

Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral (*cymbopogon citratus*) en β -ciclodextrinas usando CO_2 supercrítico

Jaime Restrepo[§], Luz E. Vinasco^{**}, Lorena P. Jaramillo^{*}, Ana J. Colmenares^{*}

^{*} Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

^{**} Departamento de Ciencias de la Ingeniería y la Producción, Facultad de Ingeniería, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia.

[§]Email: jarestre@univalle.edu.co

(Recibido: Marzo 21 de 2008 - Aceptado: Diciembre 10 de 2009)

Resumen

Usando CO_2 supercrítico (CO_2 -SC) y β -ciclodextrinas (β -CD) es posible obtener complejos de inclusión (encapsulados) en el estado sólido con mejores propiedades de solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad. En el presente estudio se determinaron las condiciones de presión y temperatura del CO_2 en las que fue factible la formación de los complejos de inclusión entre los componentes del aceite esencial (AE) del limoncillo (*Cymbopogon Citratus*) y las β -CD. Los experimentos se basaron en un diseño experimental del tipo 3^k con $K=2$ y tres niveles de temperatura y presión: 313.15, 323.15 y 333.15K, y 172.32, 206.78 y 241.25 bar respectivamente. Los complejos de inclusión se caracterizaron por GC-MS, I.R, UV, mediante un análisis comparativo de los espectros de la β -CD libre, el aceite esencial libre y el complejo β -CD-aceite esencial, obteniendo así, información de las propiedades estructurales del complejo β -CD-A.E. Los resultados indicaron que la mayor eficiencia de inclusión o encapsulamiento (48.9%) se obtuvo a 241.25 bar y 313.15K.

Palabras Claves: Encapsulamiento, Fluidos supercríticos, Limoncillo, Ciclodextrinas, Dióxido de carbono supercrítico, Citral.

CHEMICAL ENGINEERING

Encapsulation of essential oil from citral (*cymbopogon citratus*) in β -cyclodextrines by using supercritical CO_2

Abstract

By using supercritical CO_2 (CO_2 -SC) and cyclodextrines (β -CD), it is possible to obtain complexes of inclusion (encapsulation) in the solid state with better properties of solubility, stability and bioavailability. In this study, the pressure and temperature condition were determined at which the CO_2 forms inclusion complexes with the aromatic oil of lemon grass (*Cymbopogon Citratus*) and the β -CD. The experimental design was the type 3^k , with $K=2$ and three levels of temperature and pressure: 313.15, 323.15 and 333.15K, and 172.32, 206.78 and 241.25 bar respectively. The inclusion complexes were characterized by GC-MS, IR and UV spectroscopy comparing the spectra of β -CD, aromatic oil and the β -CD-A.E. complex. Results indicate that the highest efficiency of encapsulation (48.9%) was obtained at 241.25 bar and 313.15 K.

Keywords: Encapsulation, Supercritical fluid, Lemon grass, Cyclodextrines, Supercritical carbon dioxide, Citral.

1. Introducción.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos producidos por la degradación enzimática del almidón mediante la acción de la glucosiltransferasa proveniente del *Bacillus macerans*. Los compuestos más comunes son las α , β y γ -CDs las cuales contienen 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas respectivamente, unidos por enlaces α -1, 4 glicosídicos. Sus estructuras presentan una forma de tipo toroidal que les confiere una cavidad apolar la cual es capaz de incluir o encapsular algunas moléculas orgánicas relativamente grandes mediante fuerzas de interacción no covalentes (enlaces de H, fuerzas de van der Waals).

Los complejos formados por las CDs y sus derivados pueden modificar favorablemente la estabilidad, la solubilidad y la biodisponibilidad del compuesto encapsulado. Las CDs pueden estabilizar materiales volátiles, evitando que los aromas se pierdan prematuramente como suele suceder en las etapas de procesamiento de los alimentos.

Los aceites esenciales (A.E.) pueden definirse como mezclas de compuestos orgánicos volátiles los cuales producen el aroma de muchas de las sustancias vegetales. Ellos son utilizados en diversas industrias ya sea la industria alimenticia, la cosmética y la farmacéutica. En el caso del aceite esencial del limoncillo (*Cymbopogon citratus*) se sabe que es de coloración amarilla y contiene los siguientes compuestos: citral (65-70%), acetato de geranilo (3.0%), geraniol (1.8%), metil heptanona (2.6%) y mirceno (12.7%) así como también citronelal, neral y algunas trazas de livalol y dipenteno.

Recientemente, el CO_2 -SC ha sido utilizado exitosamente para la preparación de complejos de inclusión con CDs (Van Hess, 2002a; Van Hess, 2002b). Entre las ventajas del proceso se tiene que el CO_2 -SC es ecológicamente compatible, se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar y las bajas temperaturas utilizadas para el encapsulamiento no cambian químicamente los componentes de las esencias. Por otra parte, contrario a lo que sucede con los métodos

convencionales de inclusión, este método evita la evaporación de grandes volúmenes de solvente en sistemas de multietapas que consumen además gran cantidad de tiempo (Reverchon, 1994).

En virtud de las anteriores consideraciones, el presente trabajo tuvo como propósito fundamental, encapsular citral, principal componente de los aceites esenciales de limoncillo en CDs utilizando CO_2 -SC como sistema de inclusión – con un posterior análisis comparativo de los espectros UV, I.R, y GC-MS para caracterizar el grado de encapsulamiento obtenido.

2. Experimentos

2.1 Materiales

La β -CD (CAVAMAX® 7Pharma) adquirida en Merck se utilizó sin ningún tratamiento previo; el CO_2 (pureza de 97%) lo suministró la empresa AGA-FANO, Cali-Colombia; el aceite esencial (citral concentrado) se adquirió en la empresa Nutre-Aromas, Cali-Colombia.

2.2 Equipos

Los experimentos de inclusión con CO_2 se realizaron en un equipo de extracción con fluidos supercríticos elaborado en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad del Valle, Cali-Colombia según se muestra en la Figura 1 (Vilegas, 1994).

Para la identificación de los complejos de inclusión se emplearon las técnicas instrumentales de análisis: Espectroscopia de Ultra Violeta (UV) y de Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas (Ge-MS). Dichos análisis se realizaron utilizando un equipo marca Shimadzu modelo 1700 con detector UV-Vis; para la espectroscopia I.R se utilizó un equipo FTIR-Shimadzu modelo 8400. El análisis de cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas se realizó en el equipo GC-MS 2010 Shimadzu, todos pertenecientes al Departamento de Química de la Universidad del Valle.

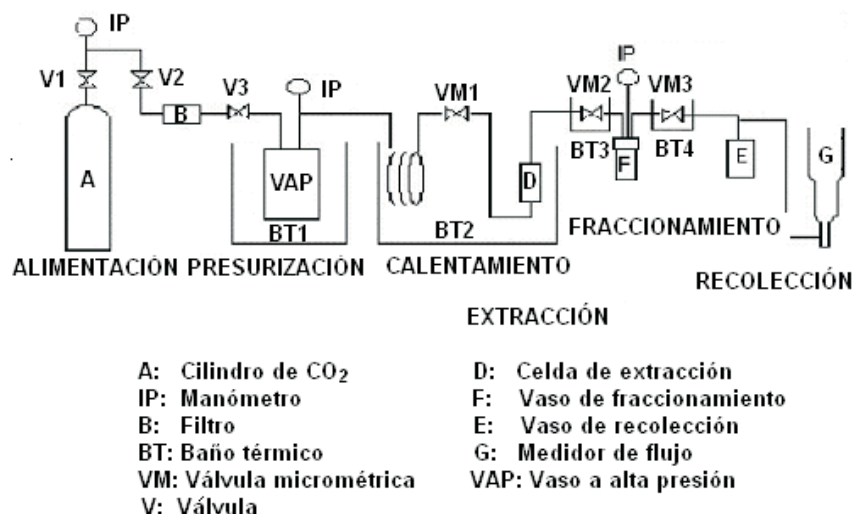


Figura 1. Diagrama del equipo de extracción con fluidos supercríticos.

3. Metodología

3.1 Preparación de los complejos de inclusión

Los experimentos para elaborar los complejos de inclusión con CO₂-SC se realizaron en el equipo de fluidos supercríticos descrito anteriormente. Dichos experimentos constaron de 4 etapas diferentes: alimentación del CO₂, presurización, calentamiento, encapsulamiento y despresurización.

El proceso de encapsulamiento propiamente dicho se llevó a cabo introduciendo en el vial de reacción una mezcla con una relación molar 1:1 de β-CD: A.E (cital concentrado, principal componente). El contenido se presurizó durante un minuto con las presiones y temperaturas de ensayo permitiendo que el CO₂-SC penetrara en el vial de reacción de la mezcla y se mantuviera en un modo estático durante 120 minutos. Al final del experimento, el vial de reacción se despresurizó lentamente (aproximadamente durante 15 segundos). El contenido del vial se depositó en viales refrigerados y posteriormente se sometió a pruebas espectroscópicas de análisis (UV-vis e IR) y espectrométricas (GC-MS) para detectar encapsulamiento cualitativo y determinar el porcentaje de rendimiento a las diferentes condiciones de temperatura y presión sugeridas.

3.2 Identificación de complejos de inclusión

Utilizando estándares de cital (principal componente del A.E. del limoncillo) y de β-CD, sin formar complejos y con el producto obtenido de la inclusión, se compararon los respectivos espectros, a fin de obtener una caracterización de tipo cualitativo que fuese altamente confiable.

En el análisis estadístico y la realización de los gráficos de respuesta se utilizó el paquete estadístico SPSS®

4. Resultados

4.1 Determinación del rendimiento de la inclusión y su dependencia con la presión y la temperatura

Con el propósito de observar la influencia de la presión y la temperatura supercríticas sobre el rendimiento o eficiencia en el proceso de encapsulamiento, se planteó un diseño experimental del tipo 3² con dos factores (presión y temperatura) y tres niveles en cada factor. Para la presión se fijaron niveles de 175.32 bar (2500 psi), 206.79 bar (3000 psi) y 241.2 bar (3500 psi). Igual procedimiento se empleó para la

temperatura: 313.15 K (40°C), 323.15 K (50°C) y 333.15 K (60°C), respectivamente. El tiempo de contacto de la mezcla (A.E + β-CD) con el CO₂ supercrítico fue de 2 horas y la relación molar de A.E: β-CD fue de 1:1.

La eficiencia o rendimiento definida como la cantidad de aceite encapsulado sobre la cantidad total de A.E se determinó por espectrofotometría de UV, de acuerdo con la ecuación:

$$Eficiencia, \% = \frac{Cantidad\ A.E\ encapsulado}{Cantidad\ Total\ de\ A.E} 10^2$$

La Tabla 1 muestra los resultados de porcentaje de eficiencia obtenidos a tres temperaturas y tres presiones diferentes. Dicha tabla muestra que la eficiencia de encapsulamiento, aumenta a medida que la temperatura disminuye: 30.9% a 60°C, 38.7% a 50°C, 48.9% a 40°C con una presión constante de 241.25 bar; cuando la presión es de 206.786 bar el porcentaje de eficiencia promedio va desde 31.2% a 60°C, 33.8% a 50°C y de 35.7% a 40°C, es decir, disminuye a medida que la temperatura aumenta; este comportamiento no sucede cuando se emplea una presión de 173.21 bar ya que a 60°C el porcentaje de eficiencia es de 32.6%, a 50°C es de 30.5%, a 40°C la eficiencia fue de 23.1%. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que cambios en la presión combinados con cambios en temperatura tienen dos efectos: Altas presiones (241.25 bar) y altas temperaturas (60°C) disminuyen la densidad del CO₂-SC afectando de igual manera el poder de solubilizar el compuesto a encapsular (citral); cuando se disminuye la presión (172.321 bar) y se

aumenta la temperatura (60°C) se aumenta la tensión de vapor del citral mejorando su solubilidad en el CO₂-SC. A pesar de esto, las evidencias indican que las condiciones óptimas de encapsulamiento están a presión de 241.25 bar y temperatura de 40°C cuando el tiempo de contacto fue de dos horas. Este comportamiento está en concordancia con algunos reportes de procesos similares (Kotnik et al., 2007) en los cuales se han reportado valores de encapsulamiento óptimos de β-CD con fungicidas a P= 200 bar y T= 65°C (Lai et al., 2003).

4.2 Análisis de varianza

Para determinar la influencia de la presión y la temperatura sobre la eficiencia se realizó un análisis de varianza. Como se sabe una variable es más significativa si el valor p es cercano a cero. En el caso de la eficiencia se observa que la presión e interacción temperatura-presión (T*P) son influyentes a diferencia de la temperatura, tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Anova-Eficiencia

Fuente	p-Valor
Temperatura (T)	0.437*
Presión (P)	0.028 ^a
T*P	0.077 ^b

* No significativo, ^a Significativo al 95%, ^b Significativo al 90%

Una mejor manera de analizar el comportamiento seguido en el encapsulamiento del citral en β-CD se puede apreciar en la Figura 2 correspondiente a la superficie de respuesta del modelo de eficiencia. Se observa en ella que el factor más

Tabla 1. Datos experimentales

Presión (bar)	Temperatura (K)	Eficiencia Promedio (%)	Densidad (g/ml)
241.25	313.15	48.9	0.87342
241.25	323.15	38.7	0.82678
241.25	333.15	30.9	0.77750
206.79	313.15	35.7	0.84604
206.79	323.15	33.8	0.79238
206.79	333.15	31.2	0.73420
172.32	313.15	23.1	0.81073
172.32	323.15	30.5	0.74493
172.32	333.15	32.6	0.67030

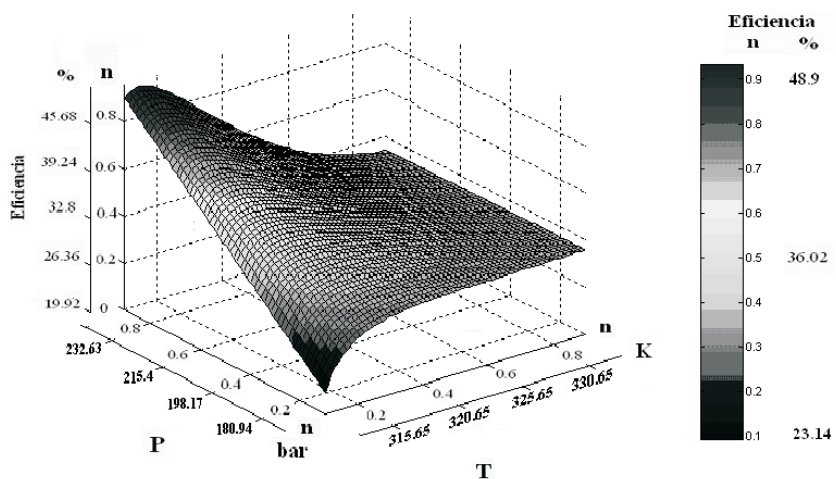


Figura 2. Superficie de respuesta del modelo de eficiencia.

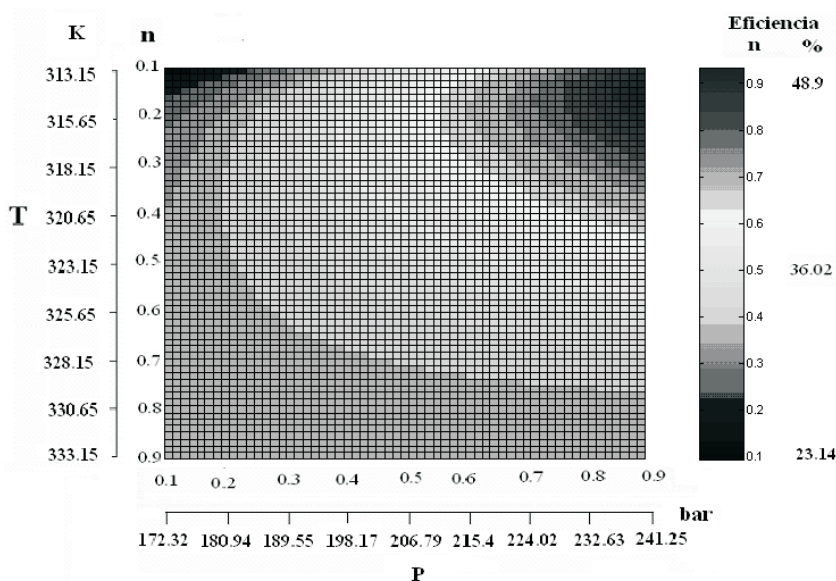


Figura 3. Curva de nivel del modelo de eficiencia (vista superior).

influyente en el proceso es la presión puesto que pequeños cambios en esta variable generan grandes incrementos de eficiencia como variable de respuesta, lo cual no sucede con la temperatura debido a que al incrementar la temperatura la eficiencia no aumenta y tiende a permanecer constante.

La Figura 3 correspondiente a la curva de nivel del modelo de eficiencia, permite definir un rango mas preciso de las condiciones óptimas de encapsulamiento; la eficiencia más alta (48.9%) se

obtuvo a altas presiones (241.25 bar) y bajas temperaturas (313.15K) dentro del rango de trabajo.

En la Figura 4 correspondiente al análisis de interacción con prueba de Tukey se evidencia la combinación de presión y temperatura, la cual es la combinación que marca la diferencia al 95%. Se observa que la eficiencia de encapsulamiento (48.9%) se alcanzó con la combinación de presión y temperatura que es significativamente diferente a las demás combinaciones.

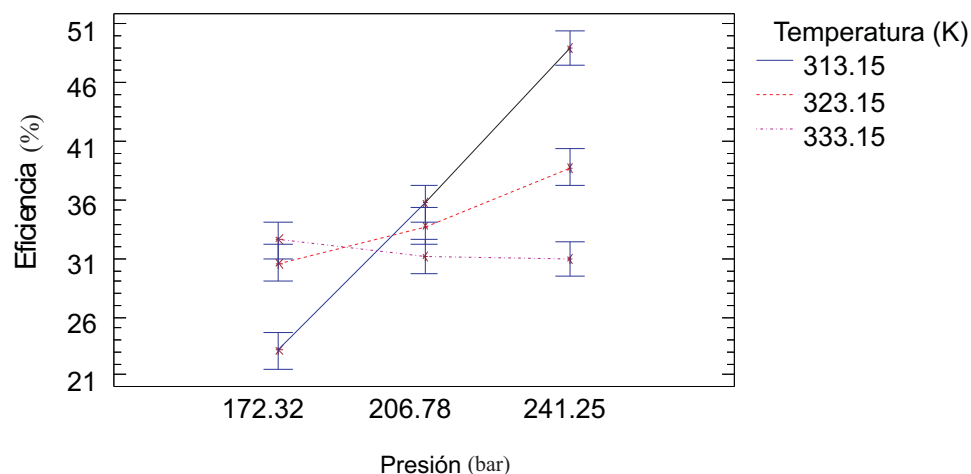


Figura 4. Análisis de interacción con prueba de Tukey

4.3 Caracterización por UV-Vis, I.R. y GC-MS

Una vez discutidas las condiciones óptimas de encapsulamiento se procedió a realizar la caracterización. En la Figura 5 se presenta el espectro UV-Vis del estándar de la ciclodextrina libre, en donde se observa ninguna banda o pico de absorción lo cual está en concordancia con la estructura química del mencionado compuesto. La Figura 6, corresponde al espectro UV-Vis del estándar de citral, principal componente del A.E. de limoncillo, se observa claramente una banda de absorción a 231 nm característica de dicho compuesto.

La Figura 7 muestra el resultado obtenido al realizar el proceso de inclusión y posterior detección espectrofotométrica en la región UV. Se puede apreciar una banda de absorción a 241 nm. El desplazamiento de esta señal de 231 a 241 nm se debe al desplazamiento batocrómico por efecto del solvente y de la interacción de los compuestos presentes en el proceso de inclusión. Como puede observarse, una vez que el citral se encapsuló su solubilidad en agua aumentó notablemente.

En la Figura 8 se observa el espectro de masas estándar del citral donde aparecen los patrones de fragmentación característicos de dicho

compuesto, los cuales proporcionan valiosa información estructural, observándose el ion molecular (M^+) a 69 de relación m/z con abundancia relativa de 100% y el ion molecular (M^+) a 41 de relación m/z con abundancia relativa de 78% aproximadamente, entre los de mayor abundancia relativa. Con mucha menor abundancia relativa aparecen patrones de fragmentación a m/z: 29, 41, 43, 95 y 123. De estos fragmentos el más significativo es el m/z = 43, correspondiente al grupo aldehído que sufre la ruptura alfa la cual ocurre primordialmente en el lado más sustituido del grupo carbonilo, produciendo un fragmento $(CH_3CO)^+$ con m/z = 43, característico de los aldehídos.

En la Figura 9 correspondiente al complejo β -CD: citral se puede observar claramente los patrones de fragmentación del citral estándar exactamente iguales a los obtenidos en la Figura 6, con la diferencia que aparece un pico de fragmentación a m/z = 18 con abundancia relativa del 30%. Este pico corresponde a la fragmentación de la β -CD, la cual al estar integrada por 7 moléculas de glucosa unidas en enlaces glicosídicos contiene alrededor de 35 grupos -OH libres que pueden haber generado este ion molecular de $H-O^+-H$, lo cual confirma que el proceso de inclusión se llevó a cabo eficientemente.

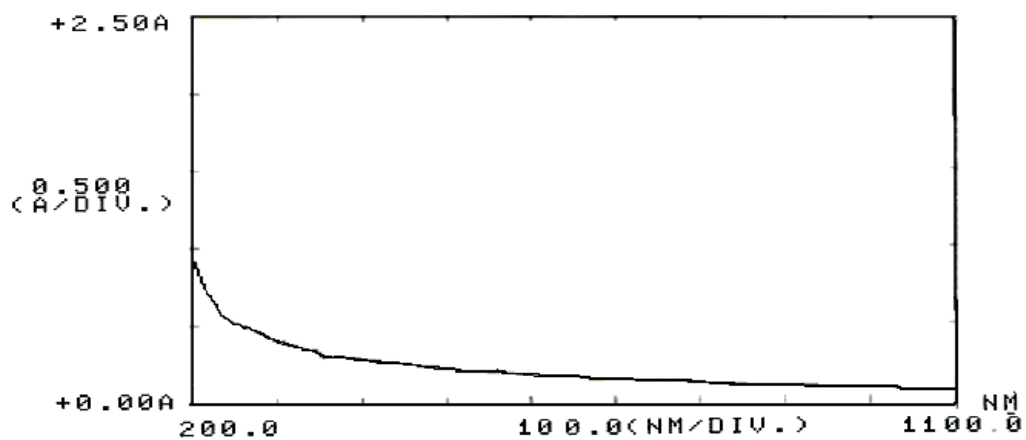


Figura 5. Espectro UV de β -ciclodextrina libre.

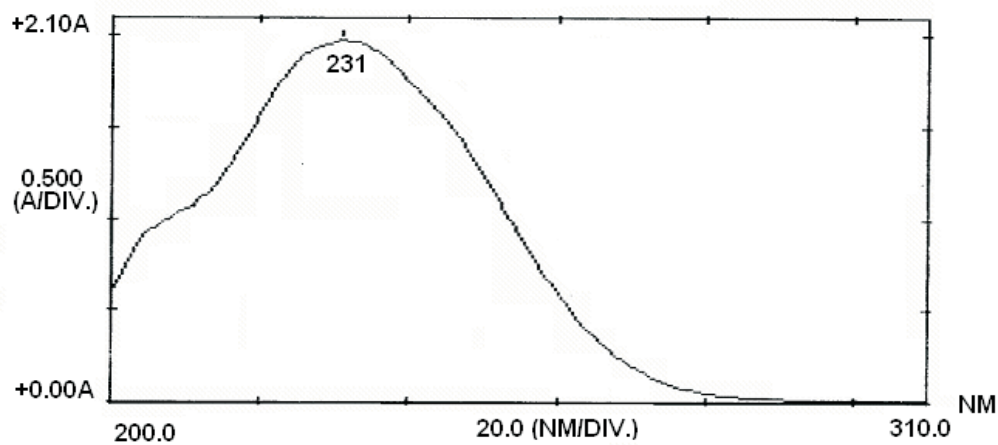


Figura 6. Espectro UV del aceite esencial en alcohol.

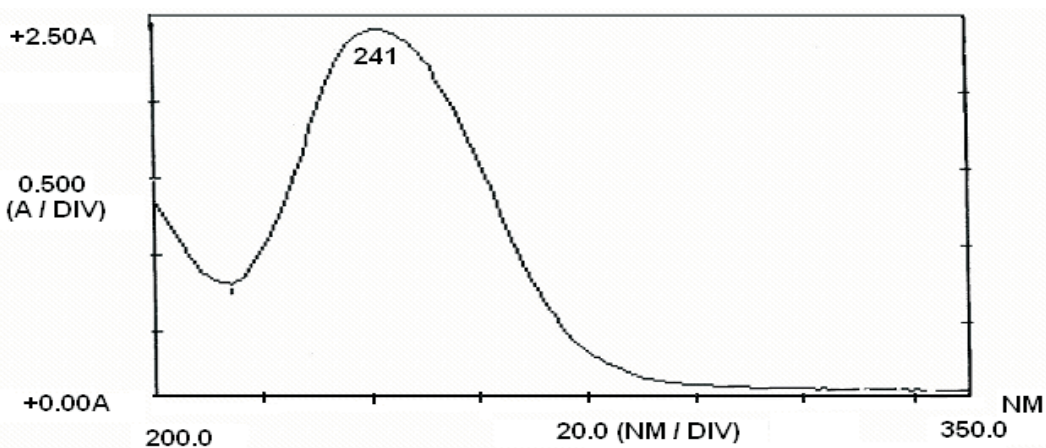


Figura 7. Espectro UV del complejo de inclusión en agua.

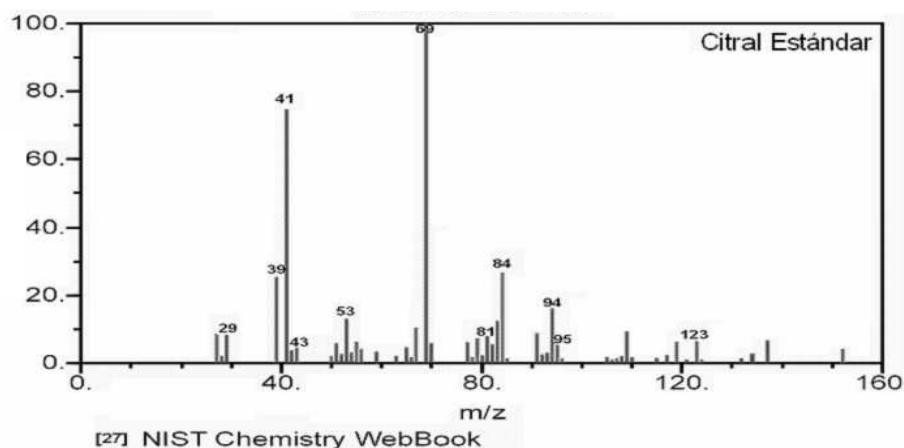


Figura 8. Espectro de masas del citral estándar

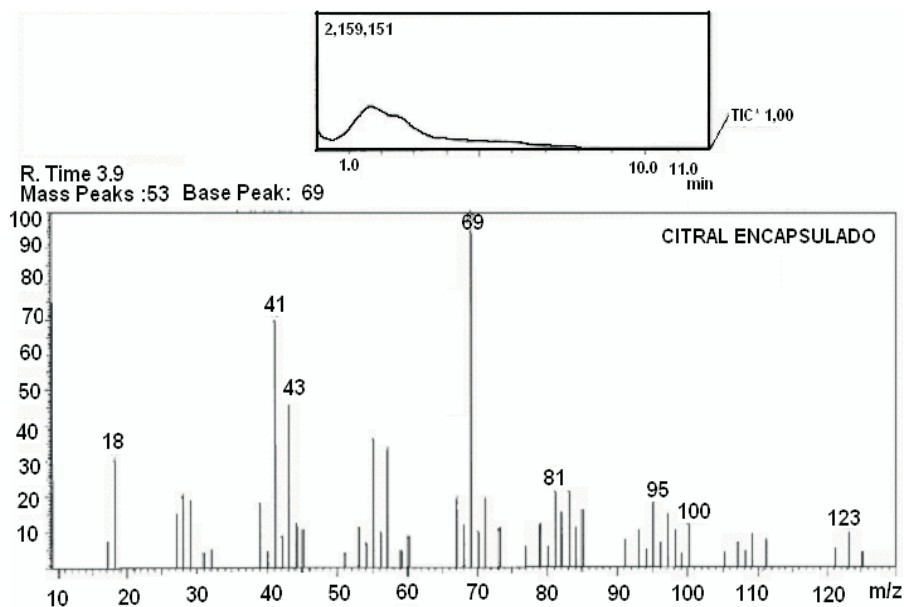


Figura 9. Espectro de masas del citral encapsulado.

En la Tabla 3 se visualizan comparativamente los patrones de fragmentación de citral obtenidos mediante el método de espectrometría de masas tanto del citral estándar como del complejo de inclusión. Se puede apreciar la similitud de los patrones de fragmentación espectral con la única diferencia en el pico de $m/z = 18$ cuyo origen se ha explicado anteriormente.








En la Figura 10 se muestra el espectro I.R del aceite esencial, en la Figura 11, el espectro I.R de la β -ciclodextrina y en la Figura 12 el espectro I.R del complejo de inclusión. En este último, los cambios, desapariciones o atenuaciones de las bandas características del aceite esencial revelan que ocurrió una modificación en su entorno. Por ejemplo, la banda a 1675.06 cm^{-1} del aceite

esencial no se detectó en el complejo y la banda de 665.39 cm^{-1} cambió a 668.29 cm^{-1} . En cuanto a la β -ciclodextrina, la banda 3362.66 cm^{-1} (alargamiento O-H) cambió a 3377.12 cm^{-1} , se conservaron iguales las bandas a 2922.92, 1157.21, 1028.95 y 939.26 cm^{-1} y desaparecieron las de 1649.03 y 1416.62 cm^{-1} . Desapareció totalmente la banda del aceite esencial a 2919.06 cm^{-1} , la cual pudo estar ocultada por alguna de las bandas pertenecientes a la β -ciclodextrina. Todos estos cambios están relacionados probablemente con la interacción y formación de enlaces intermoleculares entre los compuestos huésped y la β -ciclodextrina.

En este caso fue posible detectar el complejo mediante espectroscopia de Infrarrojo, sin embargo, se prefirió de los dos, el análisis por espectrofotometría UV por ser más sencillo, de fácil inspección y por permitir la determinación cuantitativa de la cantidad de aceite encapsulado.

De las técnicas espectroscópicas de análisis llevadas a cabo se puede afirmar que la espectrometría de masas es la que brinda una visión más contundente del proceso de inclusión, a pesar de que las otras (UV-Vis e IR) constituyen una herramienta importante y útil en el estudio del mencionado proceso.

Tabla 3. Análisis de los fragmentos obtenidos por GC-MS

u.m	Fragmento	Citral Estándar	Encapsulado
18		—	✓
29		✓	✓
41		✓	✓
43		✓	✓
69		✓	✓
95		✓	✓
123		✓	✓

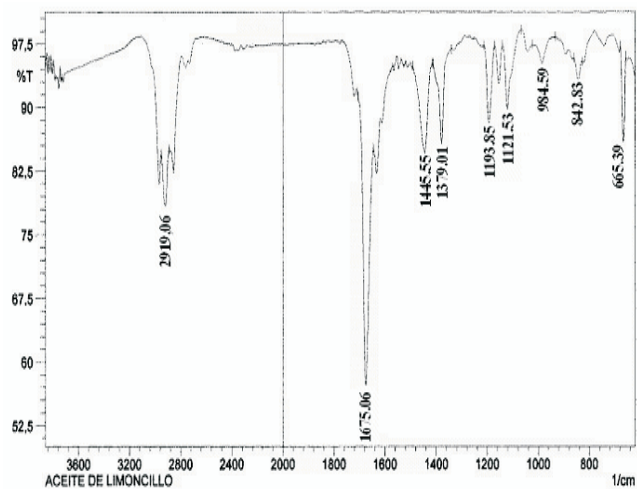


Figura 10. Espectro IR de Aceite esencial comercial

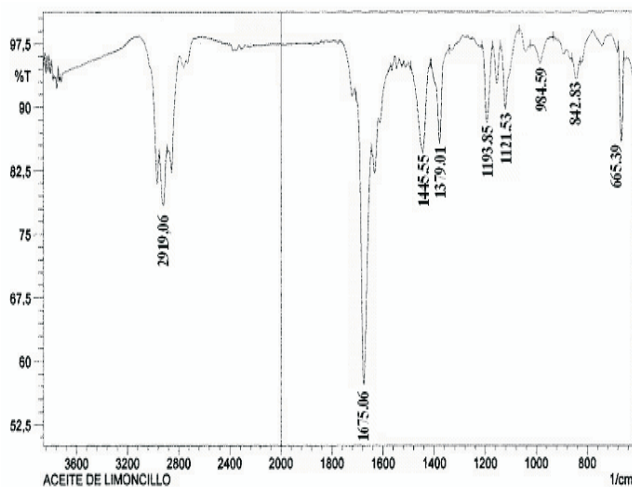


Figura 11. Espectro IR -ciclodextrina

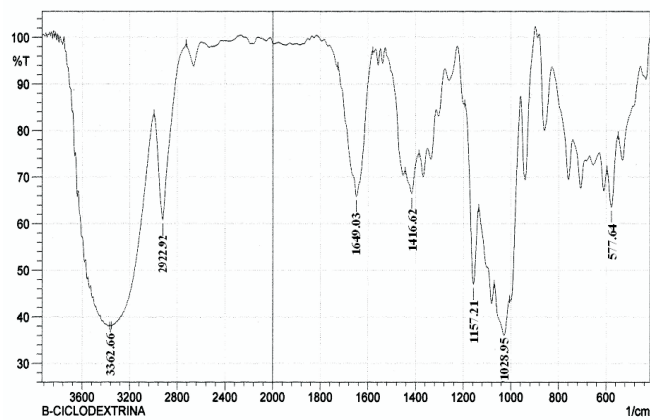


Figura 12. Espectro IR del complejo de inclusión.

5. Conclusiones

Los experimentos realizados permiten confirmar la habilidad del CO₂-SC de promover la formación de complejos de inclusión de β -CD: citral, principal componente del aceite esencial del limoncillo.

El método de análisis cualitativo de GC-MS resultó ser el más eficaz para cualificar dicho encapsulamiento debido a su alta sensibilidad, precisión y rapidez.

Las condiciones de presión y temperatura utilizadas generan un rango de rendimiento que puede mejorarse si se aumenta el tiempo de contacto de la mezcla desde 2 horas a 4 horas.

6. Referencias bibliográficas

Kotnik, P., Skerget, M., & Knez, A. (2007). Supercritical fluid extraction of Chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. I. *The Journal of Supercritical Fluids* 43(2), 192-198.

Lai, S., Locci, E., Piras, A., Proceda, S., Lai, A. & Marongiu, B. (2003). Imazalil-cyclomaltoheptaose (β -ciclodextrin) inclusion complex: preparation by supercritical carbon dioxide and ¹³C CPMAS and ¹H NMR characterization. *Carbohydrate Research* 338(21), 2227-2232.

Reverchon, F. & Senatore, G. (1994). Supercritical carbon dioxide extractions of Chamomile essential oils and its analysis by GC-MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42(1), 154-158.

Van Hess, T., Barrillaro V., Piel, G., Bertholet P., De Hassonville S., Evrard, B., & Delattre, L. (2002a). Application of Supercritical Carbon Dioxide for the Preparation of Drug-Cyclodextrin Inclusion Compounds. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 44(1-4), 271-274.

Van Hess, T., Piel, G., Henry de Hassonville, S., Evrard, B., & Delattre, L. (2002b). Determination of the free/included piroxicam ratio in cyclodextrin complexes: comparison between UV spectrophotometry and differential scanning calorimetry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15 (15), 347-353.

Vilegas, J., Lancas, F. M., & Vilegas, W. (1994). Application of a home-made supercritical fluid extraction system to the study of essentials oils. *Flavour and Fragrance Journal* 9(1), 39-43.