por cadenas de hidrocarbonos cortos, complementadas con átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre adheridos a varios puntos de la cadena. Tal mezcla de moléculas aromáticas diferentes con átomos altamente reactivos proveen diferentes propiedades funcionales a los aceites esenciales. (Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

El aroma inherente y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentran comúnmente relacionadas con la configuración química de los componentes, las proporciones en la cuales se encuentran presentes y a las interacciones entre ellas, afectando así sus propiedades bioactivas. (Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

Existen varios compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales que poseen actividad antimicrobiana y propiedades saborizantes. Algunos de los más representativos y estudiados son los terpenoides, compuestos orgánicos azufrados, aldehídos y alcoholes. (Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

d. Modo de acción. Considerando que los aceites esenciales se encuentran formados por varios constituyentes, es difícil atribuir la eficacia antimicrobiana a solamente un compuesto, en este contexto, el modo de acción de un compuesto específico puede ser diferente comparado con otros, aunque se han determinado varios puntos objetivo en la célula microbiana. Estos efectos se listan a continuación. (Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L.; 2009)

- Deterioro de la pared celular.
- Daño a la membrana citoplasmática.
- Daño a proteínas de membrana.
- Fuga de contenidos celulares.
- Coagulación del citoplasma.
- Agotamiento de sitios activos de protones.
- Inactivación de enzimas esenciales.
- Disturbio de la funcionalidad de material genético.

F. Humedad relativa

1. Definición. La humedad relativa se define como la relación entre la presión parcial del vapor y la presión de vapor del líquido a la temperatura del gas. Generalmente se expresa sobre una base porcentual, de forma que 100 % de humedad significa gas saturado y 0 % de humedad corresponde a gas libre de vapor. Su valor viene dado por la siguiente ecuación.

$$HR = \left(\frac{Presión\ Parcial\ de\ Vapor}{Presión\ de\ Vapor\ de\ Líquido}\right) \times 100$$

(McCabe, Warren L.; Smith, Julian C.; Harriott, Peter.; 2007)

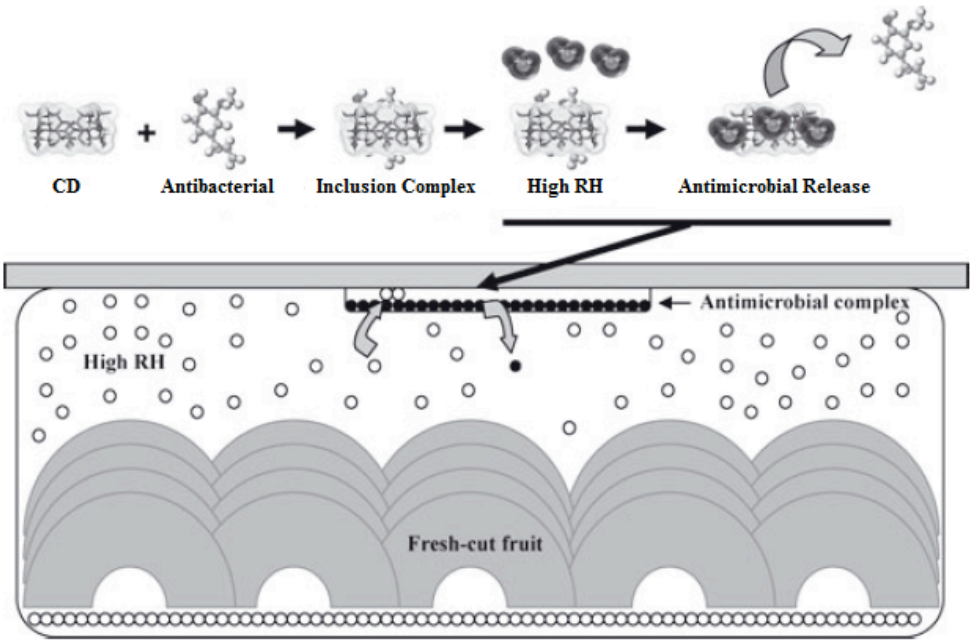
2. Humedad relativa en empaques. Si un empaque se utiliza para almacenar productos frescos, es muy común que estos posean cortes o tejido expuesto, los cuales dañan las estructuras celulares e incrementan la pérdida de agua de las mismas. Esta agua liberada y acumulada dentro del empaque afecta la atmósfera interna, causando un incremento en la humedad relativa del empaque. En empaques que contienen productos frescos, la humedad relativa es usualmente alta (>95 %) y las fluctuaciones de la temperatura durante el almacenamiento puede resultar en condensación. Esta puede ser reducida por el uso de films con una razón alta de transmisión de vapor de agua, pero es difícil controlar a un nivel específico utilizando solamente esta técnica. (J.F. Ayala-Zavala, *et al*.; 2008)

3. Efecto de la humedad relativa en características microbiológicas. La mayoría de microorganismos que afectan la vida de anaquel de productos frescos necesitan un ambiente óptimo con alta humedad relativa mayor al 80 % para su crecimiento. En general, el factor que limita la vida de anaquel de productos frescos es la presencia y crecimiento de hongos y bacterias, el cual se encuentra relacionado directamente con alta humedad relativa dentro del empaque. (J.F. Ayala-Zavala, *et al*.; 2008)

4. Efecto de la humedad relativa en inclusiones de ciclodextrina. Cuando una inclusión molecular que contiene un compuesto antibacterial encapsulado es expuesto a moléculas de agua (alta humedad relativa), las interacciones entre la ciclodextrina y el compuesto se ven debilitadas y por ende el compuesto es pasivamente liberado al ambiente. Este proceso puede ser explicado considerando que a medida que la disponibilidad de agua incrementa alrededor de las microcápsulas, el agua empieza a interaccionar con los grupos polares del complejo de inclusión, causando un desplazamiento del compuesto del interior de la cavidad al ambiente externo. (J.F. Ayala-Zavala, *et al*.; 2008)

A continuación se presenta una imagen que explica este proceso.

Figura # 16: Diagrama de reacción de inclusiones moleculares frente a alta humedad relativa



(J.F. Ayala-Zavala, *et al*.; 2008)

G. Cromatografía de gases

1. Definición general. La cromatografía es un método físico de separación, donde ésta se basa en la migración diferencial de los componentes de la muestra, que son acarreados por la fase móvil sobre o a través de una fase estacionaria dispuesta en una columna; la velocidad con la que cada componente migra, depende de la afinidad o adsorción del compuesto entre las fases móvil y estacionaria. (Badui Dergal, Salvador; 2006)

2. Cromatografía de gases. En la cromatografía de gases (GC) la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. (Gomis Yagües, Vicente; 2008)

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas - sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC). La cromatografía gas - líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (GC). (Gomis Yagües, Vicente; 2008)

a. Cromatografía de gas-sólido: Este tipo de cromatografía se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física. La cromatografía gas - sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elución con colas (una consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular. (Gomis Yagües, Vicente; 2008)

b. Cromatografía de gas-líquido: Este tipo de cromatografía se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. El concepto de cromatografía gas - líquido fue enunciado por primera vez en 1941, por Martin y Synge, quienes fueron también los responsables del desarrollo de la cromatografía de distribución líquido - líquido. Más de una década tuvo que pasar, sin embargo, antes de que la importancia de la cromatografía gas - líquido se demostrara experimentalmente. Tres años más tarde, en 1955, apareció en el mercado el primer aparato comercial para cromatografia gas - líquido. Desde entonces, las aplicaciones de esta técnica han crecido de una forma espectacular. Se ha estimado

que unos 200, 000 cromatógrafos de gases están actualmente en uso por todo el mundo. (Gomis Yagües, Vicente; 2008)

3. Cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS). Este tipo de cromatografía es la técnica más utilizada para el análisis de compuestos volátiles y no volátiles, debido a que posee un elevado poder de resolución y es extremadamente sensible, con un poder mínimo de detección hasta de una parte por trillón (ppt); además, posee una alta especificidad, ya que genera un espectro único para cada componente en la muestra y ofrece un manejo relativamente sencillo. En este sistema, la muestra se inyecta en una corriente de un gas inerte como nitrógeno o helio, que pasa a la columna recubierta por la fase estacionaria, donde los compuestos se separan según la afinidad con la fase estacionaria y luego son conducidos al detector. El detector mide la concentración de cada componente en la muestra y genera una señal eléctrica o un pico cuya altura es proporcional a la concentración. Después, el registrador genera un cromatograma en donde se muestra el tiempo de retención y la concentración relativa de cada compuesto separado. Los detectores que más se utilizan son: (Badui Dergal, Salvador; 2006)

- Conductividad Térmica.
- Ionización de Llama (FID).
- Captura de Electrones.
- Emisión Atómica (AED).
- Espectrómetro de Masas (MS).

Debido a la naturaleza del compuesto a analizar y el objetivo del análisis cromatográfico, se explicará con mayor detalle el detector espectrómetro de masas (MS).

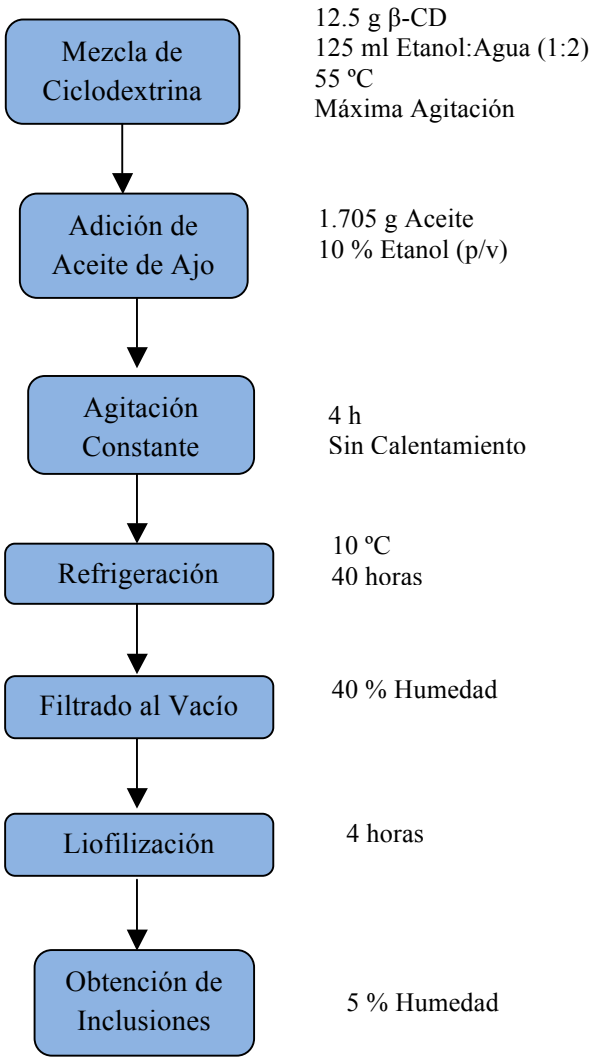
a. Espectrómetro de masas (MS): Este es un sistema de baja presión (10^{-6} mbar), en donde las moléculas en fase gaseosa son ionizadas mediante el bombardeo de electrónes. El impacto electrónico (IE) produce iones moleculares y una serie de iones

fragmento, que después son alineados y conducidos al espectrómetro de masas o analizador, el cual separa los iones según el radio masa/carga, generando así un espectro de masas único para cada molécula analizada. (Badui Dergal, Salvador; 2006)

V. METODOLOGÍA

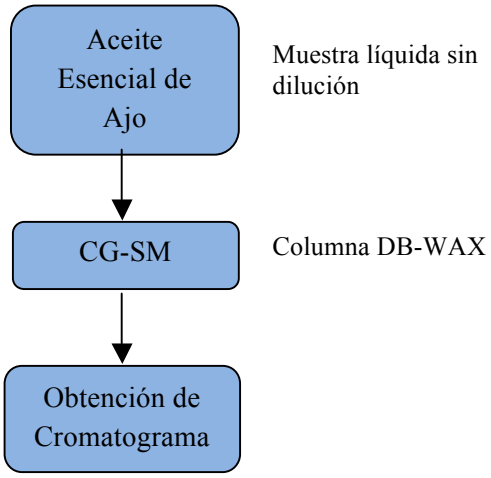
A. Inclusión molecular de aceite de ajo

1. Procedimiento (Método de coprecipitación)

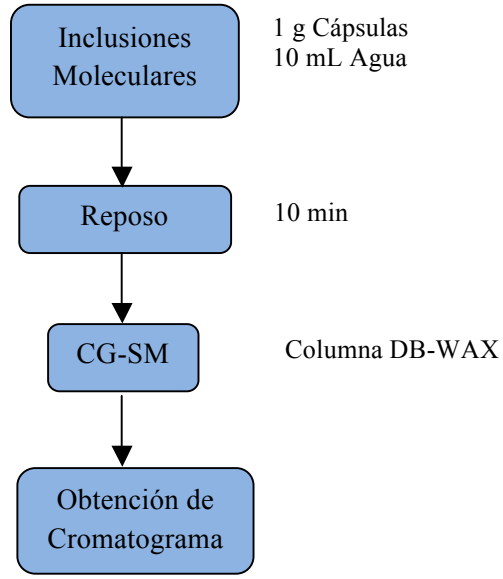


B. Determinación de compuestos volátiles

1. Aceite esencial de ajo

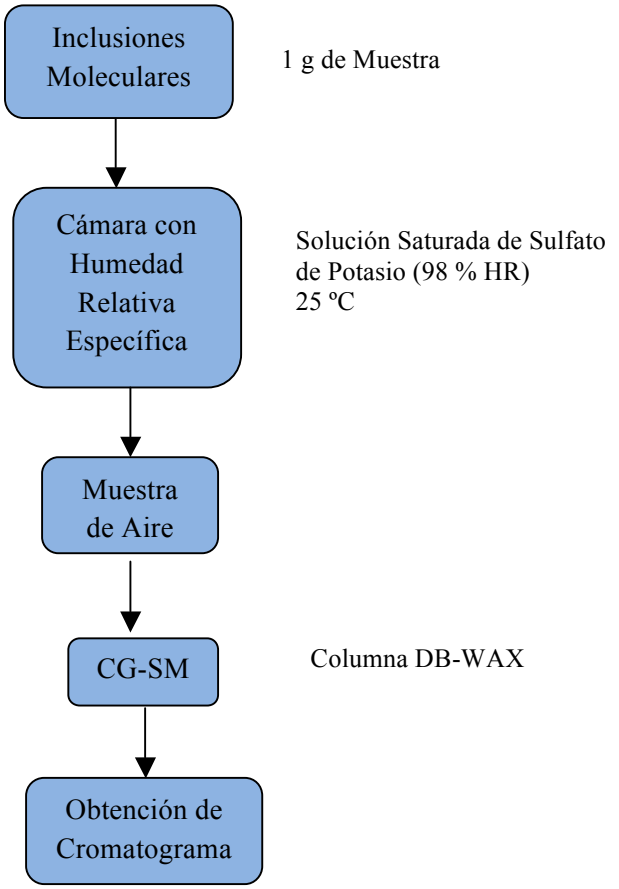


2. Inclusiones moleculares



C. Liberación controlada en ambiente con alta humedad relativa

1. Cámara



Para el establecimiento de la humedad relativa deseada se utilizó la siguiente tabla de soluciones saturadas de sales.

Tabla # 6: Soluciones saturadas de sales

Solid salt phase	Temperature, °C							
	10	20	25	30	40	50	60	80
Potassium sulfate, K_2SO_4	98.2	97.6	97.3	97.0	96.4	95.8		
Ammonium phosphate, monobasic, $NH_4H_2PO_4$		93.2	92.6	92.0	90.8	(89.6)	(Note 1)	
Barium chloride, $BaCl_2 \bullet 2H_2O$	91.4	90.4	89.9	89.4	88.4	87.4		
Potassium chromate, K_2CrO_4		86.6	86.4	86.3	85.3			
Potassium chloride, KCl	87.9	86.7	86.1	85.5	84.3		81.9	79.5
Ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$	82.1	81.3	81.0	80.6	79.9	79.2		
Sodium chloride, NaCl	76	75.7	75.3	74.9	74.7			
Cupric chloride, $CuCl_2 \bullet 2H_2O$	68.4	68.4	68.4	68.4				
Sodium nitrite, $NaNO_2$		65.4	64.4	63.3	61.4	59.5	(Note 2)	
Sodium bromide, $NaBr \bullet 2H_2O$	62.2	59.1	57.8	56.0	53.2	50.9	(Note 2; 3)	
Magnesium nitrate, $Mg(NO_3)_2 \bullet 6H_2O$	57.4	54.4	52.9	51.4	48.4	45.4	(Note 2)	
Potassium nitrite, KNO_2		49.1	48.2	47.2	45.6			
Potassium carbonate, $K_2CO_3 \bullet 2H_2O$	43.1	43.2	43.2	43.2	43.3			
Sodium iodide, $NaI \bullet 2H_2O$	41.3	40.0	38.2	36.2	32.9		(Note 2; 4)	
Magnesium chloride, $MgCl_2 \bullet 6H_2O$	34	33	33.0	33	32		30	
Potassium acetate, $CH_3COOK \bullet 1.5H_2O$	24.5	23.4	22.5	21.6	20.8			
Lithium chloride, $LiCl \bullet H_2O$	11.3	11.3	11.3	11.3	11.2	11.1	(Note 5)	
Sodium hydroxide, $NaOH \bullet H_2O$		8.9	8.2	7.6	6.3	4.9	(Note 6)	

(TIP Category: Data and Calculations; 2002)

Así mismo, en caso sea necesario, es posible utilizar la siguiente ecuación, la cual es utilizada para el cálculo del valor de humedad relativa en equilibrio y concentraciones de sales.

$$RH = 1 - \frac{xM}{xM + \frac{1000}{18}(1 - yM)}$$

$$y = \frac{\left|\left(\frac{1}{\rho}\right)M\right|}{1000}$$

(ESRF, 2013)

VI. RESULTADOS

A. Tabla # 7: Compuestos importantes detectados en mayor proporción (de mayor a menor) en aceite de ajo

COMPUESTOS IMPORTANTES DETECTATOS EN ACEITE DE AJO
Dialil Disulfuro
Metil Tio-Acetonitrilo
3,3-Tiobis 1-Propeno
Metil 2-Propenil Disulfuro
Di-2-Propenil Trisulfuro

B. Tabla # 8: Compuestos volátiles importantes detectados en mayor proporción (de mayor a menor) en aroma de aceite de ajo

COMPUESTOS IMPORTANTES DETECTATOS EN AROMA DE ACEITE DE AJO
3,3-Tiobis 1-Propeno
Alil Metil Sulfuro
Dialil Disulfuro
Metil 2-Propenil Disulfuro
Dimetil Disulfuro

*También se detectó el compuesto desconocido (presente en aire) que se menciona en la discusión, pero no se coloca en esta tabla al no ser importante para la investigación

C. Tabla # 9: Compuestos volátiles importantes de aceite de ajo detectados en comprobación de inclusiones moleculares

COMPUESTOS DETECTATOS EN INCLUSIONES MOLECULARES
Alil Metil Sulfuro
3,3-Tiobis 1-Propeno

D. Tabla # 10: Compuestos detectados (de mayor a menor) en pruebas de aroma de cápsulas

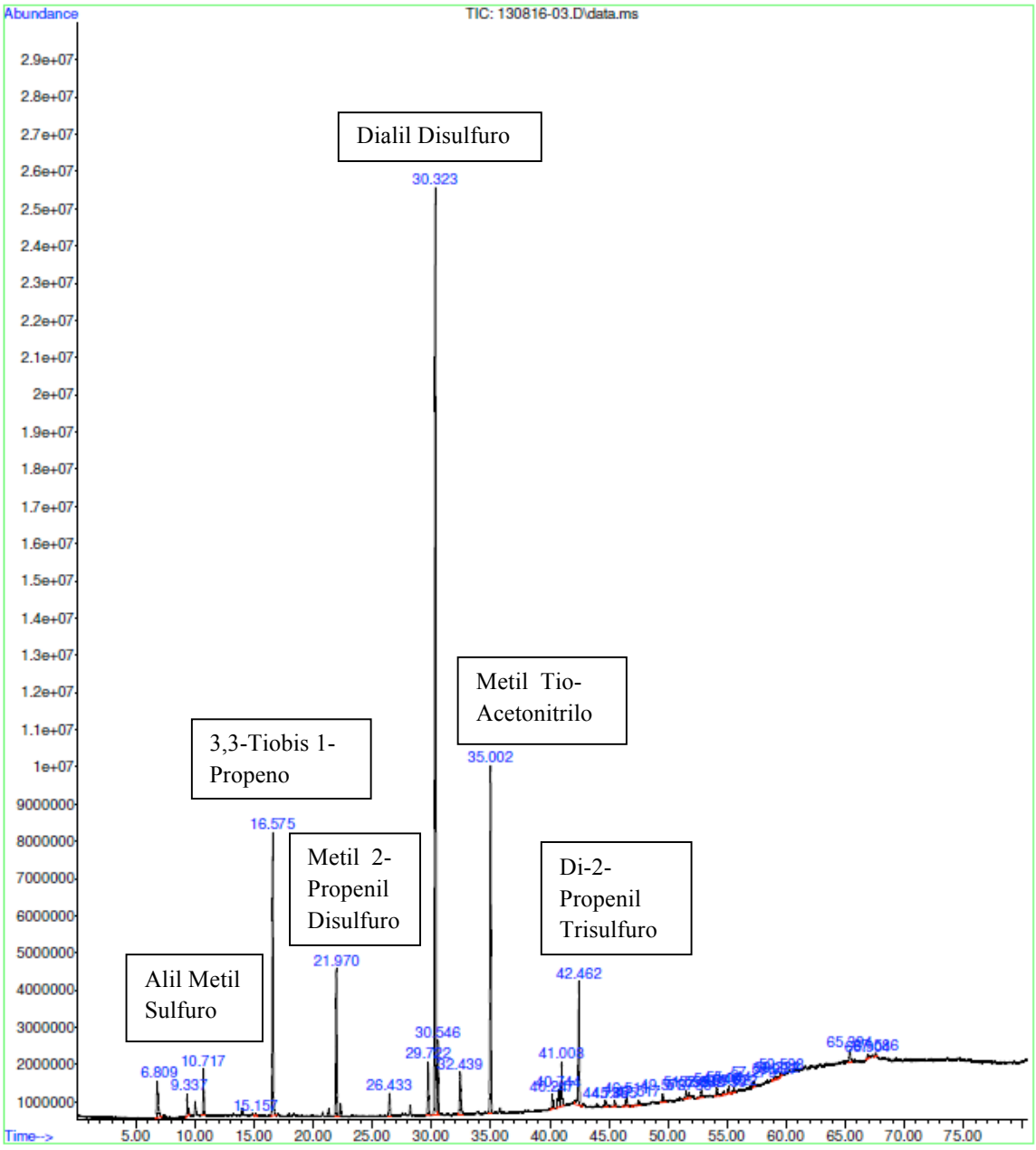
COMPUESTOS DETECTATOS EN PRUEBAS DE AROMA
Desconocido (Presente en Aire)*
Agua
Etanol
3,3-Tiobis 1-Propeno
Alil Metil Sulfuro

*El compuesto desconocido (presente en el aire) se menciona solo con fines informativos, ya que no presenta importancia para la investigación

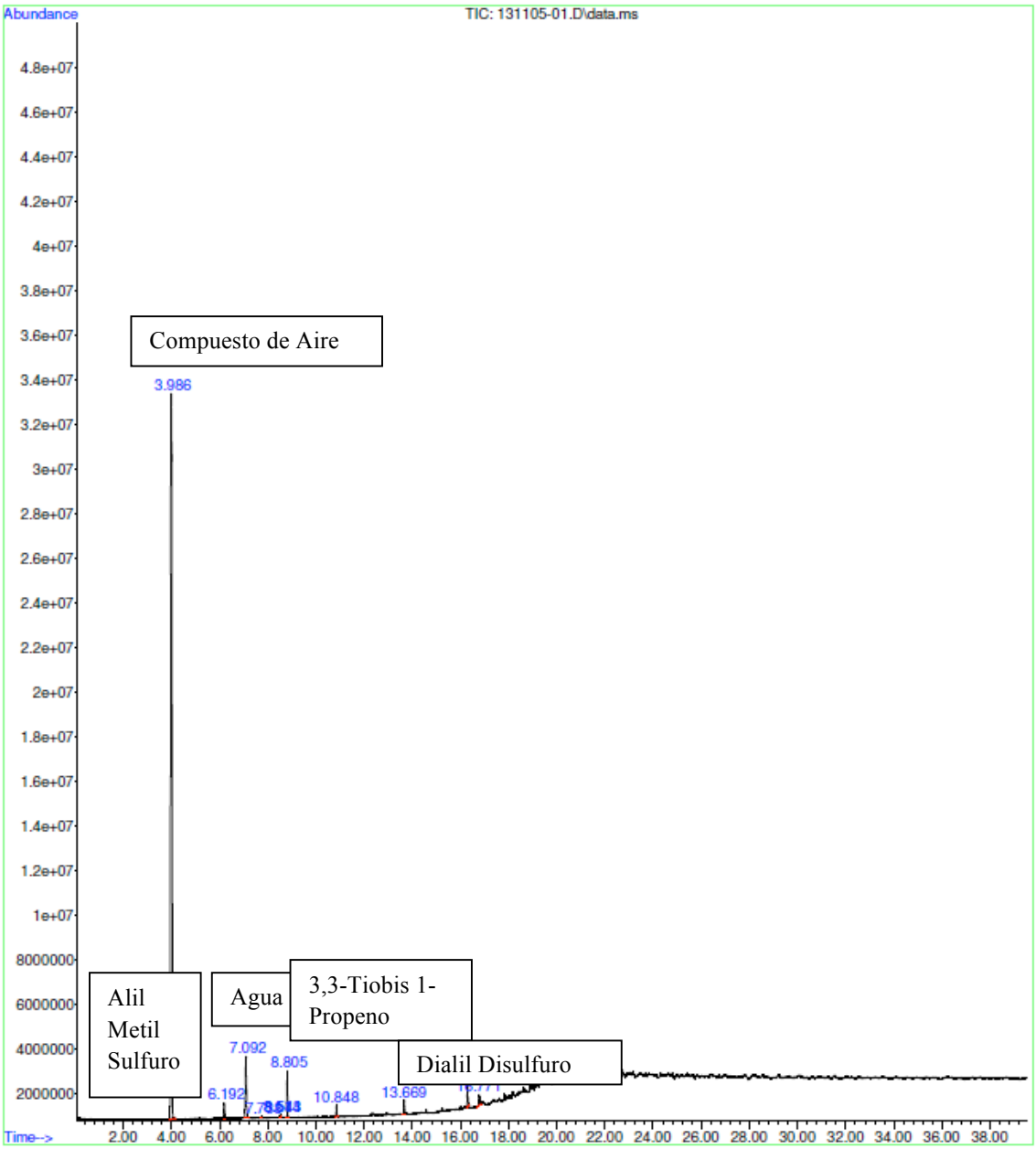
E. Tabla # 11: Compuesto volátil importante de aceite de ajo detectado en prueba de cámara con alta humedad relativa

COMPUESTO VOLÁTIL DETECTADO EN PRUEBA DE CÁMARA
3,3-Tiobis 1-Propeno

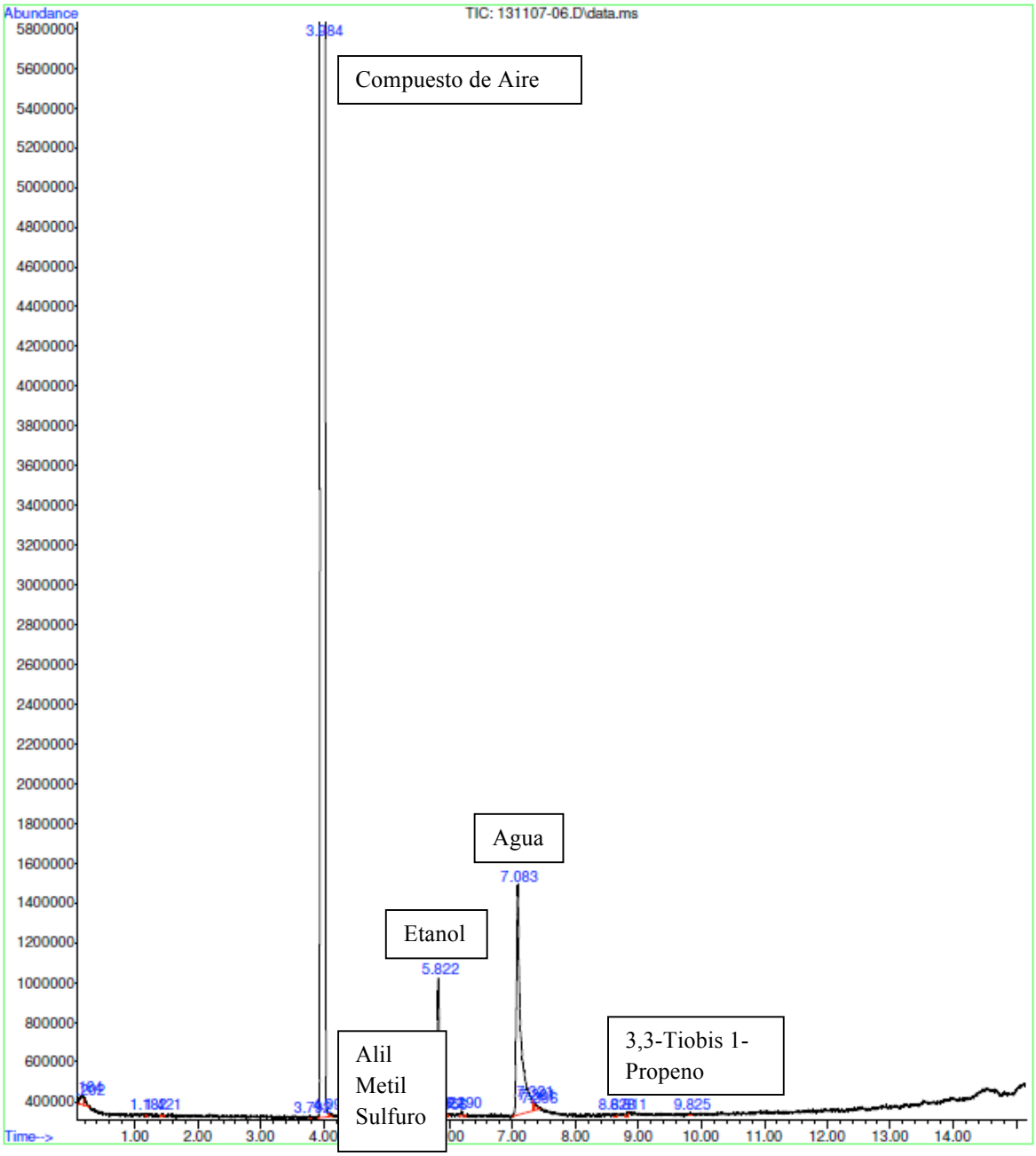
F. Cromatograma # 1: Cromatograma de aceite de ajo



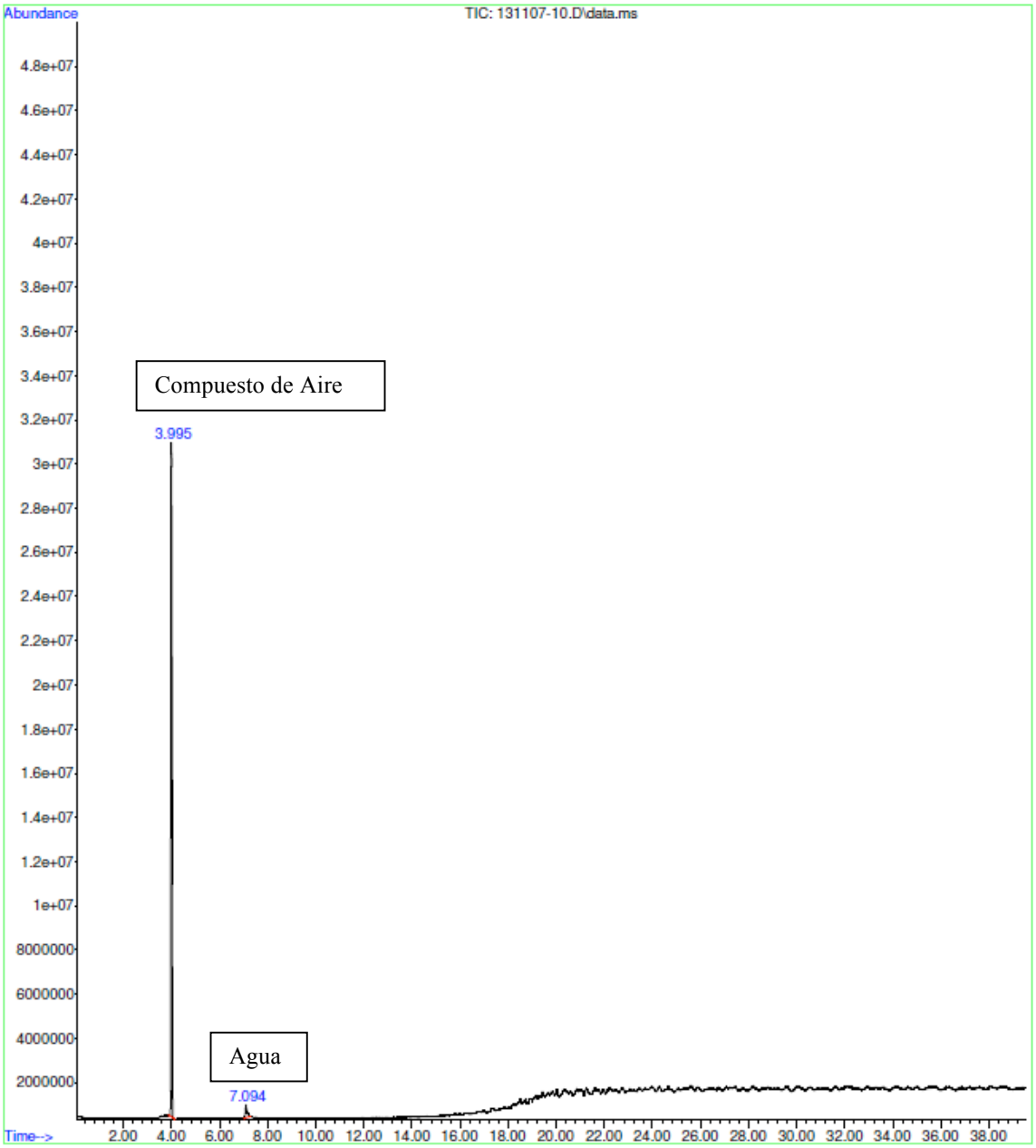
G. Cromatograma # 2: Cromatograma de aroma de aceite de ajo



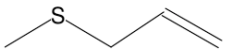
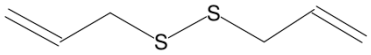
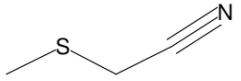
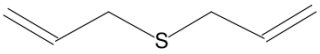
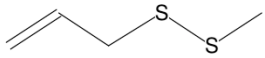
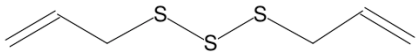
H. Cromatograma # 3: Cromatograma de tubo de análisis de cabeza de aire (comprobación de inclusiones moleculares)



I. Cromatograma # 4: Cromatograma de aire ambiental de atmósfera circundante



J. Tabla # 12: Fórmula molecular, peso molecular y estructura química de compuestos detectados en análisis

FÓRMULA MOLECULAR, PESO MOLECULAR Y ESTRUCTURA QUÍMICA DE COMPUESTOS DETECTADOS EN ANÁLISIS			
Nombre del Compuesto	**Fórmula Molecular**	**Peso Molecular (g/mol)**	**Estructura Química**
Alil Metil Sulfuro	C_4H_8S	88	
Dialil Disulfuro	$C_6H_{10}S_2$	148	
Metil Tio-Acetonitrilo	C_3H_5NS	87	
3,3-Tiobis 1-Propeno (Dialil Sulfuro)*	$C_6H_{10}S$	114	
Metil 2-Propenil Disulfuro	$C_4H_8S_2$	120	
Di-2-Propenil Trisulfuro (Dialil Trisulfuro)*	$C_6H_{10}S_3$	178	

*En paréntesis se presenta el sinónimo del compuesto

(Agilent Technologies, 2013)

K. Tabla # 13: Razón de liberación de compuestos en cámara (en relación a los otros compuestos presentes)

RAZÓN DE LIBERACIÓN	
3,3-Tiobis 1-Propeno	0.103 % en 20 horas

L. Tabla # 14: Porcentajes de humedad de cápsulas elaboradas

% DE HUMEDAD DE CÁPSULAS	
% Humedad Previo a Liofilizado	40 %
% Humedad Después de Liofilizado	5 %

M. Tabla # 15: Humedad perdida por proceso de liofilizado

% DE HUMEDAD PERDIDA	
% Humedad Perdida por Liofilizado	35 %

N. Tabla # 16: Rendimiento de proceso

% DE RENDIMIENTO DE PROCESO	
% Rendimiento	80 %

VII. DISCUSIÓN

A. Procedimiento y análisis de aceite de ajo

El análisis del aceite de ajo se realizó utilizando el método de Cromatografía de Gases con un Cromatógrafo (marca Agilent Technologies) con columna especial para aceites esenciales (DB-WAX, marca Agilent J&W, largo de 60 m, diámetro de 0.250 mm, film de 0.25 µm, límite de temperatura 20-260 °C) y conectado a un sistema de Detección de Espectro de Masas (marca Agilent Technologies). Se decidió utilizar ésta columna con el objetivo de obtener mejor separación de compuestos al momento del análisis, al ser una columna específica para la detección de compuestos de aceites esenciales.

Fotografía # 1: Cromatrógrafo de gases y detector de masas



Para su análisis se programó el sistema para que mantuviera una temperatura de 60 °C durante los primeros 2 minutos luego aumentó progresivamente 3 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura final de 250 °C. Así mismo, se tomó una muestra de 500 µl de aceite y se inyectó directamente dentro del Cromatógrafo. Debido a la naturaleza de la muestra, no fue necesaria la realización de la disolución y filtrado. Éste método propuesto y utilizado posee el beneficio que no utiliza muestra disuelta en solvente, lo que evita la presencia de compuestos no deseados ajenos al análisis respectivo. Así mismo, el hecho de utilizar una columna especial para aceites esenciales es una propuesta atractiva y mucho más precisa para la detección de los compuestos presentes en el aceite. El análisis realizado tuvo una duración de 1 hora con 15 minutos, tiempo durante el cual fue posible la detección de los compuestos del aceite de ajo y la obtención de los picos característicos de cada compuesto.

De manera general el aceite de ajo presentó las características propias de la literatura (Badui Dergal, Salvador; 2006), conteniendo los compuestos antimicrobianos azufrados en mayores proporciones y sin presencia de aditivos, solventes, preservantes ni compuestos que presenten algún riesgo. La tabla # 7, descrita en la sección de resultados y presente a continuación, muestra los compuestos obtenidos en el análisis del aceite de ajo. Se observa que el compuesto en mayor proporción es el Dialil Disulfuro, el cual ha presentado características volátiles y antimicrobianas según estudios elaborados.

COMPUESTOS IMPORTANTES DETECTATOS EN ACEITE DE AJO
Dialil Disulfuro
Metil Tio-Acetonitrilo
3,3-Tiobis 1-Propeno
Metil 2-Propenil Disulfuro
Di-2-Propenil Trisulfuro

La presencia de estos compuestos en el aceite de ajo comprueba la capacidad antimicrobiana del mismo, factor que hace posible el uso de éste aceite para la elaboración de cápsulas útiles y aplicables con objetivos antimicrobianos. Así mismo, el hecho que el aceite no haya presentado ningún tipo de aditivo ni compuestos riesgosos tanto para el producto, empaque o consumidor demuestra la viabilidad de la utilización de

éste ingrediente para la elaboración de empaques naturales e indefensos para productos alimenticios.

B. Procedimiento y análisis de aroma de aceite de ajo

El análisis del aroma del aceite de ajo se realizó utilizando el mismo procedimiento empleado para el análisis del aceite de ajo, pero tomando una muestra gaseosa en vez de una líquida. Por lo mismo se programó el sistema para que realizara el análisis en menor tiempo, inicialmente mantuvo una temperatura de 60 °C durante los primeros 2 minutos y luego aumentó progresivamente 10 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura final de 250 °C. Para su análisis se tomó una muestra de 500 µl de gas y se inyectó directamente dentro del Cromatógrafo, el cual tuvo una duración de 39 minutos. Durante éste tiempo se logró detectar compuestos antimicrobianos volátiles, los cuales son deseados para el funcionamiento del empaque activo. Estos compuestos se muestran en la tabla # 8, descrita en la sección de resultados y presente a continuación, en donde se observa que el compuesto volátil en mayor proporción es el 3,3-Tiobis 1-Propeno, siguiéndole el Alil Metil Sulfuro.

COMPUESTOS IMPORTANTES DETECTATOS EN AROMA DE ACEITE DE AJO
3,3-Tiobis 1-Propeno
Alil Metil Sulfuro
Dialil Disulfuro
Metil 2-Propenil Disulfuro
Dimetil Disulfuro

*También se detectó el compuesto desconocido (presente en aire) que se menciona en la discusión, pero no se coloca en esta tabla al no ser importante para la investigación

Con base en estos resultados se decidió tomar como indicador de encapsulado a estos dos compuestos volátiles. Así mismo se detectó un pico dentro del espectro que presentaba área considerable pero muy poca confiabilidad. Luego de varios análisis utilizando la biblioteca de datos del Cromatógrafo sin encontrar ningún resultado positivo, se decidió realizar un análisis del aire presente en el laboratorio con la misma columna utilizada para el análisis del aroma. Finalmente, en éste análisis se determinó

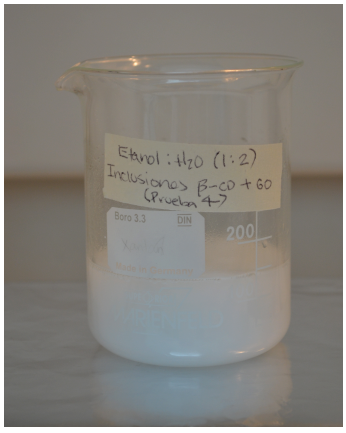
que el compuesto desconocido no pertenencia ni a las cápsulas, ni al aceite, sino que constituía parte de la atmósfera circundante, por lo que no presenta importancia para el análisis y propósito de ésta investigación.

C. Procedimiento de encapsulación

Para la encapsulación de los compuestos antimicrobianos del aceite de ajo se utilizó el método de coprecipitación, debido a la eficiencia de encapsulación y a que existen estudios previos que detallan y explican de cierta manera su funcionamiento y actividad frente a atmósferas similares a las utilizadas en éste estudio. Se utilizó la misma proporción (12:88) a la utilizada en el estudio de Ayala-Zavala, ya que mostró eficiencia, actividad frente a la humedad y microorganismos y resultados sensoriales aceptables. Con el objetivo de perfeccionar el procedimiento general se realizaron una serie de pruebas para el análisis, con cada uno de los procedimientos y cápsulas obtenidas. Inicialmente se realizó una prueba utilizando cantidades propuestas en el estudio, en donde su propósito radicaba en el aprendizaje del método y procedimiento de encapsulado.

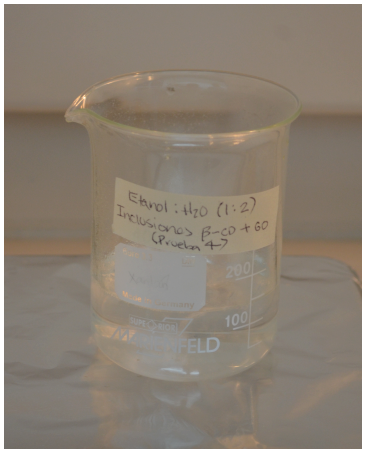
De manera general el procedimiento a seguir fue el siguiente. Inicialmente se realizó la solución 1:2 de etanol absoluto:agua para la disolución de la ciclodextrina, se midió la cantidad requerida de ciclodextrina y se disolvió en la solución previamente preparada. Debido a que la ciclodextrina presenta cierta insolubilidad en agua, al momento en que se incorporó la cantidad de ciclodextrina medida, la solución se tornó turbia y parte de la ciclodextrina precipitó y parte se encontró suspendida.

Fotografía # 2: Solución de ciclodextrina, agua
y etanol sin calentar



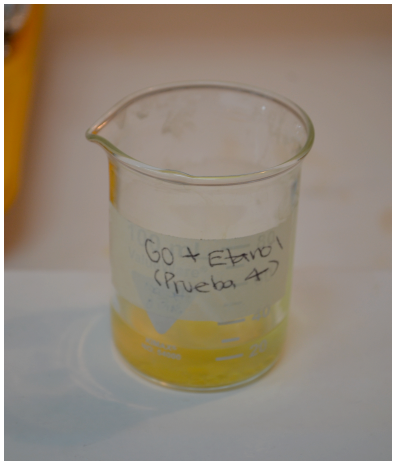
La mezcla obtenida se colocó con máxima agitación constante en una estufa eléctrica y se inició su calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 55 °C. Previo a alcanzar la temperatura deseada, fue posible observar que la solución se tornó traslucida durante el calentamiento. Esto pudo deberse a que la solubilidad de la ciclodextrina se ve aumentada con el calentamiento.

Fotografía # 3: Solución de ciclodextrina,
agua y etanol luego del calentamiento



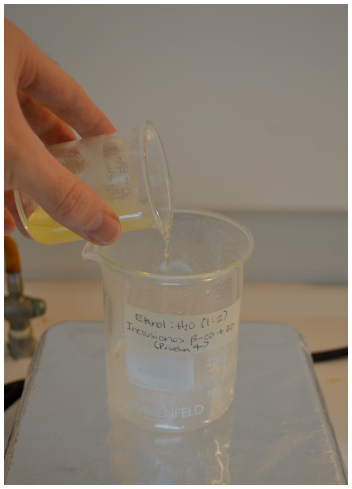
Al momento en que se alcanzaron los 55 °C se mantuvo la mezcla por 5 minutos más, con el objetivo de que ésta se estabilizara y homogenizara. Por aparte se peso la cantidad deseada de aceite de ajo y se mezcló con etanol absoluto hasta formar una solución al 10 % en peso.

Fotografía # 4: Aceite de ajo y etanol

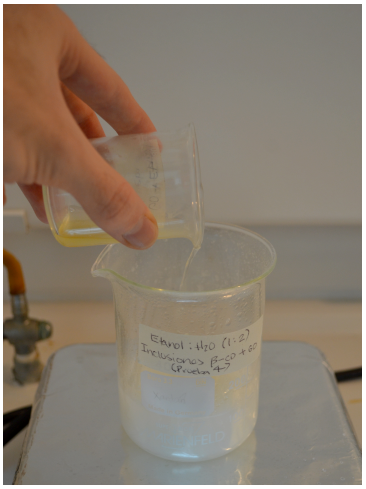


Una vez terminados los 5 minutos de espera, se vertió la solución de aceite de ajo:etanol absoluto a la solución de ciclodextrina caliente por porciones, con el objetivo que se realizara la mezcla lentamente. De manera inmediata, cuando la solución de aceite de ajo entró en contacto con la solución de ciclodextrina, la solución resultante se tornó blanca amarillenta y turbia. Una vez mezcladas totalmente las soluciones, se apagó el calentamiento, se cubrió el beaker con papel aluminio y se agitó durante 4 horas para que el encapsulado se llevara a cabo. Una vez terminadas las 4 horas de agitación, se refrigeró la solución a una temperatura de 10 °C, durante 40 horas.

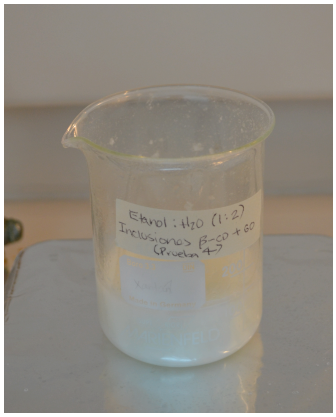
Fotografía # 6: Adición de aceite a solución de ciclodextrina



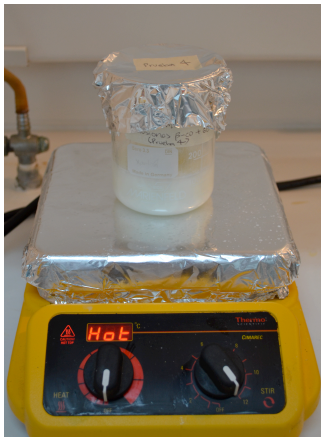
Fotografía # 5: Adición de aceite a solución de ciclodextrina



Fotografía # 8: Solución de ciclodextrina y aceite

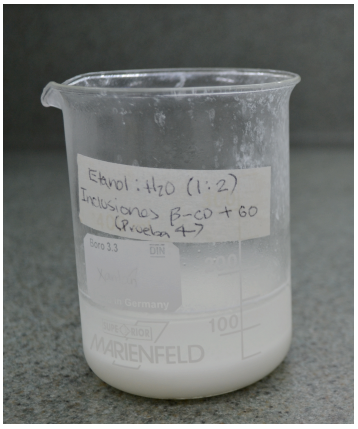


Fotografía # 7: Agitación por 4 horas

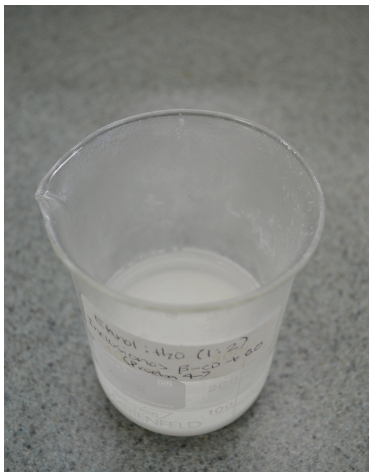


Al finalizar las 40 horas de refrigeración se prosiguió a filtrar al vacío la solución enfriada, en la cual era posible observar un precipitado blanco amarillento (cápsulas), una solución traslucida de agua:etanol y pequeños cristales pegados a la pared del beaker. De las pruebas elaboradas se tomó una muestra de los cristales respectivos y se determinó que eran cristales de hielo con ciclodextrina precipitada. Se llegó a esta conclusión debido que al momento de realizar el raspado, parte de los cristales se tornaba inmediatamente líquida y al momento de colocarlos en un papel filtro, el líquido se derretía, se evaporaba y solamente quedaba polvo blanco.

Fotografía # 10: Inclusiones moleculares luego de refrigeración

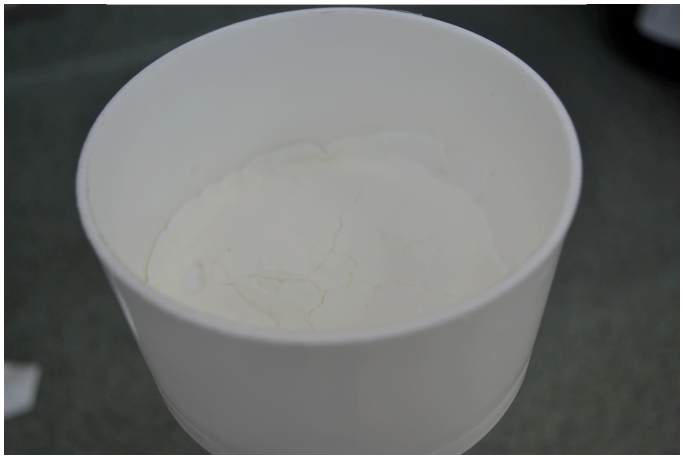


Fotografía # 9: Inclusiones moleculares luego de refrigeración



Para el filtrado se utilizó papel filtro (marca Whatman, número 4) que no permitía el paso de las cápsulas y al mismo tiempo permitía un filtrado rápido. El mismo se elaboró hasta que se observó que las cápsulas se encontraban secas y ya no se obtenía una separación del solvente considerable. En esta etapa se tomó una muestra de cápsulas de una de las pruebas para determinar el porcentaje de humedad de las mismas, obteniendo un valor inicial de aproximadamente 40 %. Es importante mencionar que, a pesar que en estudios anteriores las cápsulas han demostrado actividad por arriba de un 70 % de humedad, es necesario el secado posterior para eliminar mayor cantidad de agua y estabilizar a las cápsulas. Inmediatamente después de obtener las cápsulas por filtración al vacío, éstas se trasladaron a un recipiente especial de vidrio para ser liofilizadas.

Fotografía # 11: Inclusiones moleculares luego de filtrado al vacío



D. Procedimiento de secado (liofilización)

Para el procedimiento de secado utilizando el método de liofilización se realizaron varias pruebas hasta poder determinar la manera y el método más eficiente de secado. Para el secado se utilizó un liofilizador (marca FreeZone, Modelo Serie 78060) de laboratorio, donde se utilizaron las válvulas de vacío para realizar el proceso respectivo.

Fotografía # 12: Liofilizador



Fotografía # 13: Válvulas de vacío



Inicialmente se tomaron las cápsulas previamente filtradas al vacío y se presionaron con una espátula para romper los grumos y poder realizar el proceso de manera más eficiente. Seguido se tomó un filtro circular y se colocó en el agujero, por la parte interna, del sello de hule. Esto se realizó, y es altamente recomendable, debido a que el polvo es succionado por el vacío y se ve introducido al sistema del liofilizador, pudiendo llegar a obstruir el sistema en general. Una vez colocado el filtro en su lugar, el sello de hule se colocó sobre el recipiente de vidrio y se colocó la muestra en una válvula de vacío. Poco a poco se abrió el vacío, con el objetivo de no succionar la muestra y se realizó el proceso de liofilizado por 4 horas en total.

Fotografía # 14: Válvulas de vacío, frasco de vidrio y empaque de hule



Fotografía # 15: Muestra de inclusiones moleculares liofilizándose



Fotografía # 16: Muestra de inclusiones moleculares



Inmediatamente, cuando el proceso se inició, la muestra se tornó fría y se generó un condensado en las paredes externas del recipiente. Durante el tiempo de liofilizado se observó y agitó la muestra eventualmente, para permitir un mejor secado, y se determinó que el proceso estaba finalizado cuando la muestra se encontró a temperatura ambiente y sin condensado externo. En esta etapa es recomendable que, una vez la muestra alcanza la temperatura ambiente y deja de observar condensado, se deje el proceso por varias horas más, con el objetivo de secar el material lo máximo posible. En caso el proceso tuviera que continuar, los recipientes con las cápsulas se sellaron utilizando parafilm y se almacenaron a temperatura ambiente y no en refrigeración ni congelación. Se decidió almacenar las cápsulas de esta manera debido a que dentro de los refrigeradores la

humedad relativa del ambiente es alta, factor que podía activar las cápsulas y hubiera ocasionado perdida de compuestos encapsulados.

E. Comprobación de encapsulado

Para la comprobación del encapsulado se realizó una prueba con hidratación directa con agua, dentro de un tubo de análisis de espacio de cabeza de una capacidad de 50 ml. Para esto se pesó 1 gramo de cápsulas y se hidrataron con 10 mililitros de agua, luego de 10 minutos de hidratación se prosiguió a realizar el análisis de aroma.

Fotografía # 17: Tubo de análisis de cabeza de aire



En la primera prueba de aroma fue posible determinar la liberación de los compuestos encapsulados clasificados como indicadores, estos se muestran en la tabla # 9, descrita en la sección de resultados y presente a continuación.

COMPUESTOS DETECTATOS EN INCLUSIONES MOLECULARES
Alil Metil Sulfuro
3,3-Tiobis 1-Propeno

Como se observa en la tabla los compuestos son el Alil Metil Sulfuro y el 3,3-Tiobis 1-Propeno. En esta primera prueba el Alil Metil Sulfuro se encontraba en mayor proporción, pero luego de 2 días de saturación, el Alil Metil Sulfuro disminuyó y el 3,3-Tiobis 1-Propeno aumentó. Esto indica que las cápsulas continuaban liberando su contenido, pero el Alil Metil Sulfuro disminuía. Esta disminución pudo deberse a que el

tamaño de la molécula del Alil Metil Sulfuro es considerablemente más pequeña que la del 3,3-Tiobis 1-Propeno, lo que ocasiona que la misma se filtre a través de pequeños agujeros en la tapadera y el 3,3-Tiobis 1-Propeno se atrape, aumentando así su proporción.

Es importante mencionar otra posible prueba cualitativa y no cuantitativa. Las cápsulas resultantes de todo el proceso no poseen un olor fuerte a ajo en sí pero, si estas se humedecen con una pequeña cantidad de agua, inmediatamente es posible percibir un fuerte olor a ajo. Esto indica, de manera fácil, rápida y por observación que al contacto con agua las cápsulas liberan su contenido efectivamente.

Los resultados de esta prueba comprueban que la encapsulación de compuestos antimicrobianos del ajo se llevó a cabo con el procedimiento elaborado. Así mismo comprueban que, al contacto con agua, las cápsulas se ven inmediatamente activadas liberando así su contenido.

F. Análisis de cámara

Para el análisis de cámara fue necesaria la elaboración de una cámara hermética de vidrio, a la cual se le modificó la atmósfera interna para determinar el correcto funcionamiento de las cápsulas elaboradas, en condiciones específicas y controladas. Para esto se utilizó un envase de vidrio de alimentos, en donde se perforaron dos agujeros en la tapa superior para poder introducir el sensor de humedad y temperatura (marca Omega) y la jeringa, para la toma de muestras del ambiente interno. Al agujero del sensor de humedad y temperatura se le elaboró un empaque de hule, con el objetivo de evitar el ingreso o egreso de aire a la cámara. Así mismo, al agujero de toma de muestra se le colocó una septa que se auto sellaba al momento de tomar la muestra. Tanto el empaque de hule del agujero de humedad y temperatura y el de la toma de muestra se pegaron utilizando silicón caliente como pegamento, ya que éste material pega instantáneamente, muestra características de hermeticidad aceptables y no presenta olores o solventes que pudieran ser detectados en el análisis. De la misma manera, se colocó una base

suspendida a la mitad del recipiente para poder colocar las cápsulas elaboradas y poder determinar su actividad dentro de la cámara.

Una vez realizada la cámara se prosiguió a modificar la humedad relativa interna. Debido a que las cápsulas presentan alta actividad a mayores humedades relativas, se decidió elevar lo más posible la humedad interna sin modificar la temperatura. La temperatura no se modificó con el objetivo de no incorporar un factor irrelevante al objetivo del estudio. Para esto se utilizó una solución saturada de Sulfato de Potasio y agua, la cual elevó la humedad relativa a un 98 % a una temperatura entre 21 y 25 °C. Para realizar ésta solución se midieron 100 mililitros de agua, se colocaron en beaker de 150 mililitros de capacidad y se incorporó Sulfato de Potasio hasta saturar la solución. Inmediatamente se colocó el beaker con la solución dentro de la cámara, se cerró la cámara y se introdujo el sensor de humedad y temperatura. Se permitió que la humedad relativa, dentro de la cámara, aumentara a 98 % y luego se esperaron 10 minutos para permitir que el sistema se estabilizara. Durante el tiempo de estabilización se elaboró una bolsa utilizando papel Kimwipe, se pesó 1 gramo de cápsulas y se empacaron las cápsulas pesadas dentro de la bolsa elaborada. Se utilizó este papel debido a que evitaba que las cápsulas se perdieran, pero posee un poro suficientemente grande para permitir que las cápsulas se humedecieran y las moléculas encapsuladas se vieran liberadas a la cámara. Una vez pasados los 10 minutos de estabilización, se abrió la cámara, se introdujo la bolsa con las cápsulas, se cerró la cámara y se tomó la primera muestra del ambiente.

Fotografía # 18: Sistema de cámara de vidrio y sensor de humedad y temperatura



Fotografía # 19: Sensor de humedad y temperatura y empaques de hule



Fotografía # 20: Bolsa de inclusiones moleculares



Fotografía # 21: Vista lateral de sistema de cámara



En el análisis de cámara no se tuvo una determinación de compuestos liberados en el primer día, los primeros picos de compuestos liberados se determinaron en la primera muestra del día siguiente. Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla # 11, descrita en la sección de resultados y presente a continuación, en donde se observa que el único compuesto determinado fue el 3,3-Tiobis 1-Propeno, liberado a una razón de 0.103 % en relación a los otros compuestos presentes a lo largo de 20 horas.

COMPUESTO VOLÁTIL DETECTADO EN PRUEBA DE CÁMARA
3,3-Tiobis 1-Propeno

La determinación de este compuesto volátil concuerda con lo determinado en la prueba de aroma del aceite, en donde el compuesto volátil en mayor proporción es el 3,3-Tiobis 1-Propeno. Esto indica que las cápsulas se activaron y liberaron una cantidad considerable de compuestos volátiles por la alta humedad relativa (98 %) del ambiente luego de 20 horas de estar en contacto con la misma. La cámara se mantuvo cerrada por 2 días más con el objeto de observar su comportamiento conforme el paso del tiempo y luego de este tiempo se tomaron más muestras. En la primera muestra después de los 2 días se logró determinar nuevamente el mismo compuesto, aunque en menor proporción. Esto pudo deberse a filtraciones de los compuestos volátiles hacia el ambiente externo, lo que fue posible comprobar cualitativamente por el olor a ajo alrededor de los sensores de análisis. El largo tiempo de detección de los compuestos pudo deberse a la razón relativamente lenta de hidratación de las cápsulas a través del papel filtro, a una humedad solamente ambiental y no local de agua directa, como se mostró en la comprobación del encapsulado. Al igual, el tamaño de la cámara presenta otro factor considerable, ya que a mayor volumen menor será el tiempo de saturación del ambiente interno. Sería recomendable realizar nuevamente el mismo análisis pero por más tiempo o utilizando una cámara más pequeña, con el objetivo de permitir mayor contacto de humedad y suficiente tiempo de saturación. También es recomendable realizar pruebas con cámaras para mejorar la hermeticidad de las mismas, ya que como se observó en las pruebas realizadas existió cierta filtración de compuestos hacia el exterior, aunque esta haya sido mínima. Sin embargo, a pesar que los primeros compuestos importantes se detectaron hasta pasadas 20 horas, otros compuestos de poca importancia fueron detectados desde la primera corrida, estos se muestran en la tabla # 10 descrita en la sección de resultados y presente a continuación.

COMPUESTOS DETECTATOS EN PRUEBAS DE AROMA
Desconocido (Presente en Aire)*
Agua
Etanol
3,3-Tiobis 1-Propeno
Alil Metil Sulfuro

*El compuesto desconocido (presente en el aire) se menciona solo con fines informativos, ya que no presenta importancia para la investigación

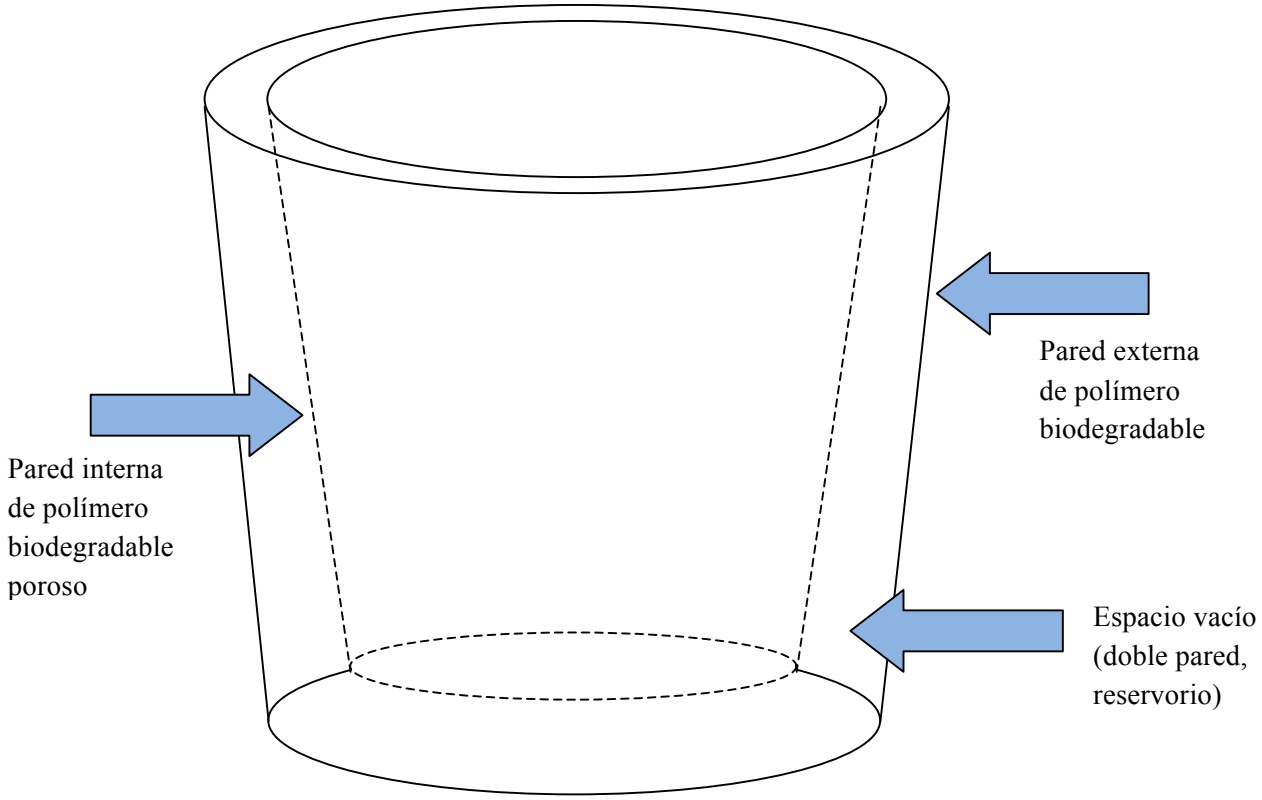
En esta tabla se puede observar que el compuesto en mayor proporción, en todas las pruebas de aroma, es el compuesto desconocido presente en la atmósfera circundante. Seguido a este compuesto se encuentra el agua, resultado esperado debido a que el ambiente interno es de alta humedad relativa y las mismas cápsulas presentan humedad del 5 %. Después se encuentra el etanol, debido a que está presente en el proceso de elaboración de las cápsulas y es posible que no se haya eliminado del todo durante el secado. Así mismo, a pesar que la ciclodextrina encapsula compuestos naturalmente hidrofóbicos y que el etanol no debería presentar problema, es posible que exista cierta encapsulación de etanol dentro de su cavidad y se libere al momento del análisis.

Los resultados obtenidos demuestran que una alta humedad relativa genera una liberación controlada de los compuestos encapsulados por la ciclodextrina. Al igual, su razón lenta hace de estas cápsulas una propuesta viable para una liberación a largo plazo, con el objetivo de disminuir y minimizar el crecimiento microbiológico indeseable durante el almacenamiento en cualquier tipo de alimento. De la misma manera, el hecho de no encontrar ningún compuesto tóxico ni dañino hace de esta propuesta más atractiva aún, ya que no genera ningún impacto negativo ni en el alimento ni en el consumidor.

G. Propuesta de diseño de empaque activo

Como propuesta de empaque se muestra el diseño de la figura # 14. Este diseño posee una forma de cono truncado con pared doble (espacio vacío) elaborado con polímeros biodegradables. La idea de este diseño es que sea posible colocar cápsulas dentro de la doble pared que actúa como reservorio, y para que estas se humedezcan con la humedad interna del empaque, se activen y liberen sus compuestos que pasan a través de la pared interna porosa. Se desea utilizar polímeros biodegradables con el objetivo de elaborar una empaque amigable al ambiente, que no presente ninguna toxicidad alguna.

Figura # 17: Diseño de propuesta de empaque



VIII. CONCLUSIONES

1. Se implementó el método de inclusión molecular, utilizando β-Ciclodextrina, para la microencapsulación de compuestos azufrados antimicrobianos del aceite de ajo. Los resultados de esta prueba comprueban que la encapsulación de compuestos antimicrobianos del ajo se llevó a cabo satisfactoriamente con el procedimiento elaborado. Así mismo comprueban que, al contacto con agua, las cápsulas se ven inmediatamente activadas liberando así su contenido.
2. Se demostró la liberación controlada de compuestos microencapsulados del aceite de ajo, en ambientes con alta humedad relativa. Los resultados obtenidos demuestran que una alta humedad relativa genera una liberación controlada de los compuestos encapsulados por la ciclodextrina. Así mismo, su razón lenta hace de estas cápsulas una propuesta viable para una liberación a largo plazo, con el objetivo de disminuir y minimizar el crecimiento microbiológico indeseable durante el almacenamiento en cualquier tipo de alimento. De la misma manera, el hecho de no encontrar ningún compuesto tóxico ni dañino hace de esta propuesta más atractiva aún, ya que no genera ningún impacto negativo ni en el alimento ni en el consumidor.
3. Fue posible comprobar la liberación controlada de compuestos microencapsulados del aceite de ajo, en ambientes con alta humedad relativa, utilizando el método de Cromatografía de Gases con Espectrómetro de Masas, utilizando la columna para aceites esenciales DB-WAX.
4. Se elaboró una propuesta de diseño para el empaque de alimentos y la liberación controlada de los compuestos encapsulados, que presentaba viabilidad y seguridad, tanto para el alimento, como para el consumidor y medio ambiente.

IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda un análisis profundo de la estequiometria de la reacción de formación de inclusiones moleculares que se lleva a cabo con el procedimiento establecido. Esto, al requerir de equipo especializado no se pudo llevar a cabo, pero su implementación permitiría mayor entendimiento de lo ocurrido durante todo el proceso.
2. Realizar nuevamente el mismo análisis, pero por más tiempo o utilizando una cámara más pequeña, con el objetivo de permitir mayor contacto de humedad y suficiente tiempo de saturación. Así mismo, es recomendable realizar pruebas con cámaras para mejorar la hermeticidad de las mismas, ya que como se observó en las pruebas realizadas existió cierta filtración de compuestos hacia el exterior, aunque esta haya sido mínima.
3. Realizar análisis microbiológico, luego de implementar las inclusiones moleculares en un empaque con alimentos, con el objetivo de comprobar que el aceite utilizado y las cápsulas elaboradas presentan acción antimicrobiana en el ambiente y sobre el alimento objetivo y específico.

X. FUENTES BIBLIOGRÁFICAS

1. Agilent Technologies. *Base de Datos del Sistema de Detección de Espectro de Masas*. Universidad del Valle de Guatemala [2013]

2. Antelo Queijo, Álvaro. 2008. *Arquitecturas Supramoleculares Generadas por Nuevos Derivados de Ciclodextrinas y Ácidos Biliares.* Tesis Universidad de Santiago de Compostela.

3. Avendaño Cetina, Grace Lady. 2009. *Diseño y Evaluación de las Propiedades Mecánicas y de Barrera de un Biopolímero Obtenido a Partir de Almidón de Papa para ser Empleado en Empaques para Alimentos.* Tesis Universidad Nacional Abierta y a Distancia Unad. Duitama, Colombia. 174 págs.

4. Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A. 2010. *Optimizing the Use of Garlic Oil as Antimicrobial Agent on Fresh-Cut Tomato through a Controlled Release System.* Journal of Food Science. 75 (7): 398-405.

5. Ayala-Zavala, J. Fernando; González-Aguilar, Gustavo A.; Del-Toro-Sánchez, L. 2009. *Enhancing Safety and Aroma Appealing of Fresh-Cut Fruits and Vegetables Using the Antimicrobial and Aromatic Power of Essential Oils.* Journal of Food Science. 74 (7): 84-91.

6. Badui Dergal, Salvador. 2006. *Química de los Alimentos*. 4ª ed. México: Pearson Educación. 736 págs.

7. Botanical-Online. *Properties of Garlic.* http://www.botanical-online.com/medicinalsalliumsativumangles.htm [2013]

8. Chernykh, E.V.; Brichkin, S. B. 2010. *Supramolecular Complexes Based on Cyclodextrins.* High Energy Chemistry. 44 (2): 83-100.

9. ESRF. *Calculation of Equilibrium Relative Humidity (RH). Equation 1.* http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/MX/How_to_use_our_beamlines/forms/equation-1[2013]

10. García Alonso, Carlos Román. 1998. *El Ajo*. 2ª Ed. España: Mundi-Prensa. 209 págs.

11. Giménez, Antonio. Empacadores Frutihortícolas. *Características del Ajo.* http://donantonioweb.com/site/index.php?option=com_content&view=article&id=98&Itemid=245 [2013]

12. Gomis Yagües, Vicente. 2008. Tema 3: *Cromatografía de Gases*. España.

13. Goud H. Desai, Kashappa; Jin Park, Hyun. 2005. *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*. Drying Technology. (23): 1361-1394.

14. Hu, Jie; Tao, Zhen; Li, Songjun; Liu, Bailing. 2005. *The Effect of Cyclodextrins on Polymer Preparation.* Journal of Materials Science. 6057-6061.

15. InfoAgro. *El Cultivo del Ajo.* http://www.infoagro.com/hortalizas/ajo.htm [2013]

16. ITIS Report. *Allium sativum.* http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42652 [2013]

17. J.F. Ayala-Zavala, *et al*. 2008. *High Relative Humidity In-Package of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Advantage or Disadvantage Considering Microbiological Problems and Antimicrobial Delivering Systems?* Journal of Food Science. 73 (4): 41-47.

18. Laza-Knoerr, A.L.; Gref, R.; Couvreur, P. 2010. *Cyclodextrins for Drug Delivery*. Journal of Drug Targeting. 18 (9): 645-656.

19. McCabe, Warren L.; Smith, Julian C.; Harriott, Peter. 2007. *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química.* 7ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 1189 págs.

20. McNulty, C.A.M. *et al.* 2001. *A Pilot Study to Determine the Effectiveness of Garlic Oil Capsules in the Treatment of Dyspeptic Patients with Helicobacter Pylori*. Blackwell Science Ltd. 6 (3): 249-253.

21. O'Gara, E.A. *et al.* 2007. *The Effect of Simulated Gastric Environments on the Anti-Helicobacter Activity of Garlic Oil.* Journal of Applied Microbiology. 1324-1331.

22. Poncelet, Denis; Picot, Arnaud; El Mafadi, Samira; Capsulæ. 2001. *Encapsulation: An Essential Technology for Functional Food Applications.* Innovations in Food Technology. 32-34.

23. Seo, Eun-Ju; Min, Sang-Gi; Choi, Mi-Jung. 2010. *Release Characteristics of Freeze-Dried Eugenol Encapsulated With β-Cyclodextrin by Molecular Inclusion Method.* Journal of Microencapsulation. 27 (6): 496-505.

24. Shafiur Rahman, M., *et al*. 2006. *Assessment of the Anti-Microbial Activity of Dried Garlic Powders Produced by Different Methods of Drying.* International Journal of Food Properties. (9): 503-513.

25. TIP Category: Data and Calculations. 2002. *Equilibrium Relative Humidities over Saturated Salt Solutions.* TAPPI.

26. Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. *Fichas de Plantas Útiles (Ajo)*. http://www1.etsia.upm.es/departamentos/botanica/fichasplantas/ajoclas.html [2013]

27. Verma S. K.; Jain V.; Verma D. 2008. *Garlic - "The Spice Of Life": Composition, Cooking Chemistry and Preparations.* Journal of Herbal Medicine and Toxicology. 2 (2): 21-28.

28. Weiss, Jochen; Takhistov, Paul; McClements, Julian. 2006. *Functional Materials in Food Nanotechnology*. Journal of Food Science. 71 (9): 107-116.

XI. ANEXO I
Especificaciones de ciclodextrina

孟州市华兴生物化工有限责任公司

MENGZHOU HUAXING BIOCHEMISTRY CO., LTD

分　析　单

CERTIFICATE OF ANALYEIS

品名：倍他环糊精
Product name: β -cyclodextrin
数量：1kg
Quantity:
检验标准：《中国药典2010版》
Inspection Standard:CP2010

批号/生产日期：20130408/2013.04.08
Batch no/manufacture Date:
有效日期至：2015.03
Expiry Date:
报告日期：2013.04.15
Report Date:

分析项目 Datemination	指标 Specification	分析结果 Result
性　状 Characteristics	White, practically odorless, fine crystalline powder having a slightly sweet tasta	符合规定.
含　量（%） Assay(%)	98.0% ~102.0%	98.5%
比旋度 Specific Optical Roration	+159° ~+164°	+161°
干燥失重（%） Moisture(%)	≤14.0%	11.0%
炽灼残渣（%） Residue on ignation	≤0.1%	0.06%
氯化物（%） Chloride(%)	≤0.018%	<0.018%
重金属(ppm) Heavy metals(ppm)	<10	<10
还原糖（%） Glucose(%)	≤1.0%	0.25%
PH 值 PH value	5.0~8.0	5.8
杂质吸光度 Light absorbing impurties	230~350nm ≤0.1 350~550nm≤ 0.05	符合规定.
残留溶剂（%） Residual solvents(%)	≤ 0.388%	0.0003%
微生物限度（cfu/g） Microbial limits(cfu/g)	细菌 T.P.C(Amount/gram) ≤1000 霉菌和酵母菌 Molds and Yeasts(Amount/gram) ≤100 大肠埃希菌 Escherichia coli No.	细菌<10cfu/g 霉菌和酵母菌<10cfu/g 大肠埃希菌未检出

结论：本品符合《中国药典》2010版的规定，同意出厂。
Concluslon:B-cyclodextrin comply with CP2010
签字/盖章：检验员 邓恒通
Signature/Seal:

NO.2610040006

CNAS

CNAS IB0071

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

MENGZHOU HUAXING BIOCHEMISTRY CO., LTD
孟州市
华兴生物化工有限责任公司

Product Name: β-Cyclodextrin

Revision Date: 2010-04-23

Compiler: Liu Linlin

Checker: Yangyi

Approver: Zhangxiaojin

Shanghai Research Institute of Chemical Industry Testing Centre
Shanghai Classification and Testing Centre of Dangerous Chemicals for State Work Safety

NO.2610040006

Mengzhou Huaxing Biochemistry Co., Ltd.

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

β-Cyclodextrin

SECTION1 PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product name:	β-Cyclodextrin
Company:	Mengzhou Huaxing Biochemistry Co., Ltd.
Address:	Xigong District, Mengzhou City, He'nan Province, 454750, P.R.China
Email:	huaxing@263.net.cn
Fax:	86-391-8511122
Emergency Phone:	86-391-8510105
MSDS Number:	2610040006
MSDS Date:	2010-04-23

MENGZHOU HUAXING BIOCHEMISTRY CO., LTD. 孟州市 华兴生物化工有限责任公司

SECTION2 INFORMATION ON INGREDIENTS

Product name: β-Cyclodextrin

Ingredient	Concentration	CAS No.	EC No.
β-Cyclodextrin	99%	7585-39-9	231-493-2

SECTION3 HAZARDS IDENTIFICATION

Hazards Identification:

This substance is considered to be non-hazardous for transport.

Emergency Overview:

May cause irritation to eyes, respiratory system and skin.

SECTION4 FIRST-AID MEASURES

Skin Exposure:

In case of contact, immediately wash skin with copious amounts of water for at least 15 minutes. If irritation persists, call a physician.

Eye Exposure:

In case of contact with eyes, flush with copious amounts of water for at least 15 minutes. Assure adequate flushing by separating the eyelids with fingers. Call a physician.

Inhalation Exposure:

If inhaled, remove to fresh air. If breathing is difficult, give oxygen.

Oral Exposure:

If victim is conscious, wash mouth out with water. Get medical aid immediately.

SECTION5 FIRE FIGHTING MEASURES

Extinguishing Media:

Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

Firefighting:

Protective Equipment: Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing to prevent contact with skin and eyes.

SECTION6 ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Procedure of Personal Precaution:

Exercise appropriate precautions to minimize direct contact with skin or eyes and prevent inhalation.

Methods for Cleaning up:

Sweep up with spade and transfer to a dry, clean, lidded container for disposal. Avoid raising dust. Ventilate area and wash spill site after material pickup is complete.

SECTION7 HANDLING AND STORAGE

Handling:

Wear appropriate protective clothing and chemical safety gloves. Avoid inhalation. Avoid contact with eyes, skin and clothing. Mechanical exhaust required. Keep away from ignition sources, heat and flame. Incompatibilities: strong oxidizing agents. No smoking at working site.

Storage:

Store in a cool, well-ventilated area. Keep away from ignition sources, heat and flame. Store in a tightly closed container. Incompatibilities: strong oxidizing agents.

SECTION8 EXPLOSURE CONTROL/PPE

Engineering Controls:

Safety shower and eye bath. Mechanical exhaust required.

Personal Protective Equipment:

Respiratory: Wear government approved respirator.

Eye: Safety glasses.

Clothing: Wear appropriate protective clothing.

Hand: Compatible protective gloves.

Other Protect:

No smoking, drinking and eating at working site. Wash thoroughly after handling.

NO.2610040006

SECTION9 PHYSICAL/CHEMICAL PROPERTIES

Appearance:	White powder
Odor:	Weak odor
Molecular Formula:	$C_{56}H_{94}O_{20}$
Molecular Weight:	1134.98
Melting Point/℃:	>200℃ decomposition
pH Value:	6.8 (25℃, 50.0g/L)
Solubility:	Weak soluble in water

SECTION10 STABILITY AND REACTIVITY

Stability:
Stable under normal temperature and pressure.

Conditions to Avoid:
Moisture.

Materials to Avoid:
Strong oxidizing agents.

Hazardous Polymerization:
Will not occur.

Hazardous Decomposition Products:
Carbon oxides.

MENGZHOU HUAXING BIOCHEMISTRY CO.,LTD 孟州市 华兴生物化工有限责任公司

SECTION11 TOXICOLOGICAL INFORMATION

Toxicity Data:

Rat	Oral	LD_{50}	18800mg/kg;
Mouse	Oral	LD_{50}	>12500mg/kg.

Irritation Data:
May cause irritation to eyes, respiratory system and skin.

Sensitization:
No data available.

SECTION12 ECOLOGICAL INFORMATION

No data available.

SECTION13 DISPOSAL CONSIDERATION

Appropriate Method of Disposal of Substance:
Observe all federal, state, and local environmental regulations. Contact a licensed professional waste disposal service to dispose of this material. Dissolve or mix the material with a combustible solvent and burn in a chemical incinerator equipped with an afterburner and scrubber.

NO.2610040006

SECTION14 TRANSPORT INFORMATION

DOT:	Proper Shipping Name: None Non-Hazardous for Transport: This substance is considered to be non-hazardous for transport.
RID/ADR:	Non-Hazardous for Transport: This substance is considered to be non-hazardous for transport.
IATA:	Non-Hazardous for Air Transport: Non-hazardous for air transport.
IMO:	Non-Hazardous for Sea Transport: Non-hazardous for sea transport.

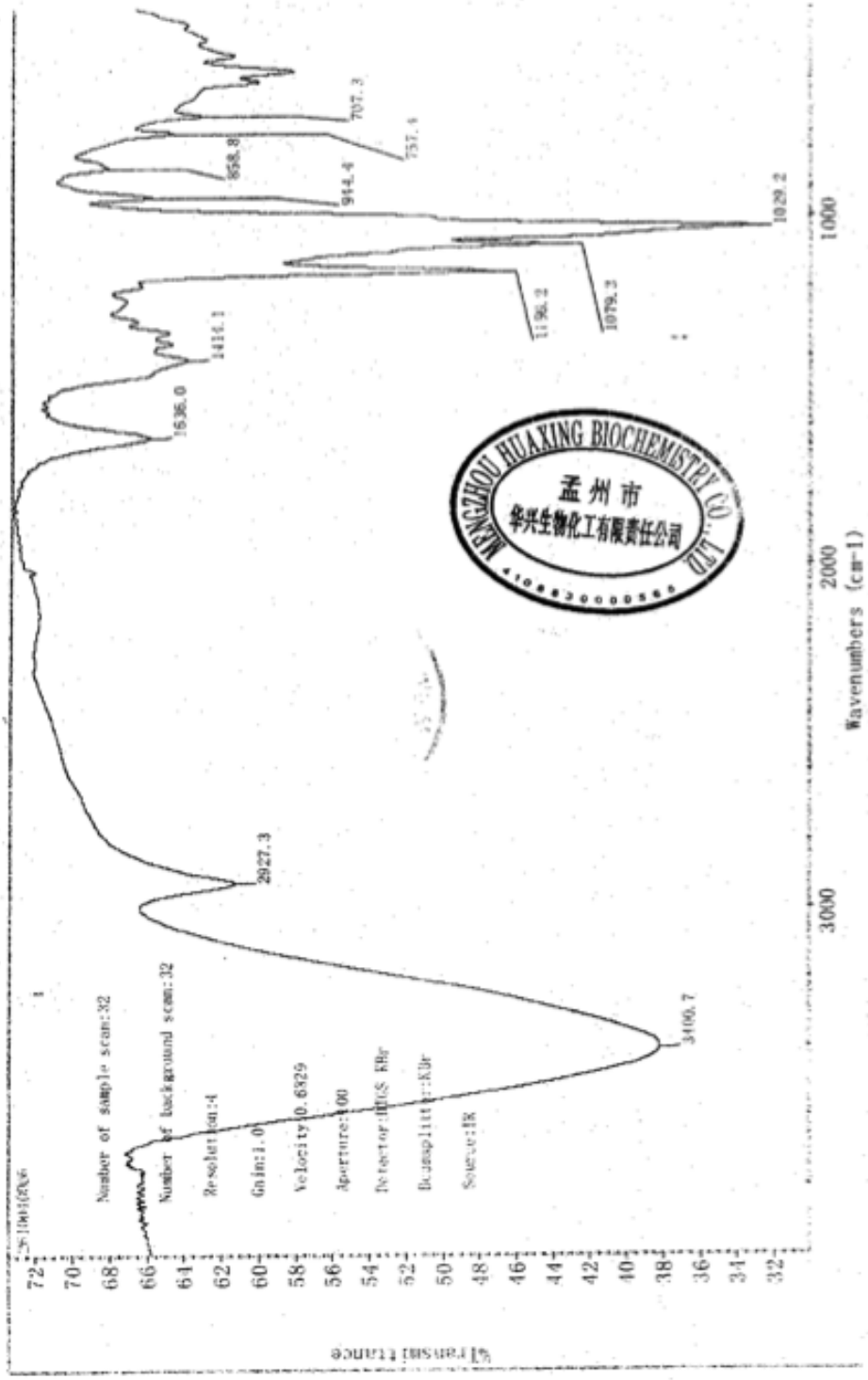
SECTION15 REGULATORY INFORMATION

EU Additional Classification:
This chemical substance is not classified in the Annex I of Directive 67/548/EEC.

SECTION16 OTHER INFORMATION

Date:	2010-04-23
Department:	Shanghai Research Institute of Chemical Industry Testing Centre Shanghai Classification and Testing Centre of Dangerous Chemicals for State Administration of Work Safety Tel(Fax):8621-52815377/52800971/52807275/52811034/52569800
Revision:	0
Other	The above information is believed to be correct but does not purport to be all inclusive and shall be used only as a guide. We make no warranty of merchantability or any other warranty, express or implied, with respect to such information, and we assume no liability resulting from its use. Users should make their own investigation to determine the suitability of the information for their particular purposes. In no way shall we be liable for any claims, losses, or damages of any third party or for lost profits or any special, indirect, incidental, consequential or exemplary damages, howsoever arising from using the above information.




%Transmittance
Wavenumbers (cm-1)
3000
2000
1000
3406.7
2927.3
1636.0
1414.1
1196.2
1079.3
1029.2
914.4
858.8
757.1
707.3
Number of sample scans:32
Number of background scans:32
Resolution:4
Gain:1.0
Velocity:0.6329
Aperture:100
Detector:DTGS KBr
Beamsplitter:KBr
Source:IR
MENGZHOU HUAXING BIOCHEMISTRY CO.,LTD
孟州市
华兴生物化工有限责任公司

XII. ANEXO II
Manual de uso de liofilizador

MANUAL DE USO

Liofilizador FreeZone
Modelo Serie 78060

PREPARACIÓN DE MUESTRA

1. Introducir la muestra deseada dentro de un frasco de vidrio apropiado. Tomar en cuenta que el frasco debe ser de dos a tres veces el tamaño de la muestra.
2. A pesar que el liofilizador enfría y congela la muestra, para que el proceso sea más eficiente y rápido, congelar la muestra con anticipación.
3. Previo a colocar la muestra congelada en el liofilizador, romper con cuidado la muestra en pequeños pedazos. Ésto aumenta el área superficial de la muestra y eficientiza el proceso.



Botón de Encendido y Apagado





Manguera

Zepelin





PROCEDIMIENTO

1. Previo al encendido del equipo, drenar el agua almacenada en el depósito abriendo la manguera localizada en la parte inferior izquierda y limpiar el exceso de condensado en el zepelín. Una vez realizado esto, verificar que todas las piezas se encuentren en su lugar.
2. Presionar el botón de encendido localizado en la parte izquierda del equipo.
3. Presionar el botón de refrigerado (AUTO o MANUAL).
4. Presionar el botón de Vacío (VACUUM).
5. Permitir que el equipo se estabilice y llegue a una temperatura de -50 °C o menor (Aproximadamente 30 min).
6. Colocar el frasco con la muestra congelada en una de las válvulas (Ver Sección de Preparación de Muestra y Sección de Precauciones) y abrir la válvula de vacío con cuidado, procurando que la succión se realice gradualmente. En este momento se observará que la temperatura del frasco disminuye.
7. En este momento se inicia el liofilizado de la muestra y el tiempo para la obtención de la muestra final depende de varios factores (Ver Sección de Tabla de Ejemplos).
8. Cuando el proceso de liofilizado casi haya llegado a su fin, se observará que ya no existe condensado en el frasco ni en el interior de la muestra. En este punto se debe continuar el proceso varias horas más para que éste se complete en su totalidad y la muestra se encuentre totalmente seca.
9. Una vez finalizado el proceso, cerrar la válvula de vacío y retirar la muestra con precaución.

NOTAS IMPORTANTES

1. Recordar que en el proceso de liofilizado se realiza vacío, lo cual es una presión negativa. Al ser una presión negativa, mientras más grande sea el valor de la presión, menor será el vacío realizado.
2. El liofilizador FreeZone posee un rango de vacío de 0 a 1.650 mBar.
3. Se recomienda que el liofilizador se opere con un vacío de 0.133 mBar o menos (Lo que significa mayor vacío por el signo negativo).
4. Cuando el sistema posea suficiente vacío, las luces de los controles se encenderan de color verde. Si el sistema no posee suficiente vacío, las luces verdes se apagan, por lo que es necesario permitir que el sistema se estabilice.
5. Para modificar los valores del sistema, presionar varias veces MENU para saltar entre opciones y SELECT para seleccionar.





Filtro

PRECAUCIONES

1. El liofilizador se encuentra compuesto por varias partes de distinto material, las cuales pueden verse afectadas por las sustancias utilizadas. A continuación se muestra una tabla con sustancias corrosivas para el sistema.

		Acids			Buffers		Solvents							
Component	**Material**	**Acetic Acid 20%**	**Formic Acid**	**Trifluoroacetic Acid (TFA)**	**Calcium Chloride**	**Sodium Phosphate**	**Acetone**	**Acetonitirle**	**Carbon Tetrochloride**	**Cyclohexane**	**Dioxane**	**Methyl t-Butyl Ether (BTBE)**	**Pyridine**
Valve Stem	Acetal (Delrin)	C	D	D	D		D						
Collector* Lid & Door	Acrylic			D			D	D	D				
Hoses, Gaskets & Valve Bodies	Neoprene	C	D	D			C	C	D	D	D	C	D
Flask Top	Silicon Rubber		C	D		D			D	D	D	C	D
Chamber & Fittings	Stainless Steel				C								

* An accessory glass lid is available for the Freeze Dry base units.
C – Moderate degradation; Limited use.
D – Severe degradation; infrequent use recommended; immediate thorough cleaning required.

2. Si la muestra a liofilizar es un polvo muy fino, se recomienda colocar un filtro en la boquilla de hule para que la muestra no sea succionada dentro del sistema.

EJEMPLOS

1. El proceso de liofilizado depende del tipo de muestra utilizada, su composición, contenido de humedad, cantidad, área superficial y espesor; así como también de la temperatura y vacío obtenido. Por lo que el proceso varía si se modifica cualquiera de estos factores. Con el objetivo de poseer un factor de comparación, se muestra una tabla con valores de proceso para distintos materiales.

SAFE TEMPERATURE AND DRYING TIMES FOR SELECTED MATERIALS			
Material 10mm Thick	Safe Temp °C	Collector Temp °C	Hours (Approx.)
Milk	-5	-40	10
Urea	-7	-40	10
Blood Plasma	-10 to -25	-40	16
Serum	-25	-40	18
Vaccinia	-30 to -40	-50	22
Influenza Vaccine	-30	-50	24
Human Tissue	-30 to -40	-50	48
Vegetable Tissue	-50	-80	60