

Marcia Margarete Meier

**ESTUDO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE
 β - E γ -CICLODEXTRINA COM OS ÁCIDOS GRAXOS
CÁPRICO E CAPRÍLICO**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Departamento de Química

Orientador: Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Marilde T. B. Luiz

Florianópolis

2000

MARCIA MARGARETE MEIER

**ESTUDO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE β - E γ -
CICLODEXTRINA COM OS ÁCIDOS GRAXOS CÁPRICO E
CAPRÍLICO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada pelos professores:


Prof. Dr. Bruno Szpoganicz
Depto. de Química
Orientador

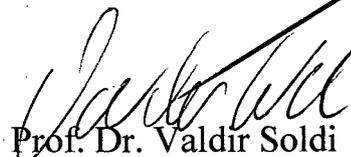

Prof.^a Dra. Marilde T. B. Luiz
Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Co-Orientadora


Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Eduardo R. Carasek
Depto. de Química


Prof. Dr. Ricardo J. Nunes
Depto. de Química


Prof. Dr. Valdir Soldi
Depto. de Química

*Aos meus pais Célia e Irineu,
ao meu marido Ricardo
que souberam compreender os
momentos de ausência.
E a Deus, que sempre esteve presente.*

Agradecimentos

- Ao professor Bruno Szpoganicz pela possibilidade de desenvolver este trabalho, pela sua paciência, dedicação, amizade e constante bom humor.
- À professora Marilde T. B. Luiz, pela amizade e sugestões dadas durante o desenvolvimento do trabalho.
- Ao professor Valdir Soldi pela amizade e fundamental contribuição nos estudos de análise térmica.
- À Marly, pela amizade e constante disposição em ajudar a resolver as dificuldades relacionadas as análises térmicas.
- Aos professores e demais funcionários do Departamento de Química e Departamento de Ciência dos Alimentos que, de alguma forma, colaboraram para o êxito deste trabalho.
- À Cerestar pela doação das ciclodextrinas.
- Ao CNPq e a UFSC pelo apoio financeiro.
- Aos amigos e colegas: Adriana, Patrícia, Cristian, Jerusa, Marcelo, Vera, Ângelo, Gledir e Clayton, que contribuíram com este trabalho, cada uma de sua forma muito particular.
- Às amigas, Fabíola (Bila) e Janaína (Jana), pela paciência em me ouvir e ajudar nos momentos de dificuldades e em sorrir comigo nos momentos de vitória.
- A minha família, principalmente meu marido Ricardo, pelo amor e compreensão.
- À Deus, por mostrar o caminho certo a ser seguido.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ciclodextrinas.....	1
1.2 Caracterização dos complexos de inclusão.....	5
1.2.1 Estado Sólido.....	5
1.2.2 Em solução.....	7
1.3 Aplicações das ciclodextrinas.....	12
1.4 Objetivos.....	15
CAPÍTULO II.....	16
PARTE EXPERIMENTAL.....	16
2.1 Material.....	16
2.2 Métodos.....	16
2.2.1 Preparação dos complexos de inclusão.....	16
2.2.2 Análise térmica.....	16
2.2.3 Cinética de decomposição térmica.....	17
2.2.4 Análise de RMN ¹ H.....	17
2.2.5 Determinação das constantes de associação.....	18
2.2.5.1 Determinação da constante de associação ciclodextrina-fenolftaleína.....	18
2.2.5.2 Determinação da constante de associação ciclodextrina-ácido graxo.....	20
2.2.6 Análise cromatográfica do leite de cabra em pó puro e com adição de β CD.....	22
CAPÍTULO III.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1 Obtenção dos complexos de inclusão.....	25
3.2 Análise térmica dos complexos de inclusão.....	25
3.2.1 Análise por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC).....	25

3.2.1.1	Correlação dos resultados de DSC	31
3.2.2	Análise Termogravimétrica (TGA).....	31
3.2.2.1	Decomposição térmica dos compostos puros.....	32
3.2.2.2	Decomposição térmica dos complexos de inclusão	34
3.2.2.3	Correlação dos resultados de Análise Termogravimétrica.....	41
3.3	Avaliação da influência da β CD no processo de secagem do leite de cabra em pó por <i>spray dryer</i>	42
3.3.1	Energia envolvida no processo de decomposição de β CD	47
3.4	Caracterização por RMN ¹ H	48
3.4.1	Sistema com β -CD	49
3.4.2	Sistema com γ -CD.....	53
3.4.3	Correlação dos resultados de RMN ¹ H	53
3.5	Determinação das constantes de associação.....	54
3.5.1	Sistema β -CD/fenolftaleína e γ -CD/fenolftaleína	54
3.5.2	Associação entre β CD, γ CD com os ácidos C ₁₀ e C ₈	56
3.5.3	Correlação dos resultados.....	60
CAPÍTULO IV		62
CONCLUSÕES		62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		64

Lista de Símbolos e Abreviaturas

A	ácido graxo de cadeia curta
AGL	ácido graxo livre
A_i	absorvância inicial
A_m	absorvância medida
A_t	concentração total de ácido
α CD	alfa-ciclodextrina
β CD	beta-ciclodextrina
β CD- C_{10}	complexo de inclusão formado entre β CD e o ácido C_{10}
β CD- C_8	complexo de inclusão formado entre β CD e o ácido C_8
C_{10}	ácido cáprico (ácido decanóico)
C_8	ácido caprílico (ácido octanóico)
CD	ciclodextrina
CDA	complexo de inclusão entre ciclodextrina-ácido graxo de cadeia curta
[CDF]	concentração do complexo ciclodextrina-fenolftaleína
CD_t	concentração total de ciclodextrina
$CHCl_3$	clorofórmio
DCl	ácido clorídrico deuterado
D_2O	água deuterada
DSC	calorimetria de varredura diferencial
DTG	derivada da análise termogravimétrica
$DTG_{m\acute{a}x}$	pico obtido pela DTG
E	energia de ativação
ϵ_F	absortividade molar da fenolftaleína
ϵ_{CDF}	absortividade molar do complexo ciclodextrina-fenolftaleína
F_t	concentração total de fenolftaleína
[F]	concentração de fenolftaleína em equilíbrio
γ CD- C_{10}	complexo de inclusão formado entre γ CD e o ácido C_{10}
γ CD- C_8	complexo de inclusão formado entre γ CD e o ácido C_8
γ CD	gama-ciclodextrina

IV	Infravermelho
KOD	hidróxido de potássio deuterado
KOH	hidróxido de potássio
K_{CDA}	constante de associação entre ciclodextrina-ácido graxo de cadeia curta
K_{CDF}	constante de associação entre ciclodextrina-fenolftaleína
Lit	literatura
$NaHCO_3$	bicarbonato de sódio
pD	log da concentração de deutério
R	constante dos gases
T	temperatura
RMN	Ressonância Nuclear Magnética
TGA	análise termogravimétrica
TMS	Tetrametil silano
UV-vis	espectroscopia no ultravioleta-visível

Lista de Figuras

- 1 Estrutura genérica da ciclodextrina com a numeração adotada para identificação de sua estrutura (a), estrutura da β CD (b) e dimensões moleculares de α , β e γ CD (c)..... 1
- 2 Representação esquemática da formação de complexo de inclusão com ciclodextrina. p-Xileno é a molécula hóspede e os pequenos círculos representam moléculas de água, como descrito por Szejtli (1998). 3
- 3 Estrutura genérica de ciclodextrina modificada, n representa o número de repetição das unidades de glicose. 4
- 4 Estrutura proposta para o complexo de inclusão entre glisentida e β CD, como descrito por Zornoza et al. (1998).....
- 5 Modos de interação entre ciclodextrina-hóspede, quando há diferença na profundidade da inclusão, como descrito por Scheneider et al. (1998)..... 9
- 6 Espectro de RMN¹H do complexo de inclusão com α CD-p-nitrofenolato (a) e da α CD (b), pD 11 em D₂O como descrito por Bergeron, 1984..... 9
- 7 Ilustração do equilíbrio estabelecido no método de espectroscopia competitiva..... 10
- 8 Curvas de DSC dos componentes puros γ CD, β CD, C₁₀ e C₈. Velocidade de varredura = 10°C/min, em N₂. 26
- 9 Curvas de DSC obtidas a partir do sistema β CD-C₁₀ em diferentes proporções: A)1:0,57 B)1:0,91 C)1:1 D) 1:1,14. Velocidade de varredura = 10°C/min, em N₂... 26
- 10 Curvas de DSC obtidas a partir do sistema β CD-C₈ em diferentes proporções: A) 1:0,8 B) 1:1 C) 1:1,2 D)1:1,5 e E) 1:1,7. Velocidade de varredura = 10°C/min, em N₂. 27
- 11 Curvas de DSC obtidas a partir do sistema γ CD-C₁₀ em diferentes proporções: A)1:1 B) 1:1,3 C)1:1,5 D)1:1,8. Velocidade de varredura = 10°C/min, em N₂..... 27
- 12 Curvas de DSC obtidas a partir do sistema γ CD-C₈ em diferentes proporções: A)1:1 B) 1:1,5 C) 1:2 D)1:2,3. Velocidade de varredura = 10°C/min, em N₂..... 28
- 13 Termograma de β CD (A) e γ CD (B). TGA = curva obtida por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TGA. Taxa de aquecimento 10°C/min..... 33

- 14 TGA obtido a partir da amostra β CD-C₁₀ (1:1), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG..... 35
- 15 TGA obtido a partir da amostra β CD-C₈ (1:1,5), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG..... 35
- 16 TGA obtido a partir da amostra γ CD-C₁₀ (1:1,5), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG..... 36
- 17 TGA obtido a partir da amostra γ CD-C₈ (1:2), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG..... 36
- 18 Sobreposição de espectros de IV para amostra β CD-C₁₀ (1:1) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr. O primeiro espectro (de baixo para cima) refere-se a β CD pura, a seguir espectros do complexo de inclusão submetido a diferentes temperaturas. 37
- 19 Sobreposição de espectros de IV para amostra β CD-C₈ (1:1,5) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr..... 39
- 20 Sobreposição de espectros de IV para amostra γ CD-C₁₀ (1:1,5) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr. O primeiro espectro (de baixo para cima) refere-se a γ CD pura, a seguir espectros do complexo de inclusão submetido a diferentes temperaturas..... 40
- 21 Sobreposição de espectros de IV para amostra γ CD-C₈ (1:2) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr. 41
- 22 TGA obtido a partir da amostra de leite de cabra seco por *spray dryer*, com taxa de aquecimento 10°C/min, TGA = análise termogravimétrica, dTG = derivada da TGA..... 43
- 23 Termograma de C₈ (A) e C₁₀ (B). TGA = curva obtida por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TGA. Taxa de aquecimento 10°C/min. 44
- 24 Sobreposição dos cromatogramas da amostra padrão contendo os ácidos C₁₀ e C₈ (Padrão) e do extrato de AGL obtido a partir da amostra de leite de cabra em pó adicionada de β CD (A)..... 45
- 25 Sobreposição de cromatogramas da amostra padrão contendo os ácidos C₁₀ e C₈ (Padrão) e do extrato de AGL obtido a partir da amostra de leite de cabra em pó

(B)	46
26 Variação da energia envolvida no processo de decomposição térmica de β CD no sistema da β CD pura (-●-) e β CDC ₁₀ (-■-). Obtido através da aplicação do método de Ozawa nas curvas de TGA para temperaturas acima de 320°C.....	48
27 Estrutura esquemática de um ácido carboxílico linear e identificação dos prótons, onde n representa o número de grupos metilênicos.	49
28 Espectro de RMN ¹ H de β -CD pura em D ₂ O, TMS como referência.....	51
29 Espectro de RMN ¹ H de β -CD-C ₁₀ em D ₂ O, TMS como referência, pD=10,4.....	52
30 Variação do deslocamento químico dos prótons de β -CD em função de diferentes quantidades de C ₁₀	53
31 Sobreposição de espectros de UV-Vis para o sistema β CD/Fenolftaleína, solução tampão pH 10,5 (NaHCO ₃ /NaOH), 2 % de etanol. De cima para baixo [β CD]: 0, 2 x 10 ⁻⁵ , 4 x 10 ⁻⁵ , 6 x 10 ⁻⁵ , 8 x 10 ⁻⁵ , 10 x 10 ⁻⁵ , 12,5 x 10 ⁻⁵ , 15 x 10 ⁻⁵ , 20 x 10 ⁻⁵ M.....	55
32 Sobreposição de espectros de UV-Vis para o sistema β CD-C ₁₀ , obtido pelo método competitivo com fenolftaleína ([F] = 4 x 10 ⁻⁵ M, [β CD] = 1x10 ⁻³ M). Solução tampão pH 10,5 (NaHCO ₃ /NaOH), 2 % de etanol. As curvas referem-se a soluções de β CD-F com diferentes concentrações de C ₁₀ : 0, 4 x 10 ⁻⁴ M – 8 x 10 ⁻³ M (de baixo para cima).	57
33 Gráfico obtido a partir dos dados do sistema β CD-C ₁₀ , pelo método espectrofotométrico competitivo com fenolftaleína (aplicação da equação 17). Solução tampão pH 10,5 (NaHCO ₃ /NaOH), 2 % de etanol, [F] = 4 x 10 ⁻⁵ M, [β -CD] = 1 x 10 ⁻³ M.	58
34 Gráfico obtido a partir dos dados do sistema γ CD-C ₈ , pelo método espectrofotométrico competitivo com fenolftaleína. Solução tampão pH 10,5 (NaHCO ₃ /NaOH), 2 % de etanol.....	59

Lista de Tabelas

1	Características da α CD, β CD e γ CD.....	2
2	Resultados obtidos através de DSC para os sistemas com diferentes proporções de β CD- C_{10} e C_8 , γ CD- C_{10} e C_8 . Velocidade de varredura $10^\circ\text{C}/\text{min}$ em N_2 . Faixa de temperatura analisada: 10°C a 250°C , para C_8 e 20°C a 250°C , para C_{10}	30
3	Resumo da máxima encapsulação dos ácidos C_8 e C_{10} em β CD e γ CD.....	31
4	Resultados obtidos por TGA para os componentes puros. Taxa de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}$	32
5	Resultados obtidos por TGA a $10^\circ\text{C}/\text{min}$, para os complexos de inclusão β CD- C_{10} (1:1), β CD- C_8 (1:1,5), γ CD- C_{10} (1:1,5) e γ CD- C_8 (1:2).....	34
6	Correlação entre as decomposições térmicas dos ácidos C_{10} e C_8 encapsulados em β CD e γ CD, resultados obtidos por TGA, $10^\circ\text{C}/\text{min}$	42
7	Decomposição térmica do leite de cabra em pó, ácidos C_8 e C_{10} , puros. Taxa de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}$	44
8	Variação no deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{puro}} - \delta_{\text{complexo}}$) para diferentes complexos de inclusão entre β - e γ -CD com os ácidos C_8 e C_{10} . Em D_2O , $\text{pD} \geq 10,5$ com adição de KOD e TMS como referência. Os valores em parênteses referem-se a proporção molar de CD:ácido.....	49
9	Constantes de associação entre β -, γ -ciclodextrinas e fenolftaleína, a 25°C , solução tampão pH 10,5 ($\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$), 2 % de etanol, $[\text{F}] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$	56
10	Constante de associação (K_{CDA}) entre β CD/ C_{10} , γ CD- C_{10} , β CD/ C_8 , e γ CD- C_8 a 25°C , solução tampão pH 10,5 ($\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$), 2 % de etanol. $[\text{F}] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\beta\text{CD}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$	59

RESUMO

Neste trabalho estudou-se os complexos de inclusão entre os ácidos cáprico (decanóico), caprílico (octanóico) e β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina. Estes complexos foram caracterizados por DSC, TGA, RMN¹H e suas constantes de associação foram determinadas por espectroscopia de UV-visível competitiva. Os resultados de DSC mostram que ocorre formação dos seguintes complexos de inclusão: β CD-C₁₀ (com proporção molar 1:1), β CD-C₈ (1:1,5), γ CD-C₁₀ (1:1,5) e γ CD-C₈ (1:2). A quantidade de calor necessário para volatilização das moléculas de água nos complexos com β CD foi cerca de 52 cal/g e para os dois complexos com γ CD foi de 91 cal/g. O envolvimento da mesma quantidade de calor para os complexos β CD-C₁₀ e β CD-C₈ indica a volatilização de igual número de moléculas de água nesses complexos, assim como os dois complexos de γ CD também apresentam a mesma quantidade de calor. Entretanto, como a cavidade de γ CD é maior que β CD, seus complexos podem alojar mais moléculas de água coexistindo com o ácido em relação a ciclodextrina de menor cavidade. Isto justifica o envolvimento de uma quantidade de calor maior nestes complexos em relação aos complexos com β CD. Através dos TGA's verificou-se aumento na estabilidade térmica dos complexos de inclusão, principalmente quando os ácidos estão encapsulados em β CD. Cerca de 65% da massa de C₈ e C₁₀ permaneceu encapsulada na cavidade de β CD até 250°C. Estudos preliminares de cromatografia gasosa confirmam a decomposição parcial de C₈ em amostras de leite de cabra em pó sem β CD, concordando com resultados de análise térmica *in vitro* deste ácido. A caracterização dos complexos de inclusão por RMN¹H mostrou que no complexo β CD-C₁₀ (1:1), ocorre deslocamento químico significativo dos prótons da cavidade de β CD (H₃ e H₅). Isto comprova a formação do complexo e indica que a associação entre β CD e C₁₀ é mais forte que nos outros sistemas, pois estes apresentaram deslocamento químico bem menor nos sinais dos prótons H₃ e H₅. Verificou-se que quando o ácido está protonado, o deslocamento químico de H₃ e H₅ é maior em relação ao ácido desprotonado. Os valores das constantes de associação, obtidos pelo método competitivo para sistema 1:1, foram $K_{\beta\text{CDC}_{10}} = 2,6 \times 10^3$, $K_{\beta\text{CDC}_8} = 5,1 \times 10^2$, $K_{\gamma\text{CDC}_{10}} = 2,5 \times 10^2$ e $K_{\gamma\text{CDC}_8} = 4,7 \times 10^1$. Esses valores mostram que dois fatores principais influenciam no valor

da constante: 1) tamanho da cavidade e 2) tamanho da cadeia alquílica do ácido. Verificou-se que a cavidade maior, como γ CD, apresenta menor constante de associação com os ácidos C_{10} e C_8 em relação aos complexos com β CD. E, cadeias alquílicas mais longas associam-se mais fortemente que cadeias menores, devido a diferença em sua hidrofobicidade.

ABSTRACT

The inclusion complexes of capric acid (decanoic acid) and caprylic acid (octanoic acid) with β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin were characterized by DSC, TGA, ^1H NMR and their association constants were determined by competitive UV-vis spectroscopy. The results from DSC show the formation of the following inclusion complexes: $\beta\text{CD-C}_{10}$ (1:1 molar ratio), $\beta\text{CD-C}_8$ (1:1,5), $\gamma\text{CD-C}_{10}$ (1:1,5) e $\gamma\text{CD-C}_8$ (1:2). The necessary amount of heat for volatilization of water molecules from βCD complexes is about 52 cal/g, and for γCD complexes is 91 cal/g. The value of 52 cal/g for $\beta\text{CD-C}_{10}$ and $\beta\text{CD-C}_8$ complexes indicates a volatilization of the same number of water molecules from these complexes. The two γCD complexes also present the same amount of heat (91 cal/g). However, as the cavity of γCD is bigger than that of βCD , it can hold more water molecules in its complexes, justifying a bigger amount of heat involved in this process. An increase in the inclusion complexes stability was observed by TGA technique. About 65% of C_8 and C_{10} were kept inside the cavity of βCD until 250°C. Preliminary studies of gas chromatographic confirm the partial C_8 decomposition in spray dried goat milk samples without βCD . These results are supported by in vitro C_8 thermal analysis. The characterization of the inclusion complexes by ^1H NMR shows in the $\beta\text{CD-C}_{10}$ (1:1) complex a down field chemical shift of H_3 and H_5 protons in the cavity of βCD . A bigger chemical shift was observed when the acid was protonated than when it was not. The values of the association constants, determined by competitive method, for the systems 1:1 are $K_{\beta\text{CD}\text{C}_{10}} = 2,6 \times 10^3$, $K_{\beta\text{CD}\text{C}_8} = 5,1 \times 10^2$, $K_{\gamma\text{CD}\text{C}_{10}} = 2,5 \times 10^2$ and $K_{\gamma\text{CD}\text{C}_8} = 4,7 \times 10^1$. These values show that two major factors influence the constant values: 1) the size of the cavity and 2) the size of the alkyl chain of the acid. A bigger cavity as γCD , shows a smaller association constant with C_{10} and C_8 by comparison with βCD , whereas a longer alkyl chain (as C_{10}) has a stronger association constant, due its hydrophobicity.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Ciclodextrinas

Em 1891 Villiers isolou um grupo de oligossacarídeos não redutores a partir da ação do *Bacillus macerans* num meio rico em amilose. Alguns anos mais tarde Schardiger elucidou a estrutura destes compostos, mostrando que eram oligossacarídeos cíclicos contendo 6 a 12 unidades de glicose ligadas entre si por ligações α -1,4.¹ A Figura 1 mostra as dimensões das ciclodextrinas mais estudadas.

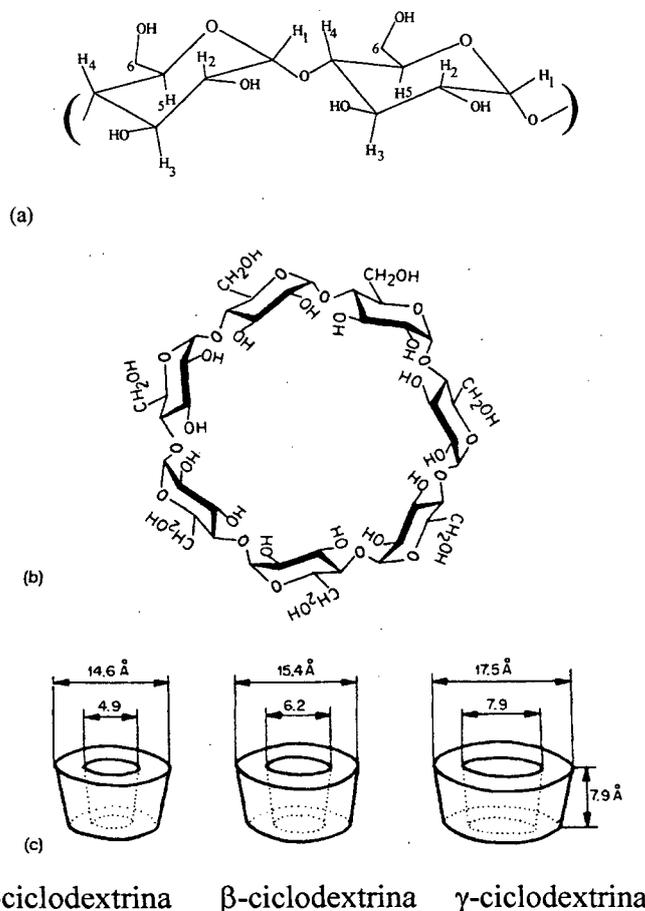


Figura 1: Estrutura genérica da ciclodextrina com a numeração adotada para identificação de sua estrutura (a), estrutura da β CD (b) e dimensões moleculares de α , β e γ CD (c). Como descrito por Szejtli (1988).

Como consequência da conformação do carbono anomérico (C_1) das unidades de glicopirranose, todos os grupos hidróxidos secundários estão voltados para um lado da cavidade, enquanto os grupos hidróxidos primários estão situados do lado oposto. Essa disposição faz com que a ciclodextrina tenha forma cilíndrica, ou melhor, cilindro cônico, pois a face que apresenta os grupos hidróxidos primários é mais estreita devido ao movimento livre deste grupo. Os pares de elétrons não ligantes do oxigênio, ligado ao carbono anomérico, estão direcionados para dentro da cavidade produzindo uma alta densidade eletrônica e dando características de base de Lewis à cavidade.

A parte externa da ciclodextrina apresenta-se polar devido a presença dos grupos hidróxidos, enquanto que seu interior é apolar em relação à parte externa.⁴

A Tabela 1 apresenta as principais características da α CD, β CD e γ CD.

Tabela 1: Características da α CD, β CD e γ CD

Característica	α CD	β CD	γ CD
Número de unidades de glicose	6	7	8
Massa molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água em g/100mL, temp. ambiente	14,5	1,85	23,2
$[\alpha]_D$ 25°C	150 \pm 0,5	162,5 \pm 0,5	177,4 \pm 0,5
Diâmetro da cavidade, Å	4,7 – 5,3	6,0 - 6,5	7,5 – 8,3
Altura, Å	7,9	7,9	7,9
Diâmetro periférico, Å	14,6	15,4	17,5
Volume aproximado da cavidade, Å ³	174	262	427
pK _a (por potenciometria) a 25°C	12,33	12,20	12,08

Descrito por Szejtli, 1988.

Através da Tabela 1 verifica-se que a β CD apresenta menor solubilidade em água em relação a α CD e γ CD. Isto ocorre devido a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre o grupo C-2-OH de uma unidade glicopiranosídica e o grupo C-3-OH da unidade glicopiranosídica adjacente, formando uma “rede” de ligações de

hidrogênio, deixando a estrutura da β CD mais rígida. Essa rede de ligações é incompleta na α CD, pois uma unidade de glicopiranosose está numa posição distorcida. A γ CD apresenta estrutura não coplanar e é mais flexível, portanto é a mais solúvel das ciclodextrinas.³ Outro fator que corrobora com a formação da rede de ligações de hidrogênio é a constante (K) de equilíbrio de troca de hidrogênio por deutério nos grupos hidróxidos secundários das unidades de glicopiranosose, onde $K = 0,65$ para β CD, $0,75$ para α CD e $0,85$ para amilose. Indicando que a troca é menos favorecida na β CD devido ao comprometimento dos grupos hidróxidos na formação de ligação de hidrogênio.

A cavidade apolar da ciclodextrina é ocupada por moléculas de H_2O que são energeticamente desfavoráveis (interação polar-apolar) e podem ser substituídas por moléculas hóspedes que sejam menos polares que H_2O . A Figura 2 ilustra a entrada do hóspede na cavidade da ciclodextrina e a saída de água.³ Por apresentar cavidade hidrofóbica, adequada para inclusão de moléculas apolares, as ciclodextrinas foram reconhecidas como as primeiras moléculas receptoras de substâncias apolares.⁵

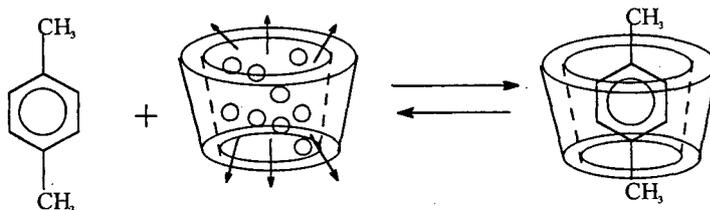


Figura 2: Representação esquemática da formação de complexo de inclusão com ciclodextrina. p-Xileno é a molécula hóspede e os pequenos círculos representam moléculas de água, como descrito por Szejtli (1998).

Como citado anteriormente a α , β e γ -ciclodextrina são as ciclodextrinas mais utilizadas como agentes encapsulantes. Mas, ciclodextrinas modificadas também vem sendo muito utilizadas na formação de complexos de inclusão. Por exemplo, a inserção de grupos hidroxipropil, carboximetil, grupos de aminas terciárias, aumentam a solubilidade destas ciclodextrinas em até 60%. A Figura 3 mostra uma estrutura genérica de ciclodextrina modificada.⁶

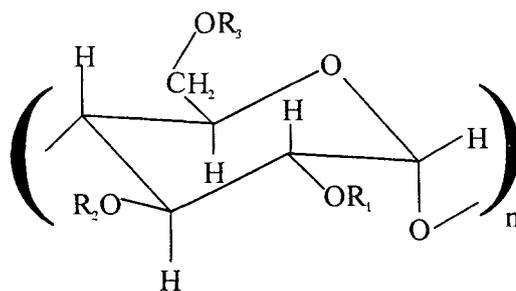


Figura 3: Estrutura genérica de ciclodextrina modificada, n representa o número de repetição das unidades de glicose.

Fazendo modificações em R_1 , R_2 ou R_3 pode-se obter ciclodextrinas modificadas. A seguir são dados alguns exemplos⁶:

$R_1, R_2, R_3 = \text{CH}_3$ temos o 2, 3, 6-tri-O-metilciclodextrina

$R_1, R_2, R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ temos o 3-hidroxipropilciclodextrina

$R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$ e $R_3 = \text{C}_2\text{H}_5$ e $R_2 = \text{H}$ temos 2,6-di-O-etilciclodextrina

$R_1, R_2, R_3 = \text{COCH}_3$ temos 2, 3, 6-tri-O-acetilciclodextrina

São vários os motivos da estabilidade dos complexos de inclusão com ciclodextrinas: (1) perda das moléculas de água da cavidade; (2) interação hidrofóbica; (3) interação eletrostática, principalmente dipolo-dipolo; (4) ligações de hidrogênio.⁴

Os complexos de inclusão podem ser obtidos por diferentes métodos: (1) coprecipitação, onde se adiciona o hóspede numa solução concentrada de ciclodextrina e de acordo com a temperatura e concentração da solução ocorre precipitação do complexo; (2) formação de pasta, onde a ciclodextrina é misturada a uma pequena quantidade de água, a substância a ser encapsulada é adicionada, e a pasta é colocada num misturador; (3) mistura física, a ciclodextrina e o hóspede são misturados sem adição de solvente, esse método é indicado somente para substâncias oleosas ou líquidas a temperatura ambiente; (4) por secagem, a mistura de complexo é agitada num solvente adequado e depois seca através de *spray drying* ou *freeze drying*.⁷

A proporção molar mais frequente obtida em complexos de inclusão (ciclodextrina:hóspede) é 1:1. Entretanto, sistema 2:1, 1:2, 2:2 ou até associações mais complicadas são possíveis.

A inclusão de moléculas na cavidade das ciclodextrinas traz várias vantagens como:

- aumento da solubilidade do hóspede;
- mudança nas propriedades espectroscópicas como diminuição da absorvância do hóspede ou deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção. Essas características podem aumentar a estabilidade do hóspede frente à luz;
- modificação da reatividade do hóspede;
- redução de sabores desagradáveis em alimentos;
- a sublimação e volatilização é reduzida para níveis bem mais baixos;
- aumento da estabilidade contra decomposição térmica e oxidação, etc.⁴

Essas qualidades dos complexos de inclusão fazem com que a utilização da ciclodextrina na indústria e o interesse na caracterização de seus complexos aumente cada vez mais.

1.2 Caracterização dos complexos de inclusão

1.2.1 Estado Sólido

As análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC)⁸⁻¹¹ e análise termogravimétrica (TGA) são muito utilizadas para estudar a formação de complexos de inclusão.⁷

DSC é uma técnica na qual a diferença no fluxo de calor de uma amostra e de uma referência é monitorada em função do tempo ou temperatura, a atmosfera é mantida inerte e a temperatura é programada.¹² Para utilização desta técnica a molécula hóspede deve apresentar temperatura de fusão ou ebulição abaixo de 300°C, temperatura na qual a ciclodextrina inicia sua decomposição térmica. O sinal de fusão do hóspede não é observado quando ele está incluso na cavidade da ciclodextrina. O sinal de fusão

desaparece pois a molécula hóspede não pode interagir com outras moléculas e, conseqüentemente não há substância na forma cristalina que possa absorver energia.⁷

Moyano et al. estudaram diferentes métodos de preparação do complexo de inclusão entre β CD e gliclazida, um medicamento de baixa solubilidade. Através de análise de DSC verificou-se que a agitação da solução aquosa de β CD e gliclazida desprotonada, com posterior neutralização e precipitação do complexo, foi o método mais eficiente. A curva de DSC mostrou o desaparecimento do sinal de fusão da gliclazida.⁹

Zornoza et al. estudaram a encapsulação da glisentida, um medicamento utilizado no tratamento de diabetes, com α CD, β CD e γ CD. Estudos de DSC mostraram que a precipitação foi o método mais adequado para obtenção dos complexos e, através de RMN¹H, verificaram qual parte da molécula está inclusa na cavidade de β CD (Figura 4).¹¹

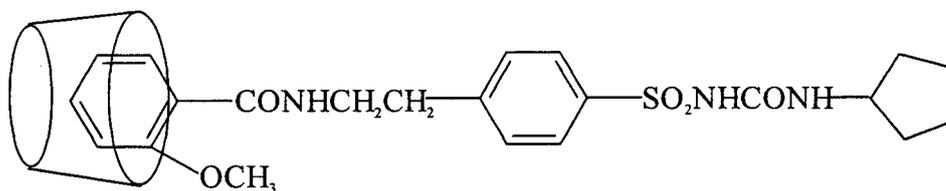


Figura 4: Estrutura proposta para o complexo de inclusão entre glisentida e β CD, como descrito por Zornoza et al. (1998).

Termogravimetria é uma técnica na qual a perda de massa de uma amostra é monitorada em função do tempo e temperatura, previamente programada. Para facilitar a visualização das etapas da curva de TGA, utiliza-se freqüentemente a derivada termogravimétrica (DTG ou dm/dt).¹² Portanto, o estudo da curva de TGA mostra os diferentes estágios de decomposição de uma amostra e se houve aumento de estabilidade térmica do hóspede, nos casos de complexos de inclusão.

As análises de TGA são interpretadas, na maioria das vezes, apenas como método qualitativo no estudo dos complexos de inclusão^{8, 9, 13} e apenas poucos trabalhos tem sido publicados sob o ponto de vista quantitativo da análise de TGA¹⁴⁻¹⁶.

Novák et al. estudaram os complexos de inclusão entre α CD, β CD e ácido mandélico. Neste trabalho foi verificado um aumento na estabilidade térmica do hóspede

após sua encapsulação nas ciclodextrinas. A decomposição térmica ocorreu em várias etapas e sugeriu-se que ocorre formação de complexos de diferentes proporções molares à medida que parte do ácido mandélico é decomposto.¹³

Yilmaz et al. comprovaram a formação de complexos de inclusão com derivados do ferroceno. Em todos os complexos estudados o sinal de fusão do derivado do ferroceno desapareceu após a encapsulação com β CD. As análises de TGA mostraram aumento da estabilidade térmica dos complexos de inclusão em relação ao hóspede puro. Em muitos casos a decomposição térmica do hóspede se sobrepôs à decomposição térmica da β CD¹⁴, comprovando o aumento na estabilidade térmica dos derivados do ferroceno encapsulados por β CD.

O mecanismo e a cinética de dissociação térmica de um complexo pode ser estudado por TGA. A partir das curvas termogravimétricas dois métodos podem ser utilizados. O método isotérmico, onde a perda de massa da amostra é acompanhada em função do tempo, numa temperatura fixa. E o método não-isotérmico, onde a perda de massa é acompanhada em função do aumento da temperatura, e cada curva é obtida em diferentes taxas de aquecimento. As curvas obtidas por TGA são analisadas por diferentes métodos de cálculo para obter o valor da energia envolvida em cada processo.

Tian et al. utilizaram o método de Coats e Redfern para estudar a dissociação do complexo de inclusão entre benzaldeído e β CD¹⁵. Li et al. estudaram a dissociação térmica do complexo β CD-álcool cinamil e β CD-aldeído cinâmico.^{16, 17}

Os métodos de análise térmica vem sendo muito utilizados na área de alimentos e farmácia. Como por exemplo, no estudos da decomposição térmica do leite em pó,¹⁸ na degradação de polissacarídeos,¹⁹ na estabilidade térmica de compostos com aroma¹⁰ e medicamentos²⁰.

1.2.2 Em solução

Quando se dissolve um complexo de inclusão um equilíbrio é estabelecido entre as formas dissociadas e associadas, isto é expresso por uma constante de estabilidade do complexo de inclusão. Portanto, essa associação e dissociação é governada por um equilíbrio termodinâmico.³

Vários métodos são utilizados para determinação da constante de equilíbrio entre a ciclodextrina e o hóspede, pode-se citar fluorescência, RMN¹H, calorimetria, espectroscopia UV-vis, tensão superficial, condutância, potenciometria, etc.

a) Análise por ressonância nuclear magnética

No estudo do complexo de inclusão por RMN¹H é possível observar o deslocamento dos prótons da ciclodextrina e do hóspede. A medida que o ambiente em torno dos átomos de hidrogênio da cavidade é alterado, observa-se o deslocamento químico destes prótons, devido ao processo de encapsulação. Comportamento semelhante pode ser observado para os prótons do hóspede.⁷

O estudo dos complexos de inclusão por RMN¹H iniciou com trabalhos de Demarco, Thakkar e Bergeron.^{1, 21, 22} Em seus estudos foi observada a variação no deslocamento químico dos prótons H₃ e H₅ da ciclodextrina em presença de numerosas moléculas hóspedes.

Tanto RMN de ¹H e ¹³C vem sendo muito utilizado na caracterização dos complexos de inclusão.²³⁻²⁶

O estudo dos complexos de inclusão por RMN¹H fornece várias informações como:

- 1) modo de encapsulação. Quando somente o próton H₃ sofre deslocamento químico após formação do complexo, então a inclusão é superficial. Mas, se H₅ também apresentar deslocamento químico significativo indica que a encapsulação é mais profunda (Figura 5)^{4, 26}
- 2) determinar a constante de associação entre ciclodextrina e o hóspede através do emprego de software adequado^{26, 27}
- 3) informações a respeito da orientação e estrutura do complexo de inclusão, com auxílio de NOE (*nuclear overhauser enhancement*) e RMN em duas dimensões^{23, 26}.

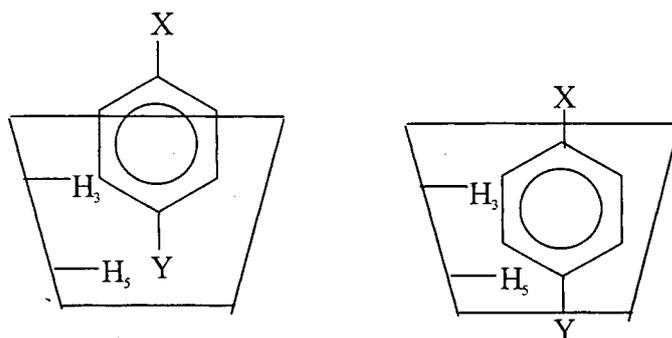


Figura 5: Modos de interação entre ciclodextrina-hóspede, mostrando a diferença na profundidade da inclusão, como descrito por Schneider et al. (1998).

Bergeron mostrou que a inclusão de p-nitrofenolato pela α CD ocorre através da entrada do grupo nitro, enquanto que o fenolato permanece em contato com o solvente. A Figura 6 mostra o espectro de RMN¹H da α CD e do complexo de inclusão. Verifica-se o evidente deslocamento químico do próton H₃ após entrada do p-nitrofenolato na cavidade.

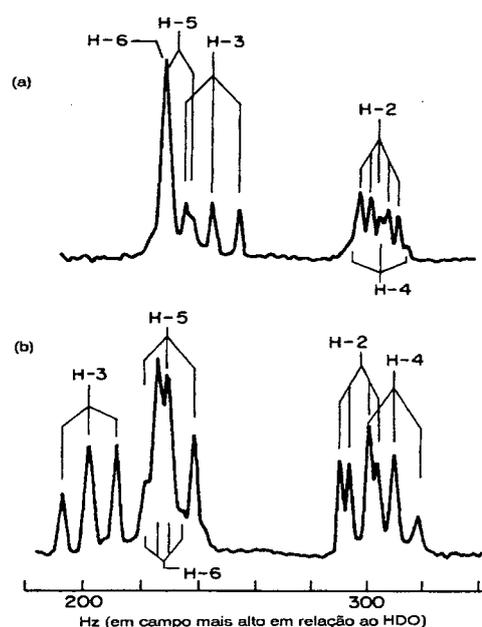


Figura 6: Espectro de RMN¹H do complexo de inclusão α CD-p-nitrofenolato (a) e da α CD (b) pD 11 em D₂O como descrito por Bergeron (1984).

b) Análise por calorimetria

Calorimetria é um dos poucos métodos de determinação direta dos valores termodinâmicos da reação de complexação, mas não é o método mais utilizado pois exige equipamento sofisticado e delicado e certa experiência para obter resultados confiáveis.^{28, 29}

c) Análise por espectroscopia

Uma grande variedade de métodos espectroscópicos é utilizada para determinar as constantes de equilíbrio dos complexos de inclusão com ciclodextrinas. A escolha do método e o procedimento experimental depende das propriedades espectrais do hóspede.

Se a interação entre um substrato e seu ligante não causa variação espectral significativa, o método de espectroscopia direta não pode ser utilizado. Uma alternativa é o método espectrofotométrico competitivo, onde um equilíbrio é estabelecido entre o ligante e um agente competitivo, que deve apresentar variação espectral após interação com o ligante. Então, o substrato de interesse é adicionado, resultando numa competição entre o substrato e o agente competitivo, com liberação deste e conseqüente variação espectral.³⁰

Portanto, o experimento consiste em medir a variação da absorvância do agente competidor, inicialmente encapsulado na cavidade da ciclodextrina, à medida em que a molécula não-cromofórica é adicionada.^{30, 31} A Figura 7 ilustra o equilíbrio entre ciclodextrina, agente competitivo e hóspede.

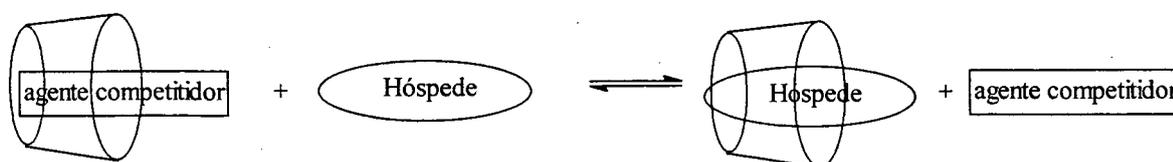


Figura 7: Ilustração do equilíbrio estabelecido no método de espectroscopia competitiva

No método competitivo moléculas com grupos cromóforos, como fenolftaleína³¹⁻³⁴, anilina e seus nitro derivados³⁵, vermelho de metila³⁶ são empregadas como agentes competitivos.

Ao utilizar algum destes agentes é importante saber como ocorre sua interação com a ciclodextrina. No caso da fenolftaleína, sua cor rosa está relacionada com a presença de

anéis fenólicos (desprotonados) e sobre estes anéis ocorre uma delocalização de elétrons. Caso esta conjugação for perturbada por algum outro tipo de interação ocorre uma diminuição significativa da coloração. Barcza et al. estudaram a interação entre β CD e fenoltaleína por espectroscopia no UV-vis e potenciometria, comprovando a formação do complexo de inclusão.³⁴

Para obter resultados confiáveis com o método competitivo é necessário que a Lei de Beer seja obedecida; certificar-se que não há interação entre o agente cromofórico e o hóspede estudado; e que exista variação significativa na absorvância do agente competidor após sua encapsulação; deve-se considerar a contribuição na absorção do complexo ciclodextrina-agente competitivo e não somente a absorção do agente competitivo livre; utilizar faixas de concentrações que permitam a formação de somente uma espécie de complexo de inclusão (1:1 ou 1:2, etc), evitando a mistura de diferentes espécies, e não usar faixa de pH onde coexistam a forma ionizada e a normal da molécula a ser encapsulada.^{5,30}

Verrall et al. estudaram a complexação entre surfactantes aniônicos, com variação no tamanho da cadeia fluorocarbônica e hidrocarbônica, e β CD através do método competitivo. Verificou-se que o valor da constante de formação dos complexos com β CD aumenta com o tamanho das cadeias, indicando a contribuição do efeito hidrofóbico neste tipo de complexação.³¹

d) Análise por fluorescência

O mesmo tratamento de dados utilizado para o método de espectroscopia competitiva pode ser adotado para estudos de fluorescência, onde a constante de equilíbrio entre ciclodextrina e hóspede é calculada a partir do tempo de vida e rendimento quântico. Neste método são utilizadas sondas que atuam da mesma forma que os agentes competitivos no método descrito anteriormente. Algumas das sondas utilizadas são: 1-anilinaftaleno-8-sulfonato⁴⁰, indole³⁸, pireno³⁹⁻⁴², cumarina⁴³.

As dificuldades apresentadas neste método são a sensibilidade da sonda não só à cavidade da ciclodextrina, mas também a restrição na sua mobilidade imposta pela inclusão, ou seja há uma contribuição destes dois efeitos na supressão da fluorescência durante a encapsulação.⁴

e) Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica é realizada acompanhando a variação do pH com adição do hóspede a uma solução de ciclodextrina⁴⁴⁻⁴⁷ ou com a adição de ácido ou base a uma solução contendo o complexo ciclodextrina-hóspede.⁴⁸ Entretanto, este último método exige uma variação significativa no valor do pK_a do hóspede livre e complexado, o que muitas vezes não ocorre, inviabilizando a utilização deste método.

Connors et al. utilizando titulação potenciométrica, compararam a complexação da ciclodextrina com diferentes séries de compostos de fórmula geral $CH_3(CH_2)_nX$, onde $X=CH_3, COOH, COO^-, OH^-, SO_3^-$. Verificou-se que a estabilidade de um complexo aumenta com o tamanho da cadeia alquílica, aproximando-se de um limite de estabilidade em valores elevados de n .⁴⁹

f) Análise por condutância

A condutância pode ser utilizada para sistemas onde o complexo exista na forma iônica, como por exemplo o alaranjado de metila e outros indicadores na forma aniônica.⁵⁰ Alguns medicamentos como tolmetin⁵¹ e naproxen⁴⁵, na sua forma desprotonada, tiveram sua constante de associação com ciclodextrina determinada por condutância.

e) Tensão Superficial

Alguns trabalhos relatam a utilização da tensão superficial para determinação da constante de associação de complexos de inclusão com ciclodextrina, o estudo é realizado na região que antecede a concentração micelar crítica da molécula hóspede e em diferentes concentrações de ciclodextrina.⁵²⁻⁵⁵

1.3 Aplicações das ciclodextrinas

As ciclodextrinas foram empregadas primeiramente pelos japoneses, pela adição em gomas de mascar, bebidas e doces causando uma liberação gradual do aroma.⁵⁶

Atualmente as ciclodextrinas vem sendo utilizadas por grandes indústrias farmacêuticas, de higiene pessoal e alimentos. Neste ano uma das maiores empresas de produtos de higiene pessoal foi contemplada com três patentes para métodos de redução

dos odores do corpo empregando ciclodextrinas. Com o aumento do uso da ciclodextrina seu preço está diminuindo drasticamente, desde 1981 até hoje seu preço já diminuiu 90%. Portanto, existem grandes perspectivas do uso das ciclodextrinas e conseqüentemente no seu estudo.⁵⁶ Alguns exemplos de complexos de inclusão são citados a seguir.

O antiinflamatório, analgésico e antipirético, (+)-naproxen, causa problemas estomacais devido sua baixa solubilidade, durante o uso oral. Quando complexado com hidroxipropil- β ciclodextrina sua solubilidade aumenta, diminuindo os efeitos colaterais.⁴⁵ De forma semelhante, os complexo de inclusão β CD-glisentida, utilizado no tratamento da diabetes¹¹, e hidroxipropil- β ciclodextrina-itraconazol⁷, que apresenta efeito fungicida, tem sua solubilidade aumentada e conseqüentemente apresenta maior absorção no organismo.

O ácido glicólico é utilizado como esfoliante da pele, mas causa certa irritação. Quando complexado com α CD a irritação desaparece devido a formação do complexo de inclusão, diminuindo a quantidade de ácido glicólico livre. Como existe um equilíbrio entre a forma livre e complexada, há um aumento no tempo de ação do ácido, já que ele é liberado gradativamente.⁷

O complexo formado entre hidroxipropil- β ciclodextrina e penicilina G, diminui 9 vezes sua degradação quando comparado com sua forma livre.⁵⁷

Outro grande emprego da ciclodextrina é na remoção de colesterol em ovos⁵⁸, derivados do leite e gordura animal.⁷

O conteúdo de aromas em licores é fator muito importante na qualidade sensorial do produto. Ito et al. verificaram que com a adição de α , β ou γ -ciclodextrina em licores há um aumento na retenção do aroma.⁵⁹

O leite de cabra é utilizado com muita freqüência no tratamento de crianças com alergia à proteína do leite de vaca, e é muitas vezes indicado como seu melhor substituto. Diferenças na composição protéica do leite de cabra em relação ao leite de vaca o tornam capaz de inibir os processos alérgicos em aproximadamente 50% da população pediátrica. Porém, o leite de cabra e seus derivados apresentam odor e *flavor* característicos, que diminuem sua aceitabilidade.⁶⁰

Com o aumento da popularidade e consumo dos produtos derivados do leite de cabra⁶¹ se faz necessário o estudo e resolução de alguns problemas relacionados a esse alimento como, por exemplo, o seu sabor caprino, um dos maiores motivos de sua rejeição.

Estudos realizados por Bordignon Luiz et al. mostram que a adição de β CD ao leite de cabra e seus derivados causa uma melhora significativa no sabor destes alimentos.^{62, 63}

O leite de cabra é similar ao leite de vaca em suas composições básicas.⁶⁴ A diferença mais significativa entre esses leites é a composição e quantidade de ácidos graxos de cadeia curta.^{65, 66} Relata-se que a proporção de ácidos graxos livres de cadeia curta (4 a 10 átomos de carbonos) é bem maior no leite de cabra que no leite de vaca,^{67, 68} sugerindo que esse grupo de moléculas é responsável pelo sabor caprino. Portanto, a melhora significativa no sabor e odor do leite de cabra, com a adição de β CD, é devido à formação de complexos de inclusão entre β CD e as substâncias causadoras do sabor caprino.⁶⁹⁻⁷²

Com base nestes dados, surgiu o interesse em estudar a formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e ácidos graxos de cadeia curta.

1.4 Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho são:

- obter complexos de inclusão entre β CD, γ CD e os ácidos graxos de cadeia curta ácido cáprico e caprílico;
- caracterizar os complexos de inclusão por DSC, TGA, RMN¹H e determinar a proporção máxima de ácido encapsulado em cada ciclodextrina;
- avaliar a estabilidade térmica dos complexos de inclusão;
- determinar as constantes de associação entre β CD, γ CD e os ácidos cáprico e caprílico;
- avaliar a influência do tamanho da cavidade da ciclodextrina e o tamanho da cadeia alquílica dos ácidos sobre a capacidade de encapsulação;
- utilizar os estudos *in vitro* para avaliar a influência de β CD no processo de secagem do leite de cabra em pó.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material

A β CD e γ CD foram doadas pela empresa Cerestar, USA. As amostras foram recristalizadas em meio aquoso a 50°C, após resfriamento lento da solução ocorreu precipitação do composto e o mesmo foi filtrado e seco sob vácuo.

Os ácidos cáprico e caprílico foram adquiridos da Fluka. Os solventes empregados foram: D₂O (com TMS), DCl e KOD (Aldrich), etanol (Vetec), KOH, NaHCO₃, NaOH, hexano, clorofórmio, éter etílico (Nuclear).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos complexos de inclusão

O ácido e a ciclodextrina foram misturados em diferentes proporções molares para se obter complexos de inclusão em diferentes proporções. As proporções molares utilizadas para síntese dos complexos de inclusão β CD-C₁₀ foram: 1:0,57; 1:0,91; 1:1; 1:1,14. Para o complexo β CD-C₈ foram: 1:0,8; 1:1; 1:1,2; 1:1,5; 1:1,7. Para o complexo γ CD-C₁₀ foram: 1:1; 1:1,3; 1:1,5; 1:1,8 e para o complexo γ CD-C₈ foram : 1:1; 1:1,5; 1:2; 1:2,3.

Os complexos de inclusão foram obtidos pesando-se o ácido e a ciclodextrina em quantidades de número de moles necessários para obter as proporções desejadas. Os compostos foram misturados e submetidos a agitação em meio aquoso (~5 mL) durante 6-7 horas. As amostras foram secas sob vácuo e guardadas num dessecador até serem analisadas.

2.2.2 Análise térmica

Para as análises termogravimétricas (TGA) utilizou-se um aparelho TGA-50 da

Shimadzu, as massas das amostras utilizadas foram 10-15 mg e a faixa de temperatura estudada foi de 25 a 650°C com taxa de aquecimento 10°C/min. Para as análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) utilizou-se um aparelho DSC-50 da Shimadzu, as massas utilizadas foram de 5 - 10 mg e faixa de temperatura estudada foi de -10 a 250°C, para as análises com o ácido C₈ e de 20 a 250°C, para as análises com o ácido C₁₀. Em ambas as análises o fluxo de N₂ foi mantido em 50 mL min⁻¹ e a taxa de aquecimento em 10°C min⁻¹. Para identificar as etapas de decomposição, os complexos foram submetidos a aquecimento durante 40 minutos nas temperaturas de DTG_{min} para cada sistema. Após aquecimento, as amostras foram analisadas por FTIR em pastilha de KBr.

2.2.3 Cinética de decomposição térmica

O estudo de decomposição térmica foi realizado utilizando-se os termogramas de TGA da β-CD e do complexo de inclusão βCD-C₁₀ (1:1) na faixa de temperatura acima de 320°C. Os TGA's foram obtidos a diferentes velocidades de varreduras (2, 5 e 10°C min⁻¹). O método de Ozawa (não-isotérmico) foi utilizado para efetuar os cálculos de energia envolvida no processo de decomposição. O método de Ozawa utiliza, como base, a equação de Arrhenius (Equação 1), onde α representa a fração de decomposição, t o tempo, A o fator pré-exponencial, E_a a energia de ativação R a constante dos gases, n a ordem de reação e T a temperatura em Kelvin.

$$\left(\frac{d\alpha}{dt}\right) = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) (1-\alpha)^n \quad (1)$$

2.2.4 Análise de RMN¹H

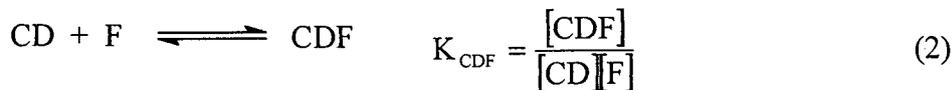
Os complexos de inclusão foram dissolvidos em D₂O, com TMS como padrão interno. Alguns complexos foram estudados em pD = 4,4 e pD ≥ 10,5, com adição de KOD. Sendo que pD se refere a concentração de Deutério na solução e foi medido com um pHmetro da Digimed DMpH-3, com um eletrodo combinado da Corning que era rinsado previamente com D₂O. O aparelho utilizado foi um espectrômetro da Bruker AC-200F, 200 MHz.

2.2.5 Determinação das constantes de associação

As constantes de associação entre as ciclodextrinas e os ácidos estudados foram determinadas pelo método competitivo.

2.2.5.1 Determinação da constante de associação ciclodextrina-fenolftaleína

Inicialmente determinou-se a constante de associação entre a ciclodextrina e fenolftaleína. Este estudo foi realizado acompanhando a diminuição da absorvância da fenolftaleína (550 nm) em função da adição de diferentes concentrações de ciclodextrina. A equação 2 define o equilíbrio entre CD e fenolftaleína, onde CD representa β - ou γ -ciclodextrina e F representa a fenolftaleína.



Os valores das constantes de associação são obtidos a partir da equação de Hildebrand e Benesi, cujo desenvolvimento é descrito a seguir.⁷³ Através da equação 2 e do balanço de massa da fenolftaleína (equação 3) obtém-se a equação 4:

$$F_t = [\text{F}] + [\text{CDF}] \quad (3)$$

$$\frac{F_t}{F_t - [\text{F}]} = \frac{1}{K_{\text{CDF}}[\text{CD}]} + 1 \quad (4)$$

$$\text{CD}_t = [\text{CD}] + [\text{CDF}] \quad (5)$$

onde [F] = concentração de fenolftaleína livre,

[CDF] = concentração de complexo ciclodextrina/fenolftaleína

F_t = concentração total de fenolftaleína

Através do balanço de massa de CD (equação 5) sabe-se que $[\text{CD}] = \text{CD}_t - [\text{CDF}]$ e como $\text{CD}_t \gg [\text{CDF}]$, considera-se $[\text{CD}] = \text{CD}_t$. A absorvância medida (A_m) durante o experimento é definida pela equação 6, ou seja, tanto a fenolftaleína livre quanto a complexada absorvem radiação. A absorvância inicial (A_i) é obtida medindo-se a absorvância de uma solução conhecida de fenolftaleína na ausência da ciclodextrina.

$$A_m = \varepsilon_F[\text{F}] + \varepsilon_{\text{CDF}}[\text{CDF}] \quad (6)$$

$$A_i = \varepsilon_F[\text{F}]_t \quad (7)$$

$$\Delta A = A_i - A_m \quad (8)$$

onde ϵ_F = absorvidade molar da fenolftaleína livre e ϵ_{CDF} = absorvidade molar do complexo CDF.

Portanto,

$$\Delta A = \epsilon_F[F]_t - \epsilon_F[F] - \epsilon_{CDF}[CDF] \quad (9)$$

A partir da equação (3) sabe-se que $[CDF] = F_t - [F]$, substituindo na equação 9 obtem-se:

$$\Delta A = (F_t - [F]) (\epsilon_F - \epsilon_{CDF})$$

Sendo que $\Delta\epsilon = \epsilon_F - \epsilon_{CDF}$, ou seja

$$\frac{\Delta A}{\Delta\epsilon} = F_t - [F] \quad (10)$$

Substituindo na equação 4 obtem-se a equação linear para determinar K_{CDF} :

$$\frac{F_t}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta\epsilon K_{CDF}} \frac{1}{CD_t} + \frac{1}{\Delta\epsilon} \quad (11)$$

Através da equação 11 obtem-se um gráfico de $F_t/\Delta A$ vs. $1/CD_t$, o coeficiente linear da reta fornece o valor de $1/\Delta\epsilon$, e o coeficiente angular fornece o valor de K_{CDF} .

Para determinar a constante de associação entre βCD -F preparou-se soluções estoque de fenolftaleína $1 \times 10^{-3} M$ usando como solvente etanol:água pH 10,5 (1:1 v/v). A solução etanol:água, com pH 10,5, permaneceu sob repouso durante 1 hora antes de ser utilizada na diluição da fenolftaleína. A solução estoque de fenolftaleína era guardada no refrigerador e refeita após 3 dias de uso. O pH 10,5 era mantido através de um tampão de $NaHCO_3/NaOH$.⁷⁴

A partir das soluções estoques de βCD $7,5 \times 10^{-4} M$ (pH 10,5) foram preparadas diversas soluções de βCD com concentrações na faixa de 2×10^{-5} a $3 \times 10^{-4} M$. A cada solução de βCD foram adicionados 400 μL de solução estoque de fenolftaleína por balão de 10 mL, obtendo assim, a concentração constante de $4 \times 10^{-5} M$ de fenolftaleína nos balões contendo βCD . Uma solução de fenolftaleína $4 \times 10^{-5} M$ foi preparada sem a adição de βCD , para obter o valor da absorvância da fenolftaleína livre. Todas as soluções foram diluídas até as concentrações desejadas com solução tampão pH 10,5.

As amostras contendo βCD e fenolftaleína foram deixadas em repouso durante 12 horas e suas absorvâncias foram medidas num espectrofotômetro U-3000 da Hitachi.

O mesmo procedimento experimental foi adotado para o sistema γ CD-F, porém utilizando concentração estoque de γ CD = 2×10^{-3} M, a partir da qual preparou-se diversas soluções com concentrações na faixa $4,5 \times 10^{-5}$ a 11×10^{-5} M.

2.2.5.2 Determinação da constante de associação ciclodextrina-ácido graxo

O valor da constante de associação entre a ciclodextrina e a fenolftaleína foi utilizado para determinar a constante de associação entre ciclodextrina e o ácido. No presente sistema ocorrem dois equilíbrios: 1) dissociação da fenolftaleína da cavidade da ciclodextrina; 2) associação do ácido graxo à cavidade. Tanto a fenolftaleína livre quanto a complexada absorvem radiação. Portanto, o equilíbrio de complexação competitiva é:



onde A representa o hóspede, ácido graxo livre, e CDA, o complexo de inclusão entre o ácido graxo e ciclodextrina. A equação 13 define o equilíbrio entre a ciclodextrina e o ácido graxo:



Connors et al. desenvolveram uma equação linear para obter o valor da constante de associação entre ciclodextrina hóspede.³⁰ Inicialmente, considera-se o balanço de massa do hóspede, da ciclodextrina e do indicador, chegando a seguinte equação:

$$\text{CD}_t = [\text{CD}] + \frac{K_{\text{CDA}}[\text{CD}]\text{A}_t}{1 + K_{\text{CDA}}[\text{CD}]} + \frac{K_{\text{CDF}}[\text{CD}]\text{F}_t}{1 + K_{\text{CDF}}[\text{CD}]} \quad (14)$$

onde [CD] é a ciclodextrina livre, K_{CDA} representa a constante de equilíbrio entre ciclodextrina e ácido graxo e A_t representa o ácido livre total. Considerando $Q = [\text{F}]/[\text{CDF}]$, pode-se escrever que $K_{\text{CDF}} = 1 / Q[\text{CD}]$, substituindo em 14, obtem-se:

$$\text{CD}_t = \frac{1}{QK_{\text{CDF}}} + \frac{\text{A}_t K_{\text{CDA}}}{QK_{\text{CDF}} + K_{\text{CDA}}} + \frac{\text{F}_t}{Q+1} \quad (15)$$

Uma quantidade P é definida como:

$$P = \text{CD}_t - \frac{1}{QK_{\text{CDF}}} - \frac{\text{F}_t}{Q+1} \quad (16)$$

Portanto, P também é:

$$P = \frac{A_t K_{CDA}}{QK_{CDF} + K_{CDA}} \quad (17)$$

A partir da equação 17 obtém-se a equação da reta cujo coeficiente angular traz o valor de K_{CDA} .

$$\frac{A_t}{P} = \frac{K_{CDF}}{K_{CDA}} Q + 1 \quad (18)$$

Mantendo-se constante a concentração de F_t , Q pode ser transformado em:

$$Q = \frac{A_m - A_{CDF}}{A_F - A_m} \quad (19)$$

onde A_F e A_{CDF} representam a absorvância da fenolftaleína livre e do complexo de inclusão CDF, respectivamente.

O valor de Q pode ser obtido através de um processo iterativo, onde o valor de [CDF] é refinado, obtendo-se assim o valor de ϵ_{CDF} que é necessário para obter o valor de A_{CDF} .³⁰ Neste trabalho empregou-se um outro método de resolução de Q. Substituindo o balanço de massa da fenolftaleína (equação 3) na equação $Q = [F]/[CDF]$, obtém-se:

$$Q = \frac{F_t - [CDF]}{[CDF]} \quad (20)$$

Substituindo equação 10 na equação acima, obtém-se

$$Q = \frac{F_t}{\Delta A / \Delta \epsilon} - 1 \quad (21)$$

A quantidade de fenolftaleína total é conhecida, ΔA é obtido através da subtração da absorvância de uma solução de fenolftaleína livre, e absorvância do sistema completo (CD-F-A) após adição de cada alíquota de ácido graxo. O valor de $\Delta \epsilon$ é obtido do sistema CD-F (equação 11). Com o valor de Q resolvido obtém-se o valor de P tornando possível determinar a constante de associação entre um substrato como ácido graxo e ciclodextrina pelo método competitivo.

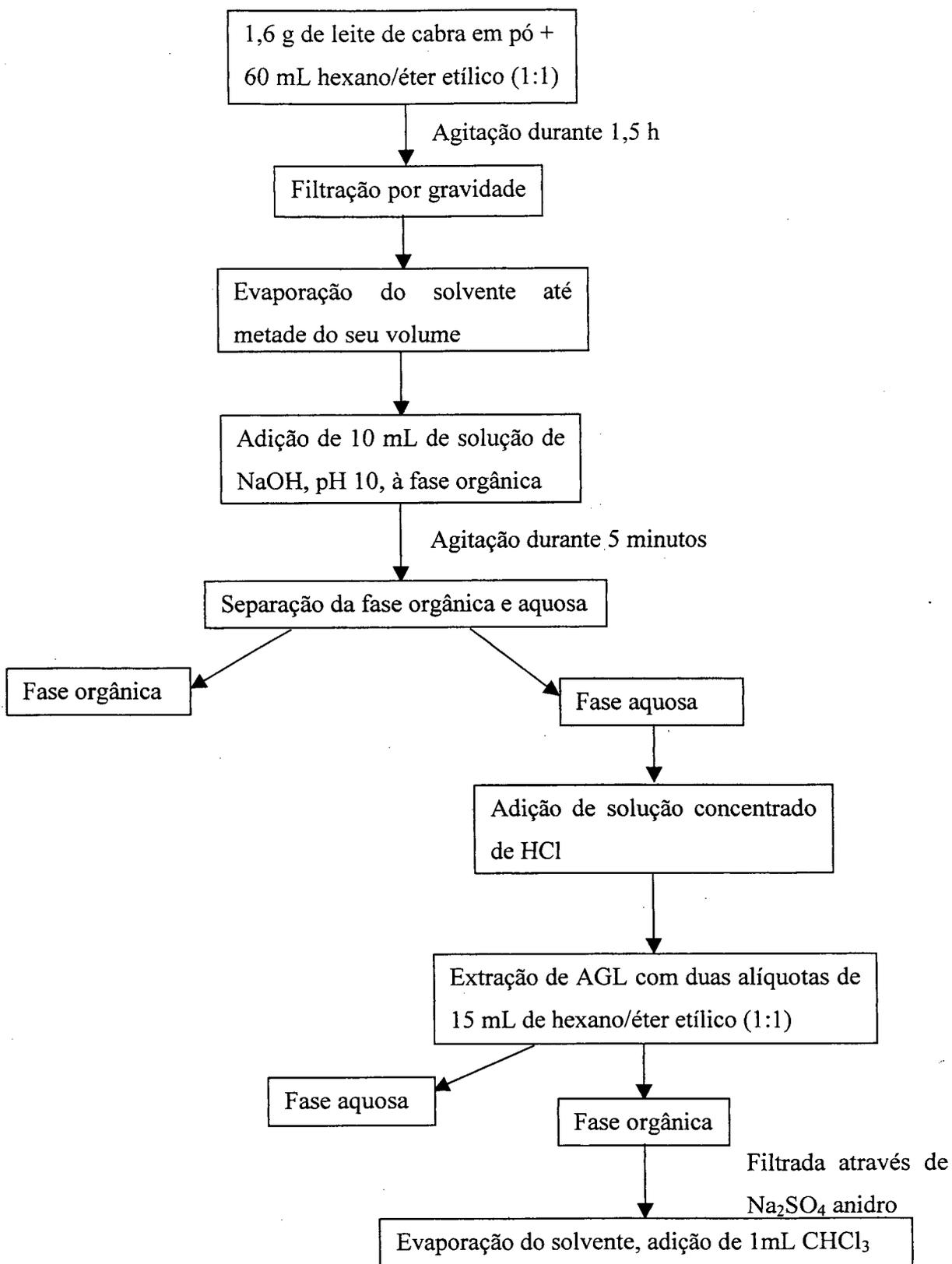
A determinação da constante de associação ciclodextrina-ácido graxo foi realizada preparando-se uma solução estoque do complexo ciclodextrina-fenolftaleína que permaneceu sob repouso durante 12 horas antes de ser utilizada e foi refeita após 3 dias de uso. Esta solução estoque foi diluída 10 vezes em balões de 10 mL. A estas soluções foram

adicionadas alíquotas de uma solução estoque do ácido. Em todas as soluções as concentrações finais foram: $[F] = 4 \times 10^{-5}$ M, $[\beta\text{CD}] = 1 \times 10^{-3}$ M, $[\gamma\text{CD}] = 2 \times 10^{-3}$ M. A faixa de concentração de C_{10} e C_8 em presença de βCD foi, respectivamente, 4×10^{-4} a 8×10^{-3} M e $2,5 \times 10^{-3}$ a 3×10^{-2} M. Em presença de γCD a concentração de C_{10} foi 4×10^{-4} a 1×10^{-3} M a concentração de C_8 foi 5×10^{-3} a 7×10^{-2} M. As soluções permaneceram em repouso durante 12 horas e foram lidas num espectrofotômetro acoplado com banho termostatizado a 25°C .

Estas faixas de concentrações dos ácidos foram adotadas para: 1) obter linearidade nos cálculos através da aplicação da equação 18, sendo que essa linearidade está relacionada com a existência de somente espécies 1:1; e 2) para obter valores de absorvância numa faixa confiável. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes e o valor da constante foi obtido através da média aritmética das diferentes leituras. O tempo de repouso das soluções de ácido, ciclodextrina e fenolftaleína é necessário para se atingir o equilíbrio do sistema. Verificou-se que em tempo de repouso menor há uma variação na absorvância.

2.2.6 Análise cromatográfica do leite de cabra em pó puro e com adição de βCD

As amostras de leite de cabra em pó puro e com a adição de βCD foram doadas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, desta Universidade. As amostras de leite em pó foram obtidas pelo método de secagem por *spray dryer*. A secagem das amostras foi realizada com temperatura de entrada no equipamento de *spray dryer* = $180 - 185^\circ\text{C}$ e temperatura de saída = $80 - 85^\circ\text{C}$. A amostra de leite em pó com βCD apresentava 0,60 % (p/v) deste agente encapsulante. Essas amostras foram submetidas ao processo de extração de ácidos graxos livres apresentado no esquema 1. A parte inicial deste procedimento de extração baseia-se no experimento realizado por Santa-María et al. que extraiu triglicerídeos do leite de ovelha, vaca e cabra.⁷⁵



Esquema 1: Processo de extração de AGL de amostras de leite de cabra em pó

As amostras contendo os AGL, extraídos do leite de cabra em pó, foram analisadas por cromatografia gasosa, numa coluna DB-WAX (análise direta de ácidos) num aparelho GC- 17A Shimadzu com detector por ionização em chama, a temperatura do injetor foi de 200°C e do detector de 260°C, a temperatura inicial de análise foi de 60°C e final 240°C com taxa de aquecimento 10°C/min e isoterma de 5 minutos em 240°C, a vazão do gás foi de 2 mL/min.

Para preparação da amostra padrão, dissolveu-se 0,02 mg do ácido comercial C₈ em 1 mL de clorofórmio. O tempo de retenção de C₈ foi utilizado para identificação deste ácido nas amostras de leite.

Através da área do pico de C₈, obteve-se a porcentagem de perda deste ácido na amostra de leite sem βCD em relação ao leite com este aditivo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção dos complexos de inclusão

Como descrito no item 2.2.1, obteve-se diversas amostras de ciclodextrina-ácido em diferentes proporções. Esse procedimento foi utilizado para determinar o máximo de ácido que permanece encapsulado na cavidade das ciclodextrinas estudadas. Outros métodos de síntese são apresentados na literatura como a precipitação do complexo através da adição do hóspede a uma solução aquosa de ciclodextrina. Mas, muitos destes métodos exigem a retirada do hóspede não-complexado por lavagem com solventes que podem proporcionar a dissociação do complexo já formado. Métodos de mistura com pequena quantidade de solvente formando uma pasta e posterior secagem por *spray dryer*, também são relatados, mas geralmente são pouco eficientes.⁷

O método utilizado neste trabalho evita a perda dos componentes (ciclodextrina ou ácido), visto que a amostra não é filtrada. Portanto, se houver ácido não complexado ele será detectado por análise de DSC, permitindo determinar qual a proporção de ácido que permanece encapsulado na ciclodextrina.

3.2 Análise térmica dos complexos de inclusão

3.2.1 Análise por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

As curvas de DSC dos componentes puros (C_8 , C_{10} , β CD e γ CD) estão apresentadas na Figura 8. Os ácidos C_8 e C_{10} mostram sinais endotérmicos em 13,9 e 33,9 °C, respectivamente, referente a fusão da amostra. Acima de 100°C inicia-se a vaporização e decomposição dos ácidos. As curvas de DSC da β CD e γ CD mostram sinais de volatilização de H_2O em 129,3 e 120°C, respectivamente.

As Figuras 9-12 mostram a sobreposição das curvas de DSC para os sistemas de β CD e γ CD com os ácidos C_8 e C_{10} , em diferentes proporções.

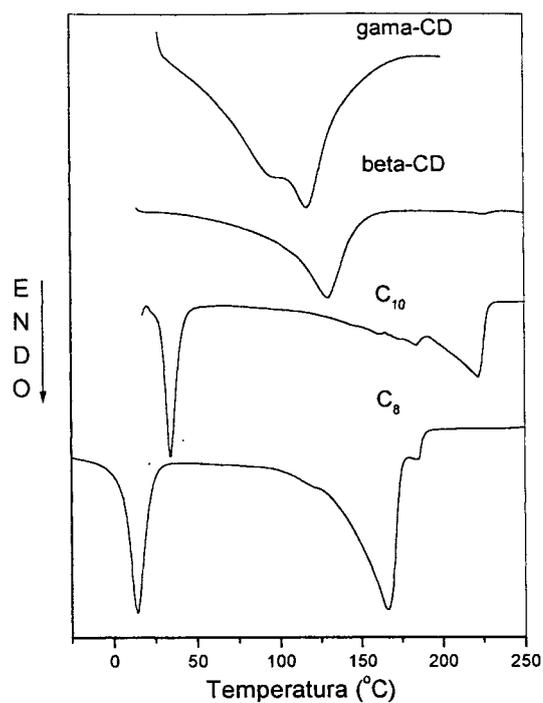


Figura 8: Curvas de DSC dos componentes puros γ CD, β CD, C_{10} e C_8 . Velocidade de varredura = $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em N_2 .

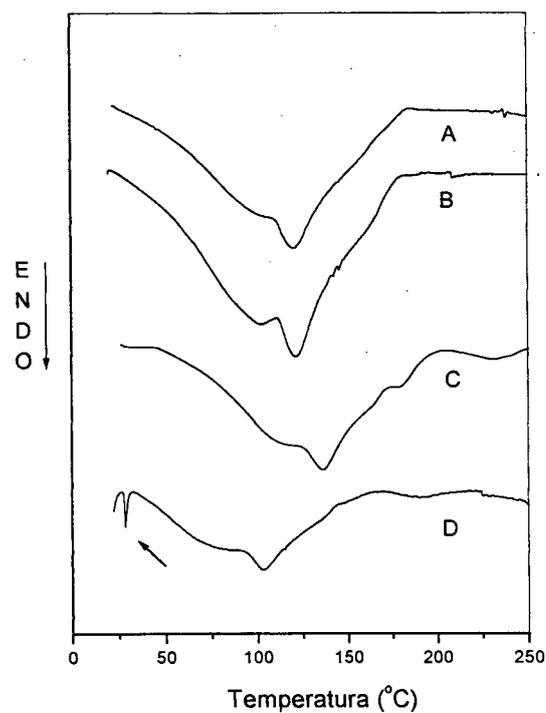


Figura 9: Curvas de DSC obtidas a partir do sistema β CD- C_{10} em diferentes proporções: A)1:0,57 B)1:0,91 C)1:1 D) 1:1,14 .Velocidade de varredura = $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em N_2 .

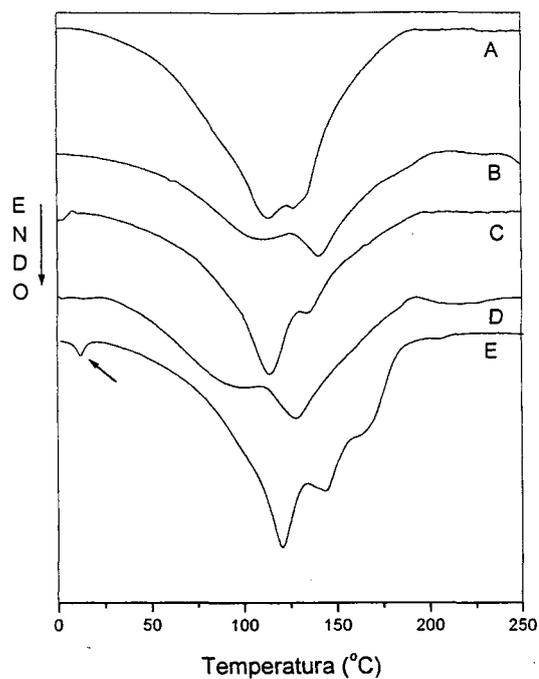


Figura 10: Curvas de DSC obtidas a partir do sistema β CD-C₈ em diferentes proporções: A) 1:0,8 B) 1:1 C) 1:1,2 D) 1:1,5 e E) 1:1,7. Velocidade de varredura = 10°C/min, em N₂.

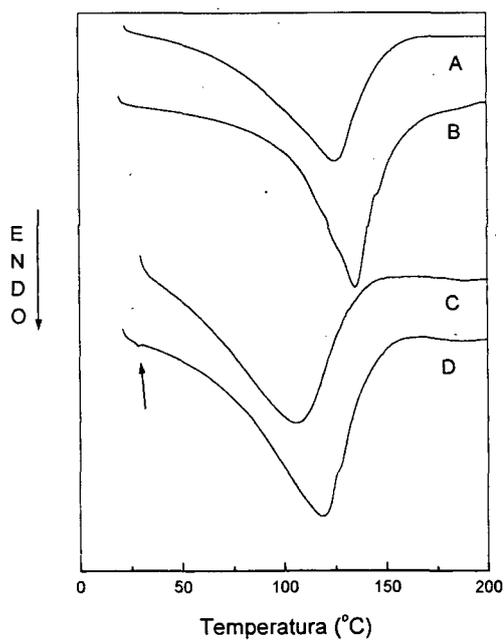


Figura 11: Curvas de DSC obtidas a partir do sistema γ CD-C₁₀ em diferentes proporções: A) 1:1 B) 1:1,3 C) 1:1,5 D) 1:1,8. Velocidade de varredura = 10°C/min, em N₂.

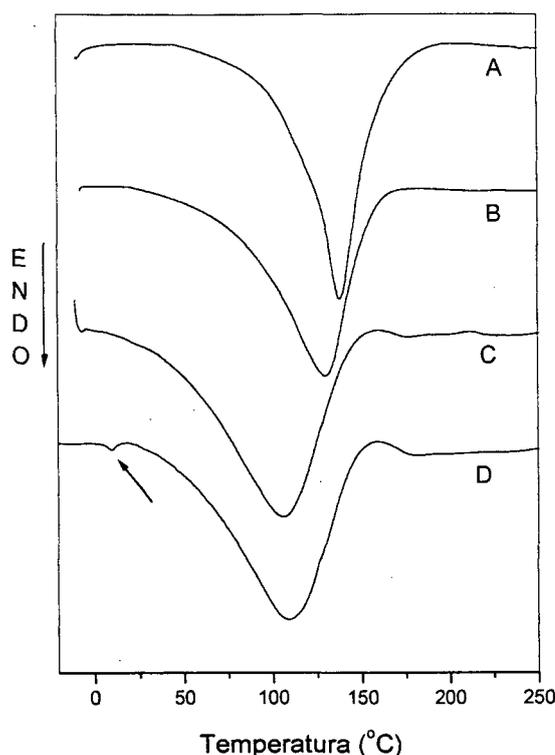


Figura 12: Curvas de DSC obtidas a partir do sistema γ CD- C_8 em diferentes proporções: A)1:1 B) 1:1,5 C) 1:2 D)1:2,3. Velocidade de varredura = $10^\circ\text{C}/\text{min}$, em N_2 .

O sinal endotérmico em $28,3^\circ\text{C}$, observado na Figura 9, mostra que na proporção 1:1,14 (β CD: C_{10}) o ácido ainda não foi totalmente encapsulado. Em proporções menores esse sinal desaparece, evidenciando que a proporção 1:1 é a que apresenta máxima quantidade de ácido encapsulado.

A Figura 10 mostra as curvas de DSC para o sistema β CD- C_8 . Verifica-se que em proporções acima de 1:1,5 (β CD: C_8) parte do ácido não é encapsulado gerando o sinal de fusão observado na curva E. Portanto, a proporção máxima de C_8 para cada molécula de β CD é 1:1,5.

Comportamento similar foi observado para o sistema γ CD- C_{10} (Figura 11) onde a presença do ácido livre é verificada em estequiometrias superiores a 1:1,5 (γ CD: C_{10}), como mostra o sinal de fusão em 28°C na curva D.

O sistema γ CD- C_8 , apresentado na Figura 12, mostra sinal de fusão do ácido em estequiometrias superiores à 1:2.

Nos complexos de inclusão com β CD, verifica-se que o sinal de volatilização das moléculas de água ocorre em diferentes estágios, como mostram as curvas de DSC onde sinais endotérmicos menores ocorrem na faixa de 100-150°C. Isso mostra a diferença na energia de desidratação para moléculas de água internas e externas. Também há a contribuição do grupo carboxílico do ácido que pode estar formando ligações de hidrogênio com moléculas de água adjacentes, fazendo com que a volatilização ocorra em temperaturas mais elevadas.¹⁶

A Tabela 2 resume os valores de calor envolvido e os picos observados nas curvas de DSC dos sistemas estudados.

Analisando a Tabela 2, verifica-se que o primeiro sinal de volatilização das moléculas de água ocorre em temperatura menor nos complexos de inclusão com máxima proporção de ácido, em relação as ciclodextrinas puras. Nos demais sistemas não há uma linearidade na temperatura de volatilização, devido a contribuição de diferentes espécies misturadas, o que também dificulta a interpretação dos valores de calor envolvido. A diminuição na temperatura de volatilização das moléculas de água nos complexos de inclusão é justificado através do processo de formação do complexo de inclusão. Quando ocorre a inclusão, parte das moléculas de água da cavidade é substituída pelo hóspede, cuja entrada é favorecida energeticamente quando sua polaridade é menor em relação a água. As moléculas de água remanescentes volatilizam numa temperatura menor por não estarem interagindo tão fortemente com a cavidade.¹⁴

Observa-se que para os dois complexos com β CD* há o envolvimento de praticamente a mesma quantidade de calor (aproximadamente 52,3 cal/g). Comportamento semelhante é observado para os complexos com γ CD*, onde o calor envolvido é aproximadamente 91 cal/g. Estes valores estão relacionados com a volatilização da mesma quantidade de moléculas de água nos dois complexos de inclusão de cada uma das ciclodextrinas. Os complexos de γ CD podem apresentar mais moléculas de água, coexistindo com o ácido, em relação a β CD. Isso ocorre devido ao maior tamanho da cavidade de γ CD em relação a β CD, justificando o envolvimento de mais calor nos dois complexos de γ CD.¹

* com máxima proporção de ácido encapsulado

Tabela 2: Resultados obtidos através de DSC para os sistemas com diferentes proporções de β CD-C₁₀ e C₈, γ CD-C₁₀ e C₈. Velocidade de varredura 10°C/min em N₂. Faixa de temperatura analisada: -10°C à 250°C, para C₈ e 20°C à 250°C, para C₁₀.

Sistema	Proporção CD:ácido	Pico (°C)	Calor (cal/g)
β CD-C ₁₀	0:1	33,9 e 221,9	35,1 e 106,1
	1:0	129,3	91,0
	1:0,57	120,3	53,8
	1:0,91	121,0	52,4
	1:1 ^a	115,0 e 127	51,9
	1:1,14	28,3 e 102,7	0,40 e 36,7
β CD-C ₈	0:1	13,9 e 166,2	36,3 e 117
	1:0,8	113,6	80,8
	1:1	110 e 140,5	55,0
	1:1,2	114 e 133	73,0
	1:1,5 ^a	~100 e 127,8	52,8
	1:1,7	10,8 e 118,9	0,41 e 71,4
γ CD-C ₁₀	1:0	120,5	65,4
	1:1	125,2	87,2
	1:1,3	135	79,5
	1:1,5 ^a	105,7	91,6
	1:1,8	≈ 28 e 118,7	91,8
γ CD-C ₈	1:1	138	90,7
	1:1,5	130	95,6
	1:2 ^a	105,8	90,3
	1:2,3	9,52 e 108	0,35 e 95,0

^a proporção com máxima quantidade de ácido encapsulado.

Observa-se que em todos os sistemas que apresentaram ácido não complexado, o sinal de fusão de C₈ e C₁₀ livre envolve baixa quantidade de calor, isso é atribuído a uma melhor dispersão do hóspede sobre a ciclodextrina.⁹

3.2.1.1 Correlação dos resultados de DSC

A Tabela 3 mostra a proporção máxima de ácido que permanece encapsulado na cavidade das ciclodextrinas. Observa-se que com o aumento do tamanho da cavidade há um aumento na quantidade de ácido encapsulado pela ciclodextrina. Os sistemas com proporções CD:ácido 1:1,5 são, provavelmente, uma contribuição da mistura de espécies 1:1 e 1:2.

Tabela 3: Resumo da máxima encapsulação dos ácidos C₈ e C₁₀ em βCD e γCD.

Sistema	Máxima proporção de ácido encapsulado ^a
βCD-C ₁₀	1:1
βCD-C ₈	1:1,5
γCD-C ₁₀	1:1,5
γCD-C ₈	1:2

^a proporção (CD:ácido)

A análise dos complexos de inclusão por DSC mostrou ser um modo eficiente de confirmar a encapsulação e determinar a quantidade de hóspede que pode ser encapsulado por determinada ciclodextrina.

3.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

O principal objetivo do estudo térmico dos sistemas de ciclodextrinas com os ácidos C₈ e C₁₀ é verificar se há um aumento na estabilidade térmica dos ácidos após sua encapsulação. Essa informação é importante na área de alimentos quando se faz necessário um tratamento térmico do produto, como por exemplo obtenção de leite em pó por *spray dryer*.

Numa primeira etapa deste trabalho, determinou-se as temperaturas de decomposição térmica de cada complexo de inclusão por TGA. Na segunda etapa, as amostras foram submetidas novamente a estas temperaturas e sua decomposição térmica foi acompanhada por espectroscopia no infra-vermelho. Somente os complexos com máxima proporção de ácido encapsulado foram analisados.

3.2.2.1 Decomposição térmica dos compostos puros

Os resultados de análise térmica para os componentes puros, usados para obter os complexos de inclusão, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos por TGA para os componentes puros. Taxa de aquecimento 10°C/min

Composto	Estágio	Faixa de temperatura de decomposição (°C)	DTG _{máx} (°C)	Perda de massa (%)
βCD	1	33 – 130	94	10,36
	2	291- 850	338	74,7
γCD	1	30 - 213	82,5	7,81
	2	288 – 850	341,7	81,9
C ₁₀	1	117 – 243	224	99,2
C ₈	1	74,7 – 225	196	99,4

Através da Tabela 4 observa-se que o ácido C₈ inicia sua decomposição em temperaturas inferiores às apresentadas pelo ácido C₁₀. Dois picos endotérmicos são observados na curva de decomposição térmica de βCD (Figura 13A). O primeiro pico, 94°C, corresponde a desidratação da βCD. A porcentagem de perda de massa informa que βCD contém 7 moles de águas de hidratação e cristalização, que são perdidas em um único estágio. Esses resultados estão de acordo com valores apresentados na literatura.¹⁶ O segundo sinal ocorre devido a degradação da estrutura de βCD. A decomposição inicia em

291°C e perde massa rapidamente até 345°C, dando aproximadamente 75% de perda de massa que continua lentamente acima de 345°C.

A γ CD apresenta dois estágios de volatilização de água, um abaixo de 100°C e outro acima, mas com pico principal em 82,5°C (DTG da Figura 13B). A perda de massa mostra que γ CD contém 6,1 moles de água. A perda é facilitada devido ao maior tamanho da cavidade de γ CD em relação a β CD. As forças que mantêm as moléculas de água na cavidade de γ CD diminuem¹, correspondendo a uma diminuição na temperatura de volatilização quando comparado a β CD.

A quantidade de moléculas de água na β CD depende da umidade relativa e γ CD pode apresentar 7 a 18 moléculas de água.⁴

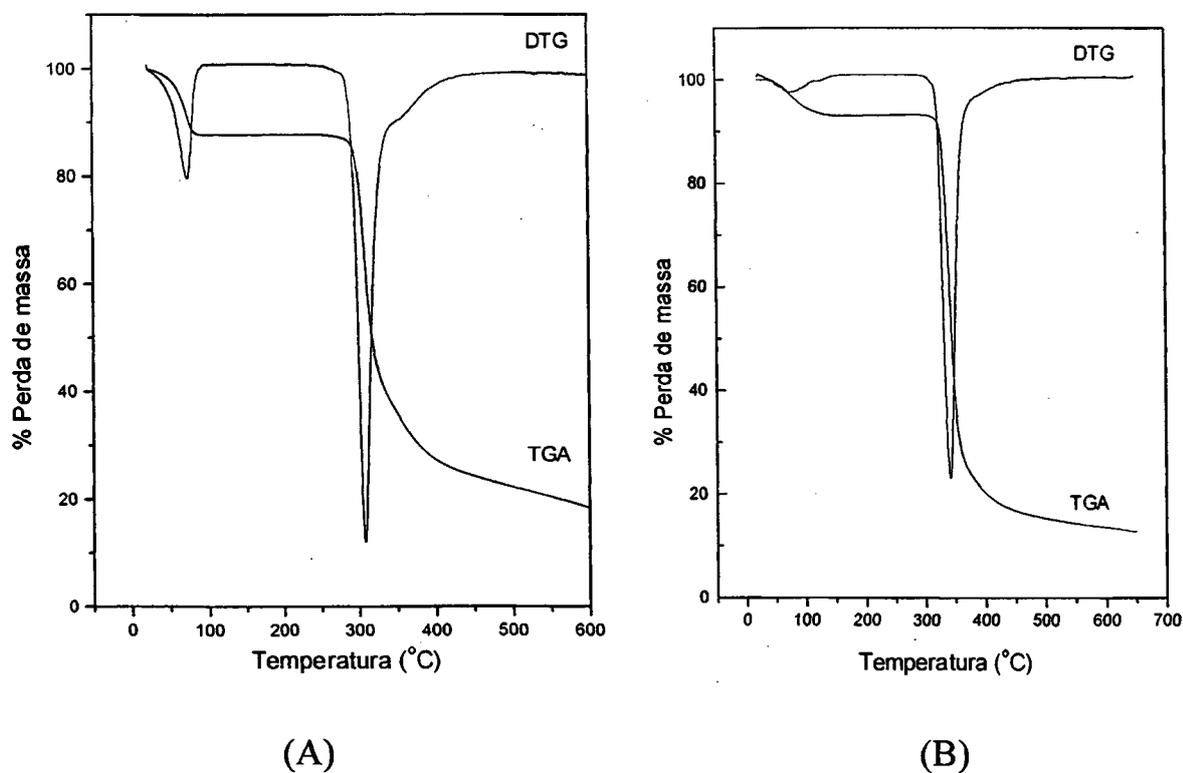


Figura 13: Termograma de β CD (A) e γ CD (B). TGA = curva obtida por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TGA. Taxa de aquecimento 10°C/min.

3.2.2.2 Decomposição térmica dos complexos de inclusão

As curvas de TGA e DTG dos complexos de inclusão com β CD, γ CD e os ácidos C_8 e C_{10} estão apresentados nas Figuras 14 – 17, as faixas de temperatura de decomposição e perda de massa calculada e experimental apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados obtidos por TGA a $10^\circ\text{C}/\text{min}$, para os complexos de inclusão β CD- C_{10} (1:1), β CD- C_8 (1:1,5), γ CDC $_{10}$ (1:1,5) e γ CDC $_8$ (1:2).

Complexos	Estágio	Faixa de temperatura de decomposição ($^\circ\text{C}$)	DTG _{min} ($^\circ\text{C}$)	Perda de massa (%)	
				Experimental	Calculado ^a
β CD- C_{10} (1:1)	1	22 – 232	93	12,18	-
	2	232 – 327	320	7,79	-
	3	327 - 637	346	71,0	-
β CD- C_8 (1:1,5)	1	25 – 135	98,3	5,74	-
	2	136 – 182	154,2	2,00	13,7
	3	182 – 260	206	2,79	-
	4	266 - 632	346	80,2	-
γ CDC $_{10}$ (1:1,5)	1	30 – 130	83,5	13,0	-
	2	134 – 283	188,9	9,61	11,0
	3	295 – 311	309,2	1,89	-
	4	316 - 650	343,4	61,0	-
γ CDC $_8$ (1:2)	1	23 – 134	90,7	14,3	-
	2	136 – 255	178,4	9,70	15,0
	3	255 – 302	281,2	2,30	-
	4	302 - 643	334,7	58,0	-

^a quantidade de ácido calculado a partir das massas utilizadas na síntese dos complexos e da porcentagem final de água presente em cada amostra.

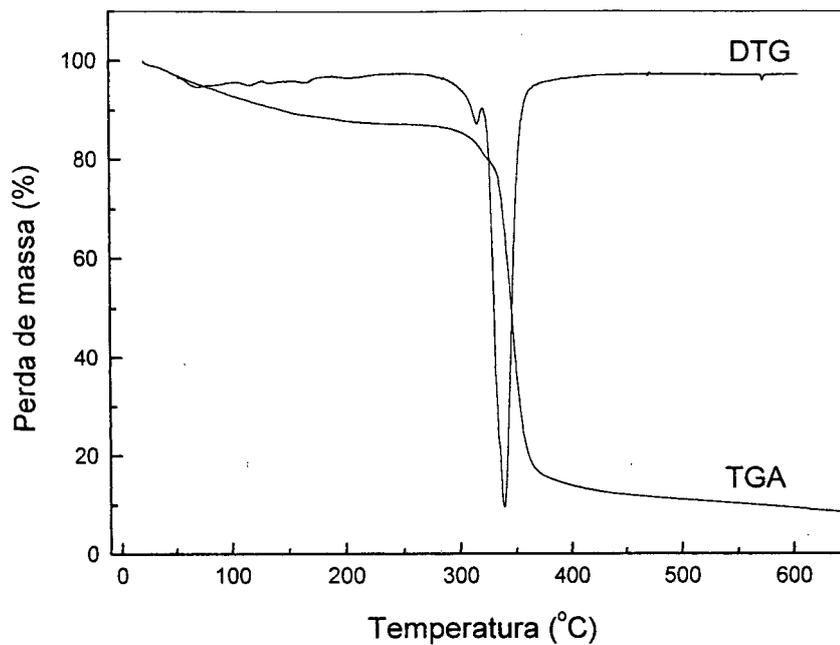


Figura 14: TGA obtido a partir da amostra β CD-C₁₀ (1:1), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG.

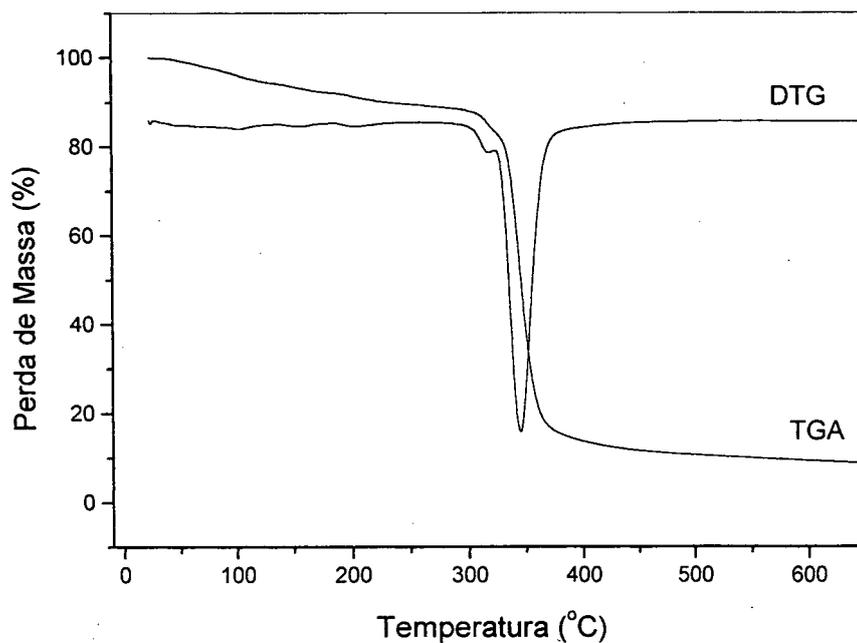


Figura 15: TGA obtido a partir da amostra β CD-C₈ (1:1,5), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG.

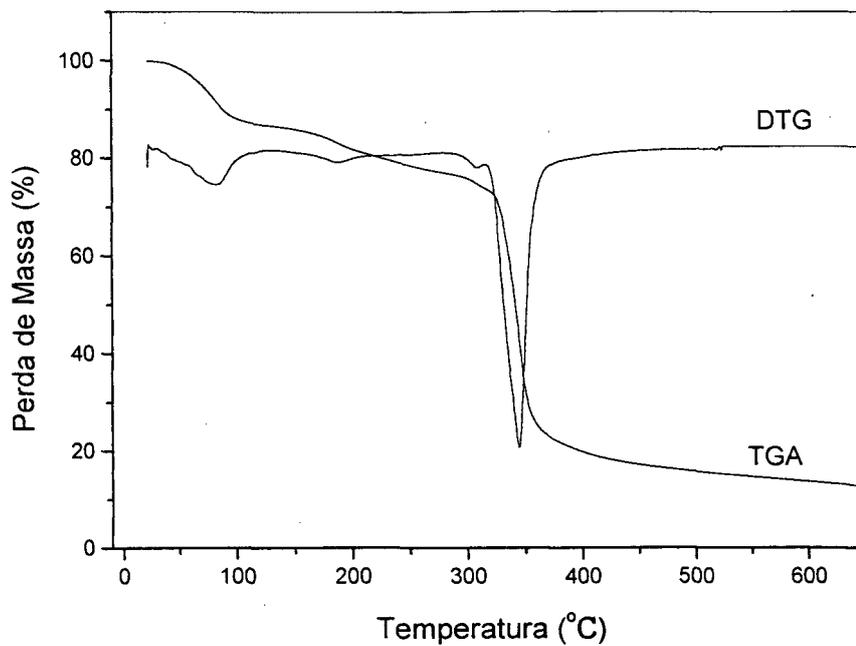


Figura 16: TGA obtido a partir da amostra γ CD-C₁₀ (1:1,5), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG.

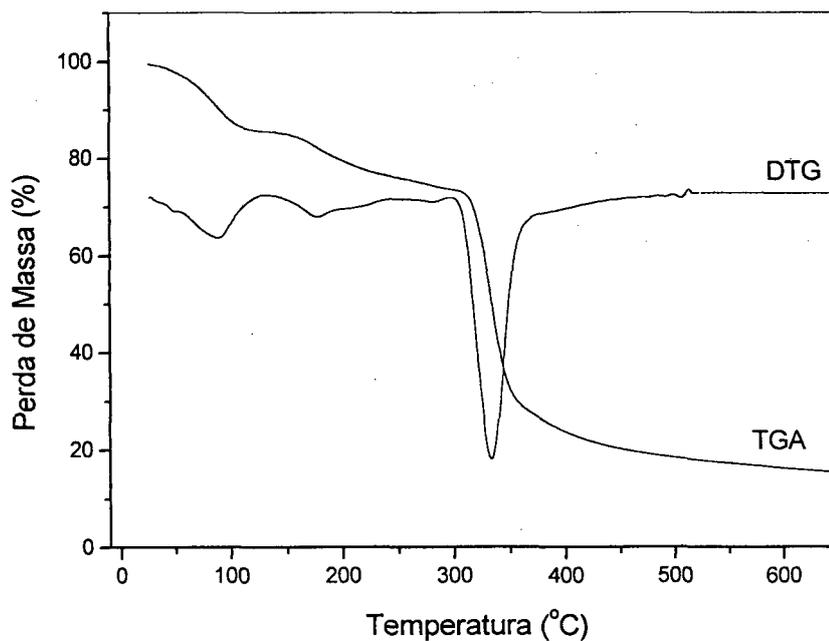


Figura 17: TGA obtido a partir da amostra γ CD-C₈ (1:2), com taxa de aquecimento 10°C/min. TG = obtido por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TG.

Avaliando o primeiro estágio de decomposição para os diferentes complexos de inclusão com β CD e γ CD, verifica-se que não houve variação significativa na temperatura de volatilização das moléculas de água, em relação as ciclodextrinas puras. No segundo estágio, inicia-se a decomposição térmica dos ácidos.

Analisando o complexo β CD- C_{10} (1:1), verifica-se que a decomposição do ácido C_{10} ocorre $232^{\circ}\text{C} - 327^{\circ}\text{C}$, com pico em 320°C e apenas 7,79% de perda de massa. Mas, a amostra contém em torno de 12% do ácido. Para saber se o restante do ácido foi decomposto abaixo de 320°C ou acima, o complexo β CD- C_{10} (1:1) foi submetido as seguintes temperaturas durante 20 minutos: 100°C , 200°C , 321°C , 350°C .

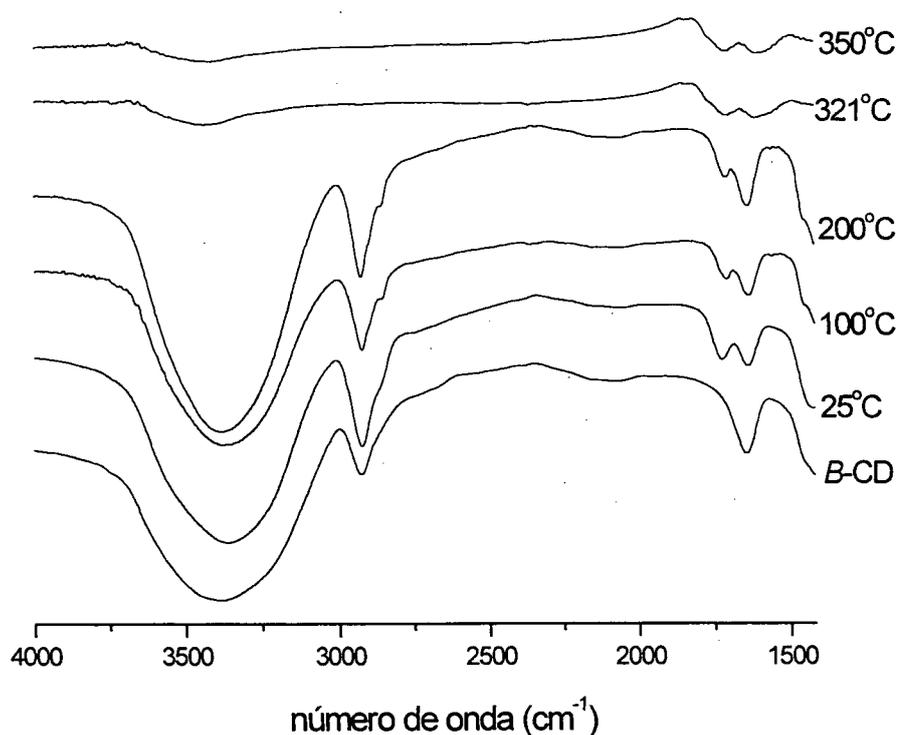


Figura 18: Sobreposição dos espectros de IV da amostra β CD- C_{10} (1:1) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr. O primeiro espectro (de baixo para cima) refere-se a β CD pura, a seguir espectros do complexo de inclusão submetido a diferentes temperaturas.

A Figura 18 mostra os espectros de infravermelho da β CD e do complexo β CD- C_{10} submetido a decomposição térmica. Os sinais em 3380 cm^{-1} referem-se ao estiramento O-H da β CD e do ácido, em 2924 cm^{-1} ocorre o sinal de estiramento de C-H, em 1712 cm^{-1} ocorre o sinal de estiramento C=O da carbonila do ácido e em 1648 cm^{-1} ocorre o sinal característico da β CD.^{13, 76} Estes mesmos sinais são observados para os complexos de inclusão discutidos a seguir.

Verifica-se que a amostra de β CD- C_{10} submetida a 100°C não apresentou variação significativa no seu espectro de IV em relação a amostra que não sofreu aquecimento (25°C). A amostra submetida ao aquecimento de 200°C mostra uma diminuição na intensidade da banda de $\nu\text{C}=\text{O}$ do ácido em relação ao sinal em 1638cm^{-1} , característico da β CD. Nas temperaturas de 321 e 350°C verifica-se a decomposição do complexo β CD- C_{10} (1:1).

Portanto, considerando os resultados dos espectros de IV, a decomposição de C_{10} ocorre em duas etapas. A primeira etapa é abaixo de 232°C e a segunda etapa, a 320°C . Isso justifica a perda de massa de $12,18\%$ na faixa de $22 - 232^\circ\text{C}$, que na realidade é o somatório do processo de volatilização da água e decomposição de C_{10} . A volatilização da água e a primeira etapa de decomposição do ácido se sobrepõem, o que não possibilitou o cálculo da porcentagem teórica de C_{10} no complexo de inclusão.

O complexo β CD- C_8 (1:1,5) apresenta 4 estágios de decomposição. No primeiro estágio ($25 - 135^\circ\text{C}$) ocorre a volatilização das moléculas de água com perda de $5,47\%$ de massa. Durante o processo de inclusão, parte das moléculas de água que estavam na cavidade da β CD são substituídas por moléculas do ácido, o que indica que diminui a porcentagem de água no complexo em relação a β CD pura.^{14, 16}

A segunda e a terceira etapa são distinguidas com dificuldade através da curva termogravimétrica na Figura 15. A porcentagem de perda de massa para estes dois estágios é de $4,79\%$. Estas etapas de decomposição referem-se a perda de C_8 . Mas, ainda restam cerca de 9% de C_8 na amostra β CD- C_8 (1:1,5). A perda do restante de C_8 inicia em 266°C e antes de completar essa etapa, inicia-se a decomposição de β CD. Portanto, esses dois processos se sobrepõem. A porcentagem de perda de massa na última etapa é de $80,2\%$,

exatamente 9% à mais em relação a perda de massa da β CD no complexo β CD- C_{10} (1:1) (71%), devido justamente a contribuição de 9% de decomposição de C_8 .

Resultados semelhantes foram observados por Yilmaz et al. nas análises de TGA para complexos de β CD e derivados do ferroceno.¹⁴ Nestes complexos de inclusão o primeiro estágio de decomposição é devido a desidratação, o segundo estágio é relativo à liberação do ferroceno e seus derivados, e a terceira etapa é devido a degradação da β CD. Em alguns destes complexos de ferroceno, a segunda e terceira etapas se sobrepõem.

Os espectros de IV do complexo β CD- C_8 (1:1,5), submetido a diferentes temperaturas de decomposição, são mostrados na Figura 19. Os espectros de IV mostram uma pequena diminuição do sinal de estiramento da carbonila do ácido quando a amostra foi submetida a 200°C de aquecimento. O restante do ácido é decomposto acima de 200°C.

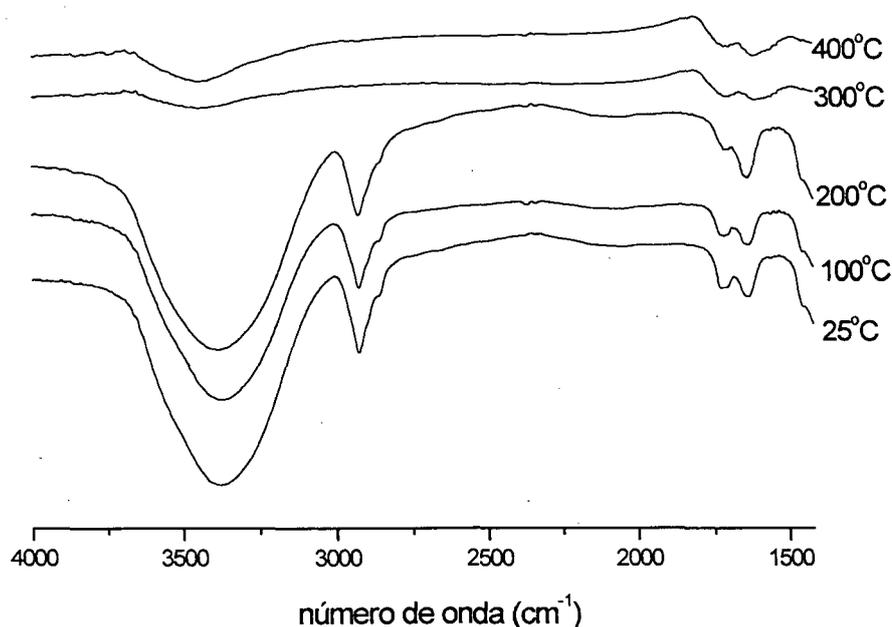


Figura 19: Sobreposição de espectros de IV para amostra β CD- C_8 (1:1,5) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr.

O complexo γ CD- C_{10} (1:1,5) apresenta quatro etapas de decomposição térmica. A primeira ocorre em 30 – 130 °C com 13% de perda de massa devido a volatilização de água. A segunda etapa (134 – 290°C) ocorre devido a perda de 9,61% de C_{10} . Observa-se um pequeno aumento na estabilidade do ácido encapsulado, visto que o ácido puro sofre

decomposição de 117°C a 243°C. O restante do ácido presente na amostra é decomposto na etapa 3 (295 a 311°C) com 1,89% de perda de massa, totalizando 11,5% de C₁₀ presente no complexo de inclusão. A quarta etapa refere-se a decomposição de βCD.

Estes resultados são confirmados pela análise de IV das amostras de γCD-C₁₀ (1:1,5) submetidas à decomposição térmica em 100°C, 190 °C, 312 °C e 360 °C (Figura 20). Estas temperaturas foram selecionadas de acordo com os picos apresentados pela DTG.

Com o aumento da temperatura ocorre diminuição do sinal de νC=O do ácido, devido sua decomposição térmica. Em 190°C ocorre diminuição significativa do sinal da carbonila, mas ainda é possível observar um ombro em 1712 cm⁻¹, indicando a presença de uma pequena quantidade de C₁₀ que permaneceu encapsulado. Em 312°C e 360°C já não se observa sinais característicos do complexo de inclusão.

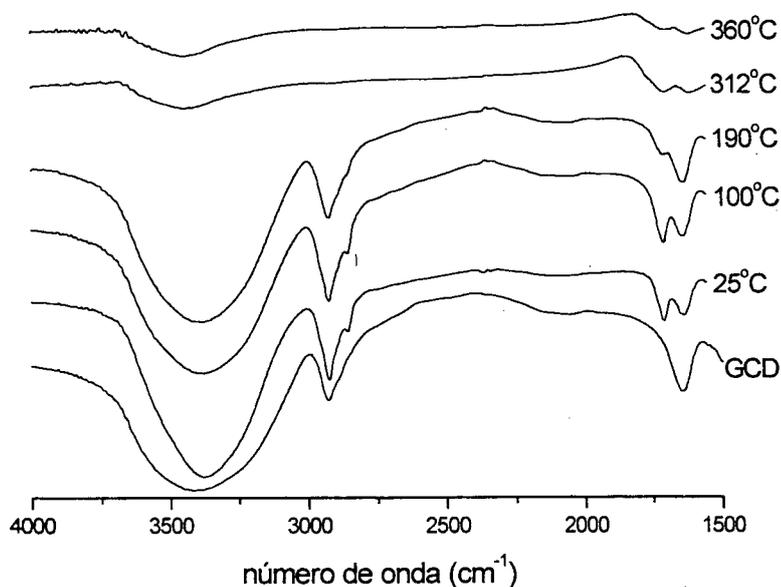


Figura 20: Sobreposição de espectros de IV para amostra γCD-C₁₀ (1:1,5) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr. O primeiro espectro (de baixo para cima) refere-se a γCD pura, a seguir espectros do complexo de inclusão submetido a diferentes temperaturas.

Na primeira etapa de decomposição do complexo γCD-C₈ (1:2) ocorre a volatilização de moléculas de água (Figura 17). A primeira parte do ácido C₈ decompõe no

intervalo de 136 a 255°C, na mesma faixa de decomposição do ácido puro. A segunda parte do ácido decompõe entre 255-302°C. Estas duas etapas representam 12% de perda de massa, o restante do ácido (3%) decompõe acima de 302°C, sobrepondo-se à decomposição de γ CD.

A Figura 21 mostra os espectros de IV para o complexo de inclusão γ CD-C₈ (1:2) submetido a diferentes temperaturas de decomposição.

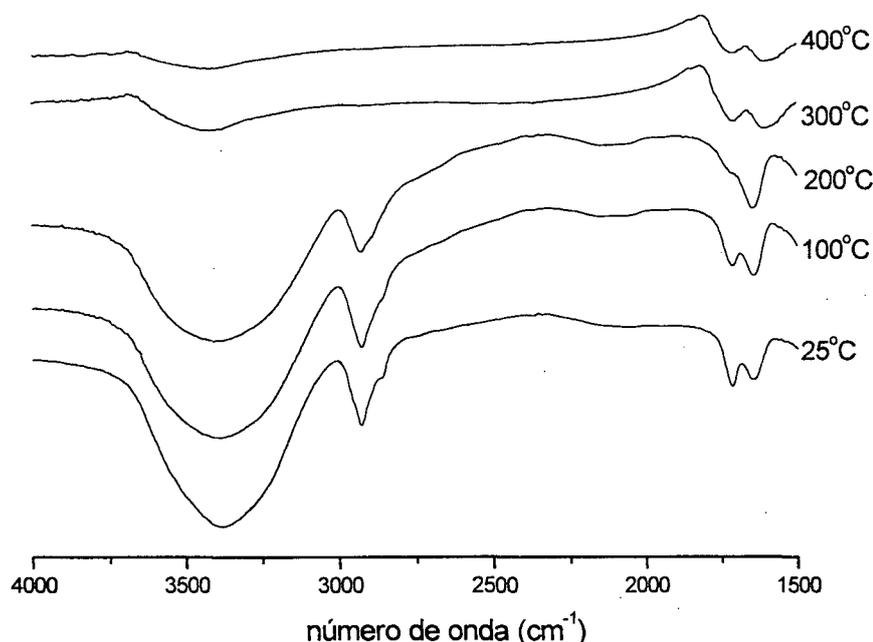


Figura 21: Sobreposição de espectros de IV para amostra γ CD-C₈ (1:2) submetida a diferentes temperaturas de decomposição, obtido em pastilha de KBr.

De forma análoga aos sistemas anteriores, ocorre diminuição do sinal de ν C=O de C₈ na etapa de decomposição descrita através da análise de TGA. Verifica-se que na segunda etapa de decomposição (200°C) o sinal da carbonila diminui muito de intensidade, indicando que a maior parte do ácido foi decomposto até essa temperatura.

3.2.2.3 Correlação dos resultados de Análise Termogravimétrica

Através da Tabela 6 é possível fazer uma comparação da estabilidade térmica dos ácidos encapsulados nas diferentes ciclodextrinas estudadas. Os ácidos C₈ e C₁₀ adquiriram

uma maior estabilidade térmica quando encapsulados na cavidade de β CD comparado a γ CD. Cerca de 65% do ácido C_{10} e C_8 permaneceram encapsulados na cavidade de β CD até 232 e 266°C, respectivamente. Enquanto que apenas 20-30% permaneceram na cavidade de γ CD até 295 e 255°C. Portanto, β CD apresentou-se como um eficiente agente encapsulante para os ácidos estudados, aumentando sua estabilidade térmica em relação aos ácidos puros (Tabela 4, p. 32).

Tabela 6: Correlação entre as decomposições térmicas dos ácidos C_{10} e C_8 encapsulados em β CD e γ CD, resultados obtidos por TGA, 10°C/min.

Complexo	Faixa de temperatura analisada (°C)	% total de perda do ácido ^a
β CDC ₁₀	até 232	35
β CDC ₈	até 260	35
γ CDC ₁₀	283	86
γ CDC ₈	255	65

^a na faixa de temperatura mencionada.

Os resultados de TGA mostram que a decomposição térmica dos complexos de inclusão estudados ocorrem em diferentes estágios. Isto pode ser interpretado pela formação de complexos de inclusão com diferentes estequiometrias, consequentemente com diferentes estabilidades térmicas.¹³

3.3 Avaliação da influência da β CD no processo de secagem do leite de cabra em pó por *spray dryer*

No processo de secagem do leite de cabra por *spray dryer*, a amostra é submetida a temperaturas de 180 a 185 °C, o que pode causar decomposição térmica de alguns de seus componentes.

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a influência do agente encapsulante β CD sobre a qualidade do leite de cabra submetido ao processo de secagem por *spray dryer*. Como os AGL (ácidos graxos livres) são os principais compostos responsáveis pelo odor e sabor

característicos do leite de cabra, tomou-se o ácido C_8 como referência para comparar as amostras de leite em pó com e sem a adição do agente encapsulante.

As amostras de leite de cabra em pó puras e com adição de 0,60 % de β CD apresentaram rendimento de secagem de 9,57 % (taxa de perda de 4,28%) e 10,59 % (taxa de perda 0,04%), respectivamente.

A Figura 22 mostra os resultados de perda de massa para amostra de leite de cabra em pó na faixa de 20 a 750°C. O termograma do leite em pó com adição de β CD não apresentou diferença significativa. O sinal em 66°C ocorre devido a volatilização de água presente na amostra, o sinal em 218°C refere-se a decomposição térmica da parte lipídica e acima de 300°C inicia-se a decomposição térmica de proteínas e glicídeos.¹⁸

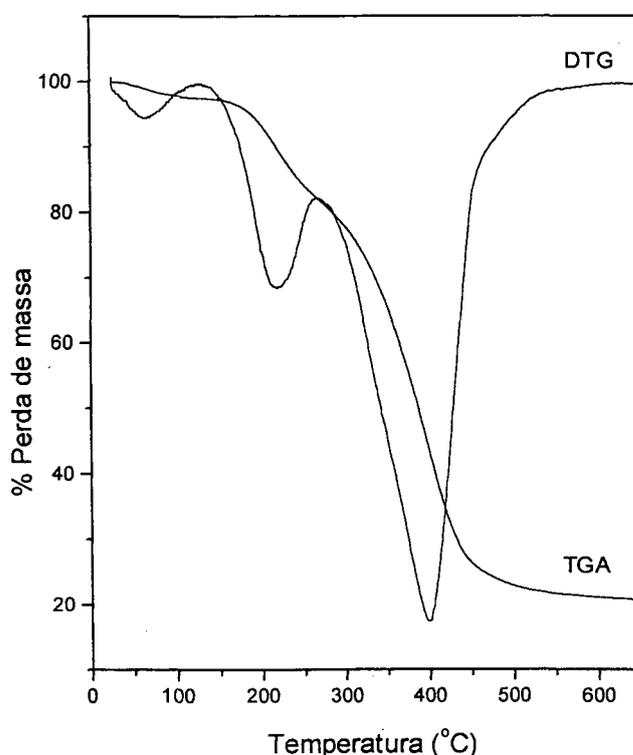


Figura 22: TGA obtido a partir da amostra de leite de cabra seco por *spray dryer*, com taxa de aquecimento 10°C/min, TGA = análise termogravimétrica, DTG = derivada da TGA

A Tabela 7 mostra que o ácido graxo C_8 puro, inicia sua decomposição térmica abaixo de 180°C (temperatura de secagem do leite de cabra).

Tabela 7: Decomposição térmica do leite de cabra em pó e ácido C_8 puro. Taxa de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

Amostra	Faixa de decomposição ($^\circ\text{C}$)	Pico ($^\circ\text{C}$)	% de perda de massa
Leite de cabra em pó	27 – 130	66	2,3
	130 – 265	218	15,0
	265 - 738	398	62,3
C_8	74,7 - 225	196	99,4

Analisando a Figura 23, verifica-se que em 180°C já ocorreu perda de aproximadamente 40% de C_8 .

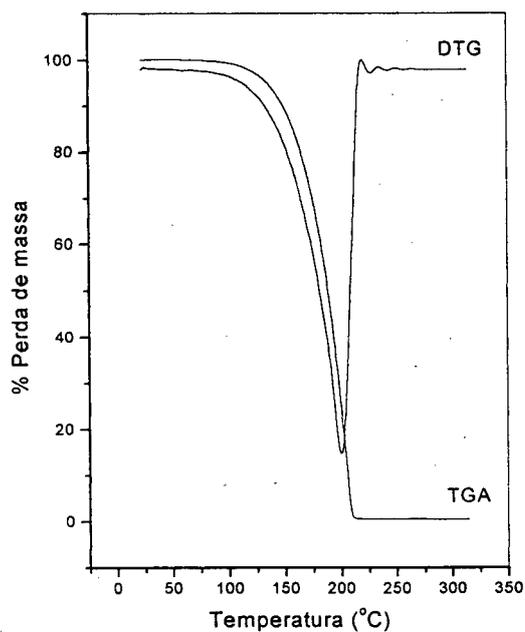


Figura 23: Termograma de C_8 . TGA = curva obtida por análise termogravimétrica, DTG = derivada da TGA. Taxa de aquecimento $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

Portanto, a análise térmica do ácido graxo C_8 puro indica a possibilidade de decomposição térmica de sua estrutura no momento da secagem do leite de cabra por *spray dryer*. Estudo semelhante pode ser realizado para outras faixas de temperatura, dependendo do tratamento térmico aplicado para obter determinado produto.

O aumento do rendimento na secagem do leite de cabra contendo β CD, pode ser justificado pela formação de complexos de inclusão entre β CD e a parte lipídica do leite. Como visto nos estudos *in vitro* (itens 3.2.2.), os complexos de inclusão entre AGL e β CD apresentam maior estabilidade térmica o que pode dificultar a perda dos AGL's presentes no leite de cabra adicionado de β CD.

A Figura 24 mostra a sobreposição dos cromatogramas da amostra de leite de cabra em pó adicionada de β CD e a amostra padrão contendo os ácidos C_8 e C_{10} e a Figura 25 mostra a sobreposição dos cromatogramas da amostra de leite de cabra em pó e do padrão.

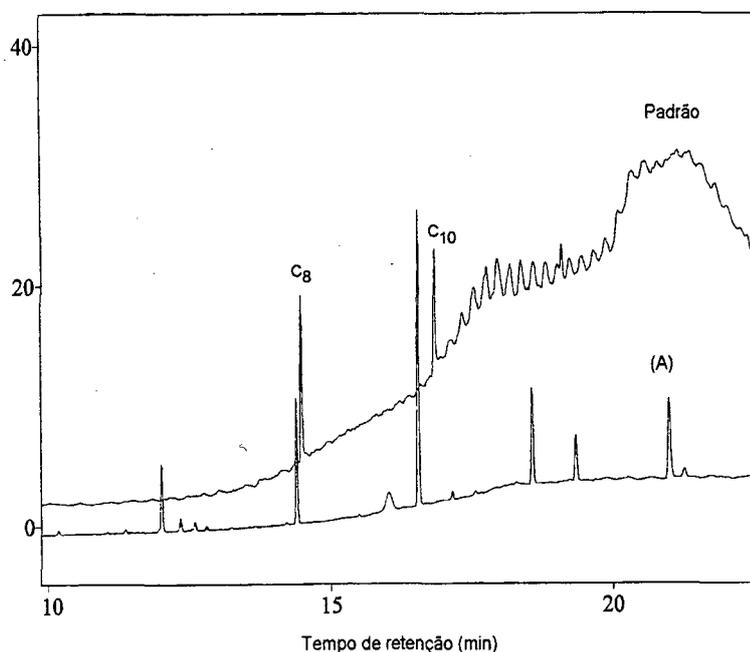


Figura 24: Sobreposição dos cromatogramas da amostra padrão contendo os ácidos C_{10} e C_8 (Padrão) e do extrato de AGL obtido a partir da amostra de leite de cabra em pó adicionada de β CD (A).

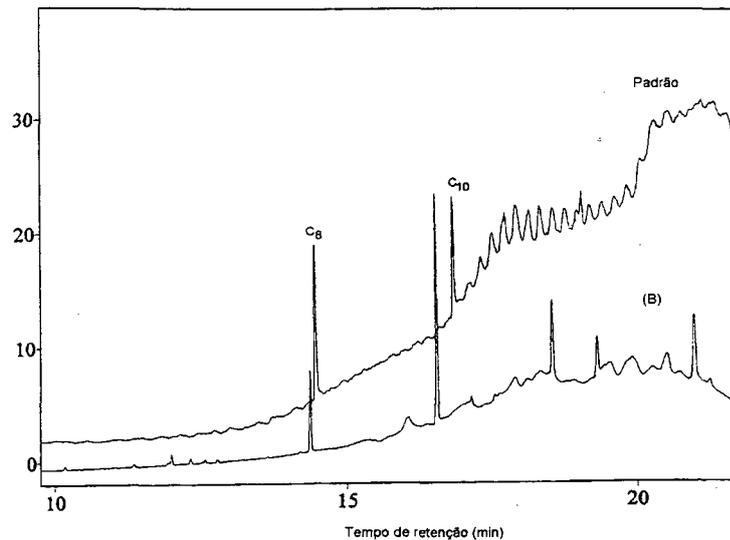


Figura 25: Sobreposição de cromatogramas da amostra padrão contendo os ácidos C_{10} e C_8 (Padrão) e do extrato de AGL obtido a partir da amostra de leite de cabra em pó (B)

Verifica-se que existe uma diferença no tempo de retenção de C_{10} no padrão e nas amostras de leite de cabra. É provável que fatores como o longo intervalo de tempo entre cada uma das análises (até 3 semanas) tenha contribuído para essa divergência, além da possibilidade do sinal observado nas amostras de leite de cabra ser devido a algum ácido ramificado com tempo de retenção semelhante ao ácido C_{10} . Mas, esta última possibilidade é remota, pois relata-se que a quantidade de ácidos graxos lineares presentes no leite de cabra é maior que ácidos ramificados. Experimentos posteriores deverão ser realizados para esclarecer esta dúvida. Portanto, somente a área do pico de C_8 foi considerado para comparar as duas amostras de leite de cabra com e sem β CD.

Através destes cromatogramas verificou-se que a quantidade de C_8 é 30% menor no leite de cabra em pó sem β CD em relação a amostra que continha este aditivo.

Esse resultado mostra que β CD influencia no processo de secagem do leite de cabra no sentido de diminuir a decomposição térmica dos ácidos graxos livres devido sua encapsulação. Concordando com os estudos *in vitro*, que comprovaram o aumento da estabilidade térmica dos complexos de β CD.

3.3.1 Energia envolvida no processo de decomposição de β CD

As curvas de TGA da β CD pura (Figura 13A) apresentam as seguintes etapas de decomposição térmica:

- 1) $\beta\text{CD}\cdot x\text{H}_2\text{O}_{(s)} \rightarrow \beta\text{CD}_{(s)} + x\text{H}_2\text{O}_{(v)}$
- 2) decomposição de β CD

A decomposição térmica do complexo βCDC_{10} ocorre nas seguintes etapas:

- 1) $\beta\text{CDC}_{10}\cdot x\text{H}_2\text{O} \rightarrow \beta\text{CDC}_{10(s)} + x\text{H}_2\text{O}_{(v)}$
- 2) $\beta\text{CDC}_{10(s)} \rightarrow \beta\text{CD} + \text{C}_{10}$
- 3) decomposição de β CD

Neste estudo foi avaliada a energia envolvida na decomposição térmica de β CD pura e complexada com C_{10} . O método de Ozawa foi aplicado para a faixa de temperatura acima de 320°C , onde inicia-se a decomposição de β CD.

A Figura 26 mostra a variação na energia de ativação em função da fração de massa decomposta para o processo de decomposição da β CD e βCDC_{10} . Na faixa de temperatura estudada, o ácido não deve estar mais presente no complexo βCDC_{10} , porém, a energia envolvida na decomposição da β CD mostra valores bem menores em relação a β CD pura. Este comportamento sugere, primeiramente, a possibilidade de que uma pequena quantidade de ácido ainda esteja presente na cavidade da β CD acima de 320°C , embora os resultados anteriores indiquem o contrário. Provavelmente, uma explicação mais plausível, é a mudança na conformação adquirida pela β CD, que após a saída do ácido, torna-se mais instável envolvendo, conseqüentemente, menos energia para sua decomposição.

Portanto, esse estudo permite dizer que a encapsulação de C_{10} proporciona, provavelmente, mudanças na conformação da β CD, refletindo-se na quantidade de energia envolvida na sua decomposição.

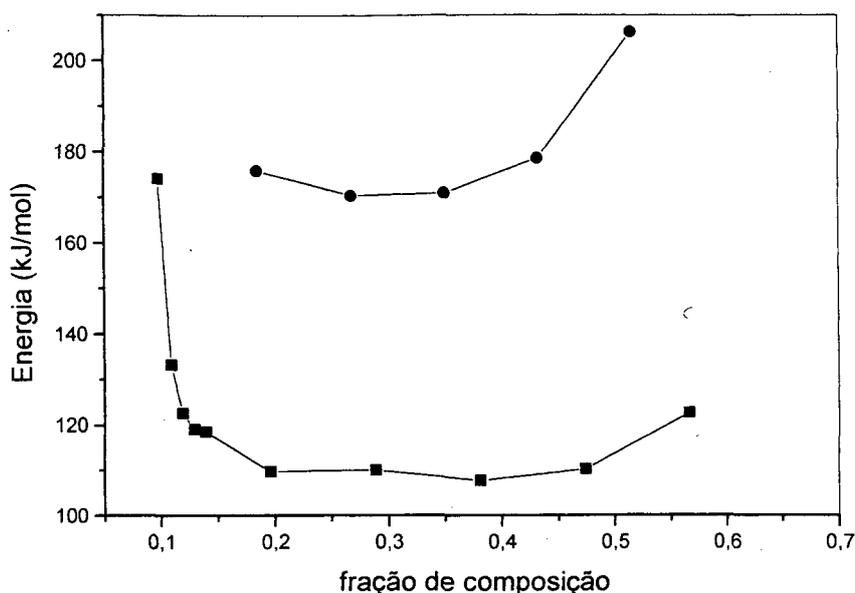


Figura 26: Variação da energia envolvida no processo de decomposição térmica de βCD no sistema da βCD pura (●) e βCDC₁₀ (■). Obtido através da aplicação do método de Ozawa nas curvas de TGA para temperaturas acima de 320°C.

3.4 Caracterização por RMN¹H

Na presente discussão, os prótons H₃ e H₅ da ciclodextrina e prótons da cadeia alquílica dos ácidos serão analisados com mais atenção em relação aos demais prótons, visto que eles dão informações à respeito da profundidade da inclusão de um substrato. Os prótons H₃ e H₅ estão localizados na cavidade das ciclodextrinas.²⁶ A numeração dada aos prótons da ciclodextrina está apresentada na página 1, Figura 1. A Figura 27 mostra a identificação dada aos prótons dos ácidos estudados.

A Tabela 8 resume a variação nos deslocamentos químicos observados para os complexos de inclusão formados entre β- e γ-CD com os ácidos C₈ e C₁₀. A discussão será feita primeiramente para cada sistema de ciclodextrina, e no final, será feita uma correlação de todos os dados.

Tabela 8: Variação no deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{puro}} - \delta_{\text{complexo}}$) para diferentes complexos de inclusão entre β - e γ -CD com os ácidos C_8 e C_{10} . Em D_2O , $pD \geq 10,5$ com adição de KOD e TMS como referência. Os valores em parênteses referem-se a proporção molar de CD:ácido.

Próton	$\Delta\delta$ (ppm)			
	β CD- C_8 (1:1,5)	β CD- C_{10} (1:1)	γ CD- C_8 (1:2)	γ CD- C_{10} (1:1,5)
H ₁	0,04	0	0,07	0,02
H ₂	-0,05	0,01	0,07	0,03
H ₃	0,06	0,06	0,04	0,03
H ₄	0,05	0	0,09	0,04
H ₅	0,06	0,11	0,02	0,01
H ₆	0,02	0,01	0,02	0,01
CH ₃ (A)	0	-0,11	0,02	-0,07
(CH ₂) _n (B)	0	-0,09	0,02	-0,06
CH ₂ (C)	0	-0,15	0,02	-0,07
CH ₂ (D)	0,01	-0,09	0,02	-0,07

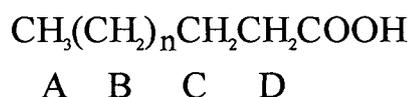


Figura 27: Estrutura esquemática de um ácido carboxílico linear e identificação dos prótons, onde n representa o número de grupos metilênicos.

3.4.1 Sistema com β -CD

Para o sistema β CD- C_{10} verificou-se que os prótons H₅ e H₃ sofreram deslocamento químico quando ocorreu encapsulação do ácido C_{10} . O pronunciado deslocamento de H₅ indica que a encapsulação foi profunda, conforme discutido no item 1.2.2. Os sinais da cadeia alquílica do ácido também apresentaram significativo deslocamento químico após encapsulação. Isso ocorre devido a mudança na polaridade do meio. O ácido livre

desprotonado encontra-se num meio polar (D_2O), porém quando ocorre a encapsulação o meio se torna mais apolar dentro da cavidade da ciclodextrina, causando um deslocamento químico dos seus prótons para campo mais baixo.

Os resultados de RMN^1H informam o modo de inclusão do hóspede e também a força da interação ciclodextrina-substrato. É importante observar que o complexo está em equilíbrio com sua forma dissociada, portanto os sinais observados no espectro representam todas as formas desse equilíbrio. Ou seja, a baixa variação no deslocamento químico dos prótons do hóspede ou da ciclodextrina, após a encapsulação não indica, necessariamente, que não tenha ocorrido inclusão, mas que a contribuição da espécie dissociada pode ser grande.

Tal comportamento foi observado para o sistema $\beta CD-C_8$. Os resultados de RMN^1H não deixam claro se o baixo deslocamento químico observado é contribuição da baixa taxa de associação ciclodextrina-hóspede, tornando necessário a determinação da constante de associação entre as ciclodextrinas e os ácidos estudados.

Um fator muito importante a ser considerado nestes sistemas é o pD no qual as análises foram realizadas. Em $pD \geq 10,5$ os ácidos analisados encontram-se desprotonados, diminuindo a hidrofobicidade do substrato e, conseqüentemente, diminuindo a tendência do ácido em se alojar na cavidade da ciclodextrina. Por exemplo, espectros de RMN^1H do sistema $\beta CD-C_8$ em $pD = 4$ revelam maior deslocamento químico para os prótons H_3 e H_5 em relação aos deslocamentos observados para o sistema desprotonado. Os valores de $\Delta\delta$ para H_3 e H_5 são 0,08 e 0,11 ppm, respectivamente.

As Figuras 28 e 29 mostram os espectros de RMN^1H da βCD e do complexo $\beta CD-C_{10}$, respectivamente. As regiões do espectro onde ocorrem os prótons da βCD e do ácido foram ampliadas para melhor visualização dos sinais.

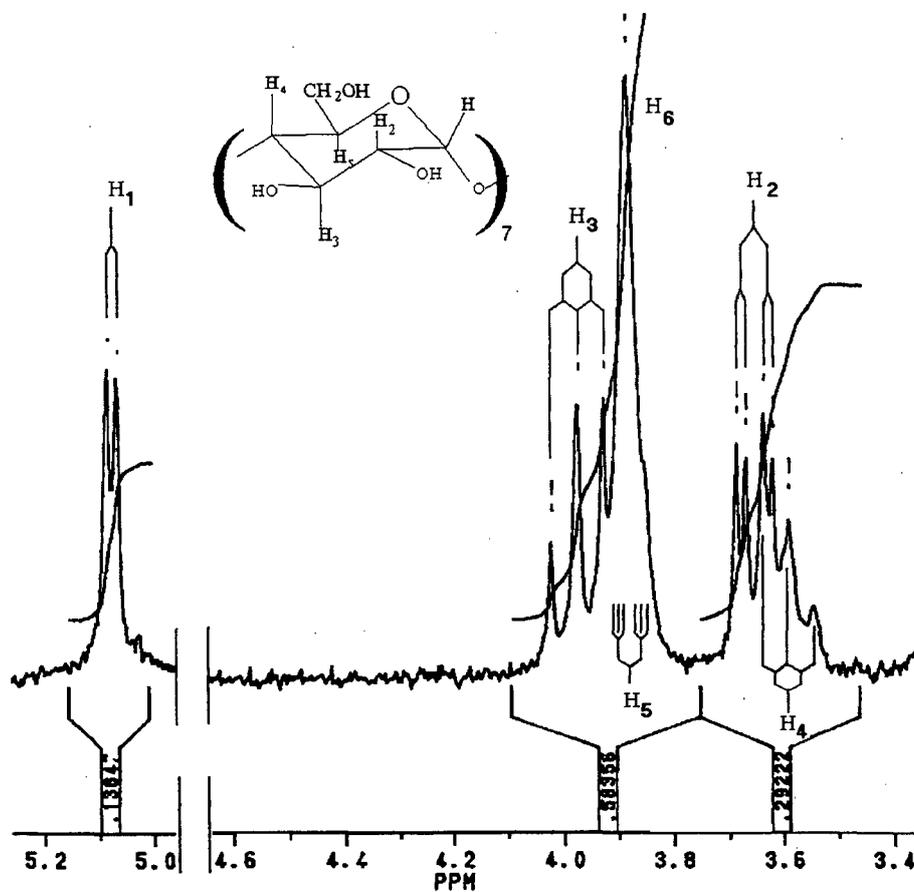


Figura 28: Espectro de RMN^1H de β -CD pura em D_2O , TMS como referência

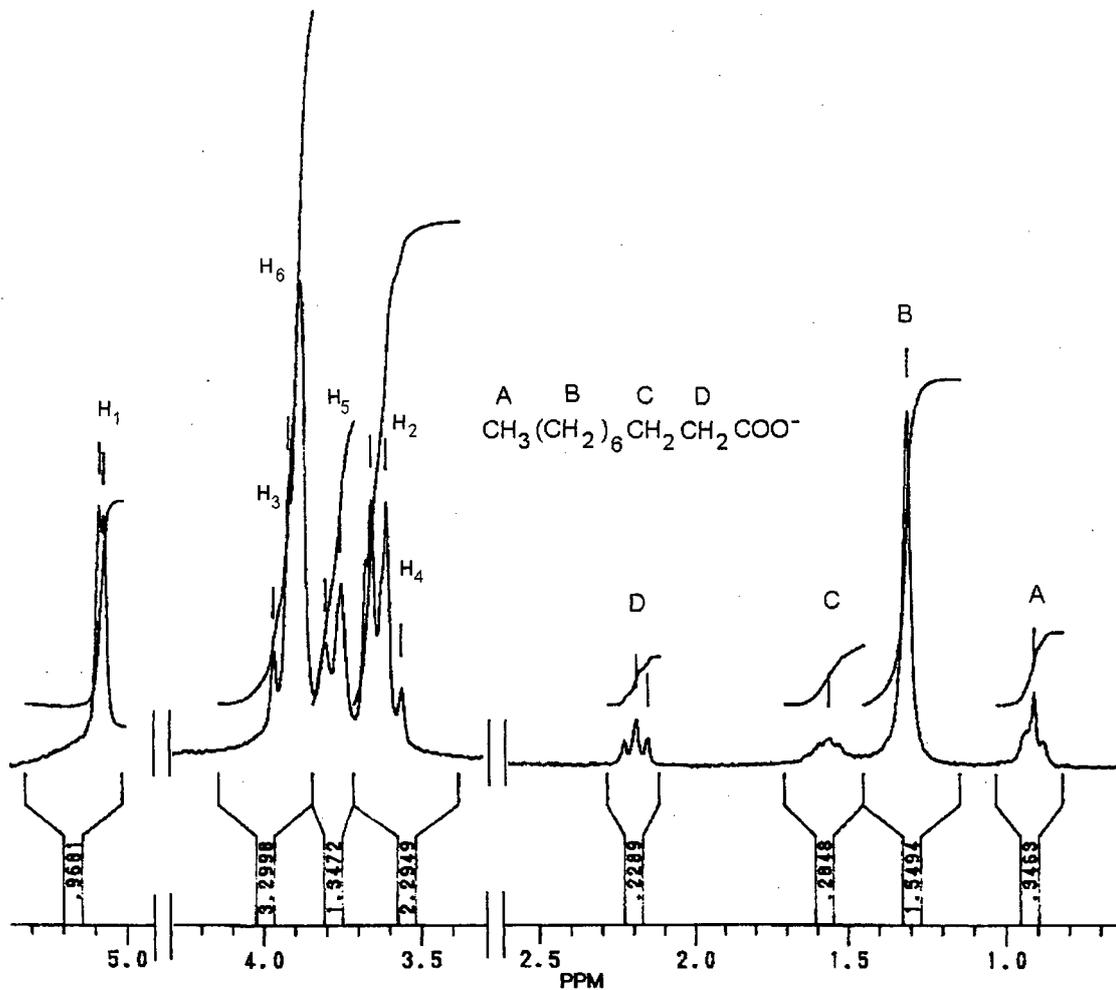


Figura 29: Espectro de RMN^1H de β -CD- C_{10} em D_2O , TMS como referência, $\text{pD}=10,4$

A Figura 30 mostra a variação no deslocamento químico para os prótons de β -CD em complexos com diferentes quantidades de C_{10} . Verifica-se máxima variação para o sistema 1:1.

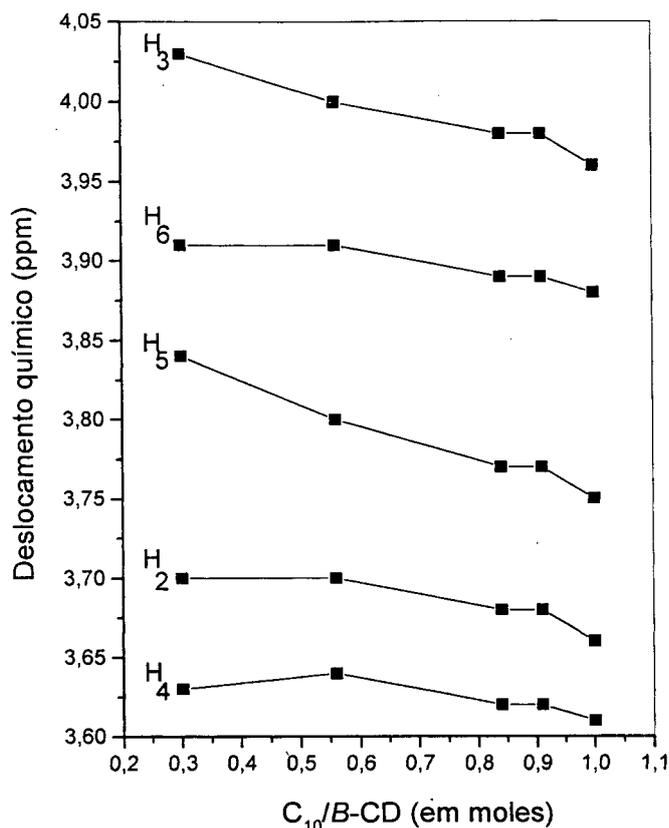


Figura 30: Variação do deslocamento químico dos prótons de β -CD em função de diferentes quantidades de C_{10} .

3.4.2 Sistema com γ -CD

Neste sistema verifica-se pouca variação no deslocamento químico tanto dos prótons da cavidade da γ -CD como dos prótons da cadeia alquílica dos ácidos C_8 e C_{10} . A γ -CD apresenta maior diâmetro de cavidade em relação a β -CD, essa característica faz com que o substrato tenha maior facilidade em entrar e sair da cavidade, diminuindo sua associação.

3.4.3 Correlação dos resultados de RMN¹H

Os resultados de RMN¹H mostram que o tamanho da cadeia alquílica do ácido influencia na profundidade da inclusão. Isso é observado na diferença do deslocamento químico sofrido pelos prótons H₃ e H₅ no sistema β CD- C_{10} . O deslocamento químico

observado nos prótons deste complexo indicam que sua associação é mais forte que os demais sistemas. Portanto, os resultados mostram que o estudo da constante de associação se faz necessário para confirmar a formação do complexo de inclusão em solução.

3.5 Determinação das constantes de associação

A determinação das constantes de associação entre as ciclodextrinas estudadas e os ácidos graxos dão informações a respeito da força de complexação. Essas constantes são afetadas por efeitos estéricos, hidrofobicidade e solvente.

Métodos como tensão superficial e titulação potenciométrica foram testados. A tensão superficial exige grande quantidade de ácido e um tempo de equilíbrio relativamente alto (4 horas para cada amostra) e aproximadamente 20-30 amostras para obtenção de uma curva, tornando o método pouco viável. Os resultados de titulação potenciométrica não foram positivos, pois não se observou variação significativa nos pK_a 's dos ácidos livres ou encapsulados, requisito necessário para utilização deste método.

No presente estudo, utilizou-se o método espectrofotométrico competitivo, sendo que o agente cromofórico empregado foi a fenolftaleína. A determinação da associação CD/fenolftaleína é um estudo secundário para que seja possível determinar as constantes de associação entre os ácidos graxos C_8 , C_{10} com β CD e γ CD.

3.5.1 Sistema β -CD/fenolftaleína e γ -CD/fenolftaleína

Inicialmente determinou-se a constante de associação entre a ciclodextrina e fenolftaleína. Este estudo foi realizado acompanhando a diminuição da absorvância da fenolftaleína (550 nm) em função da adição de diferentes concentrações de ciclodextrina. A equação abaixo define o equilíbrio entre CD e fenolftaleína, CD representa β - ou γ -ciclodextrina e F representa a fenolftaleína.



A Figura 31 ilustra o decréscimo da absorvância em 550 nm com a adição de β CD. O mesmo comportamento é observado com a adição de γ CD. O experimento foi realizado em pH 10,5, pois esta faixa de pH garante a espécie desprotonada que dá a coloração púrpura à fenolftaleína.

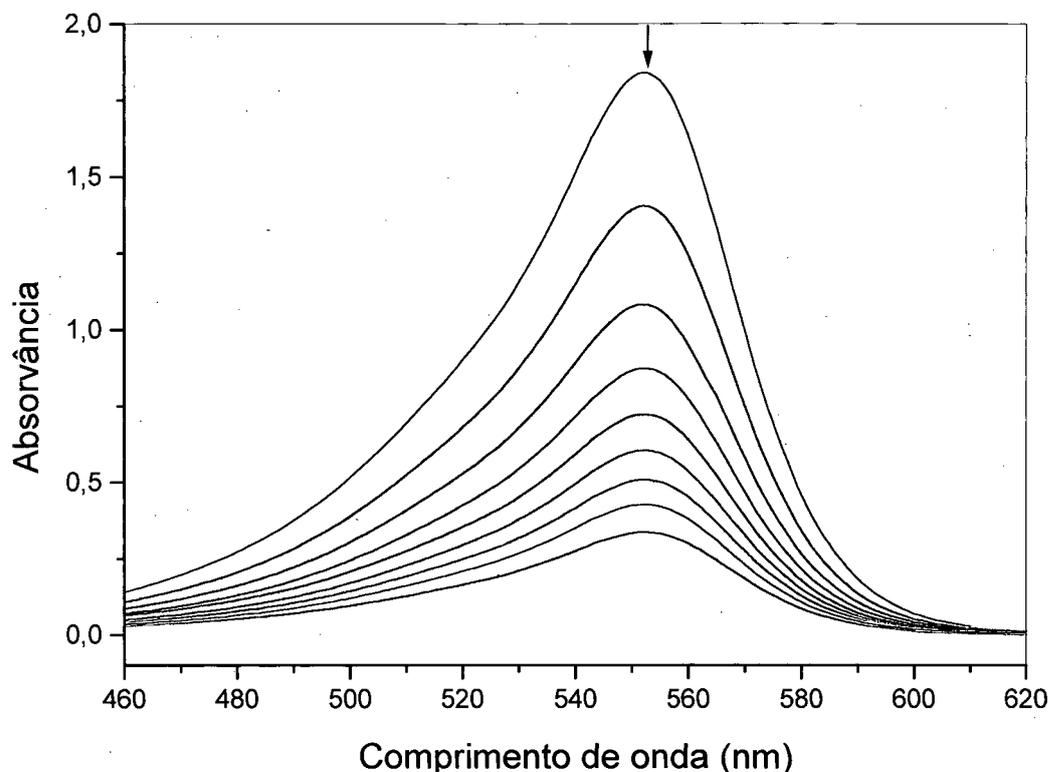


Figura 31: Sobreposição de espectros de UV-Vis para o sistema β CD/Fenolftaleína, solução tampão pH 10,5 ($\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$), 2 % de etanol. De cima para baixo $[\beta\text{CD}]$: 0, 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 6×10^{-5} , 8×10^{-5} , 10×10^{-5} , $12,5 \times 10^{-5}$, 15×10^{-5} , 20×10^{-5} M.

Tanto a β CD como a γ CD promovem uma diminuição significativa da coloração da fenolftaleína. Isso ocorre provavelmente devido à encapsulação de um dos anéis fenólicos e formação de ligação de hidrogênio com o grupo carboxílico da fenolftaleína.

A Tabela 9 mostra as constantes de associação dos sistemas β CD-F e γ CD-F.

Tabela 9: Constantes de associação entre β -, γ -ciclodextrinas e fenolftaleína, a 25°C, solução tampão pH 10,5 (NaHCO₃/NaOH), 2 % de etanol, [F] = 4 x 10⁻⁵ M.

Sistema	^c K _{CDF} = [CDF] / [CD][F]		
	Este trabalho	Literatura (ref. 34) ^a	Literatura (ref. 31) ^b
β CD-F	(1,209 ± 0,16) x 10 ⁴	(3,1 ± 0,3) x 10 ⁴	(2,5 ± 0,3) x 10 ⁴
γ CD-F	(2,02 ± 0,14) x 10 ³	-	-

^a obtido por método potenciométrico e espectrofotométrico, o solvente foi 35 %(v/v) etanol/água

^b obtido por método espectrofotométrico, em soluções contendo 0,04 % de etanol, e considerou-se que a espécie CDF não absorve.

^c definido pela equação 2, p. 18.

O valor obtido para K _{β CD-F} está na mesma ordem de grandeza em relação aos valores apresentados na literatura. A divergência apresentada pode estar relacionada aos diferentes métodos utilizados e às porcentagens de etanol empregado, que pode competir com a cavidade.

O valor de K _{γ CD-F} é menor em relação ao valor de K _{β CD-F}, isso revela a importância do tamanho da cavidade da ciclodextrina. A cavidade da γ CD é maior que a cavidade da β CD e, considerando os valores das constantes de associação, pode-se concluir que β CD apresenta um tamanho de cavidade mais adequado para encapsular a fenolftaleína.

3.5.2 Associação entre β CD, γ CD com os ácidos C₁₀ e C₈

Neste estudo teve-se como objetivo determinar a constante de associação entre as ciclodextrinas β CD e γ CD com os ácidos C₈ e C₁₀, estudar a influência do tamanho da cavidade da ciclodextrina e o tamanho da cadeia alquílica do ácido sobre a constante de associação, K_{CDA}.

Neste sistema ocorrem dois equilíbrios: 1) dissociação da fenolftaleína da cavidade da ciclodextrina; 2) associação do ácido graxo à cavidade. Tanto a fenolftaleína livre quanto a complexada absorvem radiação. Portanto, o equilíbrio de complexação competitiva é:



onde A representa o hóspede, ácido graxo livre, e CDA, o complexo de inclusão entre o ácido graxo e ciclodextrina.

O valor de $\Delta\epsilon$ encontrado para o sistema β CD-F foi $48.300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Os valores das constantes de associação foram obtidos para sistemas 1:1 (CD:ácido). A possibilidade de formar espécies 2:1 é eliminada pois, tem-se relatado que somente cadeias alquílicas com mais de 16 átomos de carbono podem formar esta espécie em solução.³¹

A Figura 32 mostra o aumento da absorvância da fenolftaleína a medida que o ácido C_{10} é adicionado ao sistema β CD/fenolftaleína. Neste sistema ocorre a encapsulação do ácido C_{10} pela cavidade da β CD e a dissociação da fenolftaleína com consequente aumento da absorvância da solução. Este mesmo comportamento foi observado para o sistema β CD- C_8 .

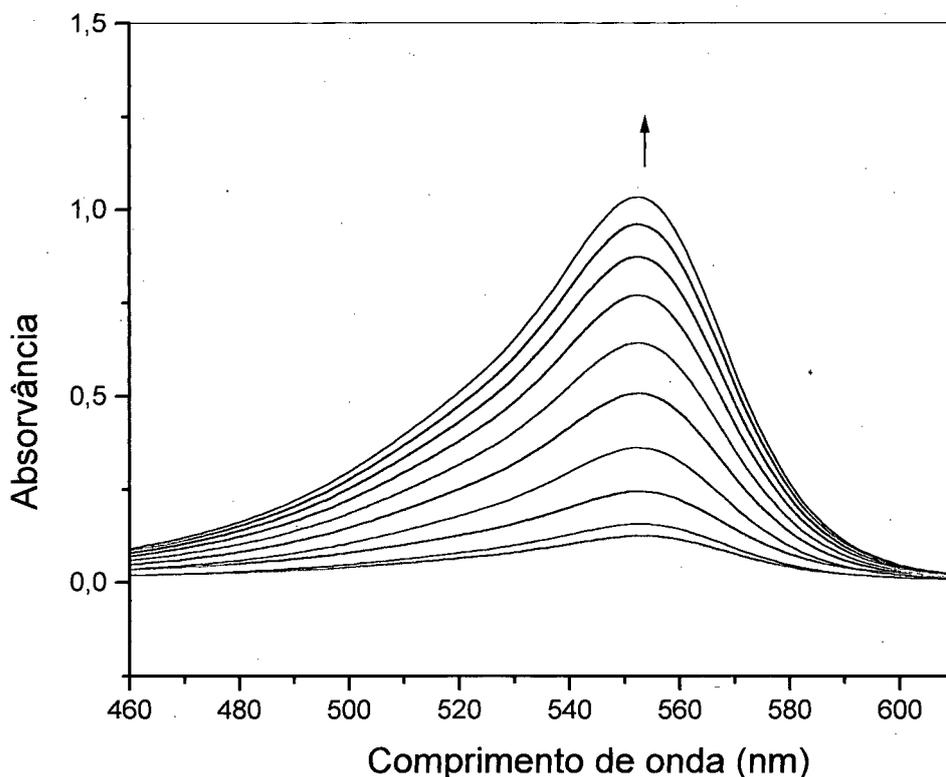


Figura 32: Sobreposição de espectros de UV-Vis para o sistema β CD- C_{10} , obtido pelo método competitivo com fenolftaleína ($[F] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\beta\text{CD}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$). Solução tampão pH 10,5 ($\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$), 2 % de etanol. As curvas referem-se a soluções de β CD-F com adição de diferentes concentrações de C_{10} : 0, $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ – $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ (de baixo para cima).

A Figura 33 mostra o resultado obtido com a aplicação da equação 18 (p. 21) aos dados espectrofotométricos. Os resultados obtidos obedecem a equação de Connors para sistemas 1:1, o coeficiente de correlação, R, foi 0,9998.

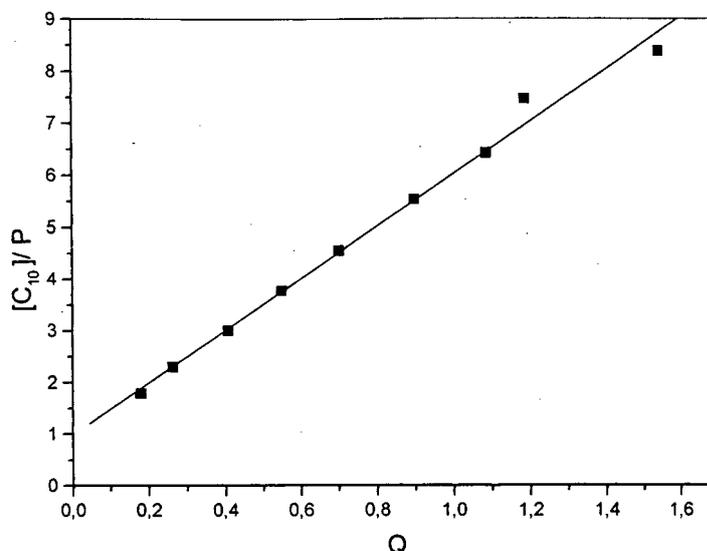


Figura 33: Gráfico obtido a partir dos dados do sistema β CD- C_{10} , pelo método espectrofotométrico competitivo com fenolftaleína (aplicação da equação 18, p. 21). Solução tampão pH 10,5 ($\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$), 2 % de etanol, $[F] = 4 \times 10^{-5}$ M, $[\beta\text{-CD}] = 1 \times 10^{-3}$ M.

Resultados da literatura mostram que a utilização de 0,025 a 5% de etanol nas soluções experimentais contendo fenolftaleína não causa nenhuma supressão da absorvância ou efeito competitivo com a ciclodextrina. Portanto, o emprego de 2% de etanol está dentro deste limite.

A Tabela 10 mostra os valores das constantes de associação obtidos e a comparação destes com valores da literatura.

A metodologia empregada no estudo da interação γ CD- C_{10} e γ CD- C_8 foi a mesma adotada para os sistemas com β CD. O valor encontrado para $\Delta\epsilon$ no sistema γ CD-F é $44.820 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A Figura 34 mostra a linearidade obtida aplicando-se a equação 18 aos dados do experimento do sistema γ CD- C_8 , considerando-se a formação da espécie 1:1. Comportamento semelhante foi observado para o sistema γ CD- C_{10} .

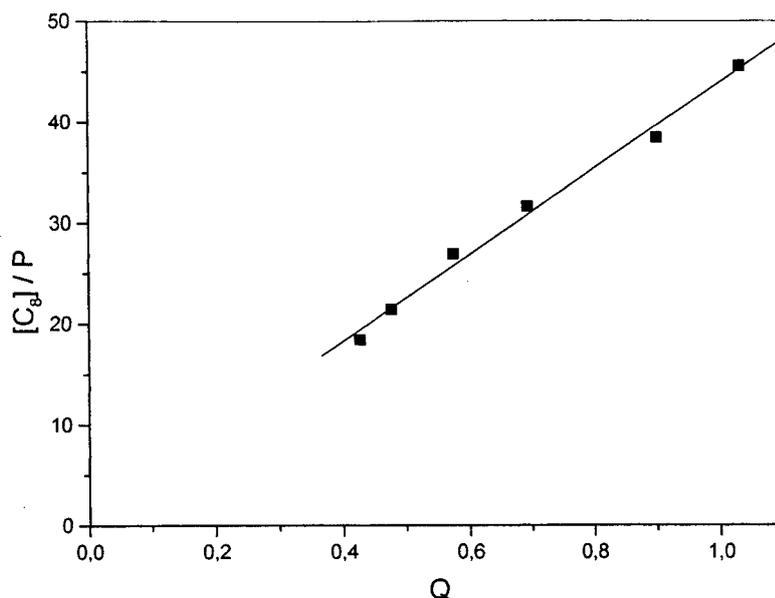


Figura 34: Gráfico obtido a partir dos dados do sistema γ CD-C₈, pelo método espectrofotométrico competitivo com fenolftaleína. Solução tampão pH 10,5 (NaHCO₃/NaOH), 2 % de etanol, [F] = 4×10^{-5} M, [γ -CD] = 2×10^{-3} M.

Tabela 10: Constante de associação (K_{CDA}) entre β CD-C₁₀, γ CD-C₁₀, β CD-C₈, e γ CD-C₈ a 25°C, solução tampão pH 10,5 (NaHCO₃/NaOH), 2 % de etanol. [F] = 4×10^{-5} M, [β CD] = 1×10^{-3} M, [γ CD] = 2×10^{-3} M.

Sistema	[CDA]/[CD][A] ^d			
	Este trabalho	Lit. (ref. 31) ^a	Lit. (ref. 32) ^b	Lit. (ref. 27) ^c
β CD-C ₁₀	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^3$	$(5,1 \pm 0,6) \times 10^3$	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^3$	$(8,0 \pm 0,2) \times 10^3$
γ CD-C ₁₀	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^2$	-	-	-
β CD-C ₈	$(5,1 \pm 0,2) \times 10^2$	$(6,6 \pm 0,8) \times 10^2$	$(5,2 \pm 0,7) \times 10^2$	$(7,0 \pm 2,9) \times 10^2$
γ CD-C ₈	$(4,7 \pm 0,2) \times 10^1$	-	-	-

^a obtido por método espectrofotométrico competitivo, em soluções contendo 0,04 % de etanol, e considerou-se que a espécie CDF não absorve.

^b obtido por método espectrofotométrico competitivo com [F] = 1×10^{-3}

^c obtido por RMN¹H, acompanhando o sinal do grupo CH₃ do ácido.

^d definido pela equação 13 p. 20.

Os valores de K_{CDA} , determinados para os sistemas β CD- C_{10} e β CD- C_8 , estão de acordo com os valores encontrados na literatura. Diferenças são devidas a fatores como solvente e metodologia para determinação da constante de associação. Por exemplo, nos estudos por RMN¹H existe uma dependência entre o valor da constante de associação e o próton levado em consideração para o cálculo da constante. E no método competitivo, concentrações elevadas de fenoltaleína apresentam variação no valor de K_{CDA} , como é o caso dos valores apresentados por Georgiou et al.³²

3.5.3 Correlação dos resultados

A estabilidade dos complexos varia com o tamanho da ciclodextrina e da cadeia do ácido. Se um substrato é maior que a cavidade da ciclodextrina e não apresentar uma geometria adequada, ele não ficará alojado na cavidade. Da mesma forma, se o substrato for muito pequeno, em relação às dimensões da cavidade do hospedeiro, ele passará através da cavidade com pequena porcentagem de associação.¹

Avaliando os resultados da Tabela 10, sob o ponto de vista do tamanho da cavidade, verifica-se que a constante de formação de β CD- C_{10} é 10 vezes mais forte que a formação do complexo γ CD- C_{10} . O mesmo ocorre para a associação do ácido C_8 . O diâmetro da cavidade da γ CD ($\sim 7,9$ Å)¹ é praticamente o dobro do diâmetro de um grupo metil (~ 4 Å).²⁹ Essa diferença faz com que γ CD não consiga manter a cadeia alquílica do ácido alojado em sua cavidade. Enquanto que β CD apresenta um diâmetro de cavidade menor ($\sim 6,3$ Å) conseguindo alojar a cadeia alquílica de forma mais efetiva que γ CD.

Sob o ponto de vista do tamanho da cadeia alquílica, verifica-se que a constante de associação de β CD- C_{10} é 5 vezes mais forte que a associação entre β CD e C_8 . Essa mesma razão é observada para γ CD- C_{10} e γ CD- C_8 . Essa relação revela uma dependência entre o tamanho da cadeia alquílica e a interação com a cavidade da ciclodextrina, confirmando resultados apresentados na literatura com substratos de fórmula geral $CH_3(CH_2)_nX$, onde $X = CH_3, COOH, COO^-, OH^-, SO_3^-$.^{31, 49} Portanto, cadeias alquílicas mais longas apresentam maior constante de associação com CD que cadeias alquílicas menores. Isso ocorre devido a diferença na hidrofobicidade do hóspede.

O baixo valor observado para as constantes de associação entre γ CD e os ácidos C₁₀ e C₈ está de acordo com o baixo deslocamento químico dos prótons da ciclodextrina e da cadeia alquílica dos ácidos, conforme observado nos espectros de RMN¹H.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

Através da análise de DSC verificou-se que ocorre formação dos seguintes complexos de inclusão: β CD-C₁₀, β CD-C₈, γ CD-C₁₀ e γ CD-C₈, com máxima encapsulação de ácido nas seguintes proporções: 1:1, 1:1,5, 1:1,5 e 1:2, respectivamente. Estes resultados mostram que, com o aumento da cavidade e diminuição do tamanho da cadeia alquílica do ácido, mais substrato pode ser alojado na cavidade da ciclodextrina.

Os calores envolvidos para a volatilização de moléculas de água nos complexos de uma mesma ciclodextrina são aproximadamente iguais, indicando o envolvimento da mesma quantidade de moléculas de água na vaporização. Porém, com o aumento da cavidade da ciclodextrina, mais moléculas de água podem ser encapsuladas e consequentemente há o envolvimento de uma quantidade maior de calor para volatilizá-las em relação ao sistema com menor cavidade.

A estabilidade térmica dos ácidos encapsulados na β CD é muito maior que os ácidos encapsulados em γ CD, conforme resultados de TGA.

Os estudos de análise térmica dos complexos de inclusão *in vitro* foram úteis no estudo da influência da β CD no processo de secagem do leite de cabra. Foi verificado que o ácido C₈ pode ser decomposto parcialmente a 185°C, temperatura de desidratação do leite de cabra. Resultados preliminares de cromatografia gasosa de amostras de leite de cabra com e sem β CD, mostram que a proporção de C₈ é menor no leite que não contém este agente encapsulante. Sugerindo que os ácidos graxos livres estão sendo encapsulados pela β CD, aumentando sua estabilidade térmica e diminuindo a degradação destes ácidos no processo de secagem do leite de cabra.

No estudo em solução, os resultados de RMN¹H mostram um deslocamento químico significativo para os prótons da cavidade da β CD quando ocorre encapsulação de C₁₀. Nos demais sistemas não foi observado comportamento semelhante, devido a menor associação entre ciclodextrina-ácido.

O método de espectroscopia competitiva mostrou ser um método eficiente no estudo da determinação da constante de associação ciclodextrina-ácido. Os resultados mostram

que β CD apresenta uma melhor associação com os ácidos C_{10} e C_8 em relação a γ CD, indicando a importância do tamanho da cavidade da ciclodextrina no processo de inclusão. Para uma mesma ciclodextrina o ácido C_{10} apresenta melhor associação em relação ao ácido C_8 , devido ao aumento da cadeia alquílica e conseqüente maior hidrofobicidade do substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGERON, R. J. Cycloamylose-substrate binding. In: ATWOOD, J. L., DAVIES, J. E. D., MacNICOL, D. D. Inclusion Compounds. Bristol: Academic Press, 1984. v. 3. p. 391 - 443.
2. SZEJTLI, J. Cyclodextrin Technology. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1988. p. 4 - 18.
3. SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chem. Rev., v. 98, p. 1743 – 1753, 1998.
4. CONNORS, K. A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. Chem. Rev., v. 97, p. 1325-1357, 1997.
5. INOUE, Y., REKHARSKY, M. V. Complexation thermodynamics of cyclodextrin. Chem Rev., v. 98, p. 1875-1917, 1998.
6. UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. Chem. Rev., 98, p. 2045-2076, 1998.
7. HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. Chem. Rev., v. 98, p. 2035 - 2044, 1998.
8. FODOR, M., NOVÁK, Cs., RÁKOSA, R., TOMOR, K., POKOL, G., GÁL, S. Solid and liquid state investigations of mandelic acid cyclodextrin complexes. Journal of Thermal Analysis, v. 48, p. 515 -525, 1997.

9. MOYANO, J. R., ARIAS, M. J., GINÉS, J. M., PÉREZ-MARTÍNEZ, J. I., MUÑOZ, P., GIORDANO, F. Thermal Characterization of gliclazide/ β -cyclodextrin inclusion complexes. Journal of Thermal Analysis, v. 51, p. 1001 - 1007, 1998.
10. CHANG Y-I., REINECCIUS, G. A., Interaction of β -cyclodextrin with enantiomers of limonene and carvone. Journal of Food Science, v. 55, n. 6, p. 1686 – 1695, 1990.
11. ZORNOZA, A., MARTÍN, C., SÁNCHEZ, M., VÉLAZ, I., PIQUER, A. Inclusion complexation of glisentide with α -, β - e γ -cyclodextrin. International Journal of Pharmaceutics, v. 169, p. 239 –244, 1998.
12. HAINES, P. J., WILBURN, F. W., Differential Thermal Analysis and Differential Scanning Calorimetry. In: HAINES, P. J. Thermal Methods of Analysis. Oxford: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 22, 63.
13. NOVÁK, Cs., FODOR, M., POKOL, G., IZVEKOV, V., SZTATISZ, J., ARIAS, M. J., GINÉS, J. M. Investigation of cyclodextrin complexes of mandelic acid. Journal of Thermal Analysis, v. 51, p. 1039 – 1048, 1998.
14. YILMAZ, V. T., KARADAG, A., IÇBUDAK, H. Thermal decomposition of β -cyclodextrin inclusion complexes of ferrocene and their derivatives. Thermochemica Acta, v. 261, p. 107 - 118, 1995.
15. TIAN, S-J., XI, G.-X., CHENG, Q-T., LOU, S-D., LI, J-H. Mechanism and kinetics of thermal dissociation of inclusion complex of benzaldehyde with β -cyclodextrin. Journal of Thermal Analysis, v. 53, p. 825 – 833, 1998.
16. LI, J-H., ZHANG, N., LI, X-T., WANG, J-Y., TIAN, S-J. Kinetic studies on the thermal dissociation of the inclusion complex of β -cyclodextrin with cinnamic aldehyde. Journal of Thermal Analysis, v. 49, p. 1527 – 1533, 1997.

17. LI, J-H., YU, S-Z., LI, X-T., WANG, J-Y., TIAN, S-J. Kinetic Studies on the thermal dissociation of β -cyclodextrin-cinnamyl alcohol inclusion complex. Journal of Thermal Analysis, v. 49, p. 1517 – 1525, 1997
18. MACÊDO, R. O., MOURA, O. M. de, SOUZA, A. G. de, MACÊDO, A. M. C. Comparative studies on some analytical methods. thermal decomposition of powder milk. Journal of Thermal Analysis, v. 49, p. 857 – 862, 1997.
19. KHOMUTOV, L. I., PTICHKINA, N. M., SHEENSON, V. A., LASHEK, N.A., PANINA, N. I. Thermal degradation of polysaccharides. Russian Journal of Applied Chemistry, v. 67, n. 4, p. 574 – 577, 1994.
20. TORRES-LABANDEIRA, J. J., de LABRA PIÑÓN, P., PÉREZ-MARCOS, B., ALVAREZ-LORENZO, C., VILA-JATO, J. L. Effect of norfloxacin complexation with β -cyclodextrin on the in vitro dissolution behaviour and its interaction with Mg^{2+} and Al^{3+} . Journal of Thermal Analysis, v. 51, p.1009-1021, 1998.
21. DEMARCO, P. V.; TRAKKAR, A. L. J. Chem Soc. Chem. Commun, p. 2, 1970. apud SCHNEIDER, H-J., HACKET, F., RÜDIGER, V. NMR Studies of cyclodextrins complexes. Chemical Reviews, v. 98, n. 5, p. 1755 – 1785, 1998.
22. DEMARCO, P. V.; TRAKKAR, A. L. J. Pharm. Sci., v. 60, p. 652, 1971. apud SCHNEIDER, H-J., HACKET, F., RÜDIGER, V. NMR Studies of cyclodextrins complexes. Chemical Reviews, v. 98, n. 5, p. 1755 – 1785, 1998.
23. DIVAKAR, S., JYOTHIRMAYI, N., RAMADOSS, C. S. Nuclear magnetic resonance studies of cyclodextrin complexes of linolei acid and arachidonic acid. J. Agric. Food Chem, v. 39, p. 2123 – 2127, 1991.
24. GOLDBERG, R. N., REKHARSKY, M. V., MAYHEW, M. P. Thermodynamic and nuclear magnetic resonance study of the reactions of α - and β -cyclodextrins with

- acids, aliphatic amines, and cyclic alcohols. J. Phys. Chem. B, v. 101, p. 87 - 100, 1997.
25. GANZA-GONZALEZ, A., VILA-JATO, J. L., ANGUIANO-IGEA, S., OTERO-ESPINAR, F. J., BLANCO-MÉNDEZ, J. A proton nuclear magnetic resonance study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrins. International Journal of Pharmaceutics, v. 106, p. 179 - 185, 1994.
26. SCHNEIDER, H-J., HACKET, F., RÜDIGER, V. NMR Studies of cyclodextrins complexes. Chemical Reviews, v. 98, n. 5, p. 1755 – 1785, 1998.
27. WILSON, L. D., VERRALL, R. E. A ^1H NMR study of cyclodextrin – hydrocarbon surfactant inclusion complexes in aqueous solutions. Can. J. Chem., v. 76, p. 25 – 34, 1998.
28. CASTRONUOVO, G., ELIA, V., FESSAS, D., VELLECA, F., VISCARDI, G. Thermodynamics of the interaction of α -cyclodextrins with monocarboxylic acids in aqueous solutions: a calorimetric study at 25 °C. Carbohydrate Research, v. 287, p. 127 – 138, 1996.
29. LAUFER, D. A., GELB, R. I., SCHWARTZ, L. M., CARDELINO, B., FUHRMAN, H. S., JOHNSON, R. F.. Binding Mechanisms in cyclohexaamylose complexes, J. of Am. Chem. Soc., v. 103, p. 1750 – 1757, 1981.
30. CONNORS, K. A. Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability. Canada: John Wiley & Sons, 1987, p.175 – 180.
31. VERRALL, R. E., WILSON, L. D., SIDDALL, S. R. A spectral displacement study of binding constants of cyclodextrin-hydrocarbon and –fluorocarbon surfactant inclusion complexes. Can. J. Chem., v. 75, p. 927 – 933, 1997.

32. GEORGIU, C. A., SKOULIKA, S. G., POLISSIOU, M. G. Interaction of β -Cyclodextrin with unsaturated and saturated straight chain fatty acid anions studied by phenolphthalein displacement. J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 34, p. 85 – 96, 1999.
33. LAMPARCZYK, H., ZARZYCKI, P. K. The equilibrium constant of β -cyclodextrins-phenolphthalein complex; influence of temperature and tetrahydrofuran addition. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 18, p. 165 – 170, 1998.
34. BARCZA, L., BUVÁRI, Á. Complex formation of phenolphthalein and some related compounds with β -cyclodextrin. J. Chem. Soc Perkin Trans. II, p.1687 – 1690, 1988.
35. BUVÁRI, Á., BARCZA, L. Complex formation of phenol, aniline, and their nitro derivatives with cyclodextrin. J. Chem. Soc Perkin Trans. II, p. 543 – 545, 1988.
36. TAWARAH, K. M., KHOURI, S. J. An equilibrium study of p-methyl red inclusion complexes with alpha-cyclodextrin and beta-cyclodextrin. Carbohydrate Research, v. 245, n. 2, p. 165 – 173, 1993.
37. PARK, J. W., SONG, H. J. Association of anionic surfactants with β -cyclodextrin. Fluorescence-probed studies on the 1:1 and 1:2 complexation. J. Phys. Chem., v. 93, p. 6454 – 6458, 1989.
38. ROSSI, R. H. de, SANRAMÉ, C. N., ARGÜELLO, G. A. Effect of β -cyclodextrin on the excited state properties of 3-substituted indole derivatives, J. Phys. Chem., v. 100, p. 8151 – 8156, 1996.
39. WARNER, I. M., ANIGBOGU, V. C. Fluorescence studies of the effects of t-butyl functionalities on the formation of ternary β -cyclodextrin complexes with pyrene. Applied Spectroscopy, v. 50, n. 8, p. 995 – 999, 1996.

40. WARNER, I. M., SCHUETTE J. M., VILL, A. Y., AGBARIA, R. A. Fluorescence characterization of the cyclodextrin/pyrene complex interaction with chiral alcohols and diols. Applied Spectroscopy, v. 48, n. 5, p. 581 – 586, 1994.
41. KANO, K., TAKENOSHITA, I., OGAWA, T. Fluorescence quenching of pyrene and naphthalene in aqueous cyclodextrin solutions. Evidence of 3-component complex formation. J. Phys. Chem, v. 86, n. 10, p. 1833 – 1838, 1982.
42. WARNER, I. M., PATONAY, G., SHAPIRA, A. Systematic study of pyrene inclusion complexes with α -, β -, and γ -cyclodextrins. J. Phys. Chem, v. 90, p. 1963 – 1966, 1986.
43. DRAKE, J. M., SCYPINSKI, S. Photophysics of coumarin inclusion complexes with cyclodextrin. Evidence of normal and inverted complex formation. J. Phys. Chem., v. 89, p. 2432 – 2435, 1985.
44. AICART, E., JUNQUERA, E. Thermodynamic analysis of the binding of a hepatoprotectant drug, thiocetic acid, by β -cyclodextrin. J. of Pharmaceutical Sciences, v. 88, n. 6, p. 626 – 631, 1999.
45. AICART, E., JUNQUERA, E. A. Fluorimetric, potentiometric and conductimetric study of the aqueous solutions of naproxen and its association with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. International Journal of Pharmaceutics, v. 176, p. 169 – 178, 1999.
46. LAUFER, D. A., GELB, R. I., SCHWARTZ, L. M., JOHNSON, R. F. The complexation Chemistry of cicloheamyloses.4. Reactions of cyclohexaamylose with formic, acetic, and benzoic acids and their conjugate bases. J. Am. Chem. Soc., v. 28, p.1869 – 1874, 1979.
47. CONNORS, K. A. Population characteristics of cyclodextrin complex stabilities in aqueous solution. J. of Pharmaceutical Sciences, v. 84, n. 7, p. 843 – 848, 1995.

48. BOUDEVILLE, P., BURGOT, J-L. A new pH-metric methodology for the determination of thermodynamic inclusion constants of guest/cyclodextrin complexes. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 84, n. 9, p. 1083 – 1089, 1995.
49. CONNORS, K. A., SCHNEIDER, H-J., RÜDIGER, V., GADRE, A. Binding of cyclodextrin to alicyclic and aromatic substrates: complex formation of α -, β - and γ -cyclodextrins with substituted cyclohexanecarboxylic acids and phenylalkanoic acids. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 86, n. 2, p. 236 – 243, 1997.
50. TAWARAH, K. M., WAZWAZ, A. A. Conductance Study of the binding of metryl orange, o-methyl red and p-methyl red anions by α -cyclodextrin in water. J. Chem. Soc. Faraday Trans., v. 89, n. 11, p. 1729 – 1732, 1993.
51. AICART, E., JUNQUERA, E., MENDICUTI, F. Driving forces for the inclusion of the drug tolmetin by β -cyclodextrin in aqueous medium. Conductometric and molecular modeling studies. Langmuir, v. 15, n. 13, p. 4472 – 4479, 1999.
52. CHRISTIAN S. D., TUNÇÇAY, M. A study of the binding of dimethyldodecylamine oxide by β -cyclodextrin using surface tension measurements. J. of Colloid and Interface Science, v. 167, p. 181 – 185, 1994.
53. WANG, H., LU, R., HAO, J., TONG, L. Determination of association constants for cyclodextrin-surfactant inclusion complexes: a numerical method based on surface tension measurements. J. of Colloid and Interface Science, v. 192, p. 37 – 42, 1997.
54. PITTAU, B., DELITALA, C., MARONGIU, B., PORCEDDA, S. Thermodynamic studies on water- β -cyclodextrin-surfactant ternary systems. Fluid Phase Equilibria, v. 126, p. 257 – 272, 1996.
55. DHARMAWARDANA, U. R., CHRISTIAN, S. D., TUCKER, E. E., TAYLOR, R. W., SCAMEHORN, J. F. A Surface tension method for determining binding constants

- for cyclodextrin inclusion complexes of ionic surfactants, Langmuir, v. 9, p. 2258 – 2263, 1993.
56. McCOY, M. Cyclodextrins: great product seeks a market. Chemical & Engineering, Washington, march 1, 1999.
57. ONG, J. K.; SUDERLAND, V. B. ; McDONAD, C., J. Pharm. Pharmacol, v. 49, p. 617, 1977. apud HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. Chem. Rev., v. 98, p. 2035 -2044, 1998.
58. CULLY, J., VOLLBRECHT, H-R. Process for the removal of cholesterol from egg yolk. A23L 1/015. U. S. n. 5,292,546. 8 march 1994.
59. ITO, K., KIKUCHI, K., OKAZAKI, N., KOBAYASHI, S. Retention of aroma components in liquors with cyclodextrin. Agric Biol. Chem., v. 52, n. 11, p. 2763 - 2759, 1988.
60. HENN R. Avaliação do estado nutricional de crianças com alergia ao leite de vaca em tratamento com leite de cabra e desenvolvimento de um produto hipoalergênico à base de leite de cabra. Florianópolis, 1999. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.
61. GAJEWSKA, R., NABRZYSKI, M., GANOWIAK, Z. Evaluation of the health aspects of goat milk. Rocz-Panstn-Zakl-Hig, v. 47, n. 3, p. 295 - 301, 1996.
62. MEIER, M. M., DRUNKLER, D. A., BORDIGNON LUIZ, M. T., FETT, R., SZPOGANICZ, B. The influence of β -cyclodextrin on goatly milk. Characterization of synthetic inclusion complex with capric acid and caprilic acid, British Food Journal, no prelo, 2000.

63. BORDIGNON LUIZ, DRUNKLER, D. A., M. T., HENN, R., FETT, R. Influência do complexo de inclusão beta-ciclodextrina no “flavor” da bebida láctea de soro de queijo e leite de cabra. Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, n. 310, v. 54 , p. 03-06, 1999.
64. JENNESS, R. Compositions and characteristics of goat’s milk: A review 1968-1979. J. of Dairy Science, v. 63, n. 10, p. 1605-1630, 1980.
65. ATTAIE R., RICHTER, R. L. Formation of volatile free fatty acids during ripening of cheddar-like hard goat cheese. J. Dairy Sci., v. 179, p. 717 – 724, 1996.
66. LINDSAY R. C., HA, J. K. Contributions of cow, sheep, and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. J. Dairy Sci, v. 74, p. 3267 – 3274, 1991.
67. ABO-ELNAGA, I.G.; el-DAHAN, A.S.; RIDHA, S.H. The fatty acid composition of Iraqi ewe’s, goat’s and cow’s milk fat. Nahrung, v. 29, n. 3, p. 241 - 245, 1985.
68. LOEWENSTEIN, M.; SPECK, J. S.; BARNHART, H. M.; FRANK, J. F. Recherche on goat milk products: a review. J. Dairy Science, v. 63, n. 10, p 1631-1948, 1980.
69. BORDIGNON LUIZ, M. T., DRUNKLER, D. A., HENN, R., FETT, R. Leite de Cabra: hipoalergenicidade, composição química e aspectos nutricionais. Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, n. 306, v. 54 , p.23-31, 1999.
70. HENN, R., BORDIGNON LUIZ, M. T., FETT, R. Desenvolvimento de um produto hipoalergênico à base de leite de cabra: uma alternativa para crianças alérgicas ao leite de vaca. I Congresso Latino Americano de Nutrição Humana (Anais), Gramado, n. 222A, p. 81, junho 1999.

71. MEIER, M. M., DINIZ, A. C., FETT, R., LUIZ, M. T. B., SZPOGANICZ, B. Estudo do efeito agente encapsulante β -ciclodextrina no processo de secagem do leite de cabra por spray dryer. In: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3, 1999, Campinas, Anais. Campinas, 1999, p. 205.
72. MEIER, M. M., DRUNKLER, D. A., LUIZ, M. T. B., FETT, R. SZPOGANICZ, B. Avaliação da influência da beta-ciclodextrina no flavor do leite de cabra e caracterização dos complexos de inclusão formados entre beta-ciclodextrina e os ácidos graxos C₆, C₈ e C₁₀. In: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3, 1999, Campinas, Anais. Campinas, 1999, p. 19.
73. BENESI, H.A., HILDEBRAND, J.H. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 71, p. 2703, 1949. apud SAENGER, W., CRAMER, F., SPATZ, H.-Ch. Inclusion Compounds. XIX The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. *Thermodynamics and Kinetics. J. Am. Chem. Soc.*, v. 89, p. 14 – 20, 1967.
74. WEAST, R. C., ASTLE, M. J., BEYER, W. H. *Handbook of Chemistry and Physics*. USA: CRC Press, Inc, 1983, 64th ed. p. D151.
75. SANTA-MARÍA, G., MARTÍNEZ-CASTRO, I., HIERRO M. T. G., RUIZ-SALA, P. Triglyceride composition of ewe, cow and goat milk fat. *J. Am. Oil Chemical Soc.*, v. 73, p. 283 – 293, 1996.
76. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. USA: John Wiley & Sons, 1981, p. 110 - 115.