



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Nutrición
y Seguridad Alimentaria

Aplicación de ciclodextrinas en distintos sectores
industriales: biotecnología enzimática, industria
alimentaria y descontaminación de aguas.

Autor:

José Antonio Pellicer Balsalobre

Directores:

Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado

Dra. D^a. María Isabel Fortea Gorbe

Murcia, Julio de 2016



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Nutrición
y Seguridad Alimentaria

Aplicación de ciclodextrinas en distintos sectores
industriales: biotecnología enzimática, industria
alimentaria y descontaminación de aguas.

Autor:

José Antonio Pellicer Balsalobre

Directores:

Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado

Dra. D^a. María Isabel Fortea Gorbe

Murcia, Julio de 2016



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado y la Dra. D^a. María Isabel Fortea Gorbe como Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de ciclodextrinas en distintos sectores industriales: biotecnología enzimática, industria alimentaria y descontaminación de aguas” realizada por D. José Antonio Pellicer Balsalobre en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 24 de Junio de 2016.

Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado

Dra. D^a. María Isabel Fortea Gorbe

*A Carmen María, conocerte ha sido
lo mejor que me ha sucedido en la vida.
Gracias por estar siempre a mi lado.*

*A mis padres, por darlo todo por nosotros.
Gracias a vuestro esfuerzo y sacrificio
he podido llegar hasta aquí.*

*A mi hermana Rosa,
que se cumplan todos tus sueños.*

AGRADECIMIENTOS

Después de varios años de trabajo, llega el momento de agradecer a todas las personas que, de una manera u otra, han estado presentes durante este periodo. Parece algo sencillo, pero no lo es, ya que hay mucho que agradecer en apenas unas pocas líneas.

A la Universidad Católica de Murcia tengo que agradecerle que haya confiado en mí todo este tiempo. Es digno de alabar que en la peor época de crisis en España, esta Universidad haya seguido apostando por la investigación, contratando a jóvenes investigadores para que completen sus estudios.

Creo que he tenido mucha fortuna, ya que tener como directoras de mi Tesis a Isabel Fortea y Estrella es para sentirse satisfecho. Gracias Isabel por haber apostado por mí para realizar esta Tesis Doctoral. Durante estos años que hemos compartido he aprendido muchas cosas de ti, la constancia, el trabajo bien hecho y el esfuerzo continuo por mejorar siempre dan sus frutos. Estrella, admiro tu capacidad para razonar, la trabajadora incansable que eres y tu sinceridad. Siempre buscas la perfección en todo lo que haces y eso es algo que todos deberíamos aprender de ti. Gracias a las dos por vuestra inestimable ayuda, vuestros consejos sinceros y el trato tan cercano que siempre habéis tenido conmigo. Sin duda sois mis referentes, el espejo en el que mirarse para alcanzar las cotas más elevadas.

A Agustín tengo que decirle que es la persona más generosa que conozco, porque he perdido la cuenta del número de cafés a los que me ha invitado. Sin esos cafés y nuestras charlas para intentar arreglar el mundo, te aseguro que este periodo no habría sido igual. Muchísimas gracias por tu apoyo y tus consejos.

A José Antonio Gabaldón por ayudarme en todo lo que he necesitado durante estos años. Eres una fuente de sabiduría y conocimientos y además no hay nadie en el mundo que pida más proyectos que tú en menos tiempo. Cómo te gusta darle trabajo a los becarios.

A Isabel Rodríguez, mi compañera de fatigas. Creo que hemos pasado unas cuantas horas en el laboratorio trabajando a destajo para conseguir resultados de cierto proyecto europeo de cuyo nombre no quiero acordarme. Mucho ánimo con tu Tesis, seguro que todo te va a ir fenomenal.

A la persona más metódica y organizada que conozco, Santiago. Un gran compañero con el que puedes hablar de todo y que encima controla el spray dryer. Menudos ratos más buenos hemos pasado haciendo de fontaneros.

A Ana Serrano porque es una compañera estupenda y una gran persona. Ha sido un privilegio compartir asignaturas contigo, ojalá en el futuro podamos volver a trabajar juntos.

Al resto de compañeros del departamento, y en especial a Carmen y Maite, aunque no hayamos trabajado codo con codo, siempre habéis estado para cualquier cosa que haya podido necesitar.

A mis compañeros de despacho: Vicente, Estefanía, Sara y Silvia. Que buenos momentos hemos pasado en el despacho, ojalá que continúen durante mucho tiempo.

A Gabi por estar siempre que se le necesita para poner algún equipo en marcha o encontrar el reactivo perdido. A Carmen María, gracias por tu ayuda en mis primeros pasos por la universidad. Se te echa de menos en el departamento.

A Esther Franco así como al resto de personal de AITEX. Muchísimas gracias por suministrarnos los colorantes para poder llevar a cabo parte de los experimentos de esta Tesis Doctoral. Gracias también por vuestra hospitalidad cada vez que os hemos visitado en Alcoy, al igual que las personas que trabajan en COLORPRINT.

A Paola y Pinalysa de la Universidad de Bari, por sus sabios consejos a la hora de trabajar con los diferentes polímeros de ciclodextrinas.

A Juan Trabal, Vanesa y Quiro. Aún recuerdo con muchísimo cariño mi estancia en CARINSA con vosotros y con el resto de personal de la empresa. Lo único que me hubiera gustado habría sido compartir más tiempo con Juan porque no he conocido a nadie que sepa tanto de aromas, aparte de ser una persona extraordinaria.

A Julián Castillo, porque siempre viene fenomenal hablar un rato con él para abrir la mente y darte cuenta de cosas hasta el momento ignoradas por completo.

A Carmen, mi mujer. Este año ha sido muy especial para nosotros. Nuestra boda ha sido el momento más bonito de nuestra vida. Todo este tiempo nos ha servido para darnos cuenta de que estamos hechos el uno para el otro. Gracias por ayudarme y por estar siempre a mi lado, en los buenos y en los malos momentos. Te quiero.

A mis padres, gracias por habernos dado a mi hermana y a mí la mejor educación posible. Por transmitirnos unos valores que, sin duda, nos han hecho mejores personas. Sin vuestro esfuerzo y sacrificio durante tantos años habría sido imposible que yo hubiera podido llegar hasta aquí.

A mi hermana Rosa, por ser la mejor hermana del mundo. Ya ha quedado de manifiesto que no eres gafe del todo, así que el próximo año también te dejamos que vengas al fútbol. A mi prima Rosario, mucho ánimo que seguro cumplirás todo lo que te propongas, a seguir estudiando duro como hasta ahora.

A mi amigo Pepe, gracias por tu inestimable ayuda para descifrar el mundo de las isotermas, tener un amigo matemático-informático-estudiante de inglés no tiene precio. No me olvido de Ángeles, Ana, Juan, Frenchy y Mariano. Todos vosotros formáis parte del mejor club del mundo, el de los buenos amigos, los que siempre están cerca cuando los necesitas. Espero no haberos aburrido demasiado con la Tesis.

Nunca me olvido de mis abuelos José y Rosa, de mi tía Fina y de mi Tata, sé que desde el Cielo me habéis ayudado a seguir adelante, espero que estéis orgullosos de mi trabajo.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

- Fortea, M.I., **Pellicer, J.A.**, Serrano-Martínez, A., Lopez-Miranda, S., Lucas-Abellan, C., & Núñez-Delicado, E. (2012). Red cabbage (*Brassica oleracea*) as a new source of high-thermostable peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10641-10648.
- Fortea, M.I., **Pellicer, J.A.**, Serrano-Martínez, A., Lucas-Abellán, C., López-Miranda, S., & Núñez-Delicado, E. (2013). Kinetic characterization of soluble and membrane-bound peroxidases from red cabbage (*Brassica oleracea*). *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63, 1840-1841.
- **Pellicer, J.A.**, Lucas-Abellán, C., Serrano-Martínez, A., López-Miranda, S., Núñez-Delicado, E., & Fortea, M. I. (2016). Kinetic Characterization and Thermal Properties of Two Acidic Peroxidases from White Cabbage (*Brassica Oleracea* L.). *Journal of Food Biochemistry*. *En prensa*.
- **Pellicer, J.A.**, Fortea, M.I., Trabal, J., Rodríguez-López, M.I., Gabaldón, J.A., & Núñez-Delicado, E. Microencapsulation of synthetic strawberry flavour with different blends of encapsulating agents using spray drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *Enviado*.
- **Pellicer, J.A.**, Fortea, M.I., Trabal, J., Rodríguez-López, M.I., Gabaldón, J.A., & Núñez-Delicado, E. Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *Enviado*.
- **Pellicer, J.A.**, Rodríguez-López, M.I., Gabaldón, J.A., Fortea, M.I., & Núñez-Delicado, E. Removal of Direct Ruby using cyclodextrin-EPI polymers: absorption and kinetics studies. *Carbohydrate Polymers*. *Enviado*.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Los trabajos de investigación realizados en la presente Tesis Doctoral han sido financiados por los siguientes proyectos:

- Desarrollo de una metodología de micro o nanoencapsulación de compuestos aromáticos y antioxidantes para su empleo en el sector alimentario (CFE-CARINSA/02/12). Proyecto CDTI.
- Demonstration of cyclodextrin techniques in treatment of waste water in textil industry to recover and reuse textil dyes. LIFE12 ENV/ES/000309. LIFE DYES4EVER. Proyecto Europeo.

El firmante de la presente Tesis Doctoral ha disfrutado de un Contrato Predoctoral para la formación de personal investigador del plan propio de ayudas a la investigación de la Universidad Católica San Antonio de Murcia.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández; **José Antonio Pellicer Balsalobre**; María Isabel Rodríguez López; Carmen Lucas Abellán; M^a Isabel Fortea Gorbe; María Teresa Mercader Ros; Esther Franco; Luis Miguel Pérez; Marcela Ferrandiz; Pynalisa Cosme; Paola Fini. *Dyes removal from waste water by means EPI-gamma-CDs polymers*. 4 th European Conference on Cyclodextrins, 2015, Lille, Francia.
- **José Antonio Pellicer Balsalobre**; M^a Isabel Fortea Gorbe; Juan Trabal Sau; María Isabel Rodríguez López; José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado. *Caracterización físico-química de emulsiones preparadas con diferentes tipos de agentes encapsulantes para su uso en la microencapsulación de aroma de fresa mediante spray drying*. I Jornadas de Investigación y Doctorado: Calidad y Acreditación, 2015, Murcia, España.
- María Isabel Rodríguez López; María Teresa Mercader Ros; Carmen Lucas Abellán; Ana Serrano Martínez; **José Antonio Pellicer Balsalobre**; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Encapsulación de Timol a diferentes pH*. I Jornadas de Investigación y Doctorado: Calidad y Acreditación, 2015, Murcia, España.
- **José Antonio Pellicer Balsalobre**; M^a Isabel Fortea Gorbe; Juan Trabal Sau; María Isabel Rodríguez López; José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado. *Microencapsulación de aroma de fresa con diferentes agentes encapsulantes mediante spray drying*. I Jornadas de Investigación y Doctorado: Calidad y Acreditación, 2015, Murcia, España.
- **José Antonio Pellicer Balsalobre**; Carmen Lucas Abellán; Ana Serrano Martínez; Estrella Núñez Delicado; M^a Isabel Fortea Gorbe. *Thermostability of peroxidases extracted from White Cabbage*. Future trends in phytochemistry in the global era of agri-food and health, 2015, San Pedro del Pinatar, Murcia, España.

- **José Antonio Pellicer Balsalobre**; Carmen Lucas Abellán; Ana Serrano Martínez; José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado; M^a Isabel Fortea Gorbe. *Peroxidasa de col blanca (Brassica oleracea): Efecto de inhibidores y caracterización cinética*. VII Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos "Dr. Mario Yanes García", 2014, México.
- Carmen Lucas Abellán; María Teresa Mercader Ros; José **Antonio Pellicer Balsalobre**; Ana Serrano Martínez; José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado. *Complejación de sulfatiazol en β -CDs. Cambios en el espectro de fluorescencia*. IX Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 2014, Valencia, España.
- **José Antonio Pellicer Balsalobre**; M^a Isabel Fortea Gorbe; Ana Serrano Martínez; Carmen Lucas Abellán; Estrella Núñez Delicado. *Lombarda (Brassica Oleracea) como fuente de peroxidasa termoestable*. IX Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos, 2014, Valencia, España.
- M^a Isabel Fortea Gorbe; **José Antonio Pellicer Balsalobre**; Ana Serrano Martínez; Carmen Lucas Abellán; Santiago López-Miranda González; Estrella Núñez Delicado. *Kinetic characterization of soluble and membrane bound peroxidase from red cabbage*. 20th International Congress of Nutrition, 2013, Granada, España.
- Lucía Guardiola García; **José Antonio Pellicer Balsalobre**; Ana Serrano Martínez; Santiago López-Miranda González; M^a Isabel Fortea Gorbe. *Estudio de inactivación térmica en peroxidasa de alga roja (Mastocarpus stellatus)*. VII Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2013, Córbo, España.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	23
ÍNDICE DE FIGURAS	25
ÍNDICE DE TABLAS.....	31
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL DE CICLODEXTRINAS	33
1. Introducción general de ciclodextrinas.....	35
1.1. INTRODUCCIÓN	35
1.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y DESCUBRIMIENTO	35
1.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS CICLODEXTRINAS.....	42
1.4. USO Y REGULACIÓN DE LAS CICLODEXTRINAS.....	44
1.5. SOLUBILIDAD ACUOSA DE LAS CICLODEXTRINAS	45
1.6. SITUACIÓN ACTUAL.....	45
1.6.1. Ciclodextrinas y complejos de inclusión	46
1.6.1.1. <i>Energía y mecanismos de inclusión</i>	<i>46</i>
1.6.1.2. <i>Efecto de las propiedades de la molécula huésped.....</i>	<i>48</i>
1.6.1.3. <i>Propiedades del complejo de inclusión en disolución</i>	<i>49</i>
1.6.2. Ciclodextrinas y agregados.....	50
1.6.3. Ciclodextrinas e industria farmacéutica.....	52
1.6.4. Ciclodextrinas y nanotecnología.....	55
1.6.5. Aplicaciones biomédicas	55
1.6.6. Ciclodextrinas e industria alimentaria.....	56
1.6.6.1. <i>Encapsulación de aromas con CDs</i>	<i>57</i>
1.6.6.2. <i>Protección frente a degradación, luz y temperatura.....</i>	<i>59</i>
1.6.6.3. <i>Eliminación de aromas y sabores desagradables</i>	<i>61</i>
1.6.6.4. <i>Atrapamiento de colesterol</i>	<i>62</i>
1.6.6.5. <i>Preservación de alimentos</i>	<i>62</i>

1.6.7. Ciclodextrinas y cromatografía	64
1.6.8. Ciclodextrinas, fragancias e industria cosmética	64
1.6.9. Ciclodextrinas e industria textil	66
1.6.10. Estructuras supramoleculares.....	68
1.6.11. Ciclodextrinas y tensoactivos	70
1.6.12. Ciclodextrinas y membranas	71
1.6.13. Ciclodextrinas y descontaminación.....	71
CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	73
2. Objetivos.....	75
CAPÍTULO III: USO DE CICLODEXTRINAS EN BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA.....	77
3. Uso de ciclodextrinas en biotecnología enzimática	79
3.1. INTRODUCCIÓN	79
3.1.1. Taxonomía, descripción botánica y distribución mundial del género <i>Brassica</i>	79
3.1.2. Valor nutricional del género <i>Brassica</i> y su relación con la salud.....	80
3.1.3. Enzimas oxidativas presentes en el género <i>Brassica</i>	84
3.1.3.1. <i>Polifenol oxidasa (PPO)</i>	84
3.1.3.2. <i>Peroxidasa (POD)</i>	86
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	88
3.2.1. Material vegetal	88
3.2.2. Reactivos	88
3.2.3. Purificación de Triton X-114.....	88
3.2.4. Determinación de proteínas	89
3.2.5. Extracción de peroxidasa.....	89
3.2.6. Determinación de la actividad enzimática	90
3.2.7. pH óptimo.....	91
3.2.8. Efecto de SDS.....	91
3.2.9. Actividad enzimática en presencia de ciclodextrinas.....	91

3.2.10. Efecto de agentes reductores.....	91
3.2.11. Determinación de los parámetros cinéticos V_m y K_M	92
3.2.12. Temperatura óptima	92
3.2.13. Estabilidad térmica	92
3.2.14. Análisis estadísticos	93
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
3.3.1. Lombarda.....	93
3.3.1.1. Extracción, efecto de pH y SDS	94
3.3.1.2. Caracterización cinética.....	98
3.3.1.3. Efecto de inhibidores.....	101
3.3.1.4. Efecto de CDs.....	103
3.3.1.5. Temperatura óptima.....	106
3.3.1.6. Estabilidad térmica.....	107
3.3.2. Col blanca	112
3.3.2.1. Extracción, efecto de pH y SDS	112
3.3.2.2. Caracterización cinética.....	116
3.3.2.3. Efecto de inhibidores.....	118
3.3.2.4. Efecto de CDs.....	120
3.3.2.5. Temperatura óptima.....	122
3.3.2.6. Estabilidad térmica.....	122
CAPÍTULO IV: USO DE CICLODEXTRINAS EN MICROENCAPSULACIÓN DE AROMAS.....	127
4. Uso de ciclodextrinas en microencapsulación de aromas	129
4.1. INTRODUCCIÓN	129
4.2. TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN	131
4.2.1. Secado por aspersión (spray drying)	131
4.2.2. Liofilización	134
4.2.3. Lecho fluido.....	135
4.3. AGENTES ENCAPSULANTES.....	138
4.3.1. Hidratos de carbono	139
4.3.1.1. Maltodextrinas.....	139
4.3.1.2. Almidón.....	141

4.3.1.3. <i>Ciclodextrinas</i>	143
4.3.2. Gomas	144
4.3.2.1. <i>Goma arábica</i>	144
4.3.2.2. <i>Goma xantana</i>	145
4.4. MATERIAL Y MÉTODOS	146
4.4.1. Reactivos	146
4.4.2. Formación de emulsiones	146
4.4.2.1. <i>Estabilidad</i>	147
4.4.2.2. <i>Viscosidad</i>	147
4.4.2.3. <i>Densidad</i>	147
4.4.3. Secado por aspersión	147
4.4.4. Liofilización	148
4.4.5. Lecho fluido	148
4.4.6. Eficacia de secado	148
4.4.7. Cuantificación de compuestos volátiles	148
4.4.8. Eficacia de encapsulación	149
4.4.9. Humedad	149
4.4.10. Tamaño de partícula	149
4.4.11. Estabilidad en función del tiempo y de la temperatura de almacenamiento	150
4.4.12. Método cromatográfico (GC/MS)	150
4.4.13. Análisis morfológico y estructural	150
4.4.14. Análisis estadísticos	151
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	152
4.5.1. Formación de la emulsión y propiedades físico-químicas	152
4.5.2. Eficacia de secado	154
4.5.3. Análisis del polvo	157
4.5.3.1. <i>Cuantificación de compuestos volátiles</i>	160
4.5.3.2. <i>Contenido de humedad</i>	165
4.5.3.3. <i>Análisis morfológico de las muestras</i>	166
4.5.4. Estudios realizados con diferentes técnicas de secado	168
4.5.4.1. <i>Eficacia de secado</i>	169
4.5.4.2. <i>Contenido de humedad</i>	170

4.5.4.3. Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento.....	171
4.5.4.4. Análisis del tamaño de partícula.....	178
4.5.4.5. Análisis morfológico de las muestras	180

CAPÍTULO V: USO DE CICLODEXTRINAS PARA LA ELIMINACIÓN DE COLORANTES DE AGUAS DE LA INDUSTRIA TEXTIL..... 183

5. Uso de ciclodextrinas para la eliminación de colorantes de aguas de la industria textil 185

5.1. INTRODUCCIÓN	185
5.1.1. Uso de ciclodextrinas para descontaminar aguas residuales de la industria textil.....	186
5.1.2. Polímeros de CDs y EPI	188
5.1.3. Polímeros de quitosan	189
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	190
5.2.1. Reactivos	190
5.2.2. Preparación del polímero.....	190
5.2.3. Preparación del colorante	191
5.2.4. Análisis y evaluación de la capacidad de absorción.....	191
5.2.5. Experimentos de absorción.....	193
5.2.6. Cinética de absorción	193
5.2.6.1. Modelo cinético de pseudo primer orden	194
5.2.6.2. Modelo cinético de pseudo segundo orden	195
5.2.6.3. Modelo de difusión intrapartícula.....	196
5.2.7. Equilibrio de absorción.....	197
5.2.7.1. Isoterma de Freundlich	197
5.2.7.2. Isoterma de Langmuir.....	198
5.2.7.3. Isoterma de Temkin.....	200
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	200
5.3.1. Efecto del tiempo de contacto.....	200
5.3.1.1. α - y HP- α -CDs-EPI	200
5.3.1.2. β - y HP- β -CDs-EPI	203
5.3.1.3. γ - y HP- γ -CDs-EPI	205
5.3.2. Cinética de absorción	207

5.3.2.1. Modelo de pseudo primer orden	207
5.3.2.2. Modelo de pseudo segundo orden.....	210
5.3.2.3. Modelo de difusión intrapartícula.....	215
5.3.3. Equilibrio de absorción.....	219
5.3.3.1. Isoterma de Freundlich.....	219
5.3.3.2. Isoterma de Langmuir	221
5.3.3.3. Isoterma de Temkin	224
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	227
6. Conclusiones.....	229
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	231
7. Bibliografía	233

ABREVIATURAS

- α -CDs: α -ciclodextrinas
AB: Alcohol bencílico
ABTS: 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazolina-6-sulfónico
AE: Acetoacetato de etilo
a_L: Constante de Langmuir (L/mg)
APS: Persulfato amónico
a_T: Constante de Temkin (L/g)
 β -CDs: β -ciclodextrinas
b_T: Calor de absorción (kJ/mol)
BHT: Butil-hidroxitolueno
C: Intercepto de la ecuación de difusión intrapartícula (mg/g)
CDs: Ciclodextrinas
C_e: Concentración de colorante en fase líquida en el equilibrio (mg/L)
CGTasa: Ciclodextrina glucanotransferasa
C₀: Concentración inicial de colorante en fase líquida (mg/l)
D: Tiempo para reducir la actividad enzimática al 10% de su valor original
DE: Equivalentes de dextrosa
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
E_a: Energía de activación
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EE: Eficacia de encapsulación
EPI: epiclorohidrina
ES: Eficacia de secado
FR: Fraistone
 γ -CDs: γ -ciclodextrinas
GA: Goma arábica
GRAS: Generally recognised as safe
GX: Goma xantana
HC: Almidón modificado Hi-Cap 100
HP- α -CDs: 2-hidroxipropil- α -ciclodextrinas
HP- β -CDs: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrinas

HP- γ -CDs: 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrinas

k_1 : Constante de equilibrio de pseudo primer orden (min^{-1})

k_2 : Constante de equilibrio de pseudo segundo orden (g/mg min)

K_c : Constante de complejación

K_F : Constante de la isoterma de Freundlich (L/g)

k_i : Constante de difusión intrapartícula ($\text{mg/g min}^{1/2}$)

K_L : Constante de Langmuir (L/g)

K_M : Constante de Michaelis-Menten

K_{si} : Constante de inhibición por sustrato

4MN: 4 metoxi α -naftol

m : Cantidad de polímero utilizada (g)

MDs: Maltodextrinas

n_F : Exponente de la isoterma de Freundlich

POD: Peroxidasa

PPO: Polifenol oxidasa

q_e : Cantidad de colorante absorbido en el equilibrio (mg/g)

q_{max} : Capacidad máxima de absorción del polímero (mg/g)

q_t : Cantidad de colorante absorbido a tiempo t (mg/g)

R^2 : Coeficiente de regresión lineal

RD: Rubí Directo

RL: Factor de separación

SDS: Dodecil sulfato sódico

t : Tiempo (min)

t_e : Tiempo en el equilibrio (min)

TEMED: Tetrametilen etilen diamina

t_R : Tiempo de retención

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

Triton X-114: Poli-(7-8)-oxietilen p-t-octil fenol

V : Volumen de la disolución de colorante (L)

V_m : Velocidad máxima

U : Unidades enzimáticas

x : Cantidad de colorante absorbido (mg)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Primera página del artículo original publicado por Franz Schardinger sobre dextrinas en 1903.....</i>	37
Figura 1.2. <i>Estructura de las diferentes CDs nativas.....</i>	40
Figura 1.3. <i>Tipos de complejos de inclusión que se forman entre las CDs y las moléculas huésped.....</i>	40
Figura 1.4. <i>Estructura troncocónica de las CDs sugerida por Cramer.....</i>	41
Figura 1.5. <i>Diámetro interno y externo de las CDs nativas.....</i>	43
Figura 1.6. <i>Formación del complejo de inclusión entre la CD y la molécula huésped.....</i>	47
Figura 1.7. <i>Autoensamblaje de las moléculas de CDs para dar lugar a la formación de agregados.....</i>	51
Figura 1.8. <i>Componentes alimentarios que contienen CDs en su formulación.....</i>	59
Figura 1.9. <i>Diferentes arquitecturas macromoleculares con CDs.....</i>	69
Figura 1.10. <i>Estructura esquemática de polímeros con CDs obtenidos mediante reticulación o polimerización (a), injerto (b) o mediante reacciones de recubrimiento (c).....</i>	72
Figura 3.1. <i>Lombarda y col blanca.....</i>	79
Figura 3.2. <i>Estructura y degradación de los glucosinolatos.....</i>	81
Figura 3.3. <i>Estructura de los flavonoides presentes en el género Brassica.....</i>	83
Figura 3.4. <i>Estructura tridimensional de PPO extraída de manzana tipo Fuji.....</i>	85
Figura 3.5. <i>Estructura tridimensional de POD extraída de Chamaerops excelsa.....</i>	86
Figura 3.6. <i>(A) Efecto del pH en la actividad de POD ligada de lombarda en ausencia o en presencia de SDS. (B) Efecto de la concentración de SDS en la actividad enzimática de POD ligada de lombarda.....</i>	95

- Figura 3.7.** (A) Efecto del pH en la actividad de POD soluble de lombarda en ausencia o en presencia de SDS. (B) Efecto de la concentración de SDS en la actividad enzimática de POD soluble de lombarda..... 97
- Figura 3.8.** (A) Efecto de la concentración de H₂O₂ en la actividad enzimática de POD ligada de lombarda. (B) Efecto de la concentración de ABTS en POD ligada de lombarda. (C) Efecto de la concentración de H₂O₂ en la actividad de POD soluble de lombarda. (D) Efecto de la concentración de ABTS en POD soluble de lombarda 99
- Figura 3.9.** (A) Efecto inhibitorio de diferentes agentes reductores (ácido ascórbico, L-cisteína o metabisulfito) en la actividad de POD ligada de lombarda. (B) Efecto inhibitorio de diferentes agentes reductores (ácido ascórbico, L-cisteína o metabisulfito) en POD soluble de lombarda..... 102
- Figura 3.10.** (A) Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la actividad enzimática de POD ligada de lombarda. (B) Efecto de concentraciones crecientes de HP-β-CDs en la actividad enzimática de POD soluble de lombarda..... 104
- Figura 3.11.** Temperatura óptima para POD ligada y soluble de lombarda 107
- Figura 3.12.** (A) Inactivación térmica de POD ligada de lombarda. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C. (B) Inactivación térmica de POD soluble de lombarda. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 30 °C, 40 °C, 50 °C, 70 °C y 80 °C 108
- Figura 3.13.** Representación de Arrhenius de la tasa de inactivación de POD ligada y soluble de lombarda..... 110
- Figura 3.14.** (A) Efecto del pH en la actividad enzimática de POD ligada de col blanca en ausencia o en presencia de SDS. (B) Efecto del pH en la actividad enzimática de POD soluble de col blanca en ausencia o en presencia de SDS 114
- Figura 3.15.** Efecto de la concentración de SDS en la actividad enzimática de POD ligada y soluble de col blanca a pH óptimo (4.0)..... 115
- Figura 3.16.** (A) Efecto de la concentración de H₂O₂ en la actividad enzimática de POD ligada de col blanca. (B) Efecto de la concentración de ABTS en POD ligada de col blanca. (C) Efecto de la concentración de H₂O₂ en la actividad enzimática de POD soluble de col blanca. (D) Efecto de la concentración de ABTS en POD soluble de col blanca 117

- Figura 3.17.** (A) Efecto inhibitorio de los agentes reductores ácido ascórbico y L-cisteína en POD ligada de col blanca. (B) Efecto inhibitorio de ácido ascórbico y L-cisteína en POD soluble de col blanca. (C) Efecto inhibitorio de metabisulfito en POD ligada de col blanca. (D) Efecto inhibitorio de metabisulfito en POD soluble de col blanca..... 119
- Figura 3.18.** (A) Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la actividad enzimática de POD ligada de col blanca. (B) Efecto de concentraciones crecientes de HP- β -CDs en la actividad enzimática de POD soluble de col blanca..... 121
- Figura 3.19.** Temperatura óptima para POD ligada y soluble de col blanca..... 122
- Figura 3.20.** (A) Inactivación térmica de POD ligada de col blanca. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C. (B) Inactivación térmica de POD soluble de col blanca. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C 123
- Figura 3.21.** Representación de Arrhenius de la tasa de inactivación de POD ligada y soluble de col blanca 124
- Figura 4.1.** Diferentes tipos de micropartículas obtenidas dependiendo de los materiales encapsulantes y de la técnica de secado utilizada 129
- Figura 4.2.** (A) Secador por aspersión utilizado en los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral (Mini Spray Dryer Buchi B-290). (B) Liofilizador empleado en los experimentos realizados en la Tesis Doctoral (Christ Alpha 1-2 LDplus)..... 132
- Figura 4.3.** Lecho fluido tipo “top-spray”, “bottom-spray” y spray tangencial..... 136
- Figura 4.4.** Equipo de lecho fluido empleado en los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral (Freund-Vector VFC-LAB Micro Flo-Coater®)..... 137
- Figura 4.5.** (A) Cromatograma del aroma con los tres compuestos objeto de estudio. (B) Cromatograma de una muestra secada por aspersión 158
- Figura 4.6.** (A) Recta patrón de AE. (B) Recta patrón de AB. (C) Recta patrón de FR. 159
- Figura 4.7.** Efecto de la concentración de los agentes encapsulantes HC (◐), GA (◑) y GX (◒) en la cuantificación de los compuestos volátiles AE (A), AB (B) y FR (C) tras secado por aspersión. Intervalos de confianza al 95% para AE (D), AB (E) y FR (F) 161

- Figura 4.8.** Microfotografías de microscopio electrónico para las diferentes muestras obtenidas. (A) MDs/HC/ β -CDs (9/1). (B) MDs/HC/ β -CDs (2.5/7.5). (C) MDs/GA/ β -CDs (9.5/0.5). (D) MDs/GA/ β -CDs (8/2). (E) MDs/GX/ β -CDs (9.95/0.05). (F) MDs/GX/ β -CDs (9.925/0.075) 168
- Figura 4.9.** Efecto del tiempo y de la temperatura en la cantidad de AE con diferentes agentes encapsulantes MDs/HC/ β -CDs, MDs/HC/ γ -CDs, MDs/HC y diferentes técnicas de secado (A) Secado por aspersión 4 °C (B) Secado por aspersión 25 °C (C) Liofilización 4 °C (D) Liofilización 25 °C (E) Lecho fluido 4 °C (F) Lecho fluido 25 °C..... 172
- Figura 4.10.** Efecto del tiempo y de la temperatura en la cantidad de AB con diferentes agentes encapsulantes MDs/HC/ β -CDs, MDs/HC/ γ -CDs, MDs/HC y diferentes técnicas de secado (A) Secado por aspersión 4 °C (B) Secado por aspersión 25 °C (C) Liofilización 4 °C (D) Liofilización 25 °C (E) Lecho fluido 4 °C (F) Lecho fluido 25 °C..... 175
- Figura 4.11.** Efecto del tiempo y de la temperatura en la cantidad de FR con diferentes agentes encapsulantes MDs/HC/ β -CDs, MDs/HC/ γ -CDs, MDs/HC y diferentes técnicas de secado (A) Secado por aspersión 4 °C (B) Secado por aspersión 25 °C (C) Liofilización 4 °C (D) Liofilización 25 °C (E) Lecho fluido 4 °C (F) Lecho fluido 25 °C..... 177
- Figura 4.12.** Distribución del tamaño de partícula de los diferentes polvos obtenidos mediante secado por aspersión, liofilización y lecho fluido. (Inset) Valores obtenidos de cada uno de los parámetros analizados..... 179
- Figura 4.13.** Microfotografías de una muestra de secado por aspersión (A), liofilización (B) y lecho fluido (C) 181
- Figura 5.1.** Polímeros insolubles de CDs usando EPI como agente polimerizante..... 188
- Figura 5.2.** Estructura química del colorante Rubí Directo 191
- Figura 5.3.** Espectro de absorción del colorante Rubí Directo..... 192
- Figura 5.4.** Recta de calibrado de Rubí Directo 192
- Figura 5.5.** Efecto del tiempo de contacto en la cantidad de colorante absorbido por los polímeros α -CDs-EPI y HP- α -CDs-EPI 202
- Figura 5.6.** Efecto del tiempo de contacto en la cantidad de colorante absorbido por los polímeros β -CDs-EPI e HP- β -CDs-EPI 204

- Figura 5.7.** Efecto del tiempo de contacto en la cantidad de colorante absorbido por los polímeros γ -CDs-EPI e HP- γ -CDs-EPI..... 206
- Figura 5.8.** Representación gráfica del modelo cinético de pseudo primer orden para los diferentes polímeros empleados en la absorción de Rubí Directo a diferentes concentraciones..... 208
- Figura 5.9.** Representación gráfica del modelo cinético de pseudo segundo orden para los diferentes polímeros empleados en la absorción de Rubí Directo a diferentes concentraciones..... 211
- Figura 5.10.** Representación de la constante k_1 frente a la concentración de colorante inicial 213
- Figura 5.11.** Representación de la constante k_2 frente a la concentración de colorante inicial 214
- Figura 5.12.** Representación gráfica del modelo de difusión intrapartícula para los diferentes polímeros empleados en la absorción de Rubí Directo a diferentes concentraciones..... 216
- Figura 5.13.** Representación gráfica de la isoterma de Freundlich. (A) α -CDs-EPI y HP- α -CDs-EPI. (B) β -CDs-EPI y HP- β -CDs-EPI. (C) γ -CDs-EPI y HP- γ -CDs-EPI 220
- Figura 5.14.** Representación gráfica de la isoterma de Langmuir. (A) α -CDs-EPI y HP- α -CDs-EPI. (B) β -CDs-EPI y HP- β -CDs-EPI. (C) γ -CDs-EPI y HP- γ -CDs-EPI..... 222
- Figura 5.15.** Factor de separación obtenido en los seis polímeros analizados 223
- Figura 5.16.** Representación gráfica de la isoterma de Temkin. (A) α -CDs-EPI y HP- α -CDs-EPI. (B) β -CDs-EPI y HP- β -CDs-EPI. (C) γ -CDs-EPI y HP- γ -CDs-EPI..... 225

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. <i>Propiedades fisico-químicas de las CDs nativas</i>	43
Tabla 1.2. <i>Especialidades farmacéuticas que contienen CDs</i>	53
Tabla 1.3. <i>Compuestos aromáticos encapsulados utilizando diferentes tipos de CDs</i>	58
Tabla 1.4. <i>Diferentes técnicas de fijación de β-CDs a textiles</i>	67
Tabla 3.1. <i>Actividad específica y total de POD ligada y soluble de lombarda</i>	94
Tabla 3.2. <i>Actividad específica y total de POD ligada y soluble de col blanca</i>	112
Tabla 3.3. <i>Comparación de la inhibición provocada por los diferentes agentes reductores en PODs de lombarda y col blanca</i>	118
Tabla 4.1. <i>Compuestos encapsulados usando maltodextrinas</i>	140
Tabla 4.2. <i>Compuestos encapsulados usando diferentes almidones</i>	142
Tabla 4.3. <i>Compuestos encapsulados usando CDs</i>	144
Tabla 4.4. <i>Caracterización físico-química de las emulsiones preparadas con diferentes agentes encapsulantes</i>	153
Tabla 4.5. <i>Eficacia de secado (ES) y contenido de humedad para las diferentes proporciones de agentes encapsulantes estudiadas</i>	156
Tabla 4.6. <i>Eficacia de encapsulación (EE) obtenida para AE, AB y FR en los diferentes tipos de mezclas de agentes encapsulantes</i>	163
Tabla 4.7. <i>Estimaciones del efecto de los agentes encapsulantes en cada uno de los compuestos volátiles</i>	165
Tabla 4.8. <i>Eficacia de secado (ES) obtenida para las diferentes técnicas de secado analizadas</i>	169
Tabla 4.9. <i>Contenido de humedad de las diferentes muestras obtenidas</i>	171

Tabla 5.1. k_1 , R^2 y valores de q experimentales y calculados mediante el modelo cinético de Lagergren para todos los polímeros usados	209
Tabla 5.2. k_2 , R^2 y valores de q experimentales y calculados mediante el modelo cinético de pseudo segundo orden para todos los polímeros usados	212
Tabla 5.3. k_i , R^2 y valores de q experimentales y calculados con el modelo de difusión intrapartícula para todos los polímeros usados	218
Tabla 5.4. Valores obtenidos con el estudio de las diferentes isothermas para cada uno de los polímeros	224

I. INTRODUCCIÓN GENERAL DE CICLODEXTRINAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL DE CICLODEXTRINAS

1.1. INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos naturales que se obtienen a partir de la degradación enzimática de uno de los polisacáridos más importantes de la naturaleza, el almidón. Las CDs pertenecen a una familia de compuestos con estructura tronco-cónica, en cuyo interior existe una cavidad estable de naturaleza hidrofóbica que puede atrapar o encapsular otras moléculas. Esta propiedad que tienen las CDs da lugar a la formación de una interacción de tipo hospedador-huésped, que modifica y/o mejora las características físicas, químicas y/o biológicas de la molécula encapsulada. Las aplicaciones de las CDs son muy diversas, se utilizan principalmente en la industria farmacéutica, industria alimentaria, industria química, cromatografía, catálisis, biotecnología, agricultura, cosmética e higiene, medicina, industria textil y medioambiente (Radu, Parteni y Ochiuz, 2016).

Aunque se conocen desde hace más de 120 años, las CDs tuvieron su auge en la década de los 80 del siglo pasado con las primeras aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria. Su expansión fue posible gracias a la producción a escala industrial de las tres CDs conocidas como nativas, α -, β - y γ -CDs (Rajendiran y Jenita, 2015). La producción de las mismas de forma más pura comenzó en el año 1984, lo que supuso un enorme avance en su uso industrial.

1.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y DESCUBRIMIENTO

La historia de las CDs comienza en Francia a finales del siglo XIX gracias a los trabajos del farmacéutico y químico Antoine Villiers, que estudió la acción de diversas enzimas sobre diferentes hidratos de carbono. En particular, estudiando el uso del fermento butírico de *Bacillus amylobacter* sobre almidón de patata, observó la formación de unos compuestos cristalinos con unas características

particulares. De esta manera, se produjo el descubrimiento de las CDs. Villiers describió que bajo ciertas condiciones (50 g de almidón de patata en 1 L de agua a 100 °C e inoculado con *Bacillus amylobacter* y su posterior incubación durante varios días a 40 °C), el almidón de patata fermentaba dando lugar a dextrinas. Villiers demostró lo sencillo que resultaba obtener estos nuevos compuestos a partir de la inoculación de *Bacillus*. Consideró estas nuevas sustancias como isómeros del almidón, casi insolubles en agua, solubles en alcohol, no fermentables y resistentes a ácidos. Concluyó que las propiedades que presentaban estas dextrinas eran claramente diferentes de las propiedades de los otros polisacáridos conocidos en esa época.

Al comienzo del siglo XX, en 1903, el químico y bacteriólogo austríaco Franz Schardinger, estudiando el comportamiento de microorganismos termorresistentes que podían dar lugar a intoxicaciones alimentarias, descubrió que un tipo de microorganismo especialmente termorresistente era capaz de disolver el almidón y formar subproductos cristalinos muy similares a las dextrinas observadas por Villiers. Usando la reacción de yodo, fue capaz de distinguir dos tipos de polisacáridos que denominó dextrina A y dextrina B. En 1904, Schardinger aisló otro microorganismo que denominó *Bacillus macerans* que también era capaz de producir las estructuras cristalinas denominadas dextrinas, con un rendimiento 10 veces superior a los que obtuvo Villiers en sus experimentos. Schardinger fue capaz de demostrar que estas dextrinas no eran reductoras frente a cobre, ni fermentables por levaduras y que podían ser sintetizadas a partir de diversas fuentes de almidón (patata, arroz, trigo). Concluyó que entre un 25-30% del almidón, se convertía en estas estructuras cristalinas. Sus métodos de separación los basó en la facilidad de cristalización de β -dextrina en agua y su baja solubilidad a temperatura ambiente, seguida por una precipitación de α -dextrina mediante la adición de alcohol. La distinción de estas dos formas la realizó en función de su capacidad para formar complejos de diferentes colores con yodo: gris-verdoso para α -dextrina en seco (el color cambiaba a azul en presencia de agua) y púrpura-rojizo para β -dextrina en seco y en agua (Schardinger, 1903).

Schardinger fue el primer investigador que describió las propiedades de estas dextrinas, incluyendo su capacidad para formar complejos de inclusión y sugirió que estos compuestos podían tener una estructura cíclica, sin embargo,

esta idea nunca la pudo demostrar, siendo Freudenberg quien, 30 años después, llegó a la conclusión de que se trataba de oligosacáridos cíclicos (Freudenberg y col., 1936). En los años 40, y gracias a la tecnología de difracción de rayos X se confirmó esta estructura (Kratky y Porod, 1949).

El principal descubrimiento de Schardinger fue el aislamiento del microorganismo capaz de sintetizar la enzima que cataliza la degradación del almidón para dar CDs, que años después fue denominada ciclodextrina glucosiltransferasa (CGTasa). Esta enzima se encarga de actuar frente a la amilosa, que es el componente lineal del almidón. A día de hoy, la mayor parte de la producción mundial de CDs se lleva a cabo con la utilización de *Bacillus macerans*. Los términos α - y β -dextrina fueron utilizados por primera vez por este investigador y gracias a este hecho, las CDs fueron denominadas durante muchos años “dextrinas de Schardinger”, aunque su descubrimiento se debe a Antoine Villiers (Figura 1.1).

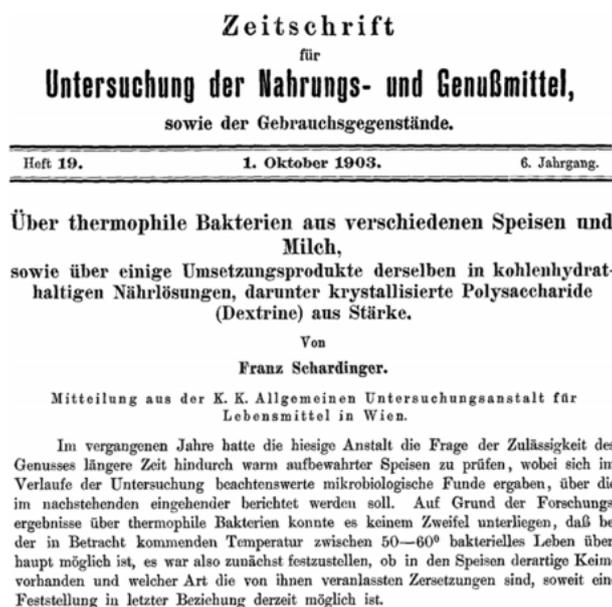


Figura 1.1. Primera página del artículo original publicado por Franz Schardinger sobre dextrinas en 1903.

En los antecedentes históricos acerca de las CDs, al periodo de tiempo comprendido entre 1911 y 1935, se le conoce como periodo de duda. Los dos

investigadores más importantes que marcaron esta época fueron Hans Pringsheim y Paul Karrer. Durante este periodo, la estructura de las CDs era aún desconocida ya que no fue hasta los años 30 cuando Freudenberg la descubrió (Freudenberg y col., 1936).

Para Hans Pringsheim, las dextrinas de Schardinger se producían a partir de una despolimerización bacteriana del almidón, dando lugar a unidades fundamentales: la fracción de amilosa se rompía dando lugar a α -dextrina y la amilopectina se degradaba para dar β -dextrina (Pringsheim, 1923). Los estudios que Pringsheim llevó a cabo junto a sus colaboradores contenían numerosos errores debido a que las dextrinas que usaron no eran totalmente puras, además de los problemas asociados de la separación de las dos fracciones. Pringsheim estaba también convencido de que las dextrinas estaban formadas exclusivamente por glucosas unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ como ocurría en el almidón. Esta teoría estaba de acuerdo con la que anteriormente había propuesto Karrer (Karrer, 1920). Estas dextrinas tenían un peso molecular mucho más bajo que el almidón y además no eran reductoras. Sin embargo, Pringsheim no fue capaz de determinar la estructura cíclica de estos compuestos.

Desde 1935 hasta 1950, las dextrinas de Schardinger entraron en un periodo de investigación clave en su historia, liderado por dos investigadores: Karl Johann Freudenberg y Dexter French. Freudenberg consideró inicialmente las dextrinas de Schardinger como cadenas de moléculas intermedias entre maltosa y almidón, no reductoras. En 1935, describió un método para la síntesis de estos compuestos con alta pureza y usó un método crioscópico para la determinación de su peso molecular (Freudenberg y Jacobi, 1935).

Freudenberg observó que la hidrólisis enzimática de las dextrinas sólo daba lugar a unidades de D-glucosa y dos años después llegó a la misma conclusión a la que había llegado Schardinger en lo relativo a su estructura cíclica. Aunque inicialmente las había considerado como cadenas de moléculas sin poder reductor, estudiando la reacción de hidrólisis, hidrólisis enzimática y acetólisis de las dextrinas, Freudenberg y sus colaboradores llegaron a la conclusión de que estas moléculas tenían estructura cíclica y estaban compuestas por unidades de maltosa unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$. En 1948, esta teoría se confirmó usando datos de actividad óptica (Freudenberg y Cramer, 1948). Por tanto, es a Freudenberg a quién hay que señalar como autor del descubrimiento de la

estructura de las CDs, aunque la determinación del peso molecular y del número de glucosas por las que estaban formadas no fuera correcto. A finales de los años 30, Freudenberg sugirió, por primera vez, la hidrofobicidad de la cavidad interna de estas dextrinas y describió su capacidad para formar complejos de inclusión con otras moléculas.

En 1947, Freudenberg y su equipo describieron el mecanismo de aislamiento de fracciones puras, modificando la versión publicada en 1935 (Freudenberg, Plankenhorn y Knauber, 1947a). Fueron capaces de producir β -dextrinas puras usando bromobenceno. Un año después descubrieron la existencia de γ -dextrinas (Freudenberg, Plankenhorn y Knauber, 1947b). Además de estos descubrimientos, Freudenberg propuso que debían existir CDs con 9 ó 10 moléculas de glucosa, cuya existencia fue demostrada por French años después.

En paralelo a los estudios llevados a cabo por Freudenberg, Dexter French también mostró interés por las dextrinas de Schardinger y repasando los trabajos sobre su peso molecular que había llevado a cabo Freudenberg, llegó a la conclusión de que los datos eran erróneos porque el método usado para su determinación no era adecuado. En 1942, French y Rundle, mediante difracción de rayos X y medidas de densidad cristalina determinaron el peso molecular de α - y β -dextrinas y descubrieron, por primera vez, el número exacto de unidades de glucosa por dextrina, que es seis y siete respectivamente. Además, demostraron que el peso molecular era múltiplo de 162.1 (peso molecular de glucosa) (French y Rundle, 1942) (Figura 1.2).

French determinó datos de solubilidad en agua de cada una de las dextrinas a temperatura ambiente. Estos valores fueron: para α -dextrina 14.5 g/100 mL, para β -dextrina 1.8 g/100 mL y para γ -dextrina 23.2 g/100 mL (French y Rundle, 1942). En 1950 determinó el tamaño molecular y la estructura de γ -dextrina, previamente descrita por Freudenberg como un heptasacárido cíclico (French, Knapp y Pazur, 1950). Usando hidrólisis ácida parcial y digestión enzimática seguida por medidas de difracción de rayos X y cromatografía en papel, French mostró que γ -dextrina estaba compuesta por 8 moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$. A finales de los años 50, French y sus colaboradores habían sido capaces de determinar el peso molecular, estructura química, dimensiones y los tipos de enlaces en las tres dextrinas descritas.

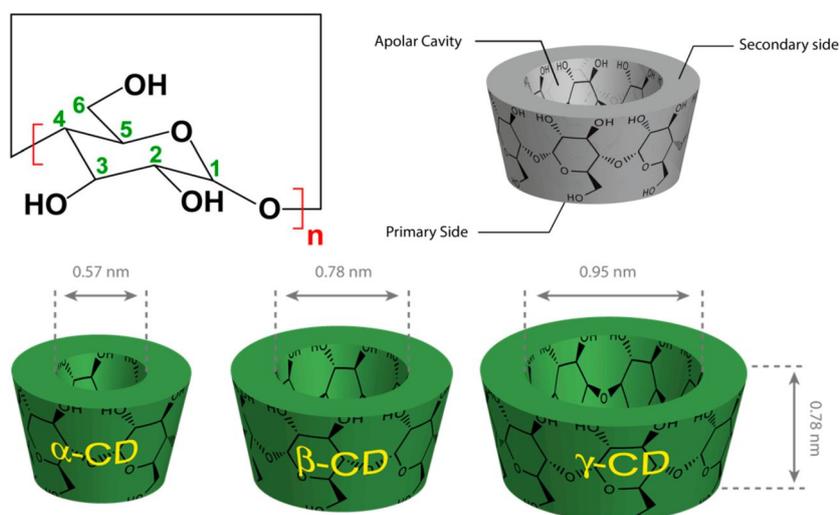


Figura 1.2. Estructura de las diferentes CDs nativas.

Para French, las principales conclusiones que se podían establecer respecto a las CDs a finales de los años 60, era que estos compuestos eran moléculas muy prometedoras para su uso en investigación pero que se necesitaban más estudios para un mejor entendimiento de sus propiedades. Además, su purificación sólo daba lugar a pequeñas cantidades de las mismas y mostraban cierta toxicidad cuando se emplearon con ratas (French, Pulley y Whelan, 1963).

Friedrich Cramer fue reconocido principalmente por sus aportaciones respecto a los complejos de inclusión en solución y en estado sólido (Figura 1.3).

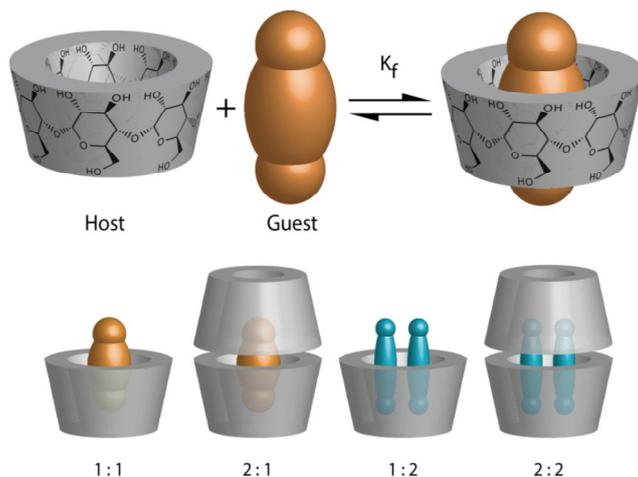


Figura 1.3. Tipos de complejos de inclusión que se forman entre las CDs y las moléculas huésped.

Cramer demostró que el principal valor de las CDs residía en su capacidad para formar complejos de inclusión en el interior de su cavidad interna y señaló que las CDs deberían ser consideradas más un cono truncado que un cilindro (Cramer 1952) (Figura 1.4).

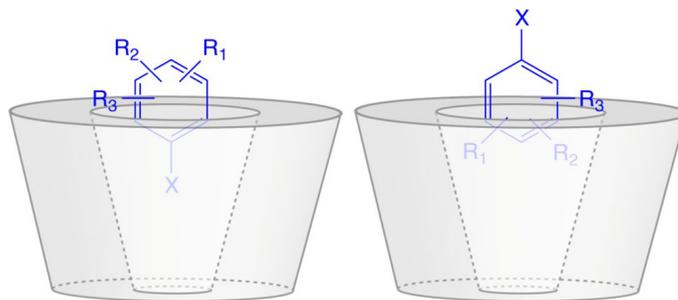


Figura 1.4. Estructura troncocónica de las CDs sugerida por Cramer (1952).

Los estudios de Cramer dieron lugar a dos conclusiones importantes:

- Los enlaces que se establecían entre la CD y la molécula huésped eran de tipo no covalente (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals), los cuales son débiles permitiendo que la unión sea de tipo reversible.
- La asociación que se establecía entre las 2 moléculas estaba regida por un equilibrio.

Fue en 1967 cuando Cramer describió con detalle cómo se producía la formación de los complejos de inclusión, llegando a las siguientes conclusiones (Cramer, Saenger y Spatz, 1967):

- El sustrato se acerca a la molécula de CD, las moléculas de agua salen del interior de la cavidad y adquieren un nuevo nivel energético.
- La molécula huésped se libera de la cubierta de agua que la envuelve, por lo que adquiere un estado energético diferente.
- La molécula huésped, en un estado de gas perfecto, entra en la cavidad y el complejo se estabiliza mediante interacciones de Van der Waals y/o puentes de hidrógeno.

- El agua que sale de la cavidad interna forma puentes de hidrógeno con otras moléculas de agua circundantes.

En los años 80, Jozsef Szejtli realizó importantes contribuciones en el campo de los complejos de inclusión formados por las CDs. Estas contribuciones pueden resumirse en los siguientes puntos (Szejtli, 1985):

- Modifican las características físico-químicas de la molécula huésped: compuestos con baja solubilidad acuosa, la incrementan tras su complejación, malos sabores u olores pueden ser eliminados, el color de ciertas sustancias puede ser alterado, etc.
- Modifican la actividad química del huésped: sustancias reactivas pueden ser estabilizadas al formar complejos de inclusión, lo que reduce su reactividad. Se pueden llevar a cabo selectivamente reacciones químicas. Además, las CDs juegan un rol importante en la catálisis, etc.
- Estabilizan sustancias sensibles a la luz o al oxígeno.
- Complejan sustancias volátiles: se puede mejorar el almacenamiento y manejo de ciertas sustancias tóxicas como pesticidas.

Además, Szejtli apuntó que las CDs son moléculas altamente versátiles ya que las diferentes formas físicas y químicas que pueden adoptar incluyen partículas (agregados, microesferas), polímeros solubles o insolubles, polímeros con CDs insertadas, geles e hidrogeles, membranas, superestructuras moleculares o nanopartículas. Todas estas formas son muy útiles para diferentes aplicaciones farmacéuticas o biomédicas.

1.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS CICLODEXTRINAS

Las CDs nativas son de tres tipos: α -, β -, y γ -CDs. También son denominadas ciclodextrinas parentales. Están formadas por 6, 7 u 8 unidades de glucosa, respectivamente, unidas por enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$ (Dass, Jessup y Apolipoprotiens, 2000). De todas ellas, β -CDs es la más accesible y la que tiene un

precio más bajo, además de ser la más usada. Las principales propiedades físico-químicas de las CDs se recogen en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas de las CDs nativas.

Propiedades	α -CDs	β -CDs	γ -CDs
N ^o glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25 °C (% <i>, p/v</i>)	14.5	1.85	23.2
ΔH (kJ/mol)	32.1	34.7	32.3
ΔS (J/°K.mol)	57.7	48.9	61.4
Tensión superficial (mN/m ²)	71	71	71
Rango T ^a de fusión (°C)	255-260	255-265	240-245
Diámetro exterior (Å)	14.6	15.4	17.5
Diámetro cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura (Å)	7.9	7.9	7.9
Volumen Cavidad (Å ³)	174	262	427

El diámetro exterior y de la cavidad así como la altura de las CDs nativas se observa en la Figura 1.5.

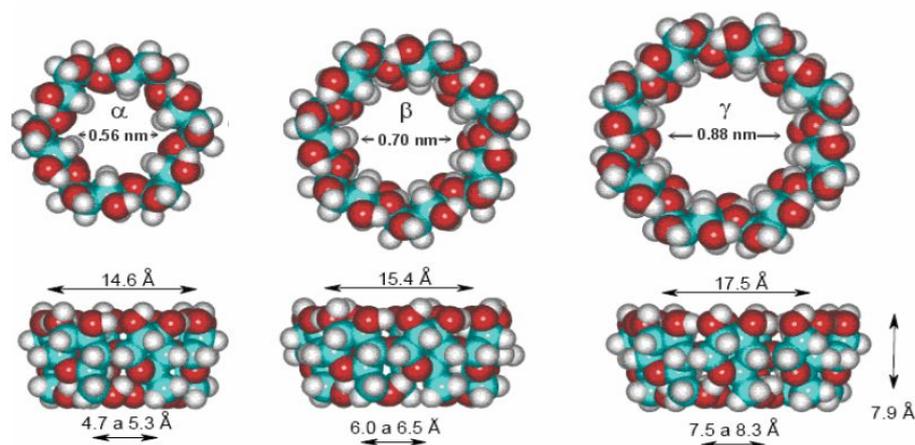


Figura 1.5. Diámetro interno y externo de las CDs nativas.

Además de las CDs parentales, existen multitud de CDs derivadas que se producen por aminaciones o esterificaciones en los grupos hidroxilo primarios o secundarios que quedan libres en las unidades de glucosa. Dependiendo del sustituyente, la solubilidad de las CDs modificadas es distinta de la de su correspondiente nativa. En general, las CDs modificadas presentan cambios en la hidrofobicidad de su cavidad interna, además de incrementar su solubilidad acuosa, estabilidad y control de la actividad química de la molécula huésped (Del Valle, 2004).

1.4. USO Y REGULACIÓN DE LAS CICLODEXTRINAS

El uso de las CDs aumenta anualmente en un 20-30%. La amplia utilización de estos compuestos tiene su reflejo en la industria farmacéutica, alimentaria, química y otras (Szejtli, 1997). En la industria farmacéutica, las CDs y sus derivados se han utilizado para la complejación de fármacos, así como para otros aditivos auxiliares con el fin de mejorar sus propiedades físico-químicas o aumentar su biodisponibilidad (Fromming y Szejtli, 1994). En la industria química, las CDs se utilizan como catalizadores para mejorar la selectividad de determinadas reacciones, así como para la separación y purificación de productos industriales (Hedges, 1998). El 80-90% de las CDs producidas se emplea en la industria alimentaria, tanto para estabilizar aromas como para eliminar sabores no deseados, contaminaciones microbiológicas, etc. (Singh, Sharma y Banerjee, 2002).

La regulación sobre el uso de las CDs es diferente dependiendo del país. En Estados Unidos, α -, β -, y γ -CDs están incluidas dentro de la lista de aditivos GRAS. En Japón, estas mismas CDs están consideradas como productos naturales y su comercialización en el sector alimentario está restringida solamente por consideraciones de pureza. En Australia y Nueva Zelanda, α - y γ -CDs están consideradas como nuevos alimentos desde 2004 y 2003 respectivamente (Cravotto y col., 2006). En Europa, α -, β -, y γ -CDs están consideradas como ingredientes alimentarios.

La recomendación de la FAO y del Comité de Aditivos Alimentarios (JECFA) sobre la ingesta de CDs en alimentos es de 5 mg/kg/día de β -CDs.

1.5. SOLUBILIDAD ACUOSA DE LAS CICLODEXTRINAS

La solubilidad acuosa de las CDs varía según el tipo; siendo β -CDs la menos soluble de todas ellas, 1,85 g/100 mL a temperatura ambiente. α - y γ -CDs son más solubles, 14,5 g/100 mL y 23,2 g/100 mL, respectivamente. Esta solubilidad depende, en gran medida, de la temperatura.

Aunque las CDs nativas son hidrofílicas, su solubilidad acuosa es limitada, especialmente en el caso de β -CDs. Esto se debe a la fuerte unión de las moléculas de CDs en el estado cristalino (alta energía de red cristalina) así como por la existencia de puentes de hidrógeno intramoleculares en el interior de la molécula de CD, lo que impide que se formen enlaces de hidrógeno con moléculas de agua de los alrededores de la cavidad (Coleman y col., 1992). La sustitución aleatoria de los grupos hidroxilo, incluso por sustituyentes hidrofóbicos, como es el caso de los grupos metoxi, provoca una gran mejora de la solubilidad acuosa de las CDs.

1.6. SITUACIÓN ACTUAL

Es conocido y está ampliamente descrito en la literatura que las CDs y sus derivados tienen una amplia variedad de aplicaciones prácticas en diferentes áreas: farmacia, medicina, alimentación, cosmética, química, catálisis, biotecnología, industria textil, etc. Además de estos sectores, la investigación con CDs también es muy activa en sectores como detergentes, pegamentos y adhesivos, sector del plástico y la industria de la fibra y del papel. La gran mayoría de estas aplicaciones químicas y biológicas están basadas en la capacidad de las CDs de formar complejos de inclusión (Crini, 2014).

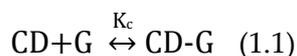
En los últimos años, se han publicado diversas revisiones sobre las aplicaciones prácticas de las CDs en diferentes áreas. Algunas de las más importantes son en: cromatografía (Vetter y Bester, 2006), agroquímica (Morillo, 2006), catálisis (Komiyama y Monflier, 2006; Karakhanov y Maximov, 2010), industria textil (Hashimoto, 2006; Voncina, 2011), tecnología enzimática (Villalonga, Cao y Fragosó, 2007), membranas (Kozłowski y Sliwa, 2008), química (Tonelli, 2008; Steed y Adwood, 2009), farmacia y medicina (Van de Manakker y col., 2009; Caliceti, Salmaso y Bersani, 2010), alimentos (Astray y col., 2009), aromas (Cabral-Marques, 2010), descontaminación (Kozłowski y Sliwa, 2010),

química supramolecular (Dong, Li y Shi, 2011), biotecnología (Li, Zhao y Li, 2011), cosmética (Tarimci, 2011), nanotecnología (Davis y Higson, 2011), remediación (Landy y col., 2012), microencapsulación (Guo y Wilson, 2013) y química analítica (Tong y Chen, 2013).

1.6.1. Ciclodextrinas y complejos de inclusión.

Las CDs pueden considerarse como cápsulas vacías de un cierto tamaño molecular que pueden incluir en su interior una gran variedad de moléculas, formando lo que se denomina “complejo de inclusión”. Los complejos de inclusión se forman entre dos o más moléculas. Una molécula es el hospedador y en ella se incluye parcial o totalmente la molécula huésped. Por tanto, las CDs son consideradas moléculas hospedadoras (Brewster y Loftsson, 2007). El enlace que se establece entre las dos moléculas es de tipo no covalente.

La formación del complejo de inclusión en disolución es un equilibrio dinámico (ecuación 1.1), donde CD es la ciclodextrina, G es la molécula huésped y CD-G es el complejo de inclusión. La estabilidad del complejo de inclusión está gobernada por una constante de equilibrio (K_c):



Cuánto más grande es la molécula huésped, más lentamente se produce la formación y descomposición del complejo. Este proceso de equilibrio es una de las características más importantes de esta asociación.

1.6.1.1. Energía y mecanismos de inclusión

La inclusión de una molécula en el interior de la cavidad de la CD, consiste en la sustitución de las moléculas de agua del interior de la cavidad por la molécula con menor polaridad (Figura 1.6). El proceso es energéticamente favorable por las interacciones de la molécula huésped con la cavidad solvatada e hidrofóbica del hospedador. En este proceso, tanto la entalpía como la entropía juegan un papel muy importante. El proceso de complejación es el resultado de varios efectos:

- Sustitución de las interacciones polares/apolares energéticamente desfavorables (entre el agua incluida en el interior de la CD y entre el agua y la molécula huésped) por otras interacciones apolares/apolares más favorables energéticamente (entre la molécula huésped y la cavidad) y las interacciones polares/polares (entre el agua y las moléculas de agua liberadas de la cavidad).
- La tensión del anillo de CDs se libera en la formación del complejo.
- Interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno que se producen entre la molécula huésped y la CD.

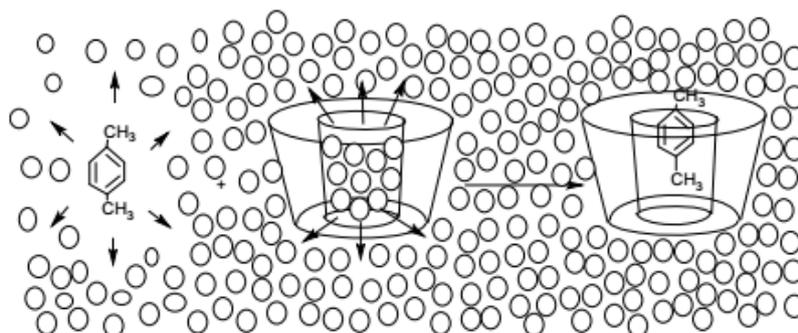


Figura 1.6. Formación del complejo de inclusión entre la CD y la molécula huésped (Astray y col., 2009).

Los parámetros termodinámicos que intervienen en la formación de los complejos de inclusión son: energía libre (ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) y se pueden obtener a partir de la dependencia con la temperatura de la constante de complejación. Los valores de ΔH y ΔS también se pueden calcular mediante espectrofotometría (Dodziuk, 2006), pero los datos más fiables se obtienen por calorimetría (Astray y col., 2009). La formación del complejo está asociada a una entalpía negativa relativamente grande, mientras que la entropía puede ser positiva o negativa.

En general, las interacciones hidrofóbicas se asocian con una entalpía ligeramente positiva y una entropía muy positiva, indicando que estas interacciones están controladas por la entropía. Esta situación difiere de la

complejación con CDs, en la que es la entalpía la que controla el proceso (Brewster y Loftsson, 2007).

De esta manera, mientras las moléculas de agua que se liberan de la cavidad están asociadas con una entalpía negativa, la contribución de energía libre de dichas moléculas a la formación del complejo es pequeña. Se ha observado que este complejo está regido por la entalpía y la entropía para diferentes moléculas huésped, con un aumento de entalpía y una disminución de la entropía (Szejtli, 1982). Este efecto se denomina compensación de la entalpía/entropía.

La energía del enlace covalente es 400 kJ/mol. La energía del enlace por puente de hidrógeno es 40 kJ/mol, mientras que la energía de enlace de las fuerzas de Van der Waals es 4 kJ/mol. En el caso de los complejos de inclusión, las moléculas que interactúan pueden alcanzar una estabilidad que puede ser proporcional a la energía del enlace covalente debido a la disposición espacial que adoptan. La otra fuerza dominante que se encarga de estabilizar es la fuerza hidrofóbica. El rol de los puentes de hidrógeno no es imprescindible y queda demostrado porque también se forman complejos estables con moléculas como el benceno el cual no puede formar este tipo de enlaces de hidrógeno.

1.6.1.2. Efecto de las propiedades de la molécula huésped

La compatibilidad geométrica entre la cavidad hidrofóbica de la CD y la molécula a encapsular, la estructura, carga y polaridad del huésped, el efecto del medio de reacción y la temperatura son factores importantes en la formación del complejo de inclusión (Szejtli, 1998).

La cavidad de β -CDs es la que tiene con mayor versatilidad para el atrapamiento molecular entre las CDs nativas, formando complejos de inclusión estables con mono y sesquiterpenos (Szente y Szejtli, 1988).

La carga y polaridad de la molécula huésped juegan un papel importante en las interacciones que se producen con la CD, sin embargo, tienen un papel menos decisivo que la estructura geométrica de la molécula. Algunas moléculas pueden ser complejadas por las CDs cuando son menos hidrofílicas o menos polares que el agua y existe una correlación positiva entre la estabilidad de los complejos de CDs y el carácter hidrofílico de las moléculas o ciertas partes de dichas moléculas. En el caso de la carga, la complejación de moléculas neutras es más sencilla que la de moléculas cargadas (Mercader-Ros y col., 2010).

El medio en el que se forma el complejo de inclusión es igualmente importante, ya que influye en el proceso de equilibrio en ambas direcciones. La formación del complejo de inclusión, no necesita solventes extras, pero la presencia de, al menos, una pequeña cantidad de agua sí es necesaria para el proceso de inclusión (Szejtli, 1995).

1.6.1.3. Propiedades del complejo de inclusión en disolución

Cuando un compuesto, más o menos polar, o con pobre solubilidad acuosa reacciona con una disolución de CDs, se producen las siguientes situaciones (Liu y col., 1999):

- La concentración de la molécula huésped disuelta aumenta significativamente y cuando se forman de manera simultánea complejos sólidos, la concentración de la CD disuelta disminuye.
- Las propiedades del espectro de absorción o fluorescencia de la molécula huésped se modifican.
- La reactividad de la molécula incluida se modifica, disminuyendo en la mayoría de los casos.
- La molécula originalmente hidrofóbica, en los complejos de inclusión, se hace más hidrofílica.

A comienzos del siglo XXI, algunos estudios arrojaron dudas sobre los mecanismos propuestos para explicar la formación de los complejos de inclusión. De hecho, los mecanismos y las fuerzas que actúan para lograr la complejación fueron y aún son, objeto de debate y controversia. El ejemplo más claro es el de las interacciones hidrofóbicas: su rol es controvertido debido a su definición. La hidrofobicidad es el resultado de la estructura que adoptan las moléculas de agua en un entorno de moléculas no polares, el cual favorece la agregación de moléculas no polares, esto minimiza la energía adicional que resultaría de la formación de una estructura protectora. Varios estudios han mostrado que es la parte hidrofóbica de la molécula huésped la que se incluye preferentemente en la cavidad de la CD y es orientada de tal manera que se maximiza el contacto entre esta parte hidrofóbica y la cavidad apolar de la CD. Por tanto, cuanto más hidrofóbica sea la molécula huésped, más estable será el complejo que se forme entre ellas. Rekharsky e Inoue en 1998 concluyeron que la hidrofobicidad y las

interacciones de Van der Waals predominaban en la formación de los complejos con respecto a los efectos estéricos y los puentes de hidrógeno. En base a cientos de publicaciones Fu, Liu y Guo en 2002 concluyeron que el agua que pudiera quedar en el interior de la cavidad no intervenía en el proceso de complejación, lo que cuestionaba alguna de las principales conclusiones propuestas por Szejtli en sus estudios, en los que afirmaba que la fuerza conductora de los complejos es la energía de estabilización del sistema a través del reemplazamiento de las moléculas de agua del interior de la cavidad por compuestos hidrofóbicos. Los complejos de inclusión se caracterizan por la estabilidad de sus interacciones, que es crucial en la eficacia que tienen las CDs en sus diferentes aplicaciones. Esto provoca que el proceso de formación de complejos de inclusión sea un aspecto muy estudiado, siendo cientos los trabajos que se pueden encontrar en la literatura científica respecto a la evaluación de las diferentes constantes obtenidas, así como la descripción de los principales conceptos asociados a esta formación.

1.6.2. Ciclodextrinas y agregados.

La manera más sencilla de fabricar complejos de inclusión es poner la molécula huésped en solución acuosa. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que los complejos de inclusión que se forman de esta manera proporcionan una versión simplificada de un proceso que es mucho más complejo (Loftsson, Brewster y Másson, 2004; Messner y col., 2010; Kurkov y Loftsson, 2013).

Las CDs son capaces de formar complejos de inclusión con moléculas huésped así como complejos de no inclusión, hecho que fue descrito por Cramer en 1956. Los grupos hidroxilo presentes en la superficie externa de la CD pueden formar puentes de hidrógeno con otras moléculas. Otra posibilidad es la formación de agregados capaces de disolver moléculas lipofílicas insolubles en agua. En los últimos años, en la industria farmacéutica, se ha observado que otro tipo de complejos, como los de no inclusión, también participan en la solubilización de determinados fármacos. La formación de estos agregados entre las moléculas de CDs y los fármacos puede aumentar su biodisponibilidad (Figura 1.7). Los agregados de CDs presentan la capacidad de formar complejos, nano-agregados y nanotubos con interacciones hospedador/huésped. Estas propiedades de las CDs están menos estudiadas y, en determinadas ocasiones, los

resultados son controvertidos porque dependen, en gran medida, de la técnica empleada para su construcción.

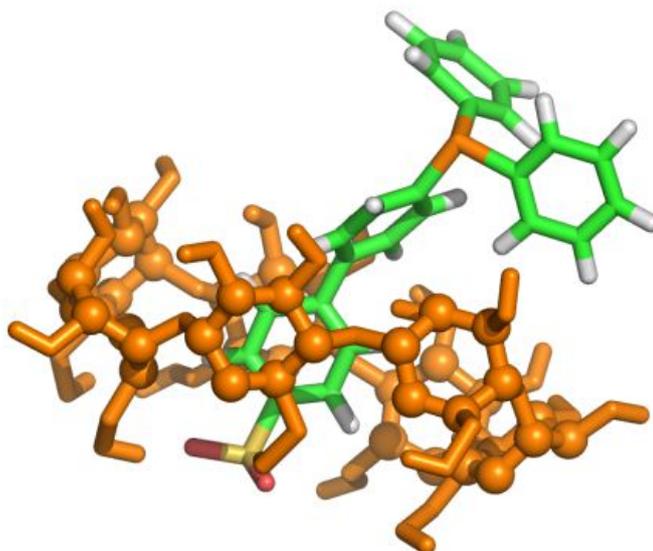


Figura 1.7. Autoensamblaje de las moléculas de CDs para dar lugar a la formación de agregados (Loftsson y Brewster, 2014).

En solución acuosa, las CDs se pueden autoensamblar para dar lugar a la formación de agregados. La formación de dichos agregados es dependiente de la concentración. En el caso de las CDs nativas, el porcentaje de CDs que forman agregados es, en la mayoría de casos, inferior al 1%. Las CDs modificadas (con sustituyentes hidroxipropilo o sulfobutileter), tienen menor tendencia a la formación de estos agregados a bajas concentraciones. Es interesante resaltar que el porcentaje de CDs que forman agregados se incrementa al aumentar su concentración. La formación de complejos de inclusión puede aumentar de forma significativa la tendencia de formar agregados (Messner y col., 2010).

El empleo de técnicas como dispersión de luz dinámica y microscopía de transmisión ha dado lugar a un mejor conocimiento del proceso de formación de agregados de CDs en disolución. Diferentes grupos de investigación, han demostrado que las CDs nativas forman agregados de diferentes formas, entre las

que se incluyen: partículas esféricas y alargadas así como fibras y varillas (González-Gaitano y col., 2002; Rossi y col., 2007).

A pesar de toda la información obtenida a partir de los artículos publicados sobre agregados de CDs, el mecanismo de formación de dichos agregados así como el complejo de agregación no ha sido totalmente aclarado por la comunidad científica.

1.6.3. Ciclodextrinas e industria farmacéutica.

Una de las aplicaciones clásicas de las CDs es en la industria farmacéutica. Esta industria siempre necesita crear nuevas formulaciones, tanto para aumentar las propiedades de los principios activos como para reformular especialidades farmacológicas ya existentes y las CDs ofrecen importantes ventajas respecto a las formulaciones tradicionales. La complejación de fármacos puede estabilizarlos, mejorar su solubilidad, biodisponibilidad y disminuir sus efectos adversos. Las CDs actúan como un sistema de transporte, lo que las convierte en candidatas para usarlas en diversas aplicaciones gracias a la formación de complejos de inclusión (Uekama, Hrayama e Irie, 1998). Su bioadaptabilidad y multifuncionalidad les permite minimizar problemas de los fármacos relacionados con las diferentes formas farmacéuticas y vías de administración.

En la Tabla 1.2 se observan diferentes formulaciones farmacéuticas que contienen distintos tipos de CDs, además de su uso terapéutico, formulación y marca comercial de los mismos.

Tabla 1.2. Especialidades farmacéuticas que contienen CDs.

CDs/Principio activo	Uso terapéutico	Formulación	Nombre comercial®
α -CDs <i>Alprostadilo</i>	Disfunción	Intramuscular	Caverject Dual
β -CDs <i>Cetirizina</i>	Agente antibacteriano	Cápsulas	Cetirizin
β -CDs <i>Dexametasona</i>	Esteroides	Pomada	Glymesason
β -CDs <i>Nicotina</i>	Sustituyente	Cápsulas	Nicorette
β -CDs <i>Nimesulida</i>	AINE	Cápsulas	Nimedex
β -CDs <i>Piroxicam</i>	AINE	Cápsulas	Brexin
HP- β -CDs <i>Indometacina</i>	AINE	Colirio	Indocid
HP- β -CDs <i>Itraconazol</i>	Antifúngico	Solución oral	Sporanox
HP- β -CDs <i>Mitomicina</i>	Anticancerígeno	Intravenoso	MitoExtra
SBE- β -CDs <i>Aripiprazol</i>	Antipsicótico	Intramuscular	Abilify
SBE- β -CDs <i>Maropitant</i>	Antiemético	Parenteral	Cerenia
SBE- β -CDs <i>voriconazol</i>	Antifúngico	Intravenoso	Vfend
HP- γ -CDs <i>Diclofenaco</i>	AINE	Colirio	Voltaren

Además de los fármacos presentes en la Tabla, también se pueden citar otras formulaciones que contienen CDs como son: prednisolona con SBE- β -CDs para aumentar solubilidad y estabilidad (Rao, Haslam y Stella, 2001), sulfametazol con β -CDs y HP- β -CDs (Bodor, Drustrup y Wu, 2000), prostaglandina E1 con sulfobutil-eter- β -CDs (Uekama et al., 2001) o insulina con HP- β -CDs para aumentar la absorción (Zhang, Jiang y Yao, 2001).

Diferentes estudios han demostrado que la administración por vía oral de especialidades farmacéuticas que contienen CDs no causa toxicidad debido a que no se absorben en el tracto gastrointestinal (Arima, Motoyama e Irie, 2011). Como se observa en la Tabla 1.2 α -, β -, HP- β -, SBE- β -, γ - y HP- γ -CDs pueden encontrarse en distintas especialidades farmacéuticas. La administración vía parenteral de α -, β -, o sus formas metiladas, puede ocasionar toxicidad renal, de tal manera que su uso se evita en estos casos. α -CDs se emplean por vía parenteral pero a dosis muy bajas para evitar estos posibles efectos adversos (Kurkov y Loftsson, 2013).

Aunque las CDs pueden encontrarse en, al menos, 40 especialidades farmacéuticas diferentes, aún son consideradas como excipientes relativamente

nuevos (Brandariz e Iglesias, 2013; Concheiro y Álvarez-Lorenzo, 2013; Zhang y Ma, 2013). Los excipientes son considerados como compuestos farmacológicamente inactivos, aunque desde el punto de vista regulatorio, son considerados como compuestos activos y se les presta mayor atención debido a su uso en humanos (Koo, 2011). A diferencia de los fármacos, los excipientes no tienen una regulación claramente definida y en muchos casos, la aceptación de su uso se debe, principalmente, a que ya han sido usados previamente en otras aplicaciones. Los excipientes que son reconocidos por las autoridades de aditivos alimentarios, son inmediatamente reconocidos como excipientes utilizables en aplicaciones farmacológicas.

Recientemente, se ha observado que las CDs y sus complejos, se autoensamblan para formar nanopartículas, y bajo determinadas condiciones, estas nanopartículas pueden dar lugar a micropartículas. Estas propiedades han cambiado la manera de usar las CDs en la investigación farmacéutica y han dado lugar al desarrollo de nuevas formulaciones (Kurkov y Loftsson, 2013).

Está descrito que las CDs pueden usarse en formulaciones con propiedades antifúngicas, donde actúan como sustancias auxiliares para modificar y mejorar las propiedades físico-químicas de los compuestos activos (solubilidad, estabilidad, etc).

Los efectos biológicos de las CDs pueden dividirse en 2 grupos: por un lado, efectos basados en la capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión con sustancias endógenas (lípidos de membrana, colesterol) y efectos basados en la formación de complejos de inclusión con algunas partes de las células fúngicas y por otro lado, efectos que se basan en la naturaleza química de las CDs y sus derivados. Los avances en la investigación de la actividad biológica de las CDs, especialmente los que se centran en las propiedades responsables de su efecto sinérgico con compuestos antimicóticos, han sido discutidos por algunos autores (Macaev y col., 2013) y el número de publicaciones donde se usan las CDs en formulaciones antifúngicas continúa creciendo hoy en día.

1.6.4. Ciclodextrinas y nanotecnología.

Las CDs y sus derivados han sido usadas con éxito para crear nuevos nanomateriales (Davis y Higson, 2011; Tejashri, Amrita y Darshana, 2013; Chilajwar y col., 2014). Estos materiales han encontrado aplicación en formulaciones en la industria farmacéutica, en particular en la liberación controlada de fármacos (Bilensoy y Hincal, 2009; Goyal, Johal y Rath, 2011). Hoy en día, la nanotecnología está en auge debido a su capacidad para combinar características que son difíciles de conseguir haciendo uso de medicamentos en su forma libre. Las nanoesponjas fabricadas a partir de CDs son un avance que indica la importancia que pueden tener en el futuro en los sistemas de liberación de los fármacos.

Según Chilajwar y col. (2014) los análisis estadísticos muestran que un 40% de los fármacos comercializados actualmente y el 90% de fármacos en fase de desarrollo tienen problemas de solubilidad. Los sistemas de nanoesponjas emergen como un sistema innovador sobre las CDs convencionales ya que solucionan algunos de los problemas y desventajas de éstas. Estas nuevas estructuras pueden mejorar la biodisponibilidad de fármacos ya que modifican sus parámetros farmacocinéticos. Las nanoesponjas ofrecen alta carga de fármaco comparadas con otros carriers, solucionando problemas relacionados con la solubilidad, estabilidad y retraso en la liberación de los principios activos (Tejashri, Amrita y Darshana, 2013). Los métodos de preparación de estas nanoesponjas son bastante conocidos y pueden ser formuladas como formas farmacéuticas para vía oral, parenteral, tópica o inhalatoria. Sin embargo, se necesita más información para optimizar su actuación para propósitos terapéuticos.

1.6.5. Aplicaciones biomédicas.

El campo de la biomedicina no escapa al interés por las CDs. Existen algunos ejemplos como es el caso del compuesto Bridion® que es una γ -CDs modificada usada para la relajación muscular, empleada desde 2008. Tras su administración vía intravenosa, neutraliza algunos agentes esteroideos mediante

la formación de complejos inactivos en el plasma, que posteriormente son eliminados por la orina (Rudzka-Nowak y Piechota, 2011).

Otro ejemplo interesante está relacionado con la preparación de la vacuna Daptacel® (Sanofi Group), para la protección contra la difteria, tétanos y tosferina, en la que se forman complejos de inclusión con dimetil- β -CDs.

También hay estudios recientes sobre las propiedades físico-químicas de anestésicos locales y sus complejos de inclusión en CDs (Brandariz e Iglesias, 2013). Su capacidad para alcanzar y bloquear los canales de sodio y actuar como anestésicos depende de su estado de protonación. Diferentes estudios mostraron que el grado de complejación con CDs varía enormemente con el estado de protonación de las moléculas implicadas (Brandariz e Iglesias, 2013).

Las CDs son consideradas como moléculas con unas propiedades muy interesantes para su uso en bio- y nanomedicina, como nanopartículas para liberación de fármacos, biosensores para diagnóstico molecular, terapia génica o ingeniería de tejidos. Esta tendencia se refleja en el elevado número de publicaciones relacionadas con este tema. Sin embargo, la mayoría de sistemas se encuentran en fase de desarrollo, ya que es difícil llevar a la práctica todas las investigaciones a nivel de laboratorio.

El coste es otro factor limitante para el éxito de estos nuevos materiales basados en el uso de CDs. Otro gran problema asociado es la falta de estudios donde se evalúe la biocompatibilidad y la toxicidad de estos nanomateriales. A pesar de estos inconvenientes, Zhang y Ma en 2013 predijeron un gran crecimiento en el uso de las CDs en campos como la biomedicina.

1.6.6. Ciclodextrinas e industria alimentaria.

El uso de CDs en la industria alimentaria tiene interés para aplicaciones en el procesado de alimentos y como aditivos con diferentes objetivos:

- Proteger componentes lipofílicos de alimentos que son sensibles al oxígeno, luz o degradación inducida por temperatura.
- Solubilizar colorantes alimentarios y vitaminas.
- Estabilizar aromas, vitaminas y aceites esenciales.
- Eliminar olores y sabores desagradables.

- Conseguir una liberación controlada de algunos componentes alimentarios.

1.6.6.1. Encapsulación de aromas con CDs

Los aromas tienen un papel esencial en la satisfacción del consumidor, lo que influirá en el consumo de determinados alimentos. El procesado y empaquetamiento puede dar lugar a modificaciones en el sabor mediante la reducción de la intensidad de los compuestos aromáticos o por la producción de compuestos que dan un sabor no deseado (Lubbers, Landy y Voilley, 1998). Para limitar la degradación o pérdida del aroma durante el almacenamiento o procesado, es importante encapsular los compuestos volátiles antes de que sean usados en alimentos y bebidas. La variedad de técnicas de encapsulación es grande, destacando como las más interesantes: secado por aspersión, liofilización, extrusión o coacervación.

El proceso de formación de complejos entre la CD y el compuesto de interés ofrece un gran potencial para la protección de dicho volátil. La adición de β -CDs como agente estabilizante puede retener ciertos compuestos aromáticos en matrices alimentarias durante el procesado térmico (Jouquand, Ducruet y Giampaoli, 2004). La encapsulación a nivel molecular inhibe o excluye las interacciones moleculares entre los diferentes componentes de sistemas naturales o sintéticos como concentrados de aroma, aceites esenciales, oleorresinas, etc. (Szente y Szejtli, 2004).

La utilización de CDs en la industria de aromas es muy importante, como se observa en la Tabla 1.3, en la que se muestran los diferentes tipos de CDs empleadas para encapsular compuestos aromáticos y sus respectivas aplicaciones en la industria alimentaria.

Tabla 1.3. *Compuestos aromáticos encapsulados utilizando diferentes tipos de CDs.*

Tipos de CDs	Aromas encapsulados	Aplicaciones de las CDs	Bibliografía
β -CDs HP- β -CDs	L-mentol, naringina, naranja	Protección frente a la degradación	Liu y col., 2000, 2013, Zhu y col., 2014
β -CDs HP- β -CDs	Aceite de canela, carvacrol, zumo de uva	Actividad antioxidante y/o antimicrobiana	Mascheroni y col., 2013, Li y col., 2015, Wen y col., 2016
β -CDs	Aceites esenciales, D-limoneno	Retención y liberación controlada	Yuliani y col., 2006, Hadaruga y col., 2008, Kfoury y col., 2015
α -CDs β -CDs γ -CDs	Leche de cabra, ginseng, naringina, cafeína	Eliminación de olores desagradables	Tamamoto y col., 2010, Young y col., 2012
HP- β -CDs	Vanillina, naringina	Mejora de la solubilidad	Karathanos y col., 2007, Mantegna y col., 2012
β -CDs γ -CDs	Vanillina, aromas de café, especias, timol y cinamaldehído	Estabilización	Singh y col., 2002, Kayaci y Uyar 2012, Cevallos y col., 2010, Kfoury y col., 2015

Existe una gran variedad de productos de la industria alimentaria en los que las CDs se han implementado con éxito (Figura 1.8). Algunos de los más interesantes son: Cyroma® es un azúcar aromatizado producido en Hungría en el que las CDs tienen un papel destacado en la preservación del aroma durante el cocinado. Flavono® es un chicle producido en Japón con CDs para estabilizar el aroma. Gymet® es un tipo de fibra que se añade a las bebidas en Japón. Las CDs también se han empleado para enmascarar olores desagradables. CAVAMAX® W8 Curcumina es un producto producido por Wachter Chemie (Alemania), es un suplemento alimentario que contiene curcumina y γ -CDs (Szejtli y Szente, 2005; Das y col., 2013; Dordevic y col., 2015). Vivid® se emplea en diferentes productos

de panadería. Con una pequeña cantidad de este polvo aromatizado, se consigue una gran aromatización en el producto final. Además, presenta una elevada resistencia a altas temperaturas.



Figura 1.8. Componentes alimentarios que contienen CDs en su formulación.

1.6.6.2. Protección frente a degradación, luz y temperatura

La formación de complejos de inclusión con CDs puede proteger algunos componentes lipofílicos presentes en los alimentos que son sensibles al oxígeno, temperatura o degradación por luz.

En la producción de zumos, la homogenización de los tejidos vegetales da lugar, a veces, a la aparición de compuestos coloreados que provocan el pardeamiento. Peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO), son las principales enzimas que participan en este proceso de pardeamiento transformando los compuestos fenólicos en compuestos coloreados. Con el objetivo de evitar este efecto, frutas y verduras pueden ser tratadas con CDs, las cuales pueden encapsular los sustratos de PPO y POD (Del Valle, 2004). Está demostrado que las CDs son capaces de proteger los compuestos fenólicos de la oxidación enzimática mediante la formación de complejos de inclusión (Irvin y col., 1994).

Recientemente, diversos estudios sobre manzana (López-Nicolás y col., 2007), melocotón (López-Nicolás y col., 2007a), pera (López-Nicolás y García-Carmona, 2007), plátano (López-Nicolás y col., 2007b) evaluaron la presencia de diferentes tipos de CDs nativas (α -, β - y γ -CDs) y modificadas (maltosil- β -CDs) en la elaboración de zumos. La efectividad de estos compuestos como agentes antipardeamiento se determinó con el estudio de los parámetros de color CIELAB. Además, para clarificar el mecanismo por el cual las CDs inhibían el

pardeamiento enzimático, los procesos fueron modelados cinéticamente en presencia y ausencia de CDs usando métodos colorimétricos.

En el caso del zumo de manzana y de pera se observó que maltosil- β -CDs podían aumentar la capacidad del ácido ascórbico de prevenir pardeamiento enzimático debido al efecto protector de estas CDs. Se puede concluir que maltosil- β -CDs actúan como antioxidantes secundarios, reduciendo el pardeamiento de ambos tipos de zumo y favoreciendo la capacidad antioxidante natural de los alimentos.

En el caso de zumo de melocotón, los resultados mostraron que la constante de afinidad más alta se obtuvo con α -CDs seguida de maltosil- β -CDs. Con β -CDs, no se pudo inhibir el pardeamiento.

En el caso del zumo de plátano, se observó que la presencia de fenoles hidrofóbicos e hidrofílicos, significó que las CDs pasaron a ser un agente favorecedor del pardeamiento, dando lugar a cambios de color que no se habían observado en otros casos (Sojo y col., 1999). Además, se calculó la constante aparente de complejación entre los inhibidores naturales de PPO en el zumo de plátano y maltosil- β -CDs ($K_{c1}=27\pm 0.2 \text{ mM}^{-1}$). El conocimiento de esta constante es de gran importancia para potenciales usos de estos moduladores de color en alimentos. Aunque el pardeamiento de alimentos está asociado a pérdidas de valor nutricional y calidad sensorial, hay un pequeño grupo de alimentos en los que el oscurecimiento es deseable.

Los compuestos aromáticos pueden ser sensibles a algunos tipos de radiación, por ejemplo, el citral, se cicla bajo radiación UV, sufriendo como otros monoterpenos cíclicos, alteraciones en el sabor. Este tipo de alteraciones se pueden prevenir mediante la complejación con β -CDs y este efecto protector se potencia en materiales en estado sólido frente a soluciones líquidas, dónde una proporción de la molécula huésped es liberada del interior del complejo para que se cumpla el equilibrio (Szejtli, 1979).

Aromas de café sintético y natural también se han estabilizado con el uso de β -CDs. En el caso del té, estudios comparativos de estabilidad y análisis sensorial demostraron que el uso de β -CDs atrapaba compuestos volátiles responsables de la aromatización (jazmín, menta o canela) dando lugar a productos con una mejor estabilidad, almacenaje y valor sensorial (Szejtli, Szejtli y Szente, 1978).

1.6.6.3. Eliminación de aromas y sabores desagradables.

El sabor amargo es la principal razón para el rechazo de productos alimentarios, aunque existen excepciones: en algunos alimentos y bebidas como café, cerveza o vino, en los que un cierto grado de amargor se considera adecuado. El amargor, sin embargo, se ha demostrado como una clara limitación para aceptar, por parte de los consumidores, zumos de frutas convencionales. Los principales responsables de este sabor son dos clases de compuestos químicos: flavonoides (naringina) y limonoides (limonina). Los zumos de cítricos naturales no son amargos pero acaban adquiriendo amargor con el almacenamiento, dependiendo del pH y de la temperatura. Se necesita un proceso capaz de eliminar los componentes que dan el sabor amargo a estos zumos para que mantengan el sabor y valor nutricional esperado.

Las CDs se pueden emplear para enmascarar olores o sabores no deseados, ya que forman complejos de inclusión con los compuestos responsables, desodorizando el producto final. Por ejemplo, se usan en la desodorización de la leche de soja y también para eliminar el olor a pescado (Sakakibara y col., 1985).

Cuando el arroz se almacena durante mucho tiempo adquiere un olor desagradable, que puede ser eliminado si es cocinado en presencia de β -CDs (0.01-0.4%) (Takeda Chem. Ind. Ltd., 1981), o maltosil- β -CDs (Kuwabara y col., 1988).

El hidrolizado de caseína de leche es una fuente de proteína adecuada pero su sabor amargo es un problema. Este sabor puede eliminarse añadiendo un 10% de β -CDs al hidrolizado proteico (Suzuki, 1975).

Con el objetivo de ensalzar la capacidad de enmascaramiento de las CDs y ampliar su campo de aplicación, Binello y col. en 2004, prepararon una serie de derivados macromoleculares, en los que β - y γ -CDs fueron unidas covalentemente a carboximetil-chitosan y carboximetil-celulosa. Los resultados fueron satisfactorios con limonina, naringina y cafeína. Sin embargo, la introducción de estos polímeros como aditivos alimentarios está sujeta a restricciones. Binello y col., en 2008 pensaron que la solución a este problema podría ser el uso de polímeros. Para ello, sintetizaron una serie de polímeros, entrecruzando β -CDs con carbonato de difenilo, epiclorohidrina o diisocianato de hexametileno. Estos polímeros fueron testados como agentes secuestrantes de

naringina y los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) demostraron su habilidad en la formación de complejos de inclusión.

La complejación de CDs con edulcorantes como aspartamo, estabiliza y mejora el sabor. También elimina el sabor amargo de otros edulcorantes como esteviósido, glicirricina o rubusósido. Además de todo ello, el uso de CDs para aumentar el sabor de bebidas alcohólicas como whiskey o cerveza ha sido apuntado por Singh, Sharma y Banerjee en 2002.

1.6.6.4. Atrapamiento de colesterol.

β -CDs son usadas para eliminar, de manera efectiva, el colesterol de origen animal en determinados productos, con el objetivo de mejorar sus características nutricionales. Entre los productos estudiados se encuentra: leche (Kwak y col., 2004), donde se consiguió una eliminación del 41% de colesterol y mayonesa con una eficacia cercana al 100% (Jung y col., 2008). Mantequilla (Jung y col., 2005; Kim y col., 2006) y manteca de cerdo (Kim, Kim y Kwak, 2007) mostraron un rango de eliminación de colesterol de 93% con un 5% de β -CDs, también en queso (Bae, Kim y Kwak, 2008), yema de huevo (Awad, Bennink y Smith, 1997) y nata (Shim, Ahn y Kwak, 2003) las CDs han eliminado el colesterol.

1.6.6.5. Preservación de alimentos.

Otra aplicación de las CDs en alimentación es la que implica su uso en materiales de envasado. Las CDs proporcionan principalmente dos ventajas (Wood, 2001):

- Mejora de las propiedades de barrera del material de envasado.
- Mejoran de las propiedades sensoriales del alimento.

Hay diferentes complejos con CDs que se utilizan en alimentos como antisépticos o agentes conservantes. Yodo- β -CDs (0.1%) inhibe la putrefacción durante dos meses a 20 °C en pasta de pescado o en productos de marisco congelados (Hara y Hashimoto, 2002). Algunos compuestos volátiles naturales como el hexanal, tienen capacidad antifúngica pero limitada en post-cosecha debido a su volatilidad. El hexanal ha sido complejado con β -CDs para estudiar

su capacidad antifúngica in vitro frente a los patógenos *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* (Almenar y col., 2007).

La complejación usando β -CDs también ha sido efectiva para la liberación controlada de α -tocoferol en envases activos (Siro y col., 2006).

Por otra parte, se ha estudiado el efecto que tiene la humedad relativa de los envases de verduras y frutas recién cortadas en el deterioro de dichos alimentos. El uso de CDs podría ser una ventaja para liberar compuestos antioxidantes y antimicrobianos de tipo hidrofóbico. Con altos niveles de humedad relativa, las interacciones CDs/molécula huésped se debilitan, de tal forma que los compuestos antimicrobianos o antioxidantes se liberan y protegen al producto frente al crecimiento microbiano (Ayala-Zavala y col., 2008).

En los últimos años, la industria de alimentos funcionales ha dirigido su investigación al desarrollo de compuestos con alto valor añadido para su uso en la fortificación de productos tradicionales. Unos de los alimentos funcionales más prometedores son aquellos enriquecidos con compuestos antioxidantes de naturaleza lipofílica. A pesar de las numerosas ventajas de estos compuestos antioxidantes, también presentan algunos inconvenientes que dificultan su uso en alimentos funcionales. Estos problemas pueden solucionarse usando CDs como agentes encapsulantes.

López-Nicolás, Rodríguez-Bonilla y García-Carmona publicaron en 2014 una revisión sobre estudios acerca de los complejos formados entre varios compuestos antioxidantes y diferentes tipos de CDs, centrando la atención en los datos contradictorios publicados sobre la capacidad antioxidante del complejo hospedador/huésped, las diferentes constantes de complejación para idénticos complejos, la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes en presencia de CDs y las recomendaciones acerca del uso de CDs nativas o modificadas. Los autores concluyeron que las CDs actúan como antioxidantes secundarios, mejorando la capacidad de los antioxidantes tradicionales para evitar el pardeamiento enzimático en diferentes alimentos.

1.6.7. Ciclodextrinas y cromatografía.

A pesar de que se han publicado, desde los años 80, una gran cantidad de artículos relacionados con CDs y cromatografía, este es un sector que continua atrayendo el interés de la comunidad científica (Vetter y Bester, 2006; Xiao y col., 2012; West, 2014). La cromatografía de gases es una de las técnicas de cromatografía más habituales y los primeros estudios del uso de CDs en este tipo de cromatografía datan de los años 60 del siglo pasado (Sand y Schlenk, 1961). Las CDs son inmovilizadas en forma de fina película sobre la pared del capilar.

Además de la cromatografía de gases, las CDs también se emplean en cromatografía de fluidos supercríticos. La principal ventaja de esta técnica respecto a otras técnicas cromatográficas es que se pueden separar compuestos termolábiles o que no sean volátiles. El dióxido de carbono es el compuesto más adecuado para utilizar como fase móvil en estas separaciones ya que debido a su pequeño tamaño puede ser desplazado rápidamente del interior de la cavidad de la CD. La aplicación más importante es en las separaciones quirales (Schneiderman y Stalcup, 2000).

La adición de CDs a la fase móvil empleada en cromatografía líquida, provoca el fraccionamiento del soluto entre la fase estacionaria y los complejos de inclusión que se forman en la fase móvil. La eficiencia de separación, así como la resolución de estos sistemas, depende del tipo y concentración de CDs utilizadas, el tipo de fase móvil, la temperatura y el tipo de fase estacionaria (Schneiderman y Stalcup, 2000).

El número de publicaciones continúa en aumento, no sólo en cromatografía líquida de alta resolución sino también en cromatografía capilar, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos. Xiao y col. en 2012 concluyeron que el empleo de CDs en cromatografía de fluidos supercríticos va a jugar un papel muy importante en el futuro de la industria farmacéutica.

1.6.8. Ciclodextrinas, fragancias e industria cosmética.

La industria de fragancias es un sector innovador dentro de la industria química (Cabral-Marques, 2010). Las fragancias químicas son añadidas a productos de higiene personal, perfumes, desodorantes, detergentes, etc. La

aplicación de técnicas de encapsulación usando CDs está aumentando en este tipo de industria con el fin de mejorar la eficiencia en la aromatización de estas fragancias.

La encapsulación de fragancias en CDs es un proceso sencillo que ayuda a protegerlas, asegura una liberación controlada de las mismas, reduce su volatilidad y aumenta su solubilidad acuosa. Gracias a todas estas propiedades, las CDs son moléculas comúnmente usadas en la encapsulación de fragancias.

Por lo que respecta a fragancias, la concentración de las mismas disminuye rápidamente durante el almacenamiento debido a su volatilidad y baja estabilidad. En preparaciones cosméticas, las CDs se emplean con los siguientes propósitos (Numanoglu y col., 2007):

- Aumentar la solubilidad en agua de compuestos lipofílicos.
- Incrementar la estabilidad física y química de la molécula huésped frente a la degradación.
- Proporcionar una liberación controlada de fragancias.
- Minimizar la irritación de la piel.
- Evitar interacciones entre diferentes componentes presentes en la formulación.
- Aumentar o disminuir la absorción de diferentes componentes en la piel.
- Estabilizar emulsiones y suspensiones.
- Reducir o eliminar olores indeseados.

Una gran cantidad de componentes cosméticos son prácticamente insolubles en agua pero son capaces de formar complejos de inclusión con CDs. En productos de higiene personal, triclosán actúa como un antiséptico tópico y desinfectante, siendo casi insoluble en agua, ligeramente soluble en disolución alcalina y bastante soluble en disolventes orgánicos. Las CDs ayudan a mejorar la solubilidad de este compuesto. Las CDs también se emplean en desodorantes de barra para atrapar los compuestos responsables del mal olor (Buschmann y Schollmeyer, 2002).

Otras aplicaciones de las CDs en la industria cosmética son: colirios, formulaciones para la estabilización de aromas y fragancias o para la eliminación

de sabores indeseados (Venturini y col., 2008). Además, el uso de CDs como moléculas formadoras de complejos de inclusión también es prometedor para otras aplicaciones, especialmente en industrias emergentes como el caso de la aromaterapia y la industria textil.

1.6.9. Ciclodextrinas e industria textil.

Muchas investigaciones así como los resultados prácticos de las mismas, señalan que las CDs podrían actuar como compuestos activos en textiles (Andreas y col., 2010; Bhaskara-Amrit, Agrawal y Warmoeskerken, 2011; Voncina y Vivod, 2013). La industria química de acabado es muy importante para darle a los textiles nuevas funcionalidades y convertirlos en más apropiados para aplicaciones sociales como resistencia antimicrobiana, retardo al fuego, etc.

β -CDs pueden incorporarse a los tejidos mediante sprayado, impresión, recubrimiento en superficie, impregnación, etc. (Voncina y Le Marechal, 2005). Algunos ejemplos de las diferentes técnicas de fijación de β -CDs y sus correspondientes modificadas se resumen en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. *Diferentes técnicas de fijación de β -CDs a textiles.*

Técnica	Material	CDs	Bibliografía
Entrecruzamiento	Algodón, lana, poliéster, poliamida	β -CDs	Voncina, Vivod y Chen, 2009
	Celulosa	β -CDs	Szejtli, 2003
	Algodón	β -CDs	Wang y Chen, 2004
Injerto	Algodón	MCT- β -CDs	Hebeish, El Shafei, y Shaarawy, 2009
	Poliamida	MCT- β -CDs β -CDs	
	Polipropileno	β -CDs	Gawish y col., 2006
	Algodón	NMA- β -CDs	Nostro y col., 2003
Fijación reactiva	Algodón	MCT- β -CDs	Ibrahim, E-Zairy y Eid, 2010
Método de tintado de dispersos	Poliamida, poliester	β -CDs modificadas no iónicas	Denter y Schollmeyer, 1996
Método de tintado de básicos	Poliacrilonitrilo	β -CDs	Denter y Schollmeyer, 1996
Electrospinning	Polimetil metacrilato	β -CDs	Uyar y col., 2009
Acoplamiento enzimático	Algodón	Tyr- β -CDs	Agrawal, Ali y Warmoeskerken, 2010
Extrusión polimérica	Polietileno, poliamida	β -CDs	Huang y col., 2001

Las CDs también se consideran como compuestos prometedores en la industria de acabado textil por su uso en productos de aplicación en el campo de la salud (Voncina y Vivod, 2013).

1.6.10. Estructuras supramoleculares.

Aunque existe una investigación exhaustiva sobre arquitectura supramolecular usando CDs, es necesario precisar la caracterización físico-química de dichas estructuras (Wenz, Han y Muller, 2006; Hapiot, Tilloy y Monflier, 2009; Wenz, 2009). De hecho, el entendimiento y el diseño de sistemas supramoleculares requiere una caracterización detallada con respecto a la estequiometría, afinidad, estructura, heterogeneidad y dinámica supramolecular. Recientemente, se ha estudiado la dinámica de diferentes sistemas supramoleculares mediante espectroscopia de fluorescencia (Dodziuk, 2006; Bilensoy, 2011). Entre las diversas técnicas usadas, la espectroscopia de fluorescencia es quizás la más prometedora debido a su alta sensibilidad y selectividad, aunque muchos sistemas supramoleculares no son fluorescentes. Un análisis más detallado acerca del desarrollo de sistemas supramoleculares basados en CDs ha sido llevado a cabo con más profundidad por Schmidt y col. en 2014.

El auge de la química supramolecular ha tenido un impacto importante en la síntesis de arquitecturas macromoleculares con una amplia variedad de aplicaciones como pueden ser autocuración o respuesta a estímulos. En particular, las CDs tienen la capacidad de actuar como hospedadores en complejos de inclusión supramoleculares con compuestos hidrofóbicos.

En los últimos años se han desarrollado una amplia variedad de estructuras supramoleculares con CDs (Figura 1.9).

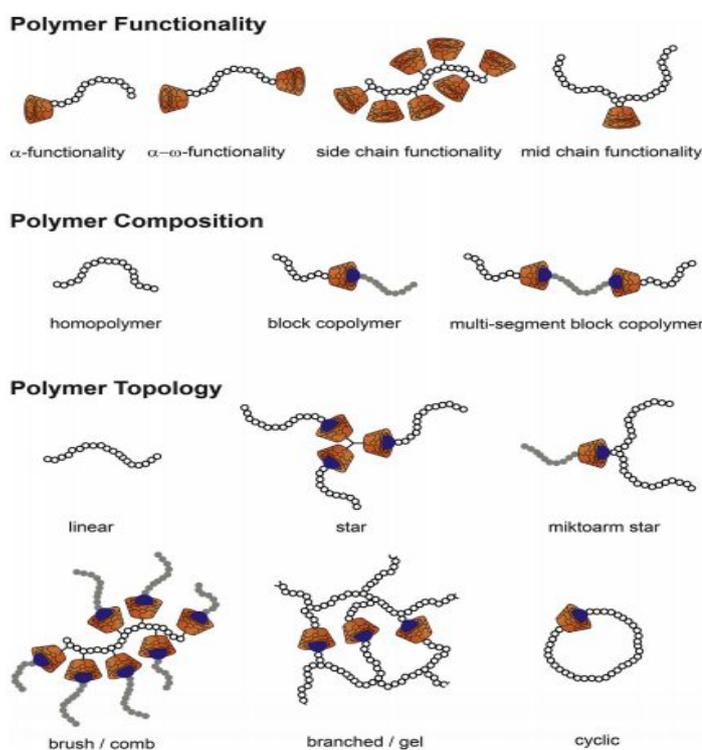


Figura 1.9. *Diferentes arquitecturas macromoleculares con CDs (Smichdt y col., 2014).*

Las estructuras poliméricas están dominadas por estructuras ramificadas y de tipo gel. Además, los polímeros en forma de estrella también tienen un papel destacado en la investigación. Aparte de los copolímeros en forma de bloque, estructuras en forma de cepillo y polímeros en forma de estrella o ramificados, existen otras estructuras que se encuentran en su fase inicial de desarrollo, como son los polímeros cíclicos supramoleculares o los conjugados proteína-polímero supramoleculares.

Aunque las CDs presentan varios grupos funcionales, la reactividad de los hidroxilos primario en C-6 y secundarios en C-2 y C-3, difieren de manera notable. Esto proporciona una adecuada oportunidad para limitar la reactividad de algunos hidroxilos en reacciones específicas (Khan y col., 1998). Sin embargo, hay al menos 6 hidroxilos diferentes en cada CD. El intermediario más utilizado es mono-tosilato en C-6, el cual puede transformarse en piridina en todas las CDs nativas (Tang y Ng, 2008). Este tosilato se transforma en diferentes estructuras como azida (Hamasaki y col., 1993), tiol (Kuzuya y col., 2009) o amina mediante sustitución nucleofílica con diamina (Bonomo y col., 1993). También es posible la

esterificación de los grupos hidroxilo, sin embargo, es más complicado debido a que la selectividad es generalmente baja. De todas maneras, las estructuras que se obtienen con estas sustituciones tienen que ser purificadas posteriormente.

1.6.11. Ciclodextrinas y tensoactivos.

Los tensoactivos son unas moléculas huésped de especial interés debido al balance de diferentes fuerzas intermoleculares: el efecto hidrofóbico el cual tiende a proteger las colas del medio acuoso, la necesidad de la deshidratación de cabezas y colas durante la formación del complejo, así como efectos debidos a los impedimentos estéricos. Los tensoactivos también permiten desarrollar estudios sistemáticos en los procesos de unión, mediante el cambio de la estructura del tensoactivo y por tanto se consigue un balance necesario entre los efectos hidrofóbicos e hidrofílicos. Esto da lugar a cambios en las propiedades físico-químicas de los tensoactivos, como por ejemplo, la concentración micelar crítica, que es muy importante en las formulaciones comerciales (Utsuki y col., 1996) de detergentes y productos de limpieza así como en cosmética y productos de higiene personal (Myers, 2006).

Los tensoactivos basados en hidratos de carbono son, hoy en día, un tipo de compuestos anfifílicos muy importantes. El creciente interés en estos compuestos se debe, entre otros, a su preparación a partir de materiales renovables, su rápida biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como otras razones más básicas pero igual de importantes como medioambientales, económicas y prácticas (Dodziuk, 2006). Cuando estos tensoactivos, a base de carbohidratos, son complejados en el interior de las CDs, aumentan considerablemente su rendimiento y rango potencial de aplicaciones. El uso de estos nuevos sistemas también se convertirá en una tecnología prometedora tal y como confirman diversos autores (Dodziuk, 2006; Villalonga, Cao y Fragoso, 2007; Li, Zhao y Li, 2011).

1.6.12. Ciclodextrinas y membranas.

La tecnología de membranas se ha extendido a diferentes campos en los últimos años, incluyendo separación, purificación y enriquecimiento de fracciones. Esto se debe a la capacidad de las membranas para trabajar en procesos continuos y además son modulares, eficientes energéticamente hablando y respetuosas con el medio ambiente. Se considera que la incorporación de sitios de complejación en membranas facilita el transporte de ciertas sustancias comparadas con las membranas convencionales. La presencia de CDs inmovilizadas en membranas puede afectar al transporte molecular a su través en membranas de soporte líquido o densas y porosas (Kozłowski y Sliwa, 2008). Esta tecnología de membranas está abriendo nuevas perspectivas en diferentes procesos de separación (Bilensoy, 2011).

Las membranas que contienen CDs en su estructura son utilizadas en una gran variedad de separaciones (Lamers, 2007). Es importante resaltar que la separación de metales con el uso de membranas con el objetivo de su eliminación y posterior recuperación es, hoy en día, un reto muy importante desde el punto de vista económico y de protección del medio ambiente (Resina y col., 2006). Entre los polímeros de CDs, aquellos que pueden atrapar iones metálicos merecen especial atención (Choi y Geckeler, 2007).

1.6.13. Ciclodextrinas y descontaminación.

Se ha descrito recientemente el uso de polímeros de CDs como matrices poliméricas para la eliminación de contaminantes mediante procesos de absorción (Morin-Crini y Crini, 2013). En la mayoría de casos, estos polímeros se usan en la descontaminación de aguas residuales (Figura 1.10).

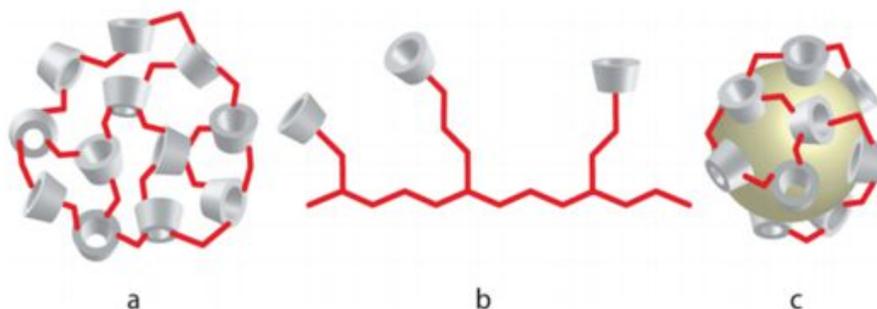


Figura 1.10. Estructura esquemática de polímeros con CDs obtenidos mediante reticulación o polimerización (a), injerto (b) o mediante reacciones de recubrimiento (c).

Desde el año 2000 hasta la actualidad, numerosos investigadores han estudiado el uso de CDs en la formación de polímeros con aplicaciones relacionadas con el medioambiente (Semeraro y col., 2015). El estudio de estos materiales, especialmente mediante resonancia magnética nuclear, ha arrojado luz sobre su comportamiento (Crini y Morcellet, 2002; Bilensoy, 2011). Actualmente, se trabaja en el uso de nanopartículas hechas con CDs para aplicaciones medioambientales (Bilensoy, 2011). De hecho, las nanoesponjas no solo se han investigado para su uso en la industria farmacéutica sino también para purificación y tratamiento de aguas residuales. Las moléculas de CDs son usadas como aditivos para aumentar la eficiencia y reducir el tiempo de tratamiento comparado con el uso de agua sola o tensoactivos convencionales (Atteia, Estrada y Bertin, 2013). La síntesis y modificación de materiales preparados a partir de quitosán magnético conteniendo CDs se ha revisado con detalle en la literatura para algunas aplicaciones como separaciones analíticas (Tong y Chen, 2013).

II. OBJETIVOS

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es estudiar aplicaciones de las CDs en diferentes sectores industriales. Para la consecución de este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. En biotecnología enzimática: estudiar el efecto de la presencia de CDs en la actividad enzimática de POD ligada y soluble de lombarda y col blanca. Determinar las condiciones del medio de reacción estándar para las cuatro enzimas estudiadas.
2. En industria alimentaria: estudiar el efecto de la presencia de CDs en la estabilidad del aroma de fresa microencapsulado utilizando diferentes agentes encapsulantes y técnicas de encapsulación.
3. En descontaminación de aguas residuales: estudiar la aplicación de polímeros de CDs en la eliminación del colorante Rubí Directo de aguas contaminadas tras el teñido de textiles.

III. USO DE CICLODEXTRINAS
EN BIOTECNOLOGÍA
ENZIMÁTICA

CAPÍTULO III. USO DE CICLODEXTRINAS EN BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1. Taxonomía, descripción botánica y distribución mundial del género *Brassica*.

La familia de las brasicáceas está compuesta por 350 géneros y 3.500 especies (Sasaki y Takahashi, 2002). Uno de los géneros más importantes desde el punto de vista nutricional y económico es *Brassica oleracea*. La selección horticultural ha favorecido la aparición de diversas variedades de *Brassica oleracea*, todas ellas usadas en alimentación y consumidas en todo el mundo (Font y col., 2005; Sardi y Tordai, 2005; Ferreres y col., 2007).

Las variedades más importantes son:

- *Brassica oleracea* var. *acephala*: berza.
- *Brassica oleracea* var. *botrytis*: coliflor.
- *Brassica oleracea* var. *capitata*: lombarda, col.
- *Brassica oleracea* var. *gemmifera*: col de Bruselas.
- *Brassica oleracea* var. *itálica*: brécol.
- *Brassica oleracea* var. *chinensis*: col china.



Figura 3.1. Lombarda y col blanca.

Aunque las distintas variedades de brasicáceas presentan distintas temperaturas óptimas para su cultivo, generalmente son cultivadas a unas temperaturas que oscilan en torno a los 14 y 21 °C, siendo el mínimo de temperatura de 4 °C y el máximo de 30 °C, dependiendo de la variedad (Wurr, Fellows y Phelps, 1996). Esto permite que sean cultivadas tanto en lugares fríos

como en zonas tropicales y subtropicales. Prefieren suelos profundos, bien drenados, fértiles, arenosos o limosos con un pH próximo a la neutralidad. El pH óptimo es 6.5 para suelos minerales y 5.8 para suelos orgánicos (Dixon, 2007).

Brassica oleracea es originaria de la región mediterránea y del sureste de Europa, la variedad capitata se adapta mejor a los ambientes húmedos que a las zonas más secas. Su temporada de recolección es de septiembre hasta mayo.

Existen evidencias que demuestran que Brassica se encuentra entre las especies más antiguas de plantas cultivadas a lo largo de la historia del hombre (Snowdon, Lühs y Friedt, 2007). Hoy en día, la producción que se lleva a cabo en Europa oscila en torno a los 70 millones de toneladas por año, con una media de consumo por persona de 3-5 kg por año (Naska y col., 2005), aunque en el noroeste de Europa el consumo alcanza los 20 kg por año. En España se producen 55.000 toneladas de brasicáceas al año, siendo las Comunidades Autónomas de mayor producción Andalucía, Extremadura y Comunidad Valenciana.

3.1.2. Valor nutricional del género Brassica y su relación con la salud.

El género Brassica contiene una amplia variedad de nutrientes y sustancias fitoquímicas beneficiosas para la salud, como son compuestos fenólicos, vitaminas (Dekker, Verkerk y Jongen, 2000), ácido fólico, fibra, azúcares solubles (Pedroche y col., 2004), glucosinolatos (Fowke y col. 2003), minerales, polifenoles (Heimler y col., 2005) y carotenoides.

La producción de metabolitos secundarios por parte de las plantas proporciona una serie de ventajas en cuanto a la defensa frente a estrés abiótico, patógenos, parásitos y herbívoros (Dong y Kahmann, 2009; Rasmann y Agrawal, 2009). Los principales metabolitos secundarios que encontramos en el género Brassica son: glucosinolatos, carotenoides y tocoferoles, polifenoles y ceras. Todos ellos relacionados con efectos beneficiosos para la salud humana (Björkman y col., 2011).

Los glucosinolatos, son un tipo de metabolitos secundarios que han sido ampliamente estudiados en brasicáceas. Tras daño mecánico, infección, o ataque por parte de insectos, se produce la liberación de los glucosinolatos almacenados, que son degradados por enzimas denominadas mirosinasas o tioglucosidasas y

proteínas específicas que actúan como cofactores de la reacción, como es el caso de las nitrilo-proteínas (Ahuja, Rohloff y Bones, 2010).

Como consecuencia de esta reacción se producen una amplia gama de compuestos como isotiocyanatos, nitrilos y tiocianato (Rask y col., 2000), como se observa en la Figura 3.2. Diversos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el consumo de vegetales con estos glucosinolatos está asociado con una reducción de la incidencia de algunos tipos de cáncer (Steinbrecher y Linseisen, 2009; Traka y Mithen, 2009; Verkerk y col., 2009).

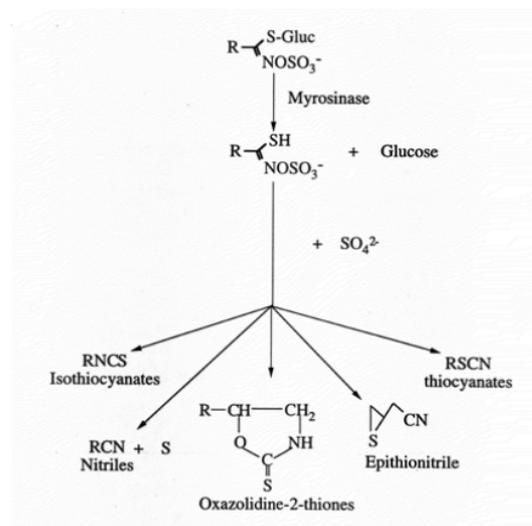


Figura 3.2. Estructura y degradación de los glucosinolatos.

Los glucosinolatos y los isotiocyanatos derivados de los primeros juegan un papel muy importante en diversos sectores como es el caso de la alimentación, farmacia o medicina (Deng y col., 2015). En el sector de la alimentación, los glucosinolatos han demostrado tener una alta eficacia antimicrobiana (Sultanbawa, 2011). Por ejemplo, alil-isotiocyanatos presentan alta inhibición en el crecimiento de la microflora en tofu (Shin y col., 2010) y buena eficacia frente al crecimiento de *E.coli* O157:H7 en carne fresca (Nadarajah, Dan y Holley, 2005a). También se ha descrito en la literatura un efecto inhibitorio cercano al 10-20% en la microbiota natural presente en carne (Nadarajah, Dan y Holley, 2005b).

En la industria farmacéutica, en las últimas dos décadas, diferentes tipos de medicamentos contienen glucosinolatos como compuestos bioactivos (extractos

de brócoli son ricos en sulforafano y otros compuestos fitoquímicos) (Velasco, Francisco y Cartea, 2011). Se han desarrollado métodos para la extracción de aceite de plantas que presentan glucosinolatos con el objetivo de obtener productos que contengan estos compuestos. Estos métodos pueden aplicarse en la producción de composiciones farmacéuticas, productos alimenticios o bebidas, suplementos o aditivos, productos para la piel o el pelo o productos agrícolas (Fahey, 2006). Además, una de las aplicaciones más importantes de los glucosinolatos, precursores de los isotiocianatos, es para controlar las plagas y enfermedades de algunos cultivos mediante fumigación (Dufour y col., 2013; Borges y col., 2014).

En medicina, diversos estudios epidemiológicos sugieren que las verduras del género *Brassica* presentan efectos beneficiosos en casos de enfermedades como cáncer de pulmón y del tracto digestivo, esto se atribuye a la presencia de glucosinolatos (Bhattacharya y col., 2010; Egner y col., 2011; Dinkova-Kostova y Kostov, 2012). Recientemente, se ha patentado un nuevo producto (Warmi®), que fue desarrollado como una alternativa natural a la terapia hormonal para el tratamiento de la menopausia y que contiene en su composición una mezcla de glucosinolatos, β -sitosterol y hesperidina (flavonoide). Los glucosinolatos se han confirmado como inductores de las enzimas citoprotectoras por lo que promueven un sistema cardiovascular más saludable (Martinot, 2012).

El segundo grupo de compuestos presentes en brasicáceas son los carotenoides y tocoferoles. Los carotenoides más abundantes son luteína, zeaxantina y β -caroteno. Respecto a los tocoferoles, destacan δ -, α -, γ -tocoferol (Ibrahim y Juvik, 2009), siendo α -tocoferol el compuesto más abundante (Goffman y Möllers, 2000).

Otro grupo de compuestos abundantes en brasicáceas son los polifenoles como son los flavonoides (apigenina, quercetina, luteolina, kaempferol y antocianinas) y los no flavonoides como los ácidos fenólicos (cafeico y gálico) (Lin y Harnly, 2009)

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como respuesta a situaciones de estrés, que incluyen un amplio rango de estructuras químicas, cuya característica común es la de poseer un anillo bencénico con grupos hidroxilos -OH (Figura 3.3). La interacción de los -OH con los electrones π del anillo bencénico confiere a la molécula unas

propiedades especiales, de las cuales la más característica es la capacidad de captar radicales libres, ya que estos quedan estabilizados por resonancia.

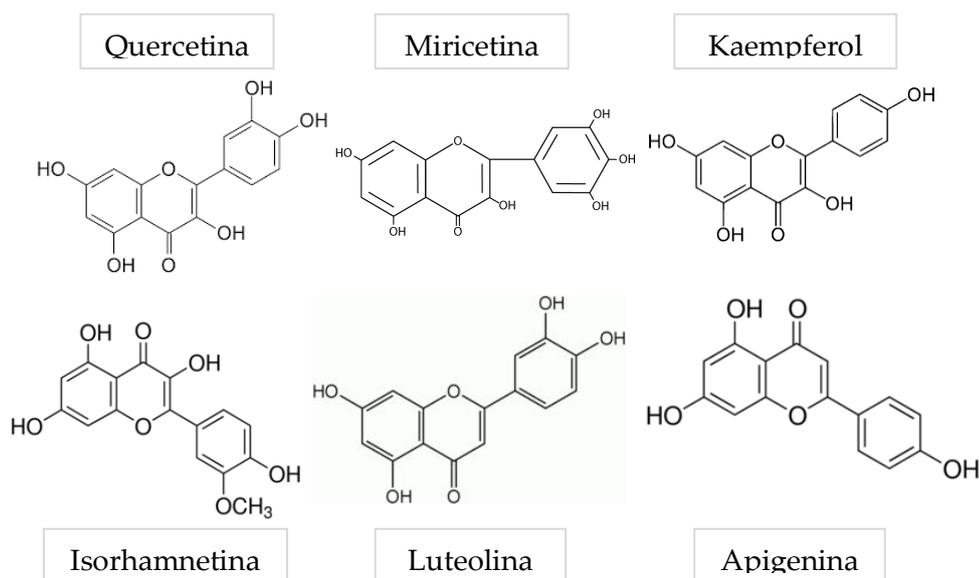


Figura 3.3. Estructura de los flavonoides presentes en el género *Brassica*.

La formación de estos radicales de larga vida puede modificar los procesos de oxidación mediados por radicales, aspecto importante en cuanto a su actividad biológica. Los *o*-difenoles son muy buenos antioxidantes, aunque también son inestables, oxidándose a quinonas química o enzimáticamente. Esta inestabilidad se hace remarcable, por ejemplo, durante el procesado o almacenamiento de frutas y hortalizas (Demian y Makris, 2015). Otra característica importante de los fenoles, es que son buenos donadores de electrones, de forma que pueden ser oxidados fácilmente por la enzima peroxidasa (POD) en presencia de peróxido de hidrógeno.

Estos compuestos fenólicos no pueden ser sintetizados por el hombre, por lo tanto, tienen que ser ingeridos en la dieta. Actualmente, el conocimiento de las propiedades beneficiosas para la salud de estos compuestos es esencial para el desarrollo de alimentos funcionales y en general para el consumo de los alimentos que posean altos niveles de fenoles.

Las antocianinas son unos pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza en flores, frutas y vegetales y son responsables de los colores brillantes como verde, rojo y azul (Kong y col., 2003). Estos compuestos juegan un papel muy importante en la fisiología de las plantas y son muy valoradas por la industria alimentaria y para la salud humana.

Por último, otro tipo de compuestos presentes en las brasicáceas son las ceras, la superficie de la planta que se encuentra en contacto con el exterior frecuentemente se encuentra cubierta por una epicutícula de ceras con función protectora. La composición química y la estructura es variada y compleja, en ella están implicadas largas cadenas hidrocarbonadas, alcoholes, cetonas y terpenoides (Tassone y col., 2016).

3.1.3. Enzimas oxidativas presentes en el género Brassica.

En relación con los compuestos fenólicos, las frutas y hortalizas mínimamente procesadas sufren importantes cambios cualitativos y cuantitativos desde la cosecha hasta su consumo. Estos cambios implican una pérdida de valor nutritivo y características organolépticas debido a la oxidación de los compuestos fenólicos por las enzimas oxidativas (Criado, Martínez y Rodrigo, 2016).

En general, unas de las enzimas responsables de esta oxidación de compuestos fenólicos son POD y PPO (Chisari, Barbagallo y Spagna, 2008).

3.1.3.1. Polifenol oxidasa (PPO)

El pardeamiento enzimático es de vital importancia en la industria del procesado de frutas y verduras. La actividad de PPO (E.C. 1.10.3.1) causa pardeamiento cuando los tejidos vegetales se exponen a la presencia de oxígeno durante el procesado y almacenamiento. El pH y la temperatura óptima de esta enzima oscilan entre 5 y 8 y entre 20 y 40 °C, respectivamente (Sulaiman y col., 2015). PPO cataliza la oxidación de los fenoles presentes en el tejido vegetal en presencia de oxígeno. Las quinonas resultantes polimerizan con otros compuestos similares, proteínas o aminoácidos para producir compuestos coloreados (pardos o negros).

Las polifenol oxidasas se dividen en mono- y difenolasas dependiendo de la presencia o ausencia de actividad cresolasa o monofenolasa. Las monofenolasas

catalizan, en primer lugar, la oxidación de monofenoles a sus correspondientes *o*-difenoles (actividad monofenolasa; EC 1.14.18.1) y posteriormente catalizan la oxidación de *o*-difenol a *o*-quinona (actividad catecolasa; EC 1.10.3.1). Las catecolasas o difenolasas solamente llevan a cabo la segunda reacción, es decir, la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (Marusek y col., 2006).

Actualmente, el mejor método para controlar el pardeamiento es el procesado térmico. La cinética de inactivación térmica de PPO se ha estudiado en diversas fuentes vegetales y cultivos, y se produce en el rango de temperaturas comprendido entre 60 y 85 °C (Goyeneche, Di Scala y Roura, 2013). Pero la temperatura empleada en el procesado térmico afecta a las propiedades organolépticas de frutas y verduras y puede destruir componentes nutritivos. Por ello, se ha estudiado el empleo de agentes antipardeamiento como ácido ascórbico, sulfitos, cloruro sódico, cisteína, ácido kojico y cinámico para preservar estos alimentos (Queiroz y col., 2008).

Estructuralmente hablando, las PPOs de origen vegetal presentan tres dominios que incluyen: un péptido de tránsito N-terminal, un centro con tres átomos de cobre altamente conservados y una región C-terminal (Tran, Taylor y Constabel, 2012) (Figura 3.4). Esta enzima está ampliamente distribuida en bacterias, animales, plantas y hongos (Mayer, 2006).

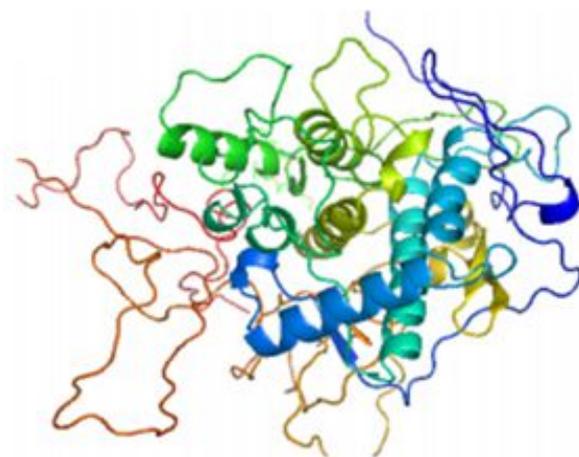


Figura 3.4. Estructura tridimensional de PPO extraída de manzana tipo Fuji (Liu y col., 2015)

3.1.3.2. Peroxidasa (POD)

Peroxidasa (E.C. 1.11.1.7) es una oxidoreductasa ampliamente distribuida en frutas y verduras, siendo responsable, al igual que PPO, del pardeamiento enzimático. Cataliza una reacción de oxidación en la que el peróxido de hidrógeno actúa como aceptor de electrones y otro compuesto como dador de electrones (Fortea y col., 2011). Esta enzima contiene un grupo hemo como grupo prostético, unido a la fracción proteica por la cadena lateral de un aminoácido a la quinta posición de coordinación del hierro (Pellicer y col., 2016) (Figura 3.5).

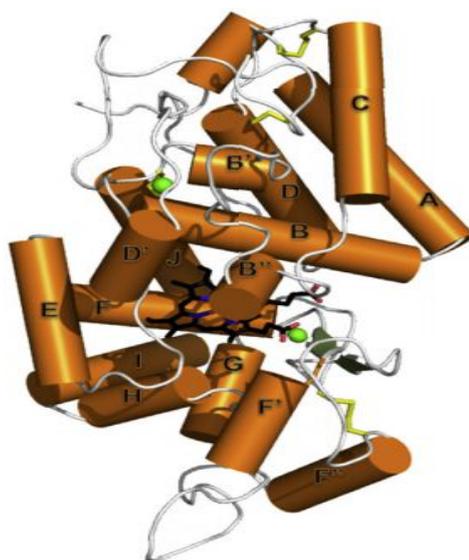


Figura 3.5. Estructura tridimensional de POD extraída de *Chamaerops excelsa* (Bernardes y col., 2015).

Esta enzima puede existir en dos formas: soluble o ligada a membrana (Sukalovic y col., 2015), y se encuentra en vacuolas, citoplasma y en la pared celular, desempeñando diversas funciones. Así, se sabe que está implicada en la regulación hormonal, mecanismos de defensa, degradación del ácido indolacético durante la maduración y senescencia de frutas y vegetales y en la resistencia a parásitos y patógenos a través de procesos de lignificación o de producción de fenoles oxidados. Debido a sus múltiples funciones, esta enzima generalmente se encuentra como diferentes formas isoenzimáticas en vegetales (Serrano-Martínez y col., 2008).

Es altamente específica respecto a su sustrato peróxido, siendo el peróxido de hidrógeno el más común, pero su especificidad respecto al sustrato donador de electrones es muy baja. En presencia de peróxido de hidrógeno, oxida a un amplio rango de compuestos fenólicos como guayacol, pirogallol, ácido clorogénico, catequina y catecol (Onsa y col., 2004). La oxidación de esta gran variedad de compuestos ha llevado a la conclusión de que está asociada a pérdidas de color, flavor y valor nutricional de alimentos vegetales frescos y procesados. POD también está relacionada con el procesado de alimentos debido a su alta termoestabilidad. De hecho, es utilizada como indicador de la correcta realización del tratamiento térmico en vegetales (tanto en escaldado como en congelación), debido a su elevada concentración en la mayoría de los tejidos vegetales, elevada estabilidad térmica y fácil medida (Dahili, Kelemen-Horváth y Feczkó, 2015).

Se han purificado y estudiado PODs de diversas fuentes vegetales: patata (Leon y col., 2002), melón (Rodríguez-López y col., 2000), nabo (Tandjaoui y col., 2015), pimiento (Serrano-Martínez y col., 2008), uva (Fortea y col., 2009) o alga roja *Mastocarpus stellatus* (Fortea y col., 2011). En todos los casos, se ha demostrado la existencia de varias isoenzimas, que difieren en peso molecular, estabilidad térmica, pH óptimo, especificidad de sustrato y papel fisiológico.

La elevada estabilidad térmica de POD puede ser una ventaja o un problema. Por una parte, proporciona un margen natural de seguridad en el que si POD es inactivada, se puede asumir que otras enzimas relacionadas con la calidad del producto también están inactivadas. Por otra parte, el uso de POD como indicador puede llevar a la aplicación de un tratamiento térmico excesivo del producto, disminuyendo su calidad.

Para optimizar el tratamiento térmico de frutas y verduras y así mejorar su calidad, es importante establecer un modelo cinético de inactivación de las enzimas relevantes para poder predecir cambios del producto durante el procesado y el almacenamiento. Para caracterizar la estabilidad térmica de una enzima es necesario determinar dos parámetros: D (tiempo necesario para reducir la actividad enzimática al 10% de su valor original) y E_a (energía de activación), que mide cómo la velocidad de inactivación varía con la temperatura. Con estos dos parámetros (D y E_a) se puede calcular la velocidad de inactivación de una enzima a cualquier temperatura y el nivel de actividad residual tras un tratamiento térmico. Para poder hacer un modelo de cambios en la calidad de un

producto durante el procesado o el almacenamiento, primero es necesario hacer estudios detallados de la estabilidad térmica de las enzimas más relevantes en el proceso, por ejemplo POD.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal.

Lombarda (*Brassica oleracea* var. capitata f.rubra) y col blanca (*Brassica oleracea* var. capitata) fueron adquiridas en una gran superficie y se mantuvieron refrigeradas hasta su inmediato procesado.

3.2.2 Reactivos.

Los reactivos químicos fueron suministrados por Sigma (España) y su uso se realizó sin purificación previa. El Triton X-114 se obtuvo de Fluka y se condensó tres veces, usando tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7.3) (Bordier, 1981). En la fase rica en detergente de la tercera condensación se obtuvo una concentración del 25 % de Triton X-114 (p/v).

La solución de peróxido de hidrógeno se preparó diariamente, y su concentración se calculó utilizando como coeficiente de extinción molar $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nelson y Kiesow, 1972).

3.2.3. Purificación de Triton X-114.

El Triton X-114 fue condensado tres veces siguiendo el método de Bordier (1981), usando tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7.3) con EDTA 20 mM. El método de purificación del Triton X-114 consistió en disolver 10 g de este detergente con 8 mg de butil-hidroxitolueno (BHT) en tampón fosfato sódico 100 mM con EDTA 20 mM (pH 7.3) a 4 °C hasta la completa disolución del detergente, tras lo cual se incubaba a 37 °C durante 15 minutos. Este incremento en la temperatura hace que el tamaño de las micelas formadas por el Triton X-114 aumente, agregándose unas con otras hasta alcanzar un tamaño en el que ya no pueden mantenerse en disolución, provocando la turbidez de la misma. La

mezcla blanquecina así obtenida, se introduce en un embudo de decantación y se deja reposar durante la noche a temperatura ambiente (20 °C). Transcurrido dicho tiempo aparecen dos fases transparentes completamente separadas: una mayoritaria, en la parte superior, pobre en detergente; y una minoritaria, en la parte inferior, rica en detergente. La fase acuosa pobre en detergente es desechada y reemplazada por un volumen igual de tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7.3) con EDTA 20 mM. Esta mezcla es sometida a condensación dos veces más, bajo las condiciones antes citadas, pero sin la adición de BHT. La fase de detergente de la tercera condensación tuvo una concentración del 25 % (p/v) de Triton X-114 y fue usada para todos los experimentos descritos en este capítulo.

3.2.4. Determinación de proteínas.

La determinación cuantitativa de proteínas se realizó según el método de Bradford (1976), usando albúmina de suero bovina como patrón. Los análisis se realizaron por triplicado para cada muestra.

3.2.5. Extracción de peroxidasa.

Para estudiar la actividad de POD, se utilizó el método de extracción descrito por Nuñez-Delicado y col. en 2005, basado en la utilización de Triton X-114 (TX-114), que permitió la extracción de extractos totalmente transparentes.

El procedimiento utilizado fue el mismo para lombarda y col blanca. Se pesaron 50 g de muestra, que fueron homogenizados con 50 mL de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.3, durante 5 minutos en un Ultra Turrax (mod. Ika Staufen, Germany). El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 4.000 \times g durante 15 minutos a 4 °C en una centrifuga Haereus modelo Biofuge Stratos. Como resultado se obtuvo un sobrenadante, que contenía la enzima soluble. Por otra parte, el precipitado obtenido en la centrifugación se mezcló con 20 mL de TX-114 al 25%, hasta obtener una concentración de TX-114 del 4% (p/v) en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 7.3) y la mezcla fue sometida a partición de fases inducida por temperatura. Para ello, primero se mantuvo a 4 °C durante 15 minutos y posteriormente se calentó a 37 °C durante el mismo tiempo. En ese punto, la disolución adquirió turbidez, debido a la formación,

agregación y precipitación de micelas de detergente que arrastran en su interior proteínas hidrofóbicas, antocianos y compuestos fenólicos. Esta disolución turbia se centrifugó a 1800 $\times g$ durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf modelo 5810.

Tras la centrifugación, la fase rica en detergente se descartó y el sobrenadante, fase pobre en detergente y totalmente clara, se utilizó como fuente de enzima ligada. Ésta se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización, conservando toda su actividad y sin presentar pardeamiento.

3.2.6. Determinación de la actividad enzimática.

La actividad de POD fue determinada espectrofotométricamente, en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1063, usando como sustrato [*ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolina-6-sulfónico)*] (ABTS), a 414 nm ($\epsilon_{414} = 31.1\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Rodríguez-López y col., 2000). Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que produce un 1 μmol del radical ABTS^{•+} por minuto.

La conversión de la velocidad de la reacción en unidades enzimáticas (UE) por gramo de muestra, se realizó teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, según la cual, la absorbancia de la muestra y la concentración del producto, están relacionadas por la ecuación $A = \epsilon \cdot c \cdot d$, donde ϵ es el coeficiente de extinción molar del producto, c es la concentración molar del producto y d es el paso óptico de la cubeta expresado en cm (en este caso $d=1$).

El medio de reacción estándar en el caso de la forma ligada de lombarda, contenía a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tampón acetato sódico 100 mM (pH 4.0), 20 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, ABTS 2 mM, H_2O_2 4 mM y tropolona 0.2 mM, en un volumen final de 1 mL.

El medio de reacción estándar en el caso de la forma soluble de lombarda, contenía a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tampón acetato sódico 100 mM (pH 4.0), 20 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, ABTS 5 mM, H_2O_2 3 mM y tropolona 0.2 mM, en un volumen final de 1 mL.

El medio de reacción estándar para POD ligada y soluble de col blanca contenía a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, tampón acetato sódico 100 mM (pH 4.0), 20 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, ABTS 4 mM, H_2O_2 4 mM y tropolona 0.2 mM en un volumen final de 1 mL.

3.2.7. pH óptimo.

El pH óptimo para cada una de las PODs de lombarda y col blanca se determinó en el medio de reacción estándar de cada una de ellas que contenía 100 mM de tampón acetato sódico (pH 3.0-5.0), 100 mM de tampón fosfato sódico (pH 6.0-7.5) ó 100 mM de tampón borato sódico (pH 8.0-9.0).

3.2.8. Efecto de SDS.

El efecto del SDS en la actividad de POD se estudió en el medio de reacción estándar adicionando concentraciones crecientes de SDS a la cubeta. En el caso de lombarda, la concentración osciló entre 0 y 1.5 mM para POD ligada y entre 0 y 0.5 mM para POD soluble. En el caso de col blanca, la concentración de SDS osciló entre 0 y 1.0 mM en ambas isoenzimas.

3.2.9. Actividad enzimática en presencia de CDs.

Para estudiar el efecto de la presencia de CDs en la actividad de POD, en el caso de lombarda, el medio de reacción a 25 °C contenía 100 mM de tampón fosfato sódico (pH 4.0), 20 µg/mL de proteína, H₂O₂ 4 mM, concentraciones crecientes de HP-β-CDs (0-40 mM) y ABTS (1, 2 ó 4 mM) para POD ligada o ABTS (0.5, 2 ó 4 mM) para POD soluble.

En el caso de col blanca, el medio de reacción a 25 °C en contenía 100 mM de tampón fosfato sódico (pH 4.0), 20 µg/mL de proteína, H₂O₂ 4 mM, concentraciones crecientes de HP-β-CDs (0-40 mM) y ABTS (1, 3 ó 5 mM) para POD ligada o ABTS (0.5, 2, 4 ó 6 mM) para POD soluble.

3.2.10. Efecto de agentes reductores.

En el caso del estudio del efecto de agentes reductores sobre la actividad de POD, en lombarda, las muestras contenían el medio de reacción estándar y concentraciones crecientes (0-3.5 mM) de ácido ascórbico, L-cisteína o metabisulfito.

En el caso de col blanca, las muestras contenían el medio de reacción estándar y concentraciones crecientes (0-4 mM) de ácido ascórbico, L-cisteína o metabisulfito.

3.2.11. Determinación de los parámetros cinéticos V_m y K_M .

Para determinar los parámetros cinéticos (V_m y K_M) de POD de lombarda, se varió la concentración de ambos sustratos: ABTS y H_2O_2 . Para estudiar el efecto de la concentración de ABTS, se añadieron concentraciones crecientes de este sustrato al medio de reacción estándar (0 a 5 mM para enzima ligada y 0 a 12 mM para enzima soluble), fijando la concentración de H_2O_2 en 4 mM. En el caso del H_2O_2 , la concentración se varió de 0 a 7 mM para ambos tipos de POD (ligada y soluble), fijando la concentración de ABTS en 3 mM.

Los parámetros cinéticos de POD de col blanca fueron estimados de la misma manera. La concentración de ABTS en el medio de reacción estándar osciló entre 0 y 6 mM para POD ligada y entre 0 y 7 mM para POD soluble, fijando la concentración de H_2O_2 en 4 mM. En el caso del H_2O_2 , la concentración se varió entre 0 y 7 mM en ambas formas enzimáticas y se mantuvo fija una concentración de ABTS de 4 mM.

3.2.12. Temperatura óptima.

La temperatura óptima para POD de lombarda y col blanca se determinó midiendo la actividad enzimática en el medio de reacción estándar entre 5 y 70 °C con intervalos de medida de 5 °C, en el valor de pH óptimo de la enzima. La temperatura se controló usando TCC-Controller, Shimadzu Corporation (Mod. TCC-240A).

3.2.13. Estabilidad térmica.

Los extractos enzimáticos se incubaron en tubos eppendorff, a diferentes temperaturas y tiempos. En el caso de la forma de POD ligada de lombarda, las muestras se incubaron en un baño termostático a 50, 60, 70 y 80 °C, mientras que las muestras de enzima soluble se incubaron a 30, 40, 50, 70 y 80 °C. En el caso de col blanca, POD ligada se incubó a 40, 50, 60 y 70 °C y POD soluble a 30, 40, 50,

60 y 70 °C. Posteriormente, se enfrió cada alícuota 5 minutos en hielo y se midió su actividad inmediatamente después, a 25 °C.

3.2.14. Análisis estadísticos.

Todas las medidas, fueron realizadas por triplicado, representándose la media de las mismas. Para realizar el ajuste de los datos se usó el programa Sigmaplot 12.0 software package (Jandel Scientific, Germany).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La purificación de enzimas a partir de extractos vegetales es un proceso complejo debido a la presencia de una gran cantidad de metabolitos secundarios que pueden adherirse a las enzimas y cambiar sus características (Suha, Babiker y Babiker, 2013). Además, cuando la enzima está ligada a membrana, es necesario para su extracción el uso de detergentes. De esta manera, POD ligada de lombarda y col blanca se extrajo con ayuda del detergente TX-114 (Gecchele y col., 2014).

Este detergente presenta un punto de turbidez a 23 °C, lo que permite que pueda usarse en un rango de temperatura compatible con la estabilidad de la proteína. Durante la separación de fases inducida por incubación a 37 °C, la mayor parte del detergente, pigmentos, fosfolípidos, fenoles y proteínas hidrofóbicas de membrana migran hacia la fase baja, rica en detergente, mientras que los fenoles polares y otras proteínas de membrana migran a la fase superior pobre en detergente (Cabanés y col., 2007). La eliminación de fenoles con TX-114, a veces, es suficiente para evitar el pardeamiento de la disolución de enzima, incluso tras varios ciclos de descongelación o tras meses de almacenamiento a - 20 °C.

3.3.1. Lombarda.

La actividad enzimática de POD de diversas fuentes se ha estudiado usando diferentes compuestos como sustrato: guaiacol en rábano (Lavery y col., 2010) y lentejas (Hidalgo-Cuadrado y col., 2012), ABTS en nabo (Rodríguez-Cabrera, Regalado y García-Almendárez, 2011), *p*-clorofenol y *o*-cresol en raíces de nabo

(Dalal y Gupta, 2010). En el caso POD de lombarda, se usó ABTS como donador de H^+ y H_2O_2 como aceptor.

3.3.1.1. Extracción, efecto de pH y SDS.

La extracción de POD de lombarda se llevó a cabo en dos fases: por una parte, en medio tamponado se extrajo la POD soluble y por otra parte, utilizando TX-114 para hacer la digestión de las membranas celulares, se extrajo POD ligada a membranas.

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a proteína, actividad enzimática total y actividad específica en cada una de las partes.

La cantidad de proteínas solubles extraídas en medio tamponado, a partir de 50 g de lombarda fue de 125 mg y las unidades de enzima totales 475, lo que supuso una actividad específica de 3.8 U/mg.

En el caso de POD ligada, se obtuvieron 70 mg de proteína, con 365 unidades enzimáticas y por tanto, una actividad específica de 5.2 U/mg.

Estos resultados indicaron que en el caso de las proteínas ligadas a membrana extraídas con TX-114, POD es más abundante proporcionalmente hablando, que en el caso de las proteínas solubles extraídas sólo con tampón.

Tabla 3.1. *Actividad específica y total de POD ligada y soluble de lombarda.*

Formas Enzimáticas	Vol (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total ^a (U)	Actividad específica(U/mg)
Sobrenadante (POD soluble)	70	125	475	3.8
Sobrenadante 4% TX-114 (POD ligada)	17	70	365	5.2

^aABTS como donador.

El pH es un factor determinante en la expresión de la actividad enzimática. La Figura 3.6A muestra el perfil de pH en el caso de POD ligada (círculos negros) en un rango de pH de 3.0 a 9.0. El pH óptimo para POD ligada de lombarda fue de 4.0, similar al obtenido para POD de la fruta marula (Mdluli, 2004) e inferior que el obtenido para POD de melón (Rodríguez-López y col., 2000), pimiento (Serrano-Martínez y col., 2008) o alga roja (Fortea y col., 2011).

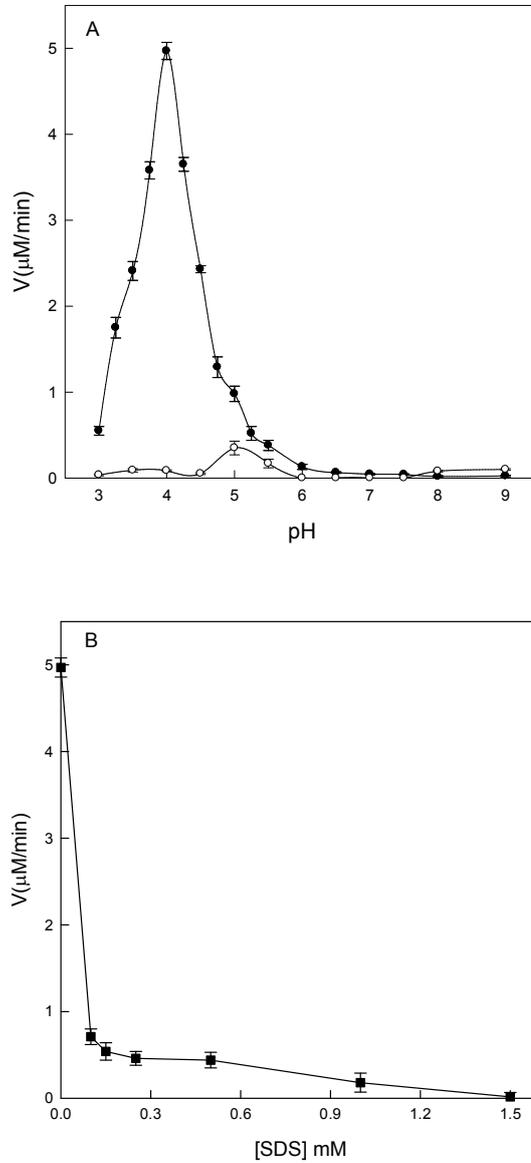


Figura 3.6. (A) Efecto del pH en la actividad de POD ligada en ausencia (●) o en presencia (○) de SDS 1.5 mM. El medio de reacción, contenía a 25 °C 100 mM de tampón acetato sódico (pH 3.0-5.0), 100 mM de tampón fosfato sódico (pH 6.0-7.5) ó 100 mM de tampón borato sódico (pH 8.0-9.0), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, ABTS 2 mM, H_2O_2 4 mM y tropolona 0.2 mM, en un volumen final de 1 mL. (B) Efecto de la concentración de SDS en la actividad enzimática. El medio de reacción estándar a pH 4.0 contenía concentraciones crecientes de SDS de 0 a 1.5 mM.

Detergentes aniónicos, como SDS, interaccionan fuertemente con proteínas cargadas y las desnaturalizan. La interacción de las proteínas con compuestos anfífilos con largas colas hidrocarbonadas, como es el caso del SDS, da lugar a cambios conformacionales en las proteínas (Ruso, Deo y Somasundaran, 2004). El efecto activador o inhibidor que puede tener SDS sobre diferentes enzimas, incluyendo PPO y POD, se encuentra ampliamente descrito en la literatura. En el caso de POD, SDS mostró efecto inhibidor en diferentes ocasiones (Nazari y col., 2005; Fortea y col., 2009).

El perfil de pH de POD ligada se analizó en presencia de 1.5 mM de SDS (Figura 3.6A, círculos blancos). La enzima fue inactivada por este detergente en todos los pHs analizados. Un efecto similar fue descrito con anterioridad para POD de rábano (Nazari y col., 2005), uva de mesa *Crimson seedless* (Fortea y col., 2009) o en el alga roja *Mastocarpus stellatus* (Fortea y col., 2011).

El efecto del SDS depende de la concentración de surfactante utilizado, tal y como se aprecia en la Figura 3.6B. La actividad enzimática disminuyó con el aumento de la concentración de SDS, alcanzándose la inactivación total a una concentración de SDS 1.5 mM. Esta inactivación se debe a cambios conformacionales producidos en la proteína por la interacción con las moléculas de detergente. Estos resultados contrastan con los descritos para PPO de diversas fuentes vegetales, donde SDS muestra un efecto activador de la actividad enzimática (Núñez-Delicado y col., 2005; Cabanes y col., 2007; Fortea y col., 2009).

En el caso de POD soluble (Figura 3.7A), al estudiar el efecto del pH en la oxidación de ABTS (círculos negros) se observó un pH óptimo de 4.0. Este resultado es idéntico al observado para POD ligada descrita en el apartado anterior. El efecto del pH en la actividad de POD soluble se estudió en presencia de SDS 0.5 mM (Figura 3.7A, círculos blancos). La enzima fue inactivada en todos los pHs estudiados, aunque a pH 5.0 se observó solamente una pequeña inhibición en presencia de SDS. El grado de inactivación con SDS a pH 5.0 para POD soluble fue de 1.5 veces, mientras que en el caso de POD ligada fue 2.8 veces.

Si comparamos el efecto de la concentración de SDS en ambas enzimas, POD soluble y ligada, se observó un efecto inhibitorio en ambos casos. Sin embargo, este efecto fue mucho más acusado para POD soluble, donde la inactivación completa de la enzima se observó a una concentración menor de SDS (0.5 mM) (Figura 3.7B).

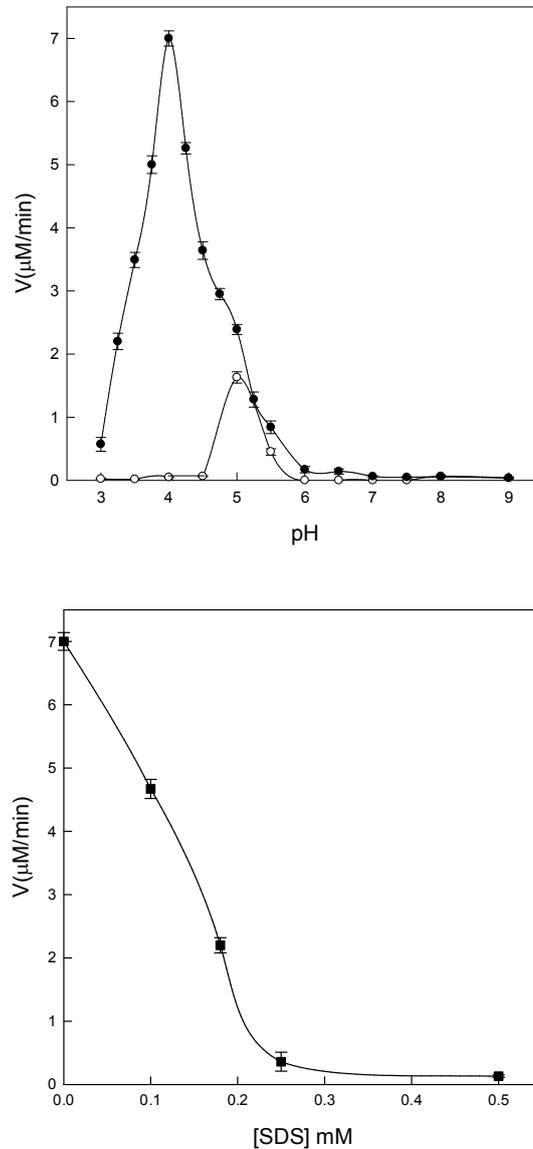


Figura 3.7. (A) Efecto del pH en la actividad de POD soluble en ausencia (●) o en presencia (○) de SDS 0.5 mM. El medio de reacción, contenía a 25 °C 100 mM de tampón acetato sódico (pH 3.0-5.0), 100 mM de tampón fosfato sódico (pH 6.0-7.5) ó 100 mM de tampón borato sódico (pH 8.0-9.0), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, ABTS 5 mM, H_2O_2 3 mM y tropolona 0.2 mM, en un volumen final de 1 mL. (B) Efecto de la concentración de SDS en la actividad enzimática. El medio de reacción estándar a pH 4.0 contenía concentraciones crecientes de SDS de 0 a 0.5 mM.

3.3.1.2. Caracterización cinética

Para completar la caracterización de POD ligada y soluble de lombarda, se llevó a cabo el estudio de los parámetros cinéticos V_m y K_M que fueron determinados ajustando los datos experimentales obtenidos a pH 4.0 a la ecuación de Michaelis-Menten (3.1).

$$v = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]} \quad (3.1)$$

La Figura 3.8A muestra la variación de la velocidad frente a la concentración de sustrato para POD ligada. Cuando se varió la concentración de H_2O_2 manteniendo constante la concentración de ABTS (2 mM), la actividad aumentó hasta alcanzar la saturación. El valor de K_M para H_2O_2 fue 0.82 mM y el valor V_m fue 6.1 $\mu\text{M}/\text{min}$. Este valor de K_M obtenido para H_2O_2 es similar al descrito para POD de nabo (0.8 mM; Duarte-Vázquez y col., 2000), inferior al de POD de pimiento (1.3 mM; Serrano-Martínez y col., 2008) y superior al de POD de uva (0.4 mM; Fortea y col., 2009) o melón (0.2 mM; Rodríguez-López y col., 2000). Este perfil cinético contrasta con los obtenidos en el caso de rábano, espárrago, nabo y alga roja en los que se describió una inhibición por alta concentración de sustrato (Hiner y col., 1996; Duarte-Vázquez y col., 2000; Fortea y col., 2011).

La Figura 3.8B, muestra la curva de saturación para ABTS de POD ligada. El valor de K_M obtenido fue 0.2 mM y la V_m 5.2 $\mu\text{M}/\text{min}$. Este valor de K_M observado para ABTS fue similar al descrito en el caso de POD de coles de Bruselas (Regalado y col., 1999) e inferior a las PODs de nabo (0.47 mM; Duarte-Vázquez y col., 2000), pimiento (0.5 mM; Serrano-Martínez y col., 2008), rábano (4 mM; Hiner y col., 1996) o alga roja (13 mM; Fortea y col., 2011).

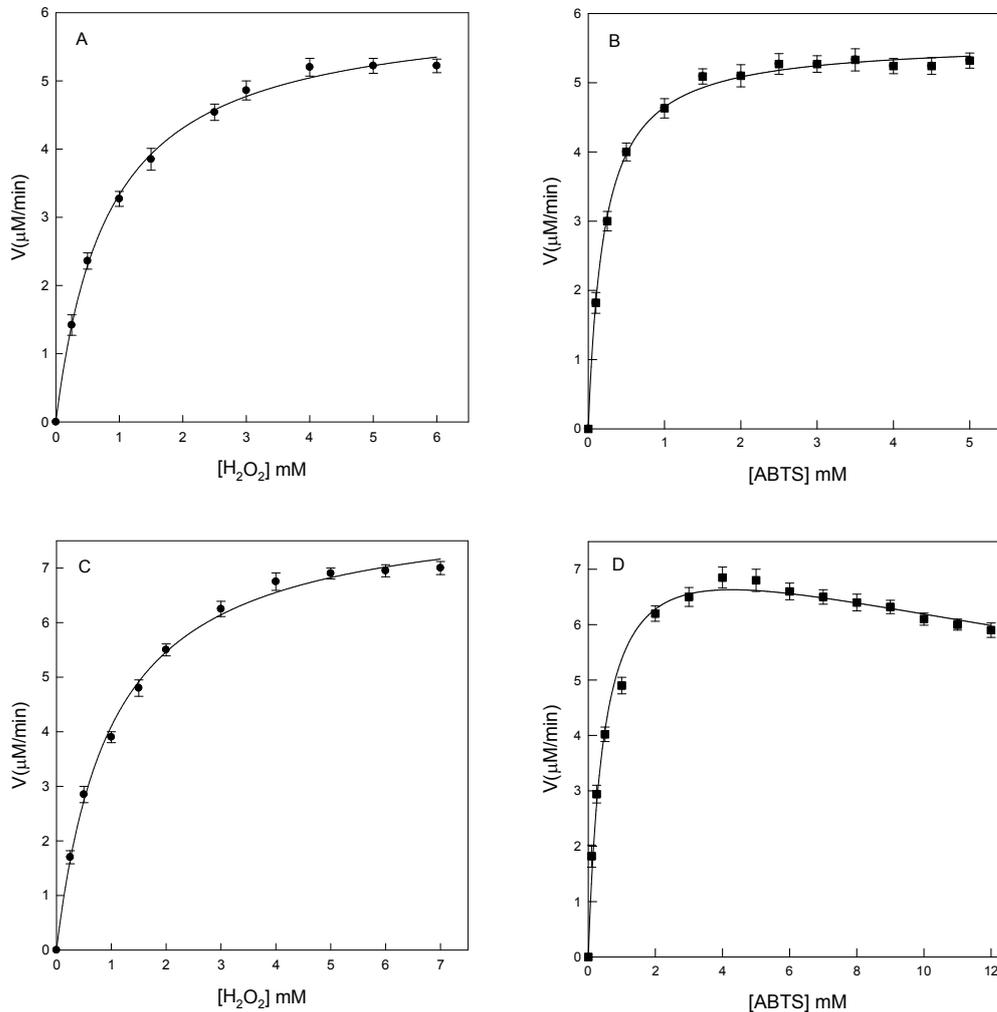


Figura 3.8. (A) Efecto de la concentración de H_2O_2 en la actividad de POD ligada. El medio de reacción a $25\text{ }^\circ\text{C}$ contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0 , $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, ABTS 3 mM , tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de H_2O_2 de 0 a 7 mM (B) Efecto de la concentración de ABTS en POD ligada. El medio de reacción a $25\text{ }^\circ\text{C}$ contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0 , $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, H_2O_2 4 mM , tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de ABTS de 0 a 5 mM (C) Efecto de la concentración de H_2O_2 en la actividad de POD soluble. El medio de reacción a $25\text{ }^\circ\text{C}$ contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0 , $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, ABTS 3 mM , tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de H_2O_2 de 0 a 7 mM (D) Efecto de la concentración de ABTS en POD soluble. El medio de reacción a $25\text{ }^\circ\text{C}$ contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0 , $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, H_2O_2 4 mM , tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de ABTS de 0 a 12 mM .

En el caso de POD soluble, la velocidad de oxidación de ABTS es dependiente de la concentración de H₂O₂ presente en el medio (Figura 3.8C). El valor de K_M para H₂O₂ observado fue 0.98 mM y el valor de V_m fue 8.1 μM/min. Este valor de K_M obtenido fue similar al de POD de nabo (0.8 mM) (Duarte-Vázquez y col., 2000), inferior al observado para POD de pimiento (1.3 mM) (Serrano-Martínez y col., 2008), el doble al descrito en el caso de uva de mesa (0.4 mM) (Fortea y col., 2009) y cinco veces superior al observado en POD de melón (0.2 mM) (Rodríguez-López y col., 2000).

Por otra parte, cuando la concentración de ABTS aumentó en el medio de reacción de 0 a 12 mM (Figura 3.8D) a una concentración fija de H₂O₂ (4 mM), la actividad enzimática aumentó al principio, antes de disminuir de forma gradual a altas concentraciones. La Figura 3.8D mostró el típico perfil cinético de inhibición por alta concentración de H₂O₂, que es analizado cinéticamente por regresión no lineal ajustando los valores experimentales a la siguiente ecuación (3.2) (Marquard, 1963):

$$v = \frac{V_m [S]}{K_M + [S] + [S]^2 / K_{s_i}} \quad (3.2)$$

donde K_{si} es la constante de inhibición por sustrato. Los parámetros cinéticos V_m, K_M y K_{si} fueron 8.9 μM/min, 0.61 mM y 24.3 mM, respectivamente. El valor obtenido de K_M para ABTS fue superior al observado para POD de coles de Bruselas (0.2 mM; Regalado y col., 1999), nabo (0.47 mM; Duarte-Vázquez y col., 2000) y pimiento (0.5 mM; Serrano-Martínez y col., 2008), inferior al descrito en rábano (4 mM; Hiner y col., 1996) o alga roja (13 mM; Fortea y col., 2011). El perfil cinético de inhibición por alta concentración de ABTS obtenido en el caso de POD soluble no se observó en el caso de la forma ligada (Figura 3.8B).

3.3.1.3. Efecto de inhibidores.

Para completar el estudio de POD de lombarda, se evaluó el efecto de diferentes agentes inhibidores (ácido ascórbico, L-cisteína y metabisulfito) en la actividad enzimática de POD ligada (Figura 3.9A) y soluble (Figura 3.9B). Los resultados mostraron que el ácido ascórbico fue el modulador de la actividad enzimática más efectivo en ambos casos (triángulos negros), actuando como un antioxidante en lugar de un inhibidor enzimático porque reduce el radical de $ABTS^+$ a su forma original. La inhibición producida por metabisulfito fue la más baja en ambos casos (cuadrados negros), quizás como resultado de una reacción adicional que tiene lugar entre el radical de $ABTS^+$ para dar lugar a productos estables y/o unión al centro activo de la enzima como ha ocurrido en el caso de metabisulfito en uva (Valero, Varón y García-Carmona, 1992) y pimiento (Serrano-Martínez y col., 2008). La inhibición producida por L-cisteína en el caso de POD ligada (Figura 3.9A) fue superior a la obtenida en el caso de POD soluble (Figura 3.9B).

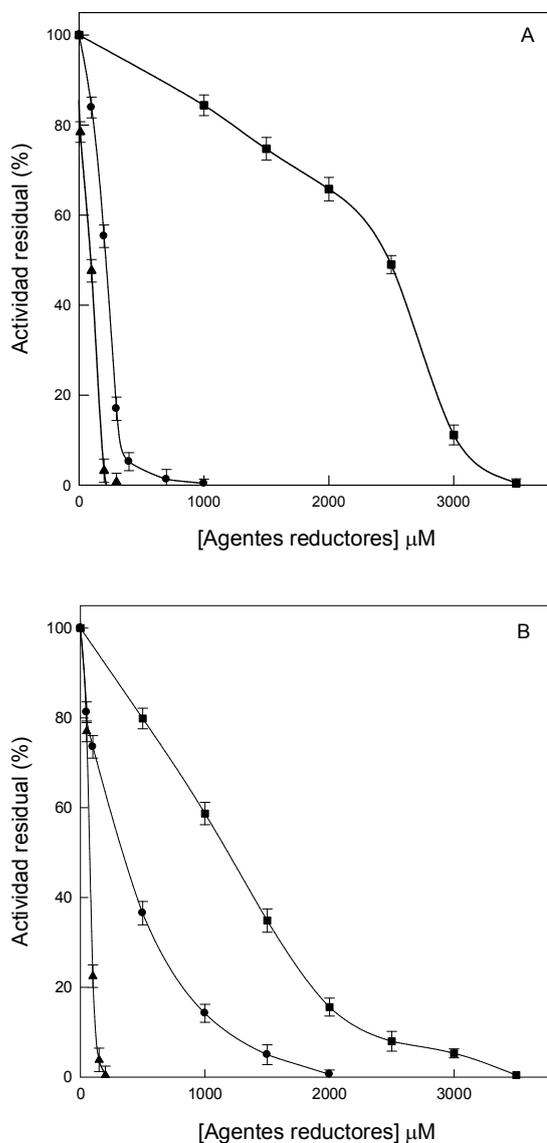


Figura 3.9. (A) Efecto inhibitor de diferentes agentes reductores en POD ligada. El medio de reacción estándar a 25 °C contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0, 20 $\mu\text{g/mL}$ de enzima, ABTS 2 mM, H_2O_2 4 mM, tropolona 0.2 mM, y concentraciones crecientes de agentes reductores de 0 a 3.5 mM [ácido ascórbico (▲), L-cisteína (●) o metabisulfito (■)]. **(B)** Efecto inhibitor de diferentes agentes reductores en la actividad de POD soluble. El medio de reacción estándar a 25 °C contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0, 20 $\mu\text{g/mL}$ de enzima, ABTS 5 mM, H_2O_2 3 mM, tropolona 0.2 mM, y concentraciones crecientes de agentes reductores de 0 a 3.5 mM [ácido ascórbico (▲), L-cisteína (●) o metabisulfito (■)].

3.3.1.4. Efecto de CDs.

Una vez caracterizadas las dos formas isoenzimáticas de POD de lombarda, se procedió a llevar a cabo el estudio del efecto de la adición de CDs al medio de reacción para comprobar si las CDs eran capaces de actuar directamente sobre la enzima, modificando su actividad o si por el contrario, lo que hacían era secuestrar a su sustrato y no tenían capacidad de actuar sobre la proteína. Las CDs son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón con seis, siete u ocho residuos de glucosa unidos por enlace glucosídico $\alpha(1\rightarrow4)$ con una estructura troncocónica. La cavidad central de estas moléculas es hidrofóbica, mientras que el borde exterior es hidrofílico. Esta cavidad hidrofóbica es capaz de atrapar en su interior un amplio rango de moléculas, incluidos compuestos fenólicos, formando complejos de inclusión (Cai y col., 1990). También se ha descrito en la literatura que estas CDs podrían modular el pardeamiento enzimático de diferentes frutas y verduras gracias a la capacidad que tienen para atrapar en su interior compuestos que son sustrato de PPO y/o POD (Sojo y col., 1999). Este efecto también se ha descrito para la oxidación de fenoles por la enzima lipooxigenasa (Núñez-Delicado, Sánchez-Ferrer y García-Carmona, 1997), en la que las CDs actúan como antioxidantes secundarios en sinergismo con ácido ascórbico.

ABTS es un compuesto que puede ser atrapado en el interior de la cavidad hidrofóbica de las CDs, formando un complejo de inclusión, y este hecho fue descrito previamente por nuestro grupo de investigación (Lucas-Abellán y col., 2011). Esta complejación, podría explicar la disminución de la actividad enzimática de POD ligada (Figura 3.10A) y soluble (Figura 3.10B) de lombarda que se observó cuando se ensayó el medio de reacción estándar en presencia de concentraciones crecientes de HP- β -CDs.

Para corroborar si esta inhibición se debía solamente a la complejación del ABTS en el interior de las CDs o también había interacción con la proteína, se procedió a ajustar los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten, en la cual, la concentración de sustrato se sustituye por la concentración de sustrato libre, es decir, no complejado por las CDs.

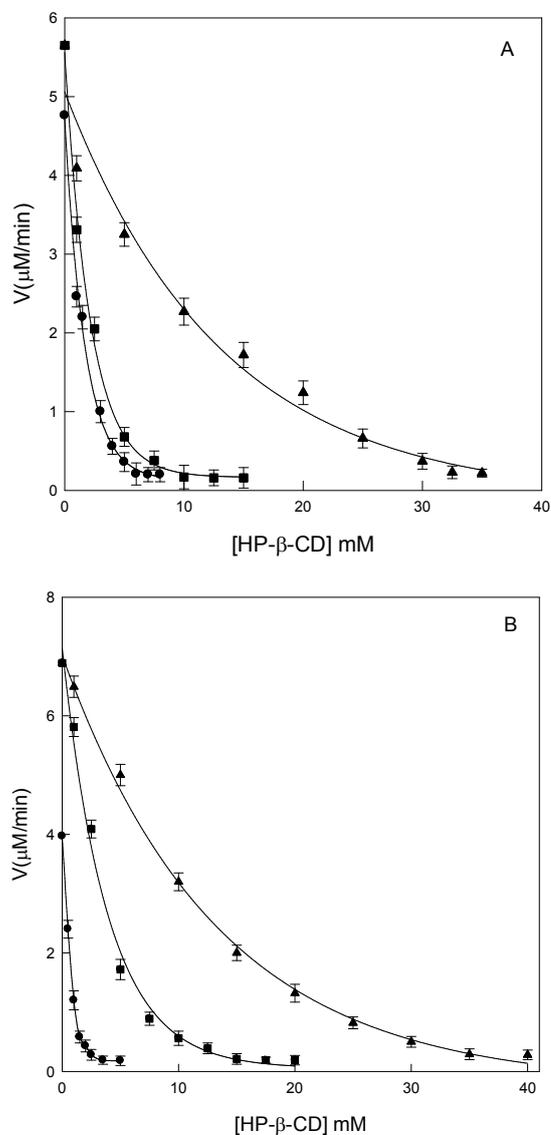


Figura 3.10. (A) Efecto de concentraciones crecientes de HP-β-CDs (0-40 mM) y ABTS [1 mM (●), 2 mM (■) o 4 mM (▲)] en la actividad enzimática de POD ligada. (B) Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la actividad enzimática de POD soluble. El medio de reacción estándar a 25 °C contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0, 20 μg/mL de proteína, H₂O₂ 4 mM y concentraciones crecientes de HP-β-CDs (0-40 mM) y ABTS [0.5 mM (●), 2 mM (■) o 4 mM (▲)].

Los datos obtenidos en las Figuras 3.10A y B se ajustaron a la ecuación modificada de Michaelis-Menten (3.3) en la que la concentración de sustrato habría sido sustituida por la concentración de sustrato libre ($[ABTS]_l$).

$$v = \frac{[V_m](-([CD]_t K_c - [ABTS]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [ABTS]_t K_c + 1)^2 + 4K_c[ABTS]_t}) / 2K_c]}{[K_M + (-([CD]_t K_c - [ABTS]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [ABTS]_t K_c + 1)^2 + 4K_c[ABTS]_t}) / 2K_c]} \quad (3.3)$$

La concentración de sustrato libre en presencia de CDs está descrita por la ecuación (3.4):

$$[ABTS]_l = (-([CD]_t K_c - [ABTS]_t K_c + 1) + \sqrt{([CD]_t K_c - [ABTS]_t K_c + 1)^2 + 4K_c[ABTS]_t}) / 2K_c \quad (3.4)$$

Esta ecuación, que define la concentración de sustrato libre en el medio, se obtuvo teniendo en cuenta el equilibrio que se produce en la formación de los complejos (ecuación 3.5).



La constante de complejación que gobierna este equilibrio está definida por la ecuación 3.6.

$$K_c = \frac{[ABTS-CDs]}{[ABTS]_L [CDs]_L} \quad (3.6)$$

Teniendo en cuenta los balances de materia:

$$[ABTS]_T = [ABTS]_L + [ABTS-CDs] \quad (3.7)$$

$$[CDs]_T = [CDs]_L + [ABTS-CDs] \quad (3.8)$$

Despejando en la ecuación 3.6:

$$[ABTS-CDs] = K_c [ABTS]_L [CDs]_L \quad (3.9)$$

Combinando las ecuaciones 3.6 y 3.7:

$$[\text{CDs}]_L = \frac{[\text{ABTS}]_T - [\text{ABTS}]_L}{K_c [\text{ABTS}]_L} \quad (3.10)$$

Sustituyendo estas dos últimas ecuaciones en la ecuación 3.8 se obtiene la ecuación de segundo grado para calcular la concentración de ABTS libre en el medio:

$$K_c [\text{ABTS}]_L^2 + ([\text{CDs}]_T K_c - [\text{ABTS}]_T K_c + 1) [\text{ABTS}]_L - [\text{ABTS}]_T = 0 \quad (3.11)$$

La solución de esta ecuación 3.11 es la ecuación 3.4, cuyo único parámetro desconocido es K_c , que puede ser calculado.

La ecuación 3.3 muestra una relación no lineal entre la velocidad de la enzima y la concentración de CDs ($[\text{CD}]_t$), tal y como se corroboró experimentalmente (Figura 3.10). Usando los datos obtenidos para POD ligada y soluble (Figura 3.10) y ajustándolos a la ecuación 3.3 por regresión no lineal, se obtuvo un valor de 312 M^{-1} para la constante de complejación (K_c) entre ABTS y HP- β -CDs. El hecho de que los datos experimentales se ajusten perfectamente a los datos teóricos obtenidos con la ecuación 3.3, sumado a que con los dos tipos de POD utilizada (ligada y soluble) se obtuviera el mismo valor de K_c , puso de manifiesto que el efecto inhibitorio que las CDs ejercían sobre la actividad enzimática venía dado por la complejación del sustrato, ABTS en este caso, y no por interacciones de las CDs con la propia proteína.

3.3.1.5. Temperatura óptima.

La temperatura óptima se determinó para POD ligada y soluble. La temperatura óptima de la forma ligada fue $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 3.11, círculos negros), que es similar a la obtenida para POD de melón variedad Charantais (Chisari y col., 2008). Temperaturas por encima de los $45 \text{ }^\circ\text{C}$ provocaron una disminución de la actividad enzimática de forma gradual. En el caso de POD soluble, la temperatura óptima fue de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 3.11, círculos blancos), resultado similar a la POD de melón variedad Amarillo (Chisari y col., 2008). Cuando la

temperatura fue superior a los 30 °C se observó una disminución progresiva de la actividad hasta llegar a un 60% de inactivación a 60 °C.

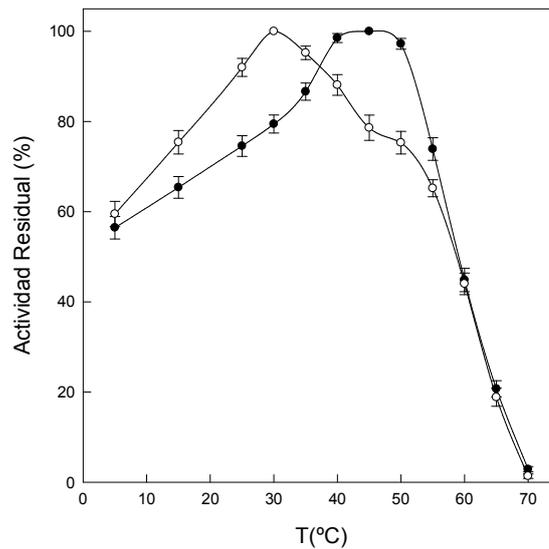


Figura 3.11. Temperatura óptima para POD ligada (●) y soluble (○).

3.3.1.6. Estabilidad térmica.

Para completar el análisis de POD de lombarda, se estudió la estabilidad térmica de ambas enzimas (soluble y ligada). Los puntos semi-logarítmicos de actividad residual de POD ligada (Figura 3.12A) y soluble (Figura 3.12B) disminuyeron de forma lineal frente al tiempo de calentamiento a todas las temperaturas estudiadas. Este resultado indicó que la inactivación térmica de la enzima se produce a través de un proceso de primer orden. El hecho de que todas las líneas confluyan en un punto común indica que se está midiendo la inactivación de una única isoenzima en cada caso. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos para POD de patata y zanahoria (Anthon y Barrett, 2002), pimiento (Serrano-Martínez y col., 2008), uva (Fortea y col., 2009) y alga roja (Fortea y col., 2011).

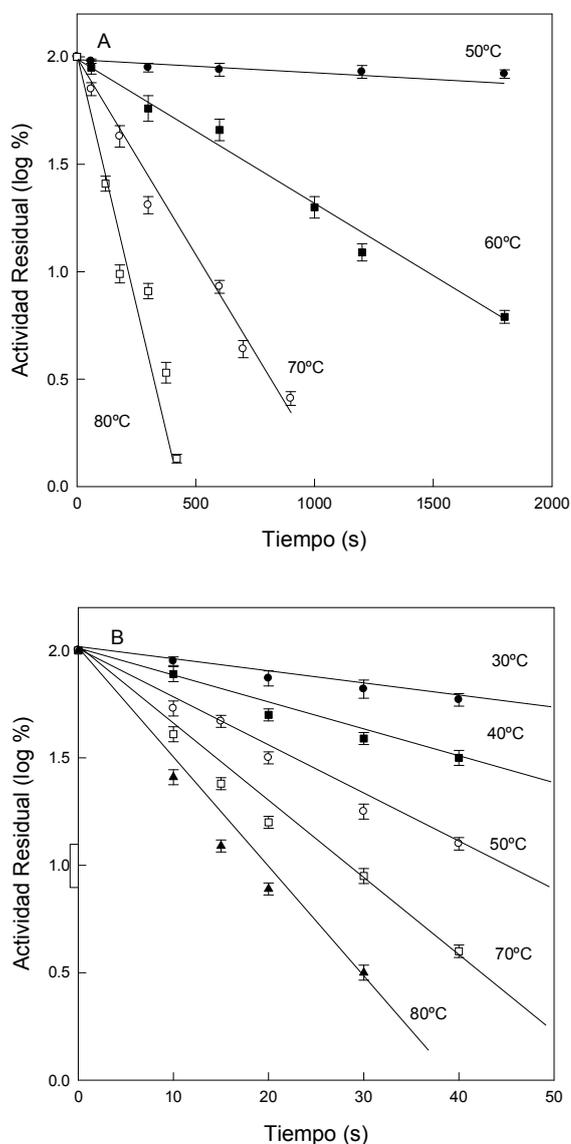


Figura 3.12. (A) Inactivación térmica de POD ligada. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 50 °C (●), 60 °C (■), 70 °C (○) y 80 °C (□). El medio de reacción estándar a 25 °C contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima, ABTS 2 mM, H_2O_2 4 mM y tropolona 0.2 mM. (B) Inactivación térmica de POD soluble. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 30 °C (●), 40 °C (■), 50 °C (○), 70 °C (□) y 80 °C (▲). El medio de reacción estándar a 25 °C contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.0, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima, ABTS 5 mM, H_2O_2 3 mM y tropolona 0.2 mM.

A partir de las pendientes de las rectas de la figura 3.12, mediante regresión lineal, se calculó la constante de inactivación (k) a partir de la siguiente ecuación (3.12):

$$\log\left(\frac{A}{A_0}\right) = -\left(\frac{k}{2.303}\right)*t \quad (3.12)$$

donde A_0 es la actividad enzimática antes del calentamiento y A es la actividad tras el calentamiento para cada tiempo t . Cuando los valores de k se representaron en la gráfica de Arrhenius (Figura 3.13), se obtuvo una línea recta para ambos tipos de POD, ligada (círculos negros) y soluble (círculos blancos) (Figura 3.13).

Las energías de activación (E_a) se calcularon a partir de la pendiente de la representación de Arrhenius mediante la siguiente ecuación (3.13) (Anthon y Barrett, 2002):

$$\ln(k) = -\frac{E_a}{RT} + c \quad (3.13)$$

donde R es la constante de los gases ($8.314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) y T es la temperatura en °K. Esta representación lineal que se obtuvo para los dos tipos de POD de lombarda, contrasta con la curvatura obtenida para otras verduras, incluyendo POD de patata y zanahoria (Anthon y Barrett, 2002), lipooxigenasa de judías verdes (Indrawati y col., 1999), lipooxigenasa de semilla de guisante (Busto y col., 1999) y uva (Fortea y col., 2009); pero es similar a la obtenida en el caso de POD de pimienta (Serrano-Martínez y col., 2008) y alga roja (Fortea y col., 2011).

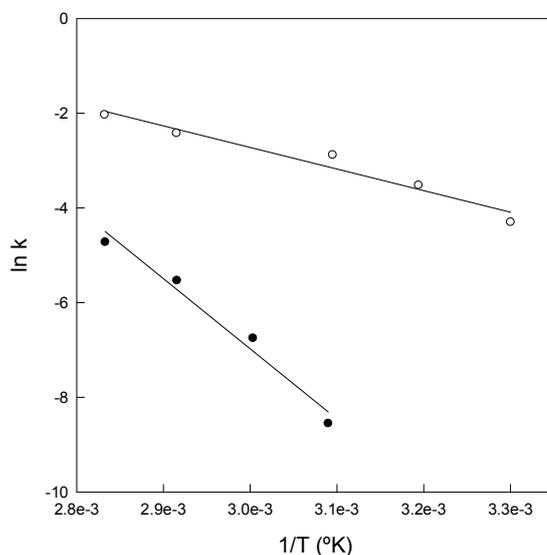


Figura 3.13. Representación de Arrhenius de la tasa de inactivación de POD ligada (●) y soluble (○).

La explicación para esta linealidad en la representación de Arrhenius en ambas isoenzimas de POD, se debe al hecho de que la inactivación se produce a través de un único mecanismo dependiente de la temperatura, como es el desplegamiento de las proteínas. Sin embargo, cuando en la representación de Arrhenius se observa una curvatura, indica que la inactivación se está produciendo a través de varios mecanismos, cada uno con una dependencia de temperatura diferente y la dependencia de temperatura global no es más que la suma de los procesos individuales.

La energía de activación (E_a) es la diferencia de energía entre una configuración activada o de transición respecto a la configuración inicial. El término de E_a fue introducido hace más de un siglo por Hood como una relación puramente empírica y dependiente de la temperatura (Sudha, Sukumar y Uma-Rao, 2014). Respecto a la energía de activación obtenida (E_a), el valor para POD ligada fue 143.1 kJ/mol, superior a la de POD de melón Charantais (86 kJ/mol; Chisari y col., 2008), la mitad que la obtenida para POD de uva (271.9 kJ/mol; Fortea y col., 2009) o tres veces inferior a la POD de patata y zanahoria (478 kJ/mol; Anthon y Barrett, 2002). Sin embargo, fue similar a la POD de melón

Amarillo (160 kJ/mol; Chisari y col, 2008), pimienta (151 kJ/mol; Serrano-Martínez y col., 2008) o alga roja (121.6 kJ/mol; Fortea y col., 2011).

Para POD soluble, el valor de E_a obtenido fue 38.5 kJ/mol, claramente inferior al valor de E_a analizado para el caso de POD ligada (143.1 kJ/mol).

El rango de temperatura necesario para la inactivación de POD ligada estuvo entre 50-80 °C. Este rango fue superior al observado para POD de alga roja (30-50 °C; Fortea y col., 2011), y pimienta (30-60 °C; Serrano-Martínez y col., 2008) pero similar a POD de uva (60-80 °C; Fortea y col., 2009), fresa (50-80 °C; Chisari y col., 2007) y melón (40-70 °C; Chisari y col., 2008). Los resultados de estabilidad térmica indicaron que POD ligada de lombarda es más termoestable que las PODs de alga roja o pimienta, pero similar a la de uva, fresa o melón. El rango de temperatura necesario para la inactivación de POD soluble estuvo entre 30-80 °C, pero solamente durante unos pocos segundos a cada temperatura analizada (0-50 segundos), a diferencia de POD ligada donde el tiempo de tratamiento en las diferentes temperaturas fue claramente superior (0-2000 segundos).

La inactivación se expresa mediante el valor D , que es el tiempo necesario para reducir la actividad enzimática al 10% de su valor original. La temperatura necesaria para un valor D de 5 minutos, en el caso de POD ligada fue 76.6 °C. Valor muy superior al de POD de alga roja (48.4 °C; Fortea y col., 2011) y pimienta (44.5 °C; Serrano-Martínez y col., 2008), similar a los observados para POD de uva (75 °C; Fortea y col., 2009), patata y zanahoria (80 °C; Anthon y Barrett, 2002), melón (70 °C; Chisari y col., 2008) y fresa (80 °C; Chisari y col., 2007). La temperatura necesaria para alcanzar este valor D de 5 minutos para POD soluble fue 30.2 °C, claramente inferior al valor en POD ligada (76.6 °C).

3.3.2. Col blanca

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos para las PODs del género *Brassica oleracea*, se procedió a la extracción de POD de col blanca, ya que tanto la caracterización cinética como el estudio del efecto de CDs sobre la actividad enzimática, no habían sido descritos en la literatura al igual que ocurría con lombarda. La extracción de las enzimas (POD ligada y soluble) se llevó a cabo usando el mismo procedimiento que en el caso de lombarda.

3.3.2.1. Extracción, efecto de pH y SDS.

La extracción de POD de col blanca se llevó a cabo en dos fases: por una parte, en medio tamponado se extrajo la POD soluble y por otra parte, utilizando TX-114 para hacer la digestión de las membranas celulares, se extrajo POD ligada a membranas.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a proteína, actividad enzimática total y actividad específica en cada una de las partes.

La cantidad de proteínas solubles extraídas en medio tamponado (sobrenadante), partiendo de 50 g de col blanca fue de 114 mg y las unidades de enzima totales 400, lo que supuso una actividad específica de 3.5 U/mg.

En el caso de POD ligada (extraída a partir de los restos de col blanca tratados con TX-114) se obtuvieron 65 mg de proteína, con 330 unidades enzimáticas y por tanto, una actividad específica de 5 U/mg.

Tabla 3.2. Actividad específica y total de POD ligada y soluble de col blanca.

Formas Enzimáticas	Vol (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total ^a (U)	Actividad específica(U/mg)
Sobrenadante (POD soluble)	62	114	400	3.5
Sobrenadante 4% TX-114 (POD ligada)	12	65	330	5

^aABTS como donador.

Estos resultados indicaron que en el caso de las proteínas ligadas a membrana extraídas con TX-114, POD es más abundante proporcionalmente hablando, que en el caso de las proteínas solubles extraídas sólo con tampón.

Los resultados obtenidos son similares a los observados en col China (Kharatmol y Pandit, 2012), cuyo contenido proteico (5 mg/mL) es similar a POD ligada en col (5.4 mg/mL). En el caso de col verde, el resultado obtenido fue similar al de POD soluble (Kharatmol y Pandit, 2012).

El estudio de col blanca también se llevó a cabo usando ABTS como donador y H₂O₂ como aceptor de electrones. El pH del medio cambia el estado de ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos, y por tanto, la estructura tridimensional de la enzima. Además el pH también altera la ionización del sustrato (Ajila y Prasada-Rao, 2009). Por estas razones, es muy importante realizar un estudio del efecto del pH en la caracterización de las enzimas.

La Figura 3.14A muestra el perfil de pH para la oxidación de ABTS por POD ligada (círculos negros) en un rango de pH comprendido entre 3.0 y 9.0. El pH óptimo para la enzima fue 4.0. Tanto por encima como por debajo de este pH, la actividad de la enzima cayó hasta valores muy próximos e incluso 0. Por encima de pH 6.0, la enzima no mostró actividad alguna. El pH óptimo para POD soluble (Figura 3.14B, círculos negros), fue similar al de POD soluble POD de lombarda (Fortea y col., 2012), fruto de marula (Mdluli, 2004), pimiento (Serrano-Martínez y col., 2008) o alga roja (Fortea y col., 2011). Por tanto, el valor de pH óptimo para PODs de col blanca se encuentra dentro del rango de pHs descritos previamente en la literatura para PODs procedentes de otras fuentes vegetales.

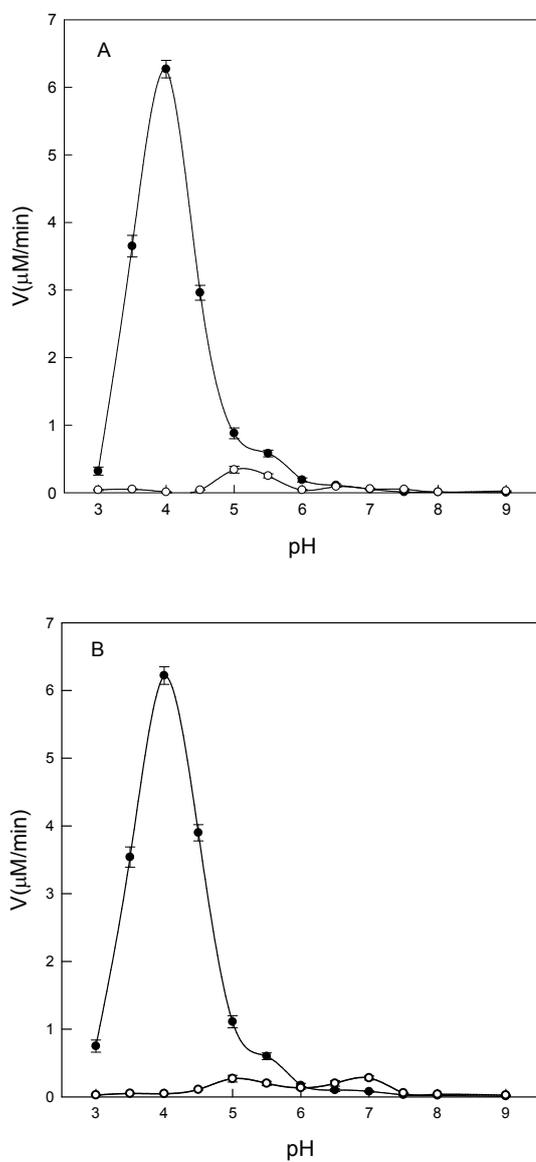


Figura 3.14. (A) Efecto del pH en la actividad enzimática de POD ligada en ausencia (●) o en presencia (○) de SDS 1 mM. (B) Efecto del pH en la actividad enzimática de POD soluble en ausencia (●) o en presencia (○) de SDS 1 mM. El medio de reacción, contenía a 25 °C 100 mM de tampón acetato sódico (pH 3.0-5.0), 100 mM de tampón fosfato sódico (pH 6.0-7.5) ó 100 mM de tampón borato sódico (pH 8.0-9.0), 20 μg/mL de proteína, ABTS 4 mM, H₂O₂ 4 mM y tropolona 0.2 mM, en un volumen final de 1 mL.

El perfil de pH también fue analizado en presencia de SDS 1.0 mM para tanto POD ligada (Figura 3.14A, círculos blancos) como POD soluble (Figura 3.14B, círculos blancos). A esta concentración de SDS, ambas enzimas fueron inactivadas en todo el rango de pH estudiado.

La actividad de ambas enzimas fue dependiente de la concentración de SDS en el medio de reacción (Figura 3.15). Cuando se comparó el efecto de la concentración de SDS en POD ligada (círculos negros) y POD soluble (círculos blancos) de col blanca, se observó un efecto inhibitorio más acusado en el caso de POD ligada que soluble. Para POD ligada, con una concentración de SDS 0.1 mM se produjo una inhibición del 75%, mientras que en el caso de POD soluble, a esa misma concentración de detergente, el % de inhibición fue mucho menor (17%). La inactivación total de ambas enzimas se alcanzó a una concentración de 0.7 mM de SDS. Esta inactivación se debe a los cambios conformacionales que se producen en la proteína como consecuencia de la interacción con las moléculas de detergente.

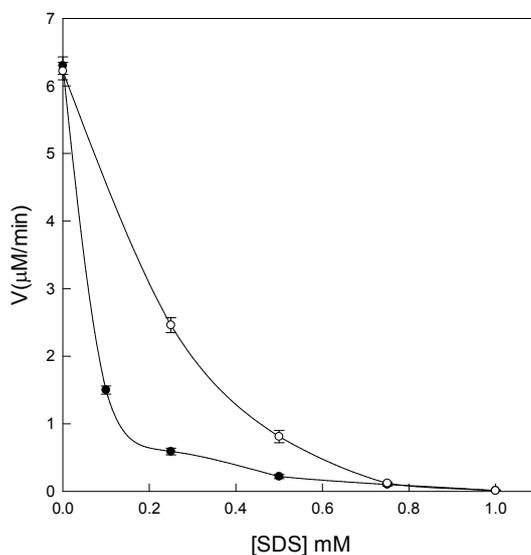


Figura 3.15. Efecto de la concentración de SDS en la actividad enzimática de POD ligada (●) y soluble (○) a pH óptimo (4.0). El medio de reacción contenía a 25 °C, tampón acetato 100 mM, 20 μg/mL de proteína, ABTS 4 mM, H₂O₂ 4 mM, tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de SDS de 0 a 1.0 mM.

3.3.2.2. Caracterización cinética.

Para determinar la afinidad de las PODs de col blanca por sus sustratos ABTS y H_2O_2 , se calcularon los parámetros cinéticos V_m y K_M mediante el ajuste de los puntos experimentales de la Figura 3.16 a la ecuación de Michaelis-Menten (3.1). El ensayo se llevó a cabo al pH óptimo de la enzima (4.0). La Figura 3.16A muestra la variación de la velocidad de la reacción frente a la concentración de H_2O_2 para POD ligada. Cuando aumentó la concentración de H_2O_2 en el medio, manteniendo fija la concentración de ABTS (4 mM), la velocidad de la reacción aumentó hasta alcanzar la saturación. El valor de K_M para el H_2O_2 fue 1.1 mM, superior al descrito para POD ligada de lombarda (0.82 mM) (Fortea y col., 2012). Este perfil cinético contrasta con la inhibición por alta concentración de H_2O_2 observada para POD de otras fuentes vegetales (rábano, Hiner y col., 1996 o alga roja, Fortea y col., 2011). El valor de K_M es una medida que nos indica la robustez del complejo enzima-sustrato. Un valor alto de K_M indica menor afinidad de la enzima por el sustrato.

La Figura 3.16B, muestra el perfil de variación de ABTS para POD ligada. El valor de K_M para ABTS fue 0.43 mM, superior al observado para POD ligada de lombarda (0.2 mM) (Fortea y col., 2012). En este caso, la enzima tampoco presentó inhibición por alta concentración de sustrato.

En el caso de POD soluble, la velocidad de oxidación de ABTS también fue dependiente de la concentración de H_2O_2 presente en el medio (Figura 3.16C). El valor de K_M para H_2O_2 fue 0.62 mM, inferior al de POD soluble de lombarda (0.98 mM) (Fortea y col., 2012), lo que indica una mayor afinidad de POD soluble de col blanca por H_2O_2 .

Finalmente, cuando se varió la concentración de ABTS entre 0 y 7 mM (Figura 3.16D), a una concentración fija saturante de H_2O_2 (4 mM), la velocidad de la reacción aumentó hasta llegar a saturación. El valor de K_M para ABTS fue 0.92 mM, superior al obtenido para POD ligada y superior al de POD soluble de lombarda (0.61 mM) (Fortea y col., 2012), lo que indicó una menor afinidad de POD soluble de col blanca por ABTS.

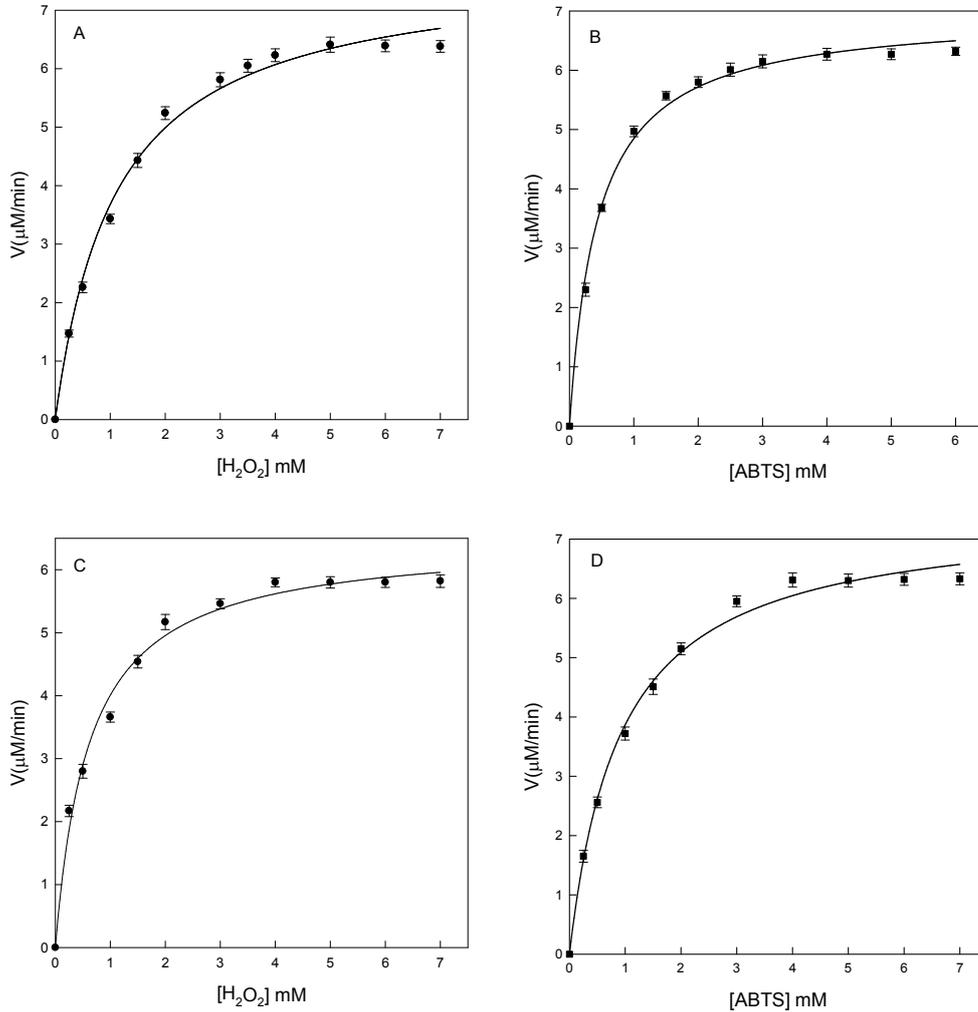


Figura 3.16. (A) Efecto de la concentración de H_2O_2 en la actividad enzimática de POD ligada. El medio de reacción contenía a 25 °C, tampón acetato 100 mM (pH 4.0), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, ABTS 4 mM, tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de H_2O_2 de 0 a 7 mM (B) Efecto de la concentración de ABTS. El medio de reacción contenía a 25 °C, tampón acetato 100 mM (pH 4.0), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, H_2O_2 4 mM, tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de ABTS de 0 a 6 mM (C) Efecto de la concentración de H_2O_2 en la actividad enzimática de POD soluble. El medio de reacción contenía a 25 °C, tampón acetato 100 mM (pH 4.0), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, ABTS 4 mM, tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de H_2O_2 de 0 a 7 mM (D) Efecto de la concentración de ABTS. El medio de reacción contenía a 25 °C, tampón acetato 100 mM (pH 4.0), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, H_2O_2 4 mM, tropolona 0.2 mM y concentraciones crecientes de ABTS de 0 a 7 mM.

3.3.2.3. Efecto de inhibidores.

Para completar el estudio de POD ligada y soluble de col blanca, se analizó el efecto de varios agentes reductores (ácido ascórbico, L-cisteína y metabisulfito) sobre su actividad (Figura 3.17A, B, C, D). Según los resultados obtenidos, el ácido ascórbico fue el modulador más efectivo de la actividad enzimática (Figura 3.17A y B, triángulos negros), alcanzando el 100% de inhibición con 0.12 mM de ácido ascórbico en el caso de POD soluble y con 0.1 mM para POD ligada. La inhibición producida por metabisulfito fue inferior en ambos casos (Figura 3.17C y D), alcanzando el 100% de inhibición con 4 mM de metabisulfito en el caso de POD soluble y 3 mM para POD ligada. Este tipo de inhibición se debe a la reacción de estos compuestos con el radical de ABTS⁺ para dar lugar a un producto estable y/o por la unión al centro activo de la enzima.

La inhibición producida por L-cisteína en el caso de POD ligada (Figura 3.17A, círculos negros) fue similar a la observada en el caso de POD soluble (Figura 3.17B, círculos).

La Tabla 3.3 muestra la concentración de agentes reductores que produce la inhibición enzimática total en las PODs de lombarda y col blanca. Los resultados son similares en el caso de ácido ascórbico y metabisulfito, pero existen importantes diferencias en el caso de L-cisteína.

Tabla 3.3. Comparación de la inhibición provocada por los diferentes agentes reductores en PODs de lombarda y col blanca.

Agentes reductores	Col POD ligada 100% Inhibición	Lombarda POD ligada 100% Inhibición	Col POD Soluble 100% Inhibición	Lombarda POD Soluble 100% inhibición
Ácido ascórbico (mM)	0.1	0.3	0.12	0.2
Metabisulfito (mM)	3	3.5	4	3.5
L-Cisteína (mM)	0.15	1	0.175	2

La inhibición completa de la actividad enzimática producida por ácido ascórbico para POD ligada de col blanca se obtuvo a una concentración de 0.1 mM, sin embargo para POD ligada de lombarda, la concentración fue 0.3 mM. En el caso de la forma soluble, la inhibición total de la actividad enzimática se

observó a una concentración de 0.12 mM de ácido ascórbico en col blanca y 0.2 mM para POD soluble de lombarda.

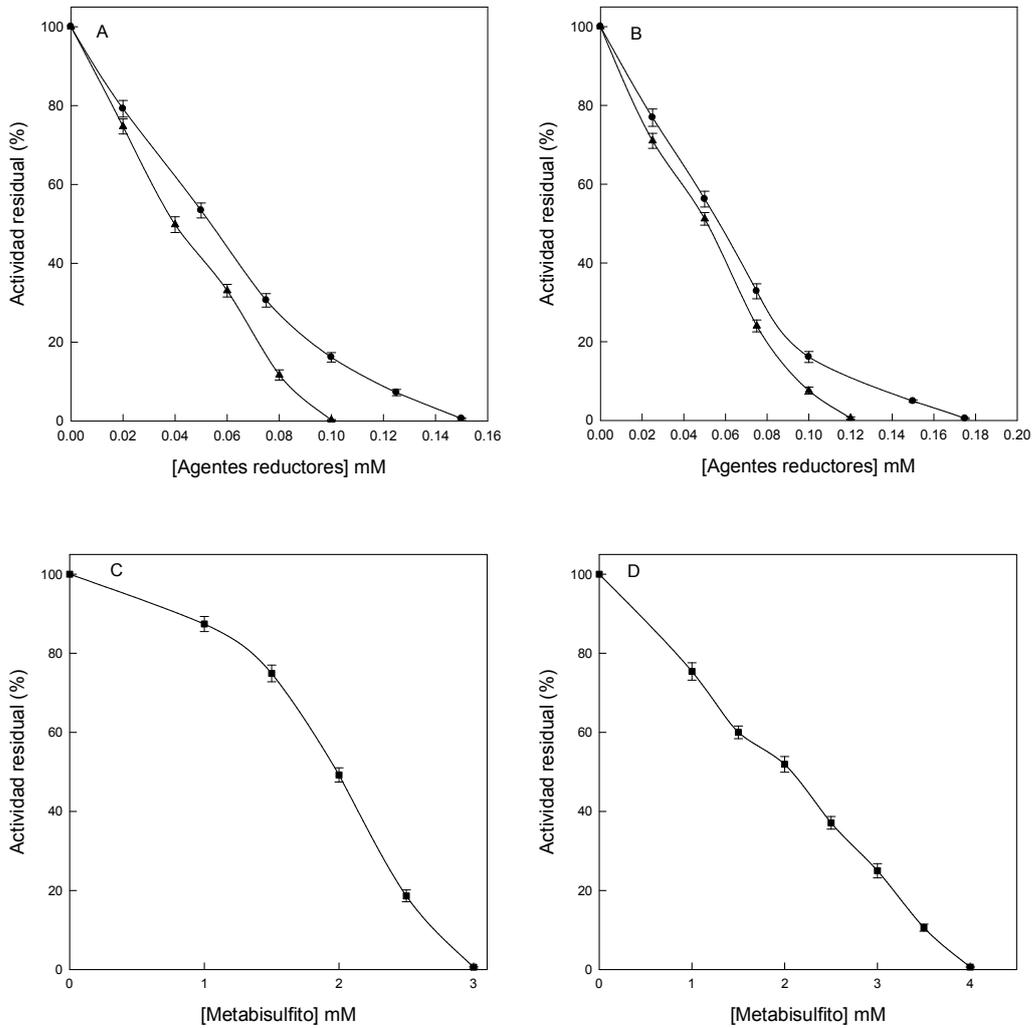


Figura 3.17. (A) Efecto inhibitor de ácido ascórbico (▲) y L-cisteína (●) en POD ligada (B) Efecto inhibitorio de los agentes reductores en POD soluble. El medio de reacción estándar a 25 °C contenía, tampón acetato 100 mM pH 4.0, 20 µg/mL de enzima ABTS 4 mM, H₂O₂ 4 mM, tropolona 0.2 mM, y agentes reductores [ácido ascórbico (▲) y L-cisteína (●)]. (C) Efecto inhibitor de metabisulfito (■) en POD ligada. (D) Efecto inhibitorio de metabisulfito (■) en POD soluble.

Por lo que respecta a metabisulfito, la concentración que provocó la inhibición total de la actividad de POD ligada de col blanca fue 3 mM y para POD ligada de lombarda 3.5 mM. Por lo que respecta a la forma soluble, la concentración de metabisulfito fue 4 mM para col blanca y 3.5 mM para lombarda.

Las diferencias más significativas se aprecian en el caso de L-cisteína, para POD ligada de col blanca, la concentración de este agente reductor que inhibió la actividad por completo fue 0.15 mM, sin embargo para POD ligada de lombarda, esta concentración fue 1 mM. Las diferencias son más grandes en el caso de la forma soluble de POD. Para col blanca la concentración de L-cisteína que provocó un 100% de inhibición fue 0.175 mM y en el caso de lombarda fue 2 mM.

3.3.2.4. Efecto de CDs.

En el caso de PODs ligada y soluble de col blanca, también se estudió el efecto de la presencia de CDs en el medio de reacción. Tal y como se ha descrito anteriormente (Fortea y col., 2012), el sustrato ABTS puede ser atrapado en el interior de la cavidad hidrofóbica de las CDs. Esta complejación explica la disminución en la actividad enzimática de POD ligada (Figura 3.18A) y soluble (Figura 3.18B) de col blanca que se observó cuando se ensayó el medio de reacción estándar en presencia de concentraciones crecientes de HP- β -CDs.

Los datos obtenidos en las Figuras 3.18A y B se ajustaron a la ecuación modificada de Michaelis-Menten (3.3) en la que la concentración de sustrato había sido sustituida por la concentración de sustrato libre ($[ABTS]$).

La ecuación 3.3 muestra una relación no lineal entre la velocidad y la concentración de CDs ($[CD]_t$), tal y como se corroboró experimentalmente, en los datos que se muestran en la Figura 3.18. Usando los datos obtenidos para POD ligada y soluble y ajustándolos a la ecuación 3.3 por regresión no lineal, se obtuvo un valor de $303 \pm 12 \text{ M}^{-1}$ para la constante de complejación (K_c) entre ABTS y HP- β -CDs. El hecho de que con ambas PODs de col blanca se obtuviera el mismo valor de K_c , junto con el hecho de que los datos experimentales se ajusten perfectamente a la ecuación 3.3, puso de manifiesto que el efecto inhibitor que las CDs ejercían sobre la actividad enzimática venía dado por la complejación del sustrato ABTS en su interior y no por interacciones de las CDs con la proteína.

Este valor de K_c es similar al obtenido en el caso de lombarda (312 M^{-1}) (Fortea y col., 2012).

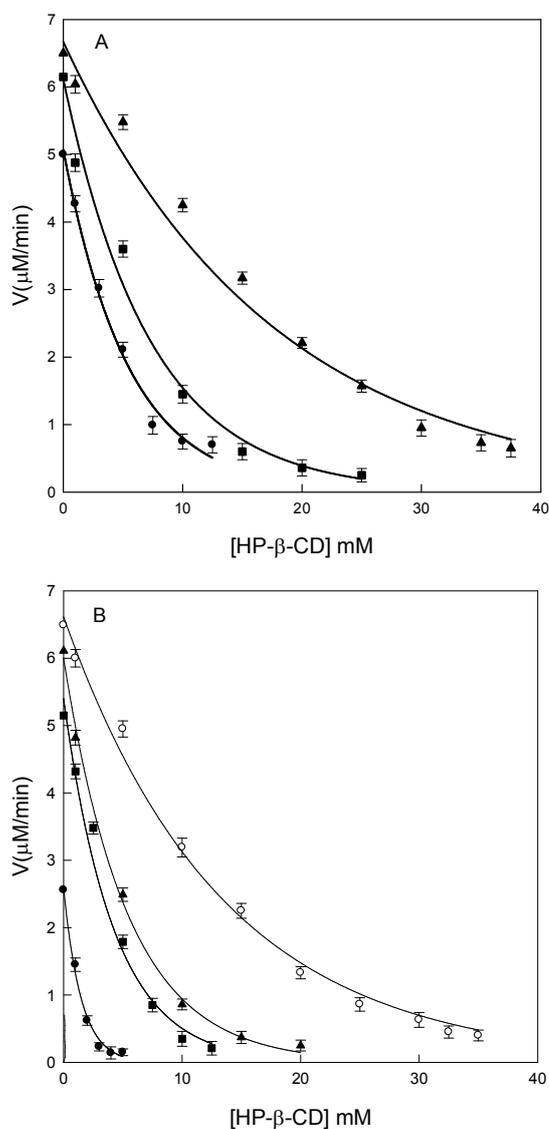


Figura 3.18. (A) Efecto de concentraciones crecientes de HP-β-CDs (0-40 mM) y ABTS [1 mM (●), 3 mM (■) ó 5 mM (▲)] en la actividad enzimática de POD ligada. (B) Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la actividad enzimática de POD soluble. El medio de reacción estándar a 25 °C contenía, tampón acetato 100 mM pH 4.0, 20 µg/mL de proteína, H₂O₂ 4 mM, concentraciones crecientes de HP-β-CDs (0-40 mM) y ABTS [0.5 mM (●), 2 mM (■), 4 mM (▲) ó 6 mM (○)].

3.3.2.5. Temperatura óptima.

POD es una de las enzimas más termorresistentes en vegetales. Sin embargo, la resistencia de una enzima a la temperatura depende de las condiciones de ensayo, pH, sustrato, etc. La temperatura óptima se determinó para POD ligada y soluble de col blanca. Esta temperatura óptima fue de 45 °C para POD ligada (Figura 3.19, ●), que es un valor similar al obtenido para POD ligada de lombarda (Fortea y col., 2012). La temperatura óptima de POD soluble fue 30 °C (Figura 3.19, ○), igual que en el caso de POD soluble de lombarda (Fortea y col., 2012).

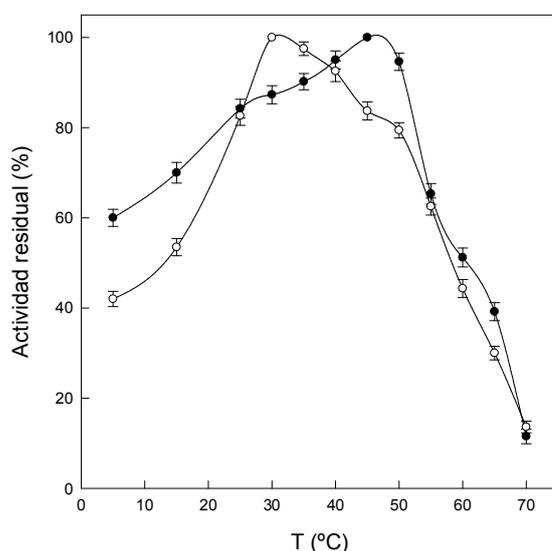


Figura 3.19. Temperatura óptima para POD ligada (●) y soluble (○).

3.3.2.6. Estabilidad térmica.

El estudio de las PODs de col blanca se completó con el análisis de su estabilidad térmica. Como en el caso de PODs de lombarda, los puntos semilogarítmicos de la actividad residual de POD ligada (Figura 3.20A) y soluble (Figura 3.20B) disminuyeron de forma lineal con el tiempo de calentamiento, a todas las temperaturas estudiadas. Este resultado indicó que la inactivación térmica de la enzima se produce a través de un proceso de primer orden. El hecho de que todas las líneas confluyan en un punto común indica que se está midiendo la inactivación de una única isoenzima en cada caso.

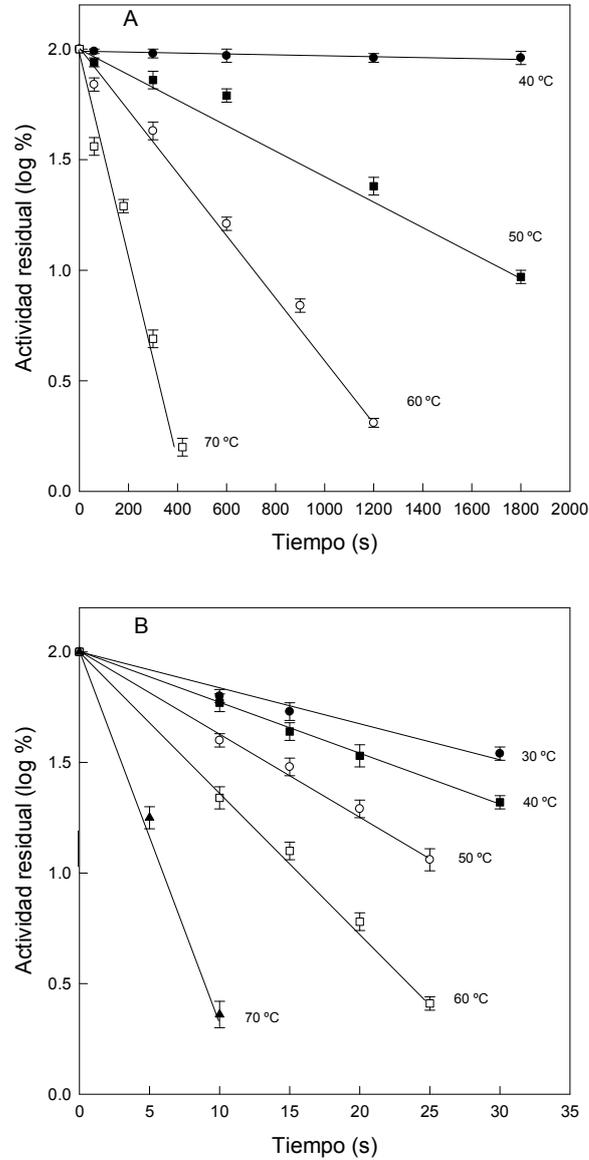


Figura 3.20. (A) Inactivación térmica de POD ligada. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 40 °C (●), 50 °C (■), 60 °C (○) y 70 °C (□). (B) Inactivación térmica de POD soluble. Actividad residual de POD frente al tiempo de calentamiento a 30 °C (●), 40 °C (■), 50 °C (○), 60 °C (□) y 70 °C (▲). El medio de reacción estándar a 25 °C contenía, tampón acetato 100 mM pH 4.0, 20 µg/mL de enzima, ABTS 4 mM, H₂O₂ 4 mM y tropolona 0.2 mM.

A partir de las pendientes de las rectas de la Figura 3.20, mediante regresión lineal, se calculó la constante de inactivación (k) a partir de la ecuación 3.12. Cuando los valores de k se representaron en la gráfica de Arrhenius (Figura 3.21), se obtuvo una línea recta para ambos tipos de POD, ligada (●) y soluble (○) (Figura 3.21).

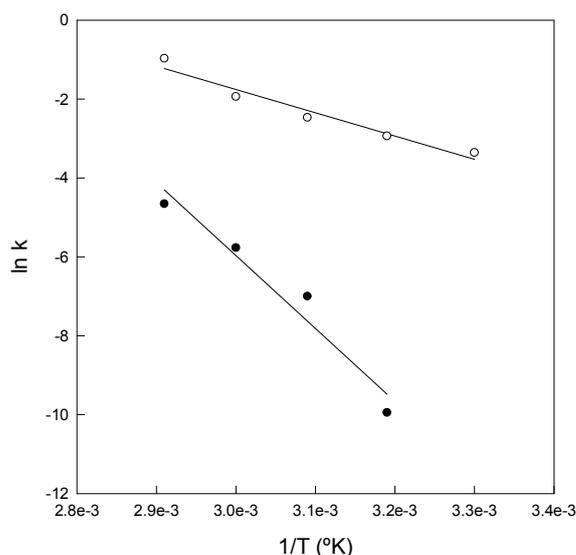


Figura 3.21. Representación de Arrhenius de la tasa de inactivación de POD ligada (●) y soluble (○).

Esta representación lineal que se obtuvo en ambas PODs de col blanca, contrasta con la curvatura obtenida en otros vegetales como POD de patata (Anthon y Barrett, 2002) o uva (Fortea y col., 2009). Pero es similar a la obtenida en el caso de POD de pimienta (Serrano-Martínez y col., 2008), alga roja (Fortea y col., 2011) o lombarda (Fortea y col., 2012).

La explicación para esta linealidad en la representación de Arrhenius en ambas isoenzimas de POD, se debe al hecho de que la inactivación se produce a través de un único mecanismo dependiente de la temperatura, como es el desplegamiento de las proteínas. Sin embargo, cuando en la representación de Arrhenius se observa una curvatura, indica que la inactivación se está produciendo a través de varios mecanismos, cada uno con una dependencia de temperatura diferente.

La E_a se calculó a partir de la pendiente de la representación de Arrhenius mediante la ecuación 3.13. En el caso de POD ligada, el valor obtenido de E_a fue 153.1 kJ/mol, por lo que respecta a POD soluble este valor fue 49.1 kJ/mol.

El rango de temperatura necesario para la inactivación de POD ligada estuvo comprendido entre 40 y 70 °C, similar al obtenido en POD ligada en lombarda (50-80 °C). En el caso de POD soluble este rango osciló entre 30-70 °C, similar al de POD soluble en lombarda (30-80 °C) (Fortea y col., 2012).

En algunos casos, la inactivación se expresa como el valor D , que es el tiempo necesario para reducir la actividad enzimática al 10% de su valor original. La temperatura necesaria para un valor D de 5 minutos en el caso de POD ligada fue 67.1 °C, que fue un valor claramente inferior al obtenido para POD ligada de lombarda (76.6 °C). En el caso de POD soluble, este valor fue 35.8 °C, que en este caso es superior al observado para POD soluble de lombarda (30.2 °C) (Fortea y col., 2012).

IV. USO DE CICLODEXTRINAS
EN MICROENCAPSULACIÓN
DE AROMAS

CAPÍTULO IV. USO DE CDs EN MICROENCAPSULACIÓN DE AROMAS

4.1 INTRODUCCIÓN

La microencapsulación consiste en el recubrimiento de un componente sólido, líquido o gaseoso mediante un material encapsulante, con el objetivo de formar una partícula que ofrezca protección frente al oxígeno, calor, humedad o luz y proporcionar una separación físico-química entre el material encapsulado y otros compuestos. Según Gharsallaoui y col., 2007, la microencapsulación es un proceso en el que pequeñas gotas de un compuesto son atrapadas en el interior de delgadas membranas formadas por agentes de uso alimentario. Las microcápsulas que se obtienen son, en general, pequeñas esferas con diámetros comprendidos entre micras y milímetros y su estructura y forma dependen del material encapsulante utilizado así como de la técnica de secado (Figura 4.1)

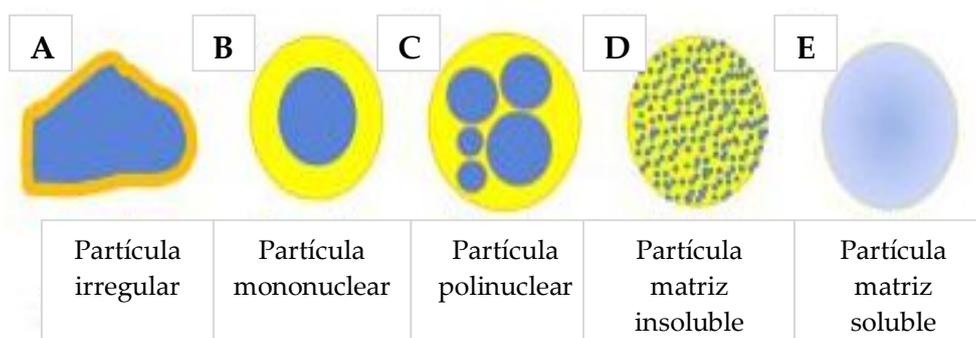


Figura 4.1. Diferentes tipos de micropartículas obtenidas dependiendo de los materiales encapsulantes y de la técnica de secado utilizada (Vasisht, 2014).

Existe un amplio rango de materiales de cubierta de uso alimentario. Los más importantes se dividen en 4 categorías: hidratos de carbono, gomas, lípidos y proteínas.

Entre los carbohidratos más empleados en la industria alimentaria destacan: almidón (Loksuwan, 2007), maltodextrinas (MDs) (Fang y Bhandari, 2012), chitosan (Estevinho y col., 2014), celulosa (Jin, Xia y Zhao, 2012), dextrano (Yang y col., 2012), almidones modificados (Carneiro y col., 2013) y CDs (Yatsu y col., 2013).

Además de los hidratos de carbono, las gomas juegan un papel muy interesante en la encapsulación de diferentes compuestos. Las más utilizadas son: goma arábica (GA) (Kanakdande, Bhosale y Singhal, 2007), goma xantana (GX) (Zhao y col., 2015), goma guar (Roos y col., 2008), alginato (Bagheri y col., 2014) y carragenano (Krishnaiah, Sarbatly y Nithyanandam, 2012).

Los lípidos son menos empleados como agentes encapsulantes, de entre ellos, los más utilizados suelen ser las parafinas (Borreguero y col., 2011).

Respecto a las proteínas destacan: caseína (Chen, Zhang y Zhong, 2015), gelatina (Su y col., 2008) y gluten (Linarés, Larré y Popineau, 2001).

Las principales técnicas de encapsulación de componentes alimentarios y aromas son: secado por aspersión, liofilización, lecho fluido, extrusión, coacervados, cocrystalización, liposomas y complejos de inclusión con CDs (Desai y Park, 2005).

La importancia de la microencapsulación de componentes alimentarios y aromas en la industria alimentaria se puede resumir en seis puntos fundamentales (Shahidi y Han, 1993):

- Reducir la reactividad del núcleo frente a factores externos para protegerlo frente a la degradación.
- Disminuir la tasa de evaporación del núcleo.
- Evitar alteraciones en las características del material original que puedan deberse a su manipulado.
- Controlar la liberación del material encapsulado para lograrla en el momento adecuado.
- Ocultar malos sabores.
- Diluir el material encapsulado cuando tenga que ser usado en pequeñas cantidades.

4.2. TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN

Existe un gran número de técnicas de encapsulación disponibles para su utilización en la industria alimentaria. Algunas de las más comunes son: el secado por aspersión y la liofilización. Es muy importante elegir la técnica de microencapsulación adecuada teniendo en cuenta el compuesto/s objeto de encapsulación y las ventajas y desventajas que ofrece cada proceso.

4.2.1. Secado por aspersión (Spray Drying).

La aplicación del proceso de secado por aspersión en la microencapsulación, implica tres etapas fundamentales: preparación de la emulsión que será procesada posteriormente, homogeneización de la misma y atomización en la cámara de secado. Sin embargo, de acuerdo con Shahidi y Han (1993), este tipo de secado incluye cuatro etapas: preparación de la emulsión, homogeneización, atomización de la emulsión y deshidratación de las partículas atomizadas.

La primera etapa es la formación de una emulsión estable entre el material a encapsular y los agentes encapsulantes. La mezcla, que será atomizada, se prepara mediante la dispersión de los compuestos a encapsular, que generalmente son hidrofóbicos, en una disolución de agentes encapsulantes. La emulsión será entonces calentada y homogeneizada, con o sin la presencia de un agente emulsionante, dependiendo de las características de nuestro material. Antes de secar, la emulsión que se prepara tiene que ser estable durante un cierto periodo de tiempo y la viscosidad debe ser la adecuada para evitar la inclusión de aire en las partículas que se forman (Drusch, 2007). La viscosidad de la emulsión y el tamaño de partícula tienen efectos significativos en la microencapsulación mediante esta técnica. Altas viscosidades interfieren con la atomización y dan lugar a la formación de gotas alargadas y grandes que afectan de manera negativa a la tasa de secado. La retención de los compuestos a encapsular durante la microencapsulación se ve afectada por la composición y las propiedades de la emulsión y las condiciones de secado.

La emulsión obtenida, es atomizada en el interior de la cámara de secado y la evaporación del solvente, generalmente agua, da lugar a la formación de las microcápsulas. A la vez que las partículas van cayendo en la cámara, van

adquiriendo la forma esférica con el compuesto encapsulado en el interior. El pequeño tiempo de exposición y la rápida evaporación del agua, mantienen la temperatura del interior de la partícula en unos 40 °C, a pesar de que la temperatura de entrada es superior a los 100 °C para poder evaporar el contenido acuoso (Gharsallaoui y col., 2007) (Figura 4.2A).



Figura 4.2. (A) Secador por aspersión utilizado en los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral (Mini Spray Dryer Buchi B-290). (B) Liofilizador empleado en los experimentos realizados en la Tesis Doctoral (Christ Alpha 1-2 LDplus).

Para obtener una buena eficacia de microencapsulación, hay que tener en cuenta las variables que intervienen en el proceso de secado por aspersión. Los principales factores son: temperatura de la emulsión, temperatura de entrada y de salida (Liu y col., 2004). De hecho, la temperatura de la emulsión modifica su viscosidad, su fluidez y su capacidad para ser atomizada homogéneamente. Cuando la temperatura de la emulsión aumenta, la viscosidad y el tamaño de las gotas debería disminuir, pero altas temperaturas dan lugar a la volatilización y degradación de algunos componentes termosensibles. La velocidad a la que la emulsión entra en la cámara de secado es otra variable a ser ajustada para

asegurar que cada gota adquiere el adecuado nivel de secado antes de entrar en contacto con la superficie de la cámara.

Además, es importante el ajuste de la temperatura de entrada así como el flujo (Zbicinski y col., 2002). De hecho, la temperatura de entrada es directamente proporcional a la tasa de secado de la microcápsula y al contenido final de agua. Cuando la temperatura de entrada es baja, la baja tasa de evaporación da lugar a la formación de microcápsulas con membranas de alta densidad, alto contenido de agua, mala fluidez y facilidad para formar aglomerados. Sin embargo, una temperatura de entrada muy alta causa una excesiva evaporación, lo que da lugar a la rotura de la membrana con la consecuente liberación prematura y degradación de los compuestos encapsulados.

La temperatura en la zona final o también llamada temperatura de escape, se considera como el control del secador. Es bastante difícil predecir esta temperatura ya que depende de las características del material. A diferencia de lo que ocurre con la temperatura de entrada, la de salida no puede ser controlada directamente. La temperatura ideal para la microencapsulación de componentes alimentarios como aromas se ha descrito en el intervalo de 50 a 80 °C. Las mejores condiciones de secado son las que aseguran una buena relación entre alta temperatura de entrada, alta concentración de sólidos y fácil pulverización y secado sin rotura de las partículas (Bimbenet, Bonazzi y Dumoulin, 2002).

La principal limitación del secado por aspersion podría ser el hecho de que con esta técnica se producen polvos muy finos que, en algunos casos necesitan un procesado posterior, como en el caso de los aglomerados.

Esta técnica se usa en un amplio rango de industrias, siendo especialmente importante en la industria alimentaria donde se ha usado para microencapsular diferentes compuestos: licopeno (Aguilar, Fávares-Trindade y Ferreira, 2012), β -caroteno (Loksuwan, 2007), alicina (Wang y col., 2012), aromas como limoneno (Soottintantawat y col., 2005), linaza (Carneiro y col., 2013), café (Frascareli y col., 2012), extracto de té (Nadeem, Torun y Ozdemir, 2011) o extracto de guava (Osorio, Forero y Carriazo, 2011), pimienta negra (Shaikh, Bhosale y Singhal, 2006) y cardamomo (Krishnan, Bhosale y Singhal, 2005).

Una de las principales ventajas de esta técnica está asociada al coste de la misma, ya que comparada con otros métodos de encapsulación, el secado por aspersion es quizás una de las más económicas. Otra ventaja es la cantidad de

agentes encapsulantes que hay disponibles en el mercado (MDs, CDs, gomas, proteínas, etc.). Sin embargo, es importante tener en cuenta la solubilidad en agua de todos estos agentes encapsulantes antes de empezar el proceso de microencapsulación. Una desventaja que presenta esta técnica es que una parte de los compuestos aromáticos pueden perderse durante el secado, lo que causaría cambios en el sabor y aroma del producto final (Madene y col., 2006).

4.2.2. Liofilización.

La técnica de liofilización es uno de los procesos más usados para el secado de compuestos termosensibles, que además son inestables en disolución acuosa (Figura 4.2B). Al comenzar el proceso, la superficie de la solución se convierte en un sólido en que la difusión selectiva es posible. Buffo y Reineccius (2001), compararon diferentes técnicas de secado para encapsular aceite de naranja prensado en frío con goma acacia y almidón modificado. Ellos concluyeron que la liofilización es el proceso que proporciona las propiedades más adecuadas al polvo obtenido.

Sin embargo, y a pesar de los diversos estudios que señalan a esta tecnología como adecuada para la microencapsulación, es una tecnología menos atractiva que otras debido al coste, que es aproximadamente 50 veces superior al de secado por aspersión. La aplicabilidad comercial está también bastante restringida por el excesivo tiempo de procesado (Jacquot y Permetti, 2003).

Algunos ejemplos de microencapsulación mediante liofilización se encuentran en la preservación de compuestos termolábiles como son crocin, pirocrocina y safranal, en el caso del azafrán. El alto coste de esta técnica se podría compensar por las mínimas pérdidas de estos compuestos en el producto final (Acar, Sadikoglu y Doymaz, 2015). Las antocianinas de arándano (*Vaccinium angustifolium*) también se han microencapsulado usando liofilización como técnica de secado con el objetivo de estudiar la influencia de esta técnica en su actividad biológica (Correa-Betanzo y col., 2015). En el caso de ácido gálico, la microencapsulación por liofilización se llevó a cabo usando quitosán, β -CDs y GX como materiales encapsulantes. Los resultados mostraron que no se perdía capacidad antioxidante durante el proceso, resultando quitosán el mejor encapsulante de todos los estudiados (Gonçalves da Rosa y col., 2013). En el caso

de aceite de lino, la microencapsulación se llevó a cabo mediante secado por aspersión y liofilización, usando zeína como encapsulante. Los resultados mostraron que la eficacia del proceso estaba afectada por la relación zeína/aceite de lino, siendo el secado por aspersión la técnica que ofreció mejores resultados de eficacia de encapsulación (Quispe-Condori, Saldaña y Temelli, 2011). También se ha microencapsulado con esta técnica zumo de limón con diferentes agentes encapsulantes, obteniendo buenos resultados con MDs y GA (Silva y col., 2013).

4.2.3. Lecho fluido.

El proceso de lecho fluido es usado de forma habitual en la industria farmacéutica y cosmética, ambas industrias con un presupuesto netamente superior para la producción de compuestos encapsulados con esta tecnología que la industria alimentaria, donde su uso está orientado a la encapsulación de aromas (Dezarn, 1998). La fluidización se produce cuando se aplica un flujo de fluido hacia arriba a través de un lecho de partículas, que llega a suficiente velocidad para soportar las partículas sin caer a la corriente de fluido. El lecho de partículas asume entonces las características de un líquido en ebullición, de ahí el término de fluidización (Dewettinck y Huyghebaert, 1999).

Esta tecnología permite una distribución del tamaño de partícula específica en el producto. Ventajas que presenta esta tecnología (Mujumdar y Devahastin, 2000):

- Altas tasas de secado debido al buen contacto entre gas y partícula, dando lugar a transferencias de calor y de masa adecuadas.
- Menor área de flujo.
- Alta eficiencia térmica, se necesita menos dinero para su mantenimiento.
- Facilidad de control.

La tecnología de lecho fluido fue desarrollada por primera vez por Wurster en los años 50, por lo que hoy en día aún se conoce como "Proceso Wurster". Existen tres metodologías diferentes: top-spray, bottom-spray y spray tangencial (Figura 4.3).

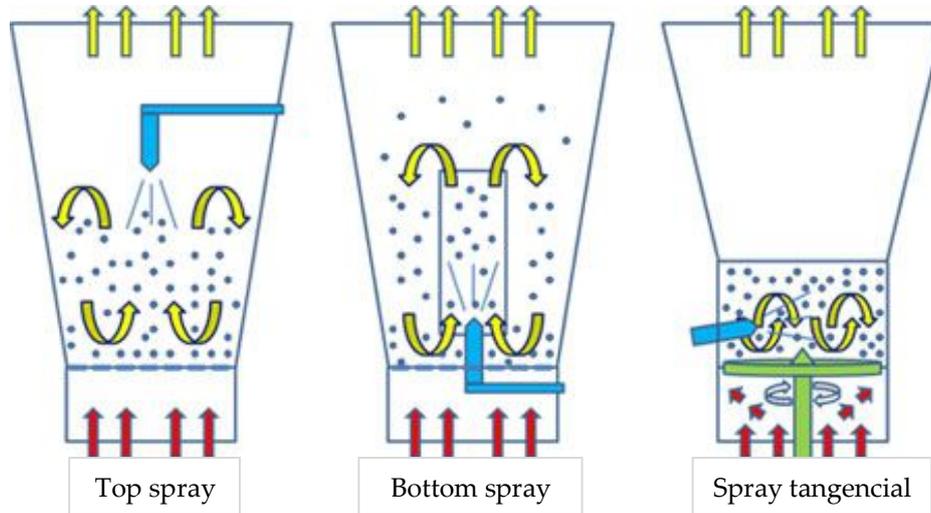


Figura 4.3. Lecho fluido tipo “top-spray”, “bottom-spray” y spray tangencial.

El aire pasa a través de un lecho del compuesto a encapsular para suspenderlo en el aire y la solución de agentes encapsulantes lo recubre a la vez. Las microcápsulas formadas se mueven desde esta zona a la cámara de expansión y de allí caen al contenedor donde se recogen las partículas que se han formado.

El equipo empleado en los experimentos de la presente Tesis Doctoral se observa en la Figura 4.4. Es usado para el recubrimiento de partículas con tamaños menores de 100 micras. En este método, las partículas pasan por la zona de recubrimiento a una tasa más alta que en el método anterior, de tal modo que el patrón de fluidización es más controlado que el lecho fluido tipo top-spray. La ventaja que aporta este método es que el camino del material encapsulante hacia los compuestos a encapsular es muy corto.



Figura 4.4. *Equipo de lecho fluido empleado en los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral (Freund-Vector VFC-LAB Micro Flo-Coater®).*

Es el método más adecuado para encapsular aromas mediante secado por aspersión ya que los agentes encapsulantes que se usan con compuestos aromáticos se disuelven fácilmente y forman fuertes puentes intrapartícula al pasar por lecho fluido (Buffo y col., 2002).

Esta técnica se usa para encapsular componentes nutricionales como vitamina C, vitaminas del grupo B, sulfato ferroso, fumarato ferroso, ascorbato de sodio o cloruro potásico. Estos compuestos se usan como suplementos nutricionales. En el caso de productos de panadería, también se usa para encapsular los componentes del sistema de fermentación como: vitamina C, ácido acético, ácido láctico, sorbato potásico, ácido sórbico, propionato cálcico y sal (De Pauw y col., 1996). En la industria cárnica, se han encapsulado diferentes ácidos así como sal usando lecho fluido (Lee y Krochta, 2002).

El principal problema de esta tecnología es el alto coste del proceso. La industria alimentaria tiene que reducir los costos de producción si quiere que esta tecnología adquiera más protagonismo en el futuro entre los tecnólogos de alimentos. Esta técnica se aplica para revestimientos de fusión en caliente como aceite vegetal, estearina, grasas, emulsionantes y ceras o revestimientos basados

en cubiertas como almidones, gomas y MDs. Ácido cítrico, ácido láctico, ácido sórbico, vitamina C, bicarbonato de sodio y sal encapsulados mediante esta técnica se añaden a galletas saladas y carnes (Desai y Park, 2005).

También es posible la combinación del secado por aspersion y el lecho fluido. En una primera etapa los compuestos aromáticos son secados por aspersion y posteriormente pueden ser recubiertos mediante lecho fluido, lo que puede proporcionar mejor protección y vida útil del producto.

Por ejemplo, las hojas de lima se emplean como hierbas aromáticas e ingredientes alimentarios. La técnica de lecho fluido se utilizó para investigar el impacto de la técnica de secado en el color del producto final, la retención de componentes químicos y vitaminas A y C. Con esta técnica se observó la menor pérdida de color comparada con el secado en horno. Tampoco se observó pérdida significativa en la composición de aceites esenciales, vitamina A y C (Tasirin y col., 2014).

4.3. AGENTES ENCAPSULANTES

La selección de los agentes encapsulantes usados en los procesos de microencapsulación es uno de los puntos clave de este proceso, ya que la estabilidad del compuesto encapsulado se verá afectada por los compuestos que hayan sido seleccionados. Además de las características físico-químicas de estos compuestos, es importante valorar el coste económico de los mismos, ya que este es un factor esencial a la hora de elegir entre los diferentes agentes encapsulantes disponibles. El balance efectividad/coste es fundamental en la industria alimentaria para obtener un producto final adecuado y con buenas propiedades.

Según Shahidi y Han 1993, el principal objetivo de los agentes encapsulantes es proteger los compuestos de interés de diferentes factores. Los compuestos usados como agentes encapsulantes tienen que ser de grado alimentario, biodegradables, capaces de formar una barrera entre la fase interna y los alrededores y solubles en agua ya que la mayoría de técnicas usadas para secar se llevan a cabo a partir de soluciones acuosas (Gouin, 2004). Otra propiedad importante que debe tener un agente encapsulante, es tener una buena capacidad de emulsificación y baja viscosidad. Algunos agentes encapsulantes tienen buena solubilidad en agua como las MDs, sin embargo tienen que ser

combinadas con otros compuestos como gomas o almidones que presentan buenas propiedades de emulsión (de Barros Fernandes, Vilela y Alvarenga, 2014).

La modificación química de agentes encapsulantes es una nueva tendencia que tendrá un gran impacto en los próximos años. Por ejemplo, los almidones hidrolizados presentan propiedades hidrofílicas, lo que significa que tienen baja afinidad por compuestos aromáticos hidrofóbicos. Esta naturaleza hidrofílica puede ser modificada mediante la unión de cadenas laterales tipo octenyl para aumentar esta afinidad (Drusch y Schwarz, 2006).

En contraste, las proteínas presentan un carácter anfifílico, lo que resulta adecuado para la microencapsulación de compuestos hidrofóbicos. Proteínas como caseinato de sodio, proteína de soja o proteína de suero presentan buenas propiedades para la microencapsulación (Gharsallaoui y col., 2007).

4.3.1. Hidratos de carbono.

Los polisacáridos son polímeros naturales de monosacáridos que difieren en el tipo, número, distribución y enlaces de los monómeros en la cadena (Fathi, Martín y McClements, 2014).

4.3.1.1. Maltodextrinas.

Las MDs son hidrolizados de almidón producidas por la hidrólisis parcial del mismo mediante modificación química o enzimática (Goula y Adamopoulos, 2012). Se clasifican según el número de equivalentes de dextrosa (DE). Este parámetro nos indica la proporción de azúcares reductores presentes en un producto con respecto a la dextrosa y oscila entre 5 y 20. Para altos valores de DE las cadenas de glucosa son más cortas y esto significa: alto dulzor, alta solubilidad y baja resistencia a la temperatura. Estos compuestos han sido usados en la industria para microencapsular diferentes compuestos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. *Compuestos encapsulados usando maltodextrinas.*

MDs	Otros encapsulantes	Compuesto encapsulado	Técnica	Referencias
DE n.d.	No	Zumo de amla	Secado por aspersion	Mishra, Mishra y Mahanta, 2014
DE 16	No	Extracto <i>Satureja montana</i>	Secado por aspersion	Vidovic y col., 2014
DE 10	GA, Almidón, Inulina	Aceite de romero	Secado por aspersion	de Barros-Fernandes y col., 2014
DE n.d.	No	Hollejo <i>Averrhoa carambola</i>	Secado por aspersion y liofilización	Saikia, Mahnot y Mahanta, 2015
DE 10	Almidón, Celulosa	Polvo de salsa de soja	Secado por aspersion	Wang y Zhou, 2015
DE 20	GA, proteína suero	Pulpa de tamarindo	Secado por aspersion	Bhusari, Muzaffar y Kumar, 2014
DE 12	Goma acacia, inulina	Aceite esencial	Secado por aspersion	Turchiuli y col., 2014
DE 10	Gelatina	Zumo de cactus púrpura	Secado por aspersion	Castro-Muñoz, Barragán-Huerta y Yáñez-Fernández, 2015
DE n.d.	No	Guava	Secado por aspersion	Patil, Chauhan y Singh, 2014
DE n.d.	GA, carragenano, β -CDs	Sulforafano	Secado por aspersion	Wu y col., 2014

El uso de MDs ofrece importantes ventajas a la hora de microencapsular diferentes compuestos como son: bajo coste, aroma y sabor neutros, baja viscosidad a alta concentración de sólidos y buena protección de compuestos volátiles frente a agentes externos (Krishnan, Krishirsagar y Singhal, 2005). Sin embargo, el principal problema de las MDs es su baja capacidad de

emulsificación, por ello es interesante combinarlas con otros compuestos que sí presentan esta capacidad de emulsionar.

Por ejemplo, según de Barros Fernandez y col., 2014 una alternativa interesante para la encapsulación de aceite esencial de romero sería una mezcla de almidón modificado y MDs.

4.3.1.2. Almidón.

El almidón está formado por 2 glucanos: amilosa, polímero lineal compuesto por unidades de *D*-glucosa unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y amilopectina, molécula altamente ramificada con cadenas lineales unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y cadenas ramificadas unidas por enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ (Moore y col., 2015). La unión de los compuestos volátiles al almidón se produce de dos maneras: por una parte, el compuesto aromático es rodeado por la hélice de amilosa a través de interacciones hidrofóbicas y por otra parte, se han descrito interacciones polares como enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del almidón y los compuestos aromáticos (Madene y col., 2006).

En la industria alimentaria se usan almidones nativos y modificados para la encapsulación de diferentes compuestos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. *Compuestos encapsulados usando diferentes almidones.*

Almidón	Otros encapsulantes	Compuesto encapsulado	Técnica	Referencias
Almidón de maíz	No	Antocianinas	Secado por aspersion	García-Tejada, Salinas-Moreno y Martínez-Bustos, 2014
Hi-Cap (HC)	Lecitina, quitosano, almíbar maíz	Aceite de café	Secado por aspersion	Carvalho, Silva y Hubinger, 2014
Hi-Cap (HC)	GA, MDs DE 16.5-19.5	Hierro	Método de evaporación de solvente	Gupta y col., 2015
Almidón resistente comercial	Concentrado de proteína de suero	Ácido fólico	Nanospray y electrospray	Pérez-Masiá y col., 2015
Almidón modificado de maíz	Trehalosa	Aceite de semilla de colza	Secado por aspersion	Domian y col., 2015

Debido a la naturaleza hidrofílica del almidón, se han desarrollado derivados más hidrofóbicos para intentar solucionar esta desventaja. Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado, diferentes almidones modificados (Capsul, N-lok, HC o Encapsul). Todos ellos son usados en la industria alimentaria para la encapsulación de aromas y aceites. Varios autores han demostrado que los materiales encapsulantes basados en almidones modificados tienen elevada capacidad de retención de volátiles y bajas cantidades de aceite no encapsulado en la superficie de las partículas de polvo obtenidas (Jafari y col., 2008).

Es importante remarcar que tanto el almidón como sus derivados tienen bajo coste y son relativamente puros. Sin embargo, la principal desventaja de estos compuestos radica en su sensibilidad al ataque con compuestos ácidos y la hidrólisis por parte de la amilasa, la cual comienza en la boca (Fathi y col., 2014).

4.3.1.3. Ciclodextrinas.

Las CDs son un grupo de oligosacáridos cíclicos derivados del almidón, formadas por 6, 7 u 8 unidades de glucosa unidas por enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$ dando lugar a una estructura tronco-cónica que recibe el nombre de α -CDs, β -CDs y γ -CDs, respectivamente. La cavidad central de estas moléculas es hidrofóbica, mientras que el exterior es hidrofílico. Esta cavidad hidrofóbica forma complejos de inclusión con una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos (Lucas-Abellán y col., 2008). Fuerzas débiles como enlaces de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno ayudan en la formación de los complejos de inclusión, atrapando las moléculas en su interior (Hundre, Karthik y Anandharamakrishnan, 2015). Se obtienen como resultado de una reacción de transglicosilación intramolecular durante la degradación del almidón, que lleva a cabo la enzima CGTasa de *Bacillus macerans* (Szejtli, 1998).

Hay tres tipos de CDs denominadas de primera generación, parentales o naturales: α -, β - y γ -CDs. β -CDs es el tipo más utilizado debido a su bajo coste.

A temperatura ambiente, β -CDs presenta baja solubilidad en agua (1.8%). Esta desventaja ha llevado a la síntesis de CDs derivadas con el objetivo de aumentar dicha solubilidad. Además de ser segura biológicamente, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CDs) es un derivado de β -CDs con mayor solubilidad acuosa (>70%), a pesar de ser estructuralmente menos hidrofílica. Este aumento de solubilidad debido a la sustitución hidrofóbica puede parecer extraño a primera vista, sin embargo, este efecto procede de la voluminosa sustitución del grupo hidroxipropilo, la cual desestabiliza el estado cristalino (Costa y col., 2015).

β -CDs es un ingrediente no tóxico, que se encuentra en la lista GRAS desde 1998 (Szente y Szejtli, 2004) y son usadas para la microencapsulación de una gran variedad de compuestos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. *Compuestos encapsulados usando CDs.*

CDs	Compuesto Encapsulado	Referencias
HP- γ -CDs	Curcumina	Popat y col., 2014
β -, HP- β -CDs	Cefixima	Jadhav y col., 2013
β -, HP- β -CDs	Isoflavonas de soja	Yatsu y col., 2013
β -CDs	Extracto de salvia	Sahin-Nadeem y col., 2013
β -CDs	Timol	Tao y col., 2014
β -CDs	Carvacrol	Santos y col., 2015
β -CDs	Aroma de naranja	Zhu y col., 2014
HP- β -CDs	Benzoato de etilo	Yuan, Lu y Jin, 2014
β -, G ₂ - β -CDs	Resveratrol	Lucas-Abellán y col., 2007a
β -, HP- β -, maltosil- β -CDs	Quercetina /Miricetina	Lucas-Abellán y col., 2007b
HP- β -CDs	Kaempferol	Mercader-Ros y col., 2010
β -CDs	Sulfatiazol	Lucas-Abellán y col., 2014
β -, HP- β -CDs	Eugenol	Hernández-Sánchez y col., 2012
β -, HP- β -CDs	Catequina/Epicatequina	López-Miranda y col., 2016

4.3.2. Gomas.

Las gomas son utilizadas en microencapsulación por su capacidad para formar films y por las propiedades de estabilización de la emulsión que poseen. Entre todas las gomas existentes, goma arábiga (GA) es la más utilizada debido a su excelente capacidad emulsionante (Dickinson, 2003).

4.3.2.1. Goma arábiga.

La GA, también conocida como goma acacia, es un exudado de las plantas pertenecientes a la familia de las Acacias, en particular, *Acacia senegal* y *Acacia seyal*. La producción de esta goma es un proceso natural como respuesta al daño tisular o estrés medioambiental. Aunque tradicionalmente se considera a *Acacia senegal* como la principal productora de esta goma, son comunes las mezclas de las dos especies debido a que se abarata el coste y la mezcla de ambas da lugar a una suma de propiedades interesantes (Williams y Phillips, 2009).

La estructura básica de la GA consta de azúcares (galactosa, arabinosa y ramnosa), junto con ácido glucurónico y aminoácidos. Está formada por tres mezclas diferentes de fracciones poliméricas: arabinogalactano en un 88%, complejo arabinogalactano-proteína (10%) y glicoproteína (1%) (Nussinovitch, 2003).

Las moléculas de arabinogalactano son las responsables de la capacidad para formar films de esta goma, mientras que la fracción proteica, en particular las moléculas de glicoproteína, le proporcionan su capacidad emulsionante. La estabilización de las emulsiones se debe a los aminoácidos, los cuales son muy hidrofóbicos, y dan lugar a una ligera carga negativa que contribuye a que las gotas que se producen sufran coalescencia. Además de estas interesantes propiedades, GA posee alta solubilidad acuosa y viscosidad, que aumenta relativamente hasta el 25% o más de sólidos totales (Sobel, 2012).

GA es capaz de formar una matriz seca alrededor de los compuestos en los procesos de deshidratación, lo que atrapa los compuestos en el interior de la matriz y previene la pérdida de volátiles, así como el contacto con el aire. Estas propiedades que presenta GA hacen que sea usada como agente encapsulante de manera habitual en la industria para la protección y retención de compuestos volátiles. Sin embargo, GA es un ingrediente caro y su disponibilidad y coste fluctúan, por ello es interesante la búsqueda de nuevos ingredientes para la encapsulación aromática (McNamee y col., 2001).

El uso de GA en la microencapsulación de componentes alimentarios está extendida en la industria. Por ejemplo, compuestos de interés del azafrán se han microencapsulado con este agente encapsulante (Rajabi y col., 2015) o el caso de la microencapsulación de hierro para fortificar leche (Gupta et al., 2015).

4.3.2.2. Goma xantana.

La goma xantana (GX) es un polisacárido extracelular secretado por *Xanthomonas campestris*. Es soluble en agua fría y su comportamiento es el de un fluido pseudoplástico. Su viscosidad presenta una excelente estabilidad frente a un amplio rango de pHs y temperaturas y muestra una interacción sinérgica con goma guar y konjac manano (Bhatia, Ahuja y Mehta, 2015).

La estructura primaria de GX es un esqueleto lineal de unidades de β -D-glucosa unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ que se enlazan a una cadena lateral de

trisacárido en cada glucosa en posición C-3, que contiene un residuo de ácido glucurónico y 2 manosas, una de las cuales se enlaza al esqueleto de unidades de glucosa (Sworn, 2009).

GX se usa como espesante (Sopade y col., 2008) o estabilizante (García-Ochoa y col., 2000) y también se ha usado para la encapsulación de compuestos aromáticos (Secouard, Grisel y Malhiac, 2007), fármacos y microorganismos.

4.4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.1. Reactivos.

El aroma de fresa fue proporcionado por Creaciones Aromáticas Industriales (Carinsa, Barcelona, España). MDs con DE 19 fueron suministradas por Tereos Syral (Francia), almidón modificado Hi-Cap 100 por National Starch (USA), β - y γ -CDs por Wacker (Alemania), GA, GX y hexano (>97.0%) por Sigma-Aldrich (Alemania). El resto de reactivos químicos usados fueron de grado analítico.

4.4.2. Formación de emulsiones.

MDs, CDs, HC, GA y GX fueron completamente disueltos en agua destilada usando un homogeneizador (Ultra-Turrax, IKA, Alemania) durante 5 minutos a una velocidad de 500 rpm. Tras 24 horas de hidratación de gomas y almidones a 25 °C, se añadió a la emulsión el aroma de fresa y todo ello se mezcló usando el mismo homogeneizador. Las emulsiones se prepararon usando diferentes combinaciones y proporciones de agentes encapsulantes (MDs/HC, MDs/GA y MDs/GX) a una concentración fija de CDs (1.7%) y fueron caracterizadas en términos de estabilidad, viscosidad, y densidad (Tabla 4.4).

4.4.2.1. Estabilidad.

Inmediatamente después de preparar la emulsión, se transfirieron alícuotas de 25 mL de cada muestra a probetas graduadas de 25 mL, se sellaron y se almacenaron a 25 °C. Tras 24 horas, se midió el volumen de la fase superior. A partir de este valor, la estabilidad se determinó como el % de separación expresado como (4.1):

$$\text{Separación (\%)} = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (4.1)$$

donde H_0 representa el tamaño inicial de la emulsión y H_1 representa el volumen de la fase superior.

4.4.2.2. Viscosidad.

La viscosidad aparente se determinó con la ayuda de un viscosímetro rotacional (FungiLab, España). La velocidad del husillo se estableció a 60 rpm y los valores de viscosidad aparente se determinaron a 25 °C ± 2 °C.

4.4.2.3. Densidad.

La densidad inicial de la emulsión se calculó a 25 °C por triplicado mediante el uso de un picnómetro.

4.4.3. Secado por aspersión.

El secado por aspersión se llevó a cabo en un secador por aspersión de laboratorio (Mini Spray Dryer B-290, Buchi, Alemania). Las emulsiones preparadas fueron introducidas en la cámara principal del secador mediante una bomba peristáltica y el flujo de entrada de muestra se controló con el panel de velocidad de la bomba. El aire del compresor se estableció a 5 bares de presión y la tasa de entrada de muestra a 2.5 mL/min. Las temperaturas de entrada y salida se establecieron en 180 y 90 °C ± 2 °C, respectivamente.

4.4.4. Liofilización.

El proceso de liofilización se llevó a cabo en un liofilizador de laboratorio (Christ Alfa, Alemania). Las emulsiones, previamente se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas y posteriormente se sometieron a liofilización para obtener consistencia de polvo.

4.4.5. Lecho fluido.

El proceso de lecho fluido se llevó a cabo en un fluidizador Wurster (VCF-LAB Micro Flo-Coater, Freund Vector, USA). El flujo de aire en la cámara del equipo se mantuvo a $15\text{ m}^3/\text{h}$ para permitir la dispersión homogénea de las partículas. La temperatura de entrada fue de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. La presión de la boquilla fue 10 psi. La velocidad de la bomba peristáltica se fijó en 10 rpm y los pulsos del filtro cada 15 segundos.

4.4.6. Eficacia de secado.

La eficacia de secado (ES) se determinó usando la siguiente ecuación (4.2):

$$\text{Eficacia de Secado(\%)} = \frac{P}{T} \times 100 \quad (4.2)$$

donde P es la cantidad de muestra obtenida en forma de polvo tras el secado por aspersión y T es la cantidad de sólidos totales que se usaron inicialmente para preparar la emulsión.

4.4.7. Cuantificación de compuestos volátiles.

Para la cuantificación de los compuestos volátiles, se disolvieron completamente muestras homogéneas del polvo obtenido (1g) en 2 mL de agua destilada. Tras este paso, se añadieron 2 mL de hexano y todo ello se agitó durante 5 minutos. La fase de hexano contenía los compuestos volátiles y las cantidades de dichos volátiles se expresaron como μg de compuestos volátiles por gramo de polvo obtenido. La fase acuosa se descartó debido a la ausencia de compuestos volátiles. Para la preparación de la recta patrón, el aroma de fresa se

diluyó de manera seriada, de tal manera que se obtuvieron las rectas de calibrado representando el área de cada compuesto frente a su concentración. Todas las muestras se midieron por triplicado.

4.4.8. Eficacia de encapsulación.

La eficacia de encapsulación (EE) indica la eficacia del proceso de microencapsulación de los diferentes compuestos volátiles presentes en el aroma de fresa con los diferentes agentes encapsulantes empleados. La EE se calculó como la relación entre la cantidad de volátiles presentes en la muestra final de polvo respecto a la cantidad de volátiles presentes en la emulsión. La EE se calculó usando la siguiente ecuación (4.3):

$$EE (\%) = \frac{\text{Compuestos volátiles en el polvo } (\mu\text{g/g})}{\text{Compuestos volátiles en la emulsión } (\mu\text{g/g})} \times 100 \quad (4.3)$$

4.4.9. Humedad.

El contenido de humedad se determinó mediante el secado de 30 g de cada una de las muestras de polvo obtenidas, en estufa a 103 °C (Mettler, Alemania) durante 72 horas. Las medidas de humedad fueron llevadas a cabo por triplicado.

4.4.10. Tamaño de partícula.

La distribución del tamaño de partícula se midió mediante un equipo de difracción de luz láser denominado Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). El tamaño de partícula se expresó como el tamaño volumétrico medio $D_{[4.3]}$ (parámetro de De Brouckere), el cual mide el diámetro medio de una esfera con el mismo volumen y es generalmente usado en la caracterización de partículas. Además, se calcularon también los parámetros D_{10} , D_{50} y D_{90} (percentiles) así como la dispersión de las partículas mediante la ecuación (4.4) (Tonon, Grosso y Hubinger, 2011):

$$\text{Dispersión} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (4.4)$$

4.4.11. Estabilidad en función del tiempo y de la temperatura de almacenamiento.

El polvo obtenido mediante secado por aspersión, liofilización y lecho fluido se almacenó a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C) y en oscuridad, durante 5 meses. La cantidad de compuestos volátiles presentes en el polvo se determinaron mediante GC/MS. Se tomaron medidas a diferentes intervalos de tiempo hasta un total de 5 meses.

4.4.12. Método cromatográfico (GC/MS).

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo Shimadzu GC/MS-QP2010 (Japón). La columna usada fue una Supelco SLB TM-5MS de sílice con dimensiones de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espesor suministrada por Sigma-Aldrich (Alemania). El helio se usó como gas portador a un flujo de 48 mL/min. El tipo de inyección fue 50:1 y la temperatura del inyector 250 °C. La rampa de temperatura que se introdujo en el software del equipo fue la siguiente: temperatura inicial de 60 °C, se subió hasta 160 °C a 4°C/min, posteriormente subió hasta 232 °C a 6 °C/min y finalmente hasta 248 °C a 8 °C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 5 minutos. El tiempo total de cada cromatograma fue de 45 min. El detector de masa trabajó en modo de ionización de electrón de 70 eV, en un rango de análisis de 40 a 350 masa/carga. La temperatura de la interfase fue de 260 °C. Los tres compuestos elegidos para su análisis fueron acetoacetato de etilo, alcohol bencílico y fraistone. Los resultados de estos compuestos se expresaron a partir de las áreas obtenidas en los cromatogramas. Como estándar interno se usó lactato de etilo, para lo cual se añadió al hexano antes de la extracción para comprobar que el proceso de extracción era correcto. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.4.13. Análisis morfológico y estructural.

Para estudiar la morfología se realizaron microfotografías de las muestras obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (Merlin VP Compact, Zeiss, Alemania). Las muestras de polvo se fijaron en los botones de montaje y se observaron al microscopio sin necesidad de recubrimiento con una capa de oro.

4.4.14. Análisis estadísticos.

Cada muestra se analizó por triplicado y se calculó la media \pm desviación estándar de los datos obtenidos para caracterizar las emulsiones así como en la eficacia de secado y contenido de humedad.

Los mismos análisis estadísticos para el estudio de la influencia de los diferentes agentes encapsulantes en la EE se llevaron a cabo con los tres compuestos volátiles analizados. Para cada agente encapsulante utilizado, se representó un modelo lineal de la eficiencia que se estimó dependiendo de la concentración y con la siguiente fórmula:

$$Y_{ij} = A_i + B_{ij} * X_j \quad (4.5)$$

donde el subíndice "i" se refiere al compuesto volátil (i = e para acetoacetato de etilo, i = b para alcohol bencílico, i = f para fraistone) y "j" se refiere al agente encapsulante (j = h para HC, j = a para GA, j = x para GX). La variable "Xi" es la concentración del agente encapsulante "j" y "Yij" es la concentración observada de compuestos volátiles "i" cuando son encapsulados con "Xj". "Ai" se refiere a la concentración estimada $\mu\text{g/g}$ de compuestos volátiles "i" en una muestra de polvo. "Bij" es la pendiente del modelo, es decir, la reducción de compuesto volátil "i" al aumentar 0.1 g/mL la concentración de agente encapsulante "j". Comparando Bij para los diferentes agentes encapsulantes "j" para un valor fijo de "i", se puede observar el efecto de los tres agentes encapsulantes sobre el mismo compuesto volátil.

Para estimar las ecuaciones lineales, se usó el modelo Bayesiano en el software libre JAGS y R. Las estimaciones de los parámetros Ai y Bij se resumieron como la media de las distribuciones y los intervalos de confianza al 95% (percentiles 2.5 y 97.5). El efecto de los diferentes agentes encapsulantes se comparó teniendo en cuenta la probabilidad posterior.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Formación de la emulsión y propiedades físico-químicas.

Una de las etapas clave en el proceso de encapsulación de compuestos alimentarios mediante secado por aspersión es la preparación de la emulsión que será bombeada al interior de la cámara de secado. Esta emulsión tiene un papel muy importante a la hora de la retención de compuestos volátiles en el polvo obtenido al final del proceso. Los parámetros a tener en cuenta son: concentración de sólidos totales, viscosidad, estabilidad y método de emulsificación. Las emulsiones se prepararon y se observaron y caracterizaron a las 24 horas. Los resultados obtenidos para cada mezcla de material encapsulante se muestran en la Tabla 4.4.

Como se observa en la Tabla 4.4, la densidad permaneció constante en cada todas las mezclas analizadas, mientras que la viscosidad y la estabilidad aumentaron cuando las MDs disminuyeron en la emulsión. Esto se debe a que la presencia de HC, GA o GX en altas cantidades, aporta una buena capacidad de emulsificación.

En el caso de HC, la viscosidad aumentó 6.5 veces cuando la proporción de MDs/HC pasó de 10/0 a 0/10. La estabilidad aumentó hasta un 20% cuando la emulsión se preparó sólo con HC. En el caso de MDs y GA, la viscosidad que se obtuvo en presencia de GA fue superior a la observada en el caso de HC. En ausencia de MDs, la viscosidad obtenida fue 0.923 Pa·s con GA y 0.289 Pa·s para HC. Esto indica que GA produce emulsiones 3.2 veces más viscosas que HC. GA y MDs dieron lugar a emulsiones con una viscosidad superior a las preparadas con otros agentes encapsulantes, algo que ya ha sido descrito previamente en la literatura (Bule, Singhal y Kennedy, 2010). Por lo que respecta a la estabilidad, se observaron resultados similares a las emulsiones con MDs y HC.

El aumento de la viscosidad de la emulsión hasta un punto óptimo suprime las circulaciones y oscilaciones internas de las gotas y acelera la difusión selectiva, mejorando así la retención. Sin embargo, el aumento de la viscosidad más allá de un punto límite, disminuye la retención de aroma debido al mayor tiempo de exposición durante la atomización, esto da lugar a una lenta formación de gotas en la atomización y dificulta su formación. Está descrito en la literatura que una emulsión con mayor viscosidad produce gotas más grandes y debido a su dificultad para formarse por la alta viscosidad, se forman partículas irregulares (ovaladas, cilíndricas y fibrosas) (Jafari y col., 2008).

En la Tabla 4.4 también se observan los resultados para la mezcla con MDs, GX y β -CDs. En el caso de la densidad, ésta disminuyó levemente con altas concentraciones de GX mientras que la viscosidad aumentó enormemente. Es importante resaltar que a bajas concentraciones de GX se obtuvieron elevados valores de viscosidad (1138 Pa·s con una proporción 9.75/0.25 MDs/GX). GX en disolución se comporta como un fluido no-newtoniano y altamente pseudoplástico. Por lo que respecta a la estabilidad, no se observó fase con espuma en ninguna de las emulsiones preparadas con GX.

Los resultados físico-químicos obtenidos para cada emulsión proporcionaron la información necesaria para decidir qué mezclas serían las más adecuadas para el secado por aspersión. Emulsiones con alta viscosidad tienen tendencia a pegarse en las paredes del ciclón de la cámara de secado, afectando negativamente a la ES y a la EE. Por estas razones, las emulsiones que se seleccionaron para el secado por aspersión fueron aquellas que presentaron las características más apropiadas para la microencapsulación de aroma de fresa. Todas las emulsiones seleccionadas tuvieron una viscosidad inferior a 0.3 Pa·s para prevenir la excesiva adherencia de las muestras en el equipo.

4.5.2. Eficacia de secado.

El rendimiento de secado se ve afectado por la temperatura de entrada en el equipo y el tipo y concentración de encapsulantes. En el caso del secado de zumo de naranja se describió una disminución de la ES como consecuencia del aumento de la temperatura de entrada (Chegini y Ghobadian, 2007). Sin embargo, Tonon y col. observaron que se conseguían altas ES con un aumento de la temperatura en

el caso del secado por aspersión de asaí (*Euterpe oleracea*) (Tonon, Brabet y Hubinger, 2008). Estas variaciones pueden deberse a las diferentes composiciones de la emulsión y a las condiciones del proceso de secado por aspersión. Durante el secado, el flujo de gas tiene poco efecto en las propiedades del producto, mientras que la velocidad de la bomba determina la tasa a la que la emulsión pasa a la cámara de secado. Si la velocidad de la bomba es alta, el agua no se evaporará por completo en este corto periodo de tiempo por lo que el polvo obtenido no estará lo suficientemente seco. Por el contrario, si la temperatura fuera baja no habría suficiente temperatura para secar el producto y los polvos con mayor humedad se pegarían con facilidad al ciclón, ya que sólo el polvo que se recolecta en el contenedor que hay al final del equipo es el que se considera que tiene una humedad baja, como se demuestra en los estudios de humedad (Su y col., 2008). Para evitar grandes pérdidas de material durante el secado, todos los experimentos descritos se llevaron a cabo con una alta temperatura de entrada y una baja velocidad de la bomba.

Los valores de ES oscilaron entre 44.4% y 57.3% en el caso de MDs, HC y β -CDs, entre 46.7 y 56.8% para la mezcla MDs, GA, β -CDs (Tabla 4.5). Estos resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos para el fruto asaí (48.5%; Tonon y col., 2008), *Morinda citrifolia* (48.1%; Krishnaiah y col., 2009) y *Radix salvia* (entre 53 y 63%; Su y col., 2008).

Tabla 4.5. *Eficacia de secado (ES) y contenido de humedad para las diferentes proporciones de agentes encapsulantes estudiadas.*

MDs/HC/ β CDs			MDs/GA/ β CDs			MDs/GX/ β CDs		
Muestra	ES (%)	Humedad (%)	Muestra	ES (%)	Humedad (%)	Muestra	ES (%)	Humedad(%)
10/0	46.1 \pm 5.2	1.3 \pm 0.10	10/0	47.3 \pm 4.8	1.3 \pm 0.10	10/0	45.5 \pm 5.9	1.3 \pm 0.10
9.5/0.5	48.3 \pm 3.9	1.4 \pm 0.15	9.5/0.5	46.7 \pm 4.2	1.4 \pm 0.12	9.99/0.01	40.2 \pm 4.2	1.5 \pm 0.12
9/1	57.3 \pm 3.2	1.9 \pm 0.20	9.25/0.75	49.2 \pm 4.5	1.4 \pm 0.15	9.98/0.02	38.6 \pm 3.4	1.7 \pm 0.11
8/2	44.4 \pm 4.5	2.6 \pm 0.14	9/1	55 \pm 5	1.5 \pm 0.11	9.975/0.025	34.3 \pm 3.9	2.1 \pm 0.17
5/5	52.3 \pm 5.3	2.9 \pm 0.15	8.5/1.5	53 \pm 4	1.7 \pm 0.13	9.95/0.05	9.6 \pm 2.2	2.4 \pm 0.15
2.5/7.5	49.8 \pm 4.7	3.2 \pm 0.25	8/2	56.8 \pm 3.6	1.7 \pm 0.13	9.925/0.07	9.2 \pm 1.9	3 \pm 0.20
1/9	45.7 \pm 3.5	3.0 \pm 0.35	--	--	--	--	--	--
0/10	45 \pm 6	3.3 \pm 0.22	--	--	--	--	--	--

En el caso de MDs, GX y β -CDs se obtuvo una relación inversamente proporcional entre la cantidad de GX añadida a la emulsión y la ES, oscilando entre un 45.5% en ausencia de GX y 9.2% para la mayor concentración de esta goma (Tabla 4.5). La drástica disminución de la ES con GX se debe a la alta viscosidad que generó este compuesto a pesar de la baja concentración que se usó. Además, la capacidad espesante de la GX se relaciona con la viscosidad, y ambos factores contribuyen a este bajo rendimiento del proceso (Cai y Corke, 2000).

4.5.3. Análisis del polvo.

Antes de proceder al secado de las emulsiones, se añadió a la emulsión el aroma de fresa a una concentración del 15% de sólidos totales. Este aroma de fresa contiene más de 20 compuestos volátiles diferentes, (Figura 4.5). Se observa un cromatograma del aroma puro (A) y un cromatograma del polvo obtenido tras el secado (B).

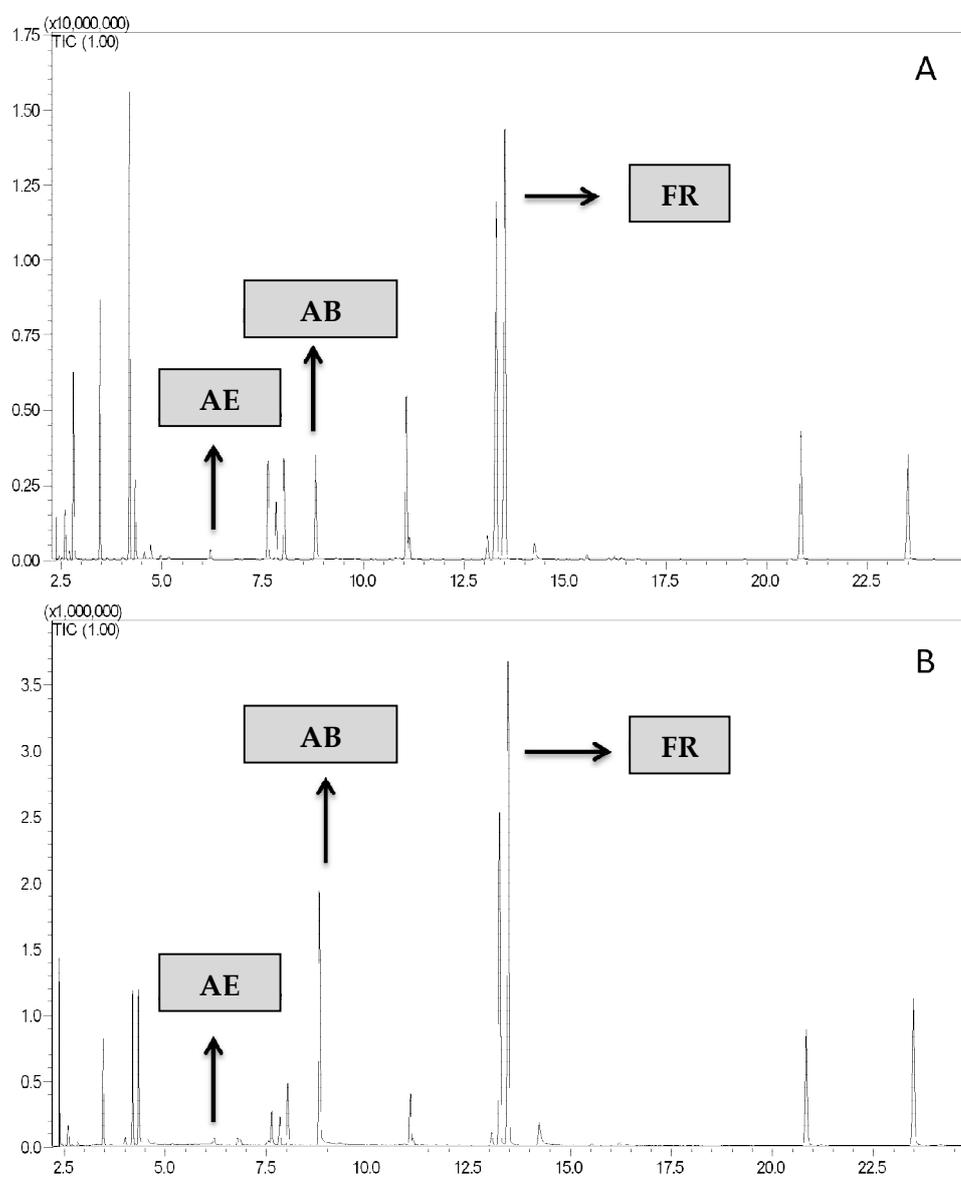


Figura 4.5. (A) Cromatograma del aroma con los tres compuestos objeto de estudio.
(B) Cromatograma de una muestra secada por aspersión.

Los tres compuestos seleccionados para su análisis cromatográfico fueron: acetoacetato de etilo (AE), cuyo tiempo de retención (t_R) fue 6.2 min y que es un compuesto minoritario y dos compuestos mayoritarios como son alcohol bencílico (AB) con t_R de 8.8 min y fraistone (FR) con t_R de 13.2 min. Las rectas patrón de cada uno de los compuestos analizados se observan en la Figura 4.6.

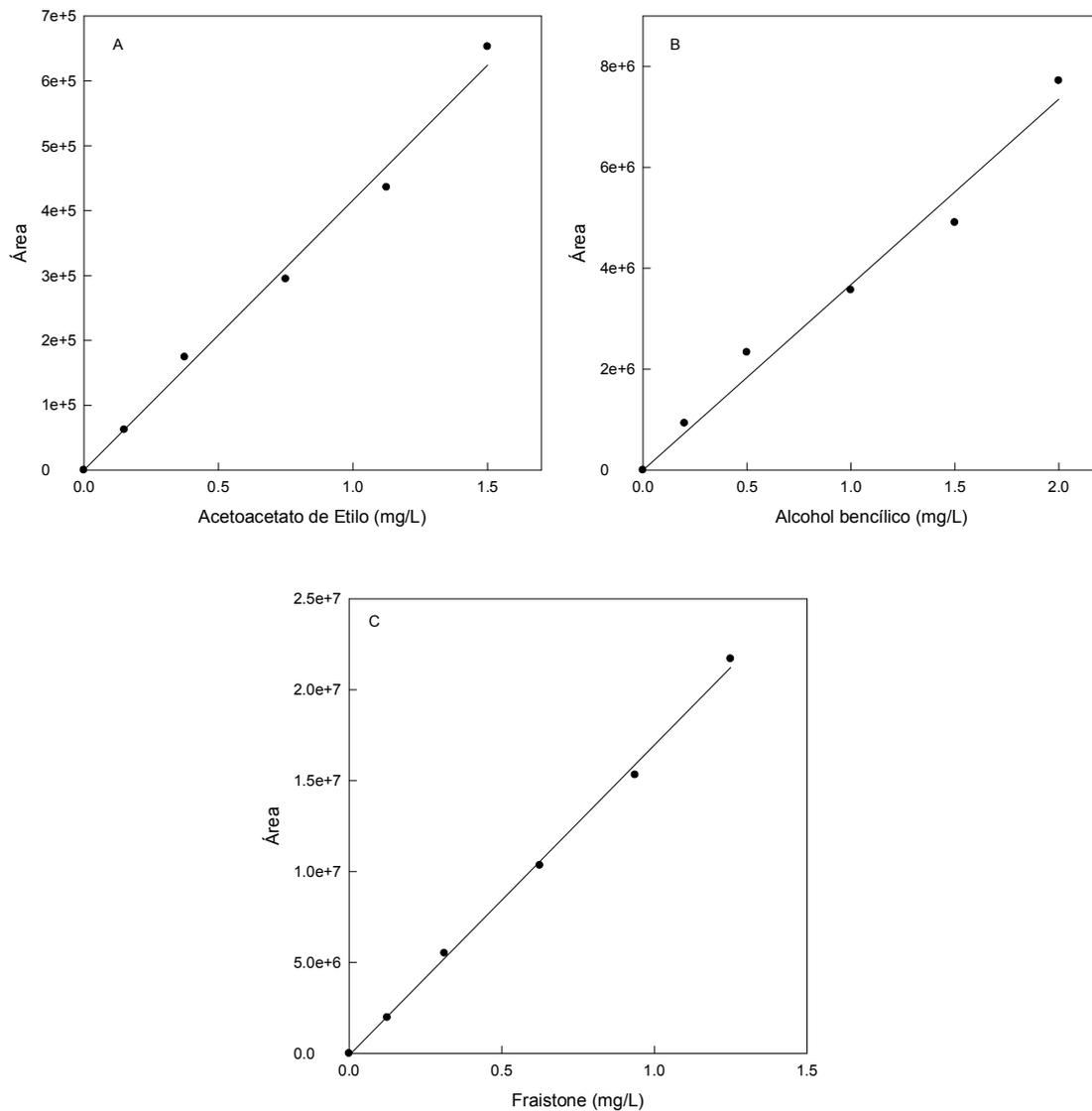


Figura 4.6. (A) Recta patrón de AE. (B) Recta patrón de AB. (C) Recta patrón de FR.

4.5.3.1. Cuantificación de compuestos volátiles.

Tras el secado por aspersión, las diferentes muestras obtenidas fueron cuantificadas en términos de compuestos volátiles (μg de volátiles/ g de polvo) y se analizó el efecto de los diferentes agentes encapsulantes usados para la microencapsulación (MDs, HC, GA, GX y CDs).

En la Figura 4.7 se observan los diferentes modelos lineales para cada agente encapsulante sobre cada uno de los tres compuestos analizados. En cada volátil (AE (Figura 4.7A), AB (Figura 4.7B) y FR (Figura 4.7C)), las tres líneas (HC (\bullet), GA (\circ) y GX (\odot)) convergen en el mismo punto cuando la mezcla de agentes encapsulantes sólo contenía MDs. El punto inicial (\square) corresponde a la cantidad de cada uno de los compuestos volátiles presentes en la emulsión.

Si analizamos en primer lugar la EE en AE, se observa que las pérdidas de este compuesto volátil fueron las mayores de los 3 analizados (Figura 4.7A), ya que se obtuvo una disminución cercana al 80% con el proceso de secado. Analizando los diferentes agentes encapsulantes empleados, se observó que con MDs/HC/ β -CDs (Figura 4.7A, círculos azules), la pérdida gradual produjo una EE entre 24 y 18% (Tabla 4.6). Si analizamos los datos obtenidos con MDs/GA/ β -CDs (Figura 4.7A, círculos rojos) observamos que la pendiente fue más pronunciada que en el caso anterior lo que indica que a medida que aumenta GA se produce una peor protección de AE, oscilando los valores entre 20 y 13% (Tabla 4.6). Finalmente, la mezcla MDs/GX/ β -CDs (Figura 4.7A, círculos verdes) es la que peores resultados ofreció de las 3 analizadas, ya que concentraciones muy pequeñas de GX dieron lugar a grandes pérdidas de AE. Los valores de EE oscilaron con esta mezcla entre 20 y 9% (Tabla 4.6). Las grandes pérdidas de este compuesto volátil se pueden deber a la alta temperatura a la que se produce el secado por aspersión, siendo el compuesto más sensible a la temperatura de los 3 analizados.

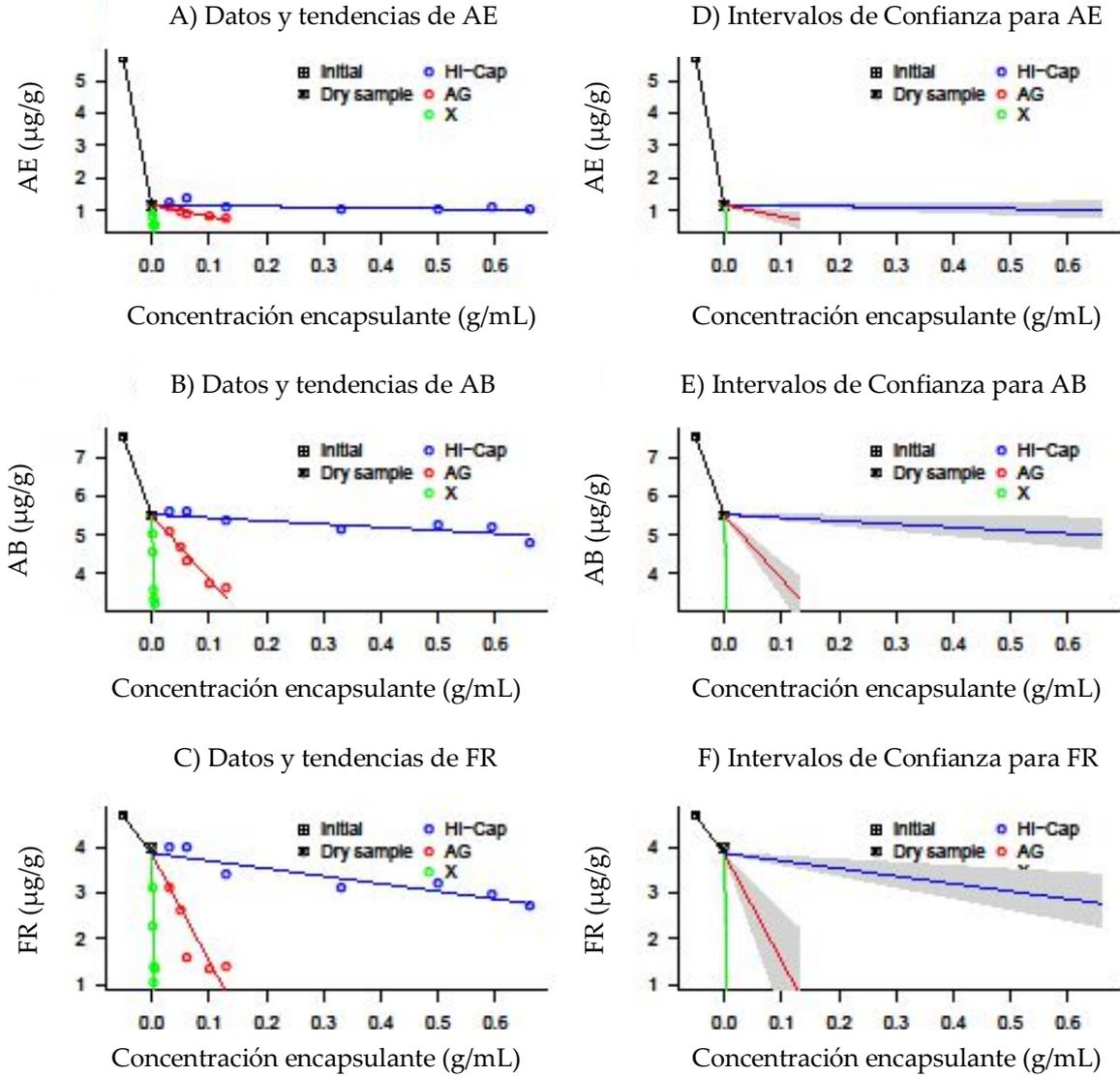


Figura 4.7. Efecto de la concentración de los agentes encapsulantes HC (o), GA (o) y GX (o) en la cuantificación de los compuestos volátiles AE (A), AB (B) y FR (C) tras secado por aspersión. Intervalos de confianza al 95% para AE (D), AB (E) y FR (F).

En lo que se refiere a AB (Figura 4.7 B), la tendencia general observada fue similar a la de AE, pero con la gran diferencia de que se perdió poca cantidad de AB durante el proceso de secado (25% aproximadamente). Analizando los datos para los diferentes agentes encapsulantes utilizados, observamos que MDs/HC/ β -CDs (Figura 4.7 B, círculos azules) volvieron a presentar la mejor EE, cuyos valores oscilaron entre 74 y 63% (Tabla 4.6). En lo que respecta a MDs/GA/ β -CDs (Figura 4.7 B, círculos rojos), la caída fue superior que con HC. A medida que aumentó GA, los valores oscilaron entre 73 y 47% (Tabla 4.6). Finalmente, con GX como agente encapsulante (Figura 4.7 B, círculos verdes), los resultados fueron los más bajos de todos, la EE osciló entre 73 y 43% (Tabla 4.6).

Por último, FR fue el compuesto que mejor EE presentó tras el proceso de secado (Figura 4.7 C). En el caso de MDs/HC/ β -CDs (Figura 4.7 C, círculos azules) la EE osciló entre 85 y 58% (Tabla 4.6), la más alta de los tres compuestos con esta mezcla de agentes encapsulantes, aunque la pendiente descendió a medida que aumentó la concentración de HC, siendo la más acusada de las 3 figuras (círculos azules). Nuevamente, cuando se añadió GA al medio de agentes encapsulantes (Figura 4.7 C, círculos rojos), la EE disminuyó, mostrando valores inferiores a los obtenidos con HC, la EE osciló entre 84 y 29% (Tabla 4.6). Tendencia que se mantuvo como en los casos anteriores cuando se empleó GX como agente encapsulante (Figura 4.7 C, círculos verdes). La EE se mantuvo entre 84 y 29% (Tabla 4.6). Estos valores fueron idénticos a GA, pero hay que destacar que las pérdidas con GX se obtuvieron con concentraciones mucho más bajas que las empleadas con GA.

Tabla 4.6. Eficacia de encapsulación obtenida para AE, AB y FR en los diferentes tipos de mezclas de agentes encapsulantes.

MDs/HC/β-CDs	10/0	9.5/0.5	9/1	8/2	5/5	2.5/7.5	1/9	0/10
AE (%)	20.7	22.1	24.2	19.5	17.9	18.2	19.3	18.2
AB (%)	73.0	74.1	74.1	71.5	68.5	69.5	68.9	63.5
FR (%)	84.5	84.9	85.4	72.8	66.1	67.8	62.5	58
MDs/GA/β-CDs	10/0	9.5/0.5	9.25/0.75	9/1	8.5/1.5	8/2	--	--
AE (%)	20.7	19.8	16.9	15.7	14.6	13.4	--	--
AB (%)	73.0	67.1	61.7	57.5	49.4	47.8	--	--
FR (%)	84.5	66.7	55.1	34.1	28.1	29.8	--	--
MDs/GX/β-CDs	10/0	9.99/0.01	9.98/0.02	9.975/0.025	9.95/0.05	9.925/0.075	--	--
AE (%)	20.7	17.6	14.3	10.0	9.5	10.3	--	--
AB (%)	73.0	66.8	60.5	46.9	44.0	42.5	--	--
FR (%)	84.5	66.1	48.2	21.8	29.9	28.9	--	--

Las tres gráficas de la derecha (Figura 4.7D, E, F) presentan los intervalos de credibilidad al 95% para las pendientes de cada modelo. En los tres compuestos volátiles, HC mostró el menor efecto. Para AE (Figura 4.7D, línea azul), por cada 0.1 g/mL de aumento en la concentración de HC, se observó una reducción en la concentración de este volátil de -0.24 (95% de intervalo de confianza entre -0.57 y 0.15). Para AB, (Figura 4.7E línea azul), la reducción estimada fue -0.82 (intervalo de confianza entre -1.34 y -0.14), finalmente para FR la reducción estimada fue -1.67 con un intervalo de confianza al 95% entre -2.44 y -0.71.

GA mostró un efecto más fuerte que HC (reducción más rápida de la concentración de volátiles). En la Figura 4.7D, E, F todas las líneas de los modelos de GA (rojo) descienden más rápido que las líneas de HC (azul). Para AE la reducción estimada fue -3.55 (intervalo de confianza entre -5.36 y -1.88), -27.4 para AB con un intervalo de confianza entre -36.1 y -18.6 y para FR la reducción que se estimó fue de -23.3 (intervalo de confianza entre -35.6 y -12.4). En la Tabla 4.7, todas las medias e intervalos de confianza para GA fueron más negativos que los de HC y las probabilidades a posteriori de la reducción de compuestos volátiles debido a GA son más fuertes que la reducción debida a HC ($\text{Prob}(B_a < B_h)$), siendo más del 99% en cada compuesto.

GX presentó un efecto más acusado que los otros agentes encapsulantes. La reducción estimada para cada compuesto volátil fue la más alta cuando se usó GX como emulsificador (Tabla 4.7). Las gráficas D, E y F mostraron que el intervalo de confianza al 95% de las pendientes del modelo no se superponen entre sí, dando una fuerte evidencia de que el efecto de los agentes encapsulantes fue diferente en cada caso.

La tabla 4.7 muestra la concentración estimada de compuestos volátiles en la muestra seca en $\mu\text{g/g}$ (parámetro A) y las estimaciones del efecto de cada uno de los agentes encapsulantes sobre estos compuestos volátiles.

Tabla 4.7. Estimaciones del efecto de los agentes encapsulantes en cada compuesto volátil.

Volátiles	AE			AB			FR		
	Inf.	Media	Sup.	Inf.	Media	Sup.	Inf.	Media	Sup.
A	1.1	1.2	1.3	5.3	5.5	5.7	3.5	3.9	4.2
HC: B _h	-0.57	-0.24	0.15	-1.34	-0.82	-0.14	-2.44	-1.67	-0.71
GA: B _a	-5.36	-3.55	-1.88	-36.1	-27.4	-18.6	-35.6	-23.3	-12.4
GX: B _x	-315	-167	-29	-976	-592	-210	-1333	-696	-68
Prob(B _a < B _h)	99.81%			99.95%			99.64%		
Prob(B _x < B _a)	98.42%			99.20%			97.87%		
Prob(B _x < B _h)	98.51%			99.27%			98.04%		

Inf. = percentil 2.5, media y Sup. = percentil 97.5. A: concentración de volátiles ($\mu\text{g/g}$). B_h = reducción de la concentración de compuestos volátiles al aumentar la concentración de HC, B_a = idem para GA, B_x = idem para GX. Prob(B_a < B_h) = probabilidad posterior de que la reducción de cada compuesto volátil debido a GA es mayor que la reducción debida a HC (idem para las dos últimas filas).

4.5.3.2. Contenido de humedad.

El contenido de humedad de las micropartículas obtenidas es un indicador muy importante de la eficacia del proceso de secado y de la calidad del producto obtenido (Peng y col., 2013). El contenido de humedad de las diferentes muestras se muestra en la Tabla 4.5. La mezcla que contenía únicamente MDs y CDs (10/0) presentó el menor contenido en humedad. Sin embargo, cuando los agentes emulsionantes aumentaron (HC, GA y GX), también lo hizo la humedad. La humedad en el polvo osciló entre 1.3 y 3.3% en el caso de MDs y HC, entre 1.3 y 1.7% para MDs y GA y entre 1.3 y 3% en el caso de MDs y GX. En el caso de

aroma de melón la humedad osciló entre 1.5 y 2.8% cuando los polvos se secaron a cuatro temperaturas diferentes (145, 155, 165 y 175 °C) y dos concentraciones diferentes de MDs (3 y 5%) (Quek, Chok y Swedlund, 2007). Otros resultados comparables a los obtenidos para el aroma de fresa son los presentados en el estudio de Papadakis, Gardeli y Tzia en 2006, donde el contenido de humedad de las muestras osciló entre 0.6 y 4.5% para una gran variedad de condiciones experimentales con tres concentraciones diferentes de MDs y cuatro temperaturas de entrada.

4.5.3.3. *Análisis morfológico de las muestras.*

El análisis morfológico y estructural de las partículas de polvo obtenidas con los diferentes agentes encapsulantes se llevó a cabo mediante análisis SEM, que permite una visualización tridimensional de las muestras (Sahin-Nadeem, Torun y Ozdemir, 2011).

Las muestras obtenidas a una temperatura de entrada baja presentan ondulaciones en superficie que contrastan con las partículas más redondeadas y con formas lisas y suaves para muestras obtenidas con temperaturas de entrada más altas. Las altas temperaturas favorecen una menor superficie de partícula evitando, de esta manera, las constricciones de las partículas (Finney, Buffo y Reineccius, 2002). Por esta razón, los experimentos se llevaron a cabo usando una temperatura de entrada relativamente alta (180 °C) con el objetivo de obtener partículas con formas suaves y redondeadas.

La Figura 4.8A Y 4.8B muestra los resultados observados en el caso de MDs/HC/ β -CDs. En la Figura 4.8A se observan las típicas partículas esféricas con alguna constricción. Sin embargo, cuando la concentración de HC aumentó (Figura 4.8B), las partículas perdieron su forma esférica y redondeada, convirtiéndose en amorfas e irregulares. Las partículas se hicieron más pegajosas en presencia de altas concentraciones de HC. Una explicación para estos resultados es que a medida que aumenta la concentración de HC, también aumenta la viscosidad de la emulsión y esta viscosidad puede afectar a la forma de las partículas en su secado, adquiriendo formas más irregulares. Las mezclas MDs/HC/ β -CDs (5/5, 2.5/7.5 y 0/10) también produjeron partículas amorfas e irregulares.

Las Figuras 4.8C y 4.8D muestran los resultados observados en el caso de MDs/GA/ β -CDs. Se observaron partículas esféricas para la combinación 9.5/0.5 (C). Sin embargo, cuando la concentración de GA aumentó, se observaron las mismas formas irregulares que en la mezcla de MDs/HC/ β -CDs. En las Figuras 4.8E y 4.8F se observan los resultados de MDs/GX/ β -CDs. La presencia de GX produjo partículas irregulares en todos los casos.

Según Barros y Stringheta 2006, las partículas más regulares y con morfología más intacta se producen por un mejor proceso de microencapsulación. Según Tonon 2009, las partículas que presentan irregularidades en su superficie pueden tener dificultades en sus propiedades de flujo. Además, las partículas que presentan superficies rugosas tienen más superficie de contacto, lo que hace que sean más susceptibles a las reacciones de degradación como es el caso de la oxidación. Por estas razones, los resultados observados con bajas concentraciones de HC y GA sugieren la idoneidad del sistema para la microencapsulación de aroma de fresa y su protección frente a la degradación.

Como conclusión de esta parte del estudio, se puede afirmar que la mezcla de MDs/HC/ β -CDs mostró el mejor balance entre las propiedades físico-químicas de la emulsión, la EE, ES, contenido de humedad y análisis morfológico. Es por ello que esta mezcla se seleccionó como la más adecuada para llevar a cabo estudios de estabilidad a diferentes temperaturas para las muestras obtenidas con diferentes técnicas de secado (secado por aspersión, liofilización y lecho fluido).

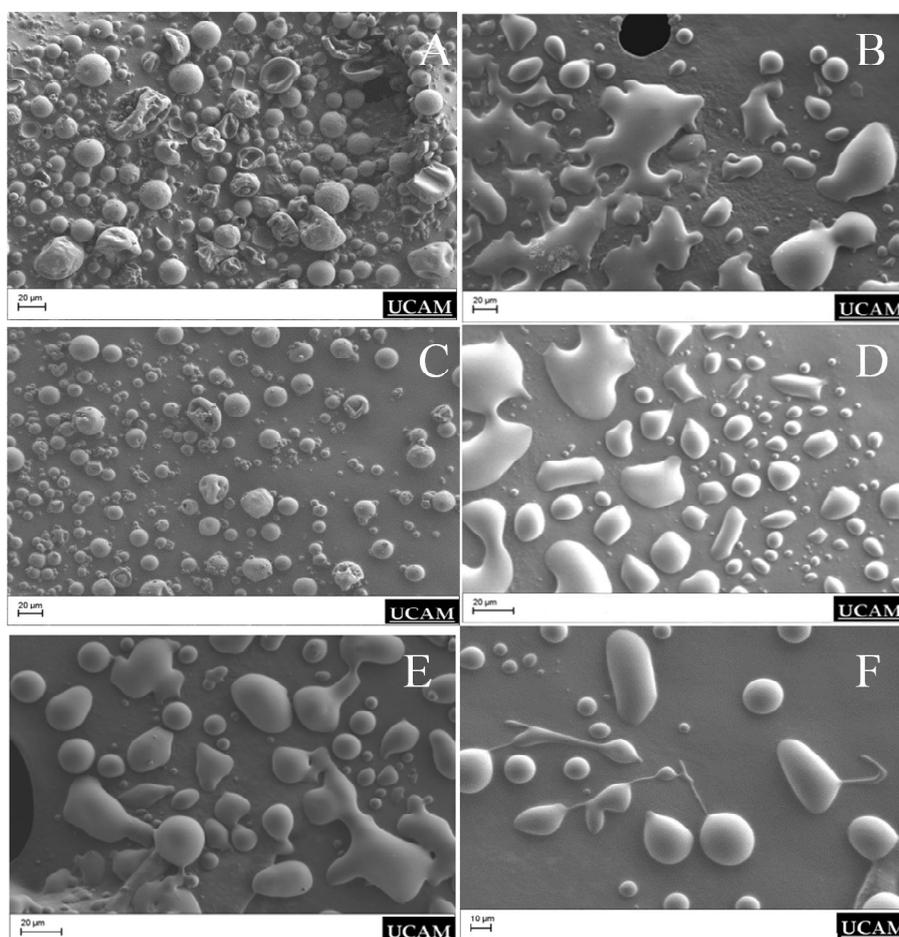


Figura 4.8. Microfotografías de microscopio electrónico para las diferentes muestras obtenidas. (A) MDs/HC/ β -CDs (9/1). (B) MDs/HC/ β -CDs (2.5/7.5). (C) MDs/GA/ β -CDs (9.5/0.5). (D) MDs/GA/ β -CDs (8/2). (E) MDs/GX/ β -CDs (9.95/0.05). (F) MDs/GX/ β -CDs (9.925/0.075).

4.5.4. Estudios realizados con diferentes técnicas de secado.

Teniendo en cuenta los resultados previos, la combinación MDs/HC/CDs fue la más apropiada para la microencapsulación de aroma de fresa. Entre todas las combinaciones analizadas se seleccionó la proporción 9/1 de MDs/HC a una concentración fija de CDs, de tal manera que esta fue la emulsión que se preparó

para llevar a cabo los estudios de estabilidad a diferentes temperaturas y diferentes técnicas de secado.

4.5.4.1. Eficacia de secado (ES).

La mayor ES se obtuvo con la técnica de liofilización, oscilando entre 87 y 88% (Tabla 4.8). En este proceso, las pérdidas fueron muy pequeñas comparadas con las de secado por aspersión o lecho fluido. Los resultados obtenidos para las muestras liofilizadas fueron ligeramente superiores a los descritos en otros artículos científicos para esta misma técnica: en la microencapsulación de lipasa de *Yarrowia lipolytica* el rendimiento obtenido fue de un 77% (Darvishi y col., 2012) o 70% en el caso de aceite de lino microencapsulado con zeina (Quispe-Condori y col., 2011).

En el caso de secado por aspersión, para evitar grandes pérdidas de muestra, los experimentos se llevaron a cabo con alta temperatura de entrada y baja velocidad de la bomba. La ES obtenida fue muy similar para la mezcla MDs/HC (56%), MDs/HC/ β -CDs (52%) y MDs/HC/ γ -CDs (50%) (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Eficacia de secado (ES) obtenida para las diferentes técnicas de secado analizadas.

Técnica	Mezcla	Sólidos totales (g)	Producto (g)	ES (%)
Secado por aspersión	MDs/HC	169.4	112.1	56 \pm 2.3
	MDs/HC/ β -CDs	169.4	104.6	52 \pm 3.5
	MDs/HC/ γ -CDs	169.4	102	50 \pm 3.1
Liofilización	MDs/HC	84.7	73.6	87 \pm 2.5
	MDs/HC/ β -CDs	84.7	74.7	88 \pm 3.0
Lecho fluido	MDs/HC	250	77.6	31 \pm 5.3
	MDs/HC/ β -CDs	250	82.5	33 \pm 4.8

Durante el secado por aspersión, es muy importante el control de los factores inherentes al propio sistema, ya que cuanto mayor sea la velocidad de la bomba peor secado obtendremos en las partículas que se obtengan. Algo similar ocurre si la temperatura de entrada es baja, las partículas no se secarán lo

suficiente por lo que no se obtendrá un buen producto final. Además, la temperatura baja favorece que las partículas se queden pegadas en la cámara de secado con la consecuente merma en la ES obtenida (Su y col., 2008). Lo importante es fijar las condiciones que mejor balance presenten para los compuestos microencapsulados.

Finalmente, por lo que respecta a la técnica de lecho fluido, los resultados de ES fueron los más bajos de las tres técnicas. El rendimiento fue similar en las dos muestras preparadas y se encontró alrededor del 30% (Tabla 4.8). Estos resultados indicaron que lecho fluido es la peor técnica de secado en términos de ES comparado con secado por aspersion y liofilización, para la encapsulación de aroma de fresa.

4.5.4.2. Contenido de humedad.

Las características de las micropartículas obtenidas dependen de las propiedades físico-químicas de la emulsión, el tipo de secado y las condiciones fijadas para el secado. De esta manera, la humedad que presenten las micropartículas obtenidas influirá en la vida media del producto final (Quispe-Condori y col., 2011).

Según Klinkesorn y col., (2006), el máximo contenido de humedad para la mayoría de polvos obtenidos por diferentes técnicas de secado para la industria alimentaria debe oscilar entre 3-4%. Prácticamente todos los resultados obtenidos para las muestras de aroma de fresa con las diferentes técnicas de secado, están en concordancia con las especificaciones recomendadas en la industria (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. *Contenido de humedad de las diferentes muestras obtenidas.*

Técnica	Mezcla	Humedad (%)
Secado por aspersión	MDs/HC	2.0 ±0.20
	MDs/HC/β-CDs	1.9 ±0.18
	MDs/HC/γ-CDs	2.3 ±0.15
Liofilización	MDs/HC	3.9 ±0.32
	MDs/HC/β-CDs	4.1 ±0.28
Lecho fluido	MDs/HC	3.8 ±0.41
	MDs/HC/β-CDs	4.6 ±0.23

Es interesante resaltar que el secado por aspersión produjo micropartículas con el menor contenido de humedad (entre 1.9 y 2.3%) comparadas con las obtenidas por liofilización (entre 3.9 y 4.1%) o lecho fluido (entre 3.8 y 4.6%). Los resultados logrados mediante secado por aspersión fueron similares a los observados en los estudios de Frascareli y col., 2012 para la microencapsulación de aceite de café mediante secado por aspersión en los cuales, el contenido de humedad osciló entre el 0.8 y 3.2%, dependiendo de las condiciones ensayadas.

4.5.4.3. Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento.

Los polvos obtenidos con las diferentes técnicas se almacenaron a diferentes temperaturas (4 y 25 °C) y la cantidad de compuestos volátiles del aroma de fresa presentes en ellos se midieron a diferentes tiempos (0, 1, 2 y 5 meses) para evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento en su estabilidad.

- Estabilidad de acetoacetato de etilo (AE).

La Figura 4.9 muestra el efecto del tiempo de almacenamiento (hasta 5 meses) y la temperatura (4 y 25 °C) en la estabilidad de AE en muestras obtenidas con diferentes agentes encapsulantes y técnicas de secado.

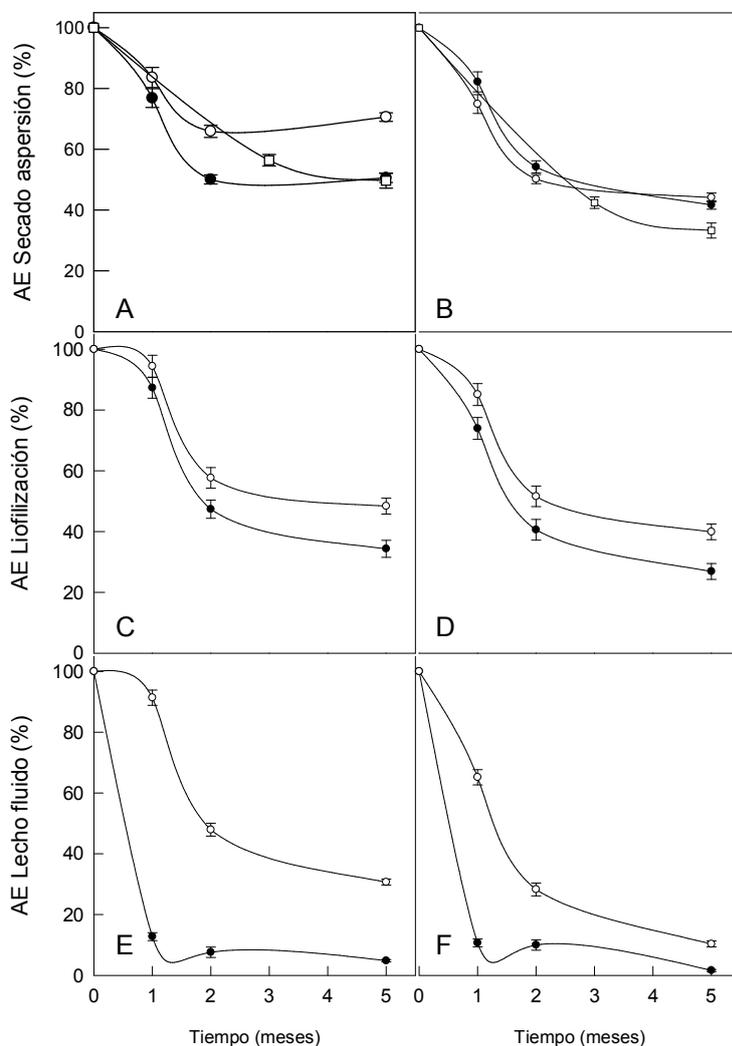


Figura 4.9. Efecto del tiempo y de la temperatura en la cantidad de AE en muestras con diferentes agentes encapsulantes MDs/HC/ β -CDs (\circ), MDs/HC/ γ -CDs (\square), MDs/HC (\bullet) y diferentes técnicas de secado (A) Secado por aspersión 4 °C (B) Secado por aspersión 25 °C (C) Liofilización 4 °C (D) Liofilización 25 °C (E) Lecho fluido 4 °C (F) Lecho fluido 25 °C.

La técnica de secado por aspersión se ha usado con éxito en la microencapsulación de diferentes componentes alimentarios desde la década de los 50 del siglo pasado, con el objetivo de proporcionar a los aromas una protección frente a reacciones de degradación u oxidación y también para

convertir emulsiones líquidas en polvo. Hoy en día, el secado por aspersión es una de las técnicas más usadas para este fin (Desai y Park, 2005).

La mezcla MDs/HC/ β -CDs (\circ) a 4 °C (Figura 4.9A) proporcionó una mayor protección de AE tras 5 meses de almacenamiento comparada con MDs/HC/ γ -CDs (\square) y MDs/HC (\bullet). Con β -CDs en la mezcla, aproximadamente el 70% de AE permaneció en el polvo tras 5 meses de almacenamiento, mientras que en las otras mezclas este valor rondó el 50% en ambos casos. A 25 °C (Figura 4.9B) se observó el mismo comportamiento, siendo la mezcla MDs/HC/ β -CDs (\circ) la que mejor protegió a este volátil. Sin embargo, como se observa en la Figura 4.9, el aumento de temperatura de 4 a 25 °C causó una disminución en la cantidad de AE presente en el polvo obtenido mediante secado por aspersión. Con la mezcla MDs/HC/ β -CDs se obtuvieron resultados más bajos a 25 °C y aproximadamente, el 45% de AE restante permaneció en el polvo tras 5 meses. Este valor fue muy similar al obtenido en el caso de MDs/HC y fue inferior al 40% que se mantuvo en presencia de la mezcla con γ -CDs. Es importante resaltar que a ambas temperaturas, la presencia de γ -CDs no mejoró el efecto protector de los compuestos volátiles comparando el resultado con el obtenido en presencia de β -CDs. Por esta razón, las técnicas de liofilización y lecho fluido se llevaron a cabo sólo con las mezclas: MDs/HC (\bullet) y MDs/HC/ β -CDs (\circ).

La técnica de liofilización es usada en la industria para tratar de encapsular sustancias termosensibles o que no son estables en disolución acuosa. Exceptuando el largo proceso de deshidratación, esta técnica es un proceso sencillo, particularmente adecuado para la encapsulación de compuestos aromáticos.

A ambas temperaturas (4 y 25 °C), se obtuvieron resultados similares (Figura 4.9C y 4.9D). A 4 °C (Figura 4.9C), la mezcla MDs/HC/ β -CDs (\circ) retuvo el 50% de AE tras 5 meses de almacenamiento. Este valor fue inferior a 40% en el mismo periodo de tiempo para la muestra sin CDs (\bullet). Comparando este resultado con los obtenidos en secado por aspersión, el proceso de liofilización a 4 °C no mejoró la capacidad de retención de volátiles.

Las curvas obtenidas a 25 °C (Figura 4.9D) fueron similares a las observadas a 4 °C, la presencia de CDs en la mezcla permitió la retención de mayor cantidad de AE tras 5 meses, sin embargo, ambos valores fueron inferiores a los obtenidos mediante secado por aspersión a 25 °C.

Originalmente desarrollada como una tecnología para la industria farmacéutica, el proceso de lecho fluido está en auge en la industria alimentaria (Rosenkranz y col., 2008). El proceso tipo “Wurster” está reconocido como el mejor para el recubrimiento de partículas individuales (Frey, 2014).

A 4 °C (Figura 4.9E), la mezcla MDs/Hi-Cap/ β -CD (\circ) obtuvo mejores resultados (35% de AE tras 5 meses) que la mezcla sin CDs (\bullet) (aproximadamente 5%). A 25 °C, las pérdidas de AE aumentaron en presencia de CDs y solo el 15% de este compuesto volátil permaneció en el polvo tras 5 meses en la mezcla MDs/Hi-Cap/ β -CD (\circ). Tras 1 mes de almacenamiento, en ausencia de CDs, las pérdidas de AE, fueron aproximadamente de un 90% a ambas temperaturas.

Comparando estos resultados con los observados previamente para secado por aspersion y liofilización en el caso de AE, se puede concluir que lecho fluido no fue una tecnología adecuada para la retención de este compuesto debido a las grandes pérdidas observadas tras 5 meses.

- Estabilidad de alcohol bencílico (AB).

La Figura 4.10 mostró el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de AB en muestras obtenidas con diferentes agentes encapsulantes y técnicas de secado.

Respecto al proceso de secado por aspersion (Figura 4.10A y 4.10B) se obtuvieron resultados similares en las tres mezclas analizadas. A 4 °C (Figura 4.10A), la presencia de β -CDs (\circ) en el medio permitió la retención de una mayor cantidad de AB tras 5 meses de almacenamiento, comparado con las mezclas MDs/HC/ γ -CDs (\square) y MDs/HC (\bullet). A 25 °C (Figura 4.10B), los resultados fueron similares en presencia de β - (\circ) o γ -CDs (\square), mejorando ligeramente los resultados respecto a las muestras en su ausencia. Es importante resaltar la alta estabilidad de AB ya que más del 85% del mismo permaneció en el polvo tras 5 meses de almacenamiento.

Respecto al proceso de liofilización (Figuras 4.10C y 4.10D), se observa que la presencia de CDs a 4 o 25 °C protegió este volátil tras 5 meses de almacenamiento. La Figura 4.10C mostró que aproximadamente el 85% de AB permaneció en el polvo tras 5 meses de almacenamiento, mientras que este valor fue inferior en el caso de la mezcla MDs/HC (\bullet) (75%). A 25 °C, se obtuvieron resultados similares. Comparando los resultados obtenidos para la técnica de

secado por aspersión y liofilización, se puede concluir que la primera favorece la retención de los volátiles.

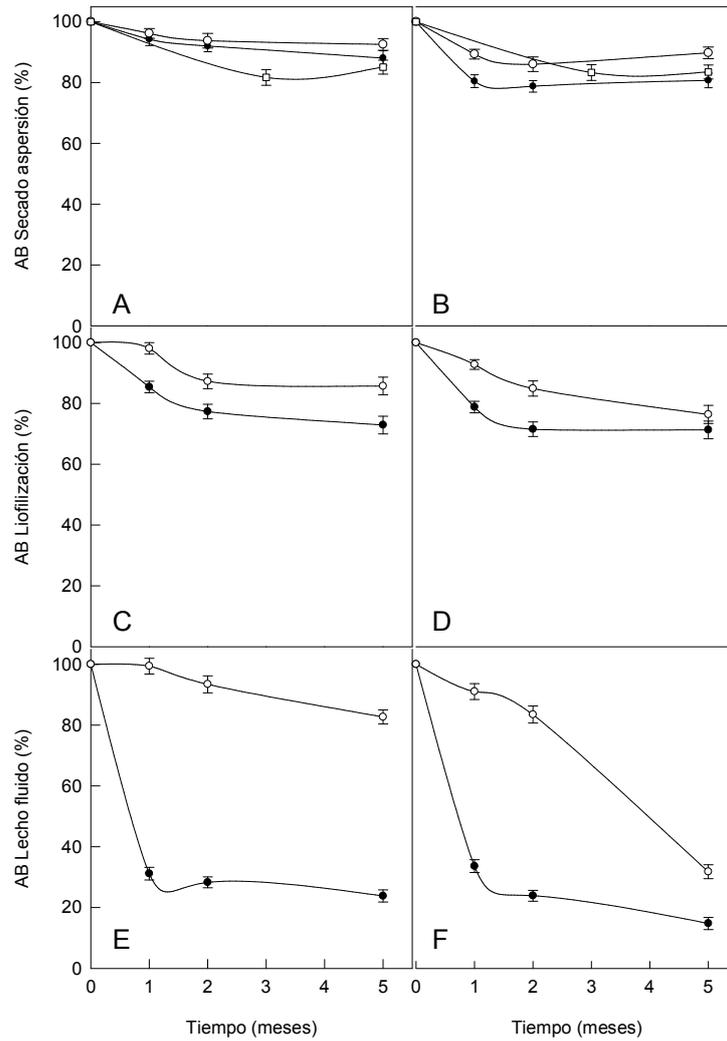


Figura 4.10. Efecto del tiempo y de la temperatura en la cantidad de AB en muestras con diferentes agentes encapsulantes MDs/HC/β-CDs (○), MDs/HC/γ-CDs (□), MDs/HC (●) y diferentes técnicas de secado (A) Secado por aspersión 4 °C (B) Secado por aspersión 25 °C (C) Liofilización 4 °C (D) Liofilización 25 °C (E) Lecho fluido 4 °C (F) Lecho fluido 25 °C.

Finalmente, respecto a la estabilidad de AB con lecho fluido se observó (Figuras 4.10E y 4.10F) que a 4 °C, la mezcla MDs/Hi-Cap/ β -CD (\circ) mostró valores similares a los obtenidos en el caso de secado por aspersión y liofilización. Sin embargo, en ausencia de CDs, se observó un gran descenso y solo el 25% de AB inicial permaneció en el polvo tras 5 meses de almacenamiento. Cuando la temperatura subió hasta los 25 °C, las pérdidas de AB en presencia de β -CDs fueron superiores con esta técnica (Figura 4.10F).

A pesar de que la cantidad de AB disminuyó en el polvo con el aumento de temperatura, la presencia de CDs en la mezcla de agentes encapsulantes, protege a este compuesto volátil.

- Estabilidad de fraistone (FR).

La Figura 4.11 mostró el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de FR en muestras obtenidas con diferentes agentes encapsulantes y técnicas de secado.

La estabilidad de FR en el polvo obtenido mediante secado por aspersión se explica en las Figuras 4.11A y 4.11B. A 4 °C (Figura 4.11A), la mezcla MDs/HC (\bullet) protegió mejor a FR que en presencia de CDs (\circ ó \square). Sin embargo, a 25 °C, la mezcla MDs/HC/ β -CDs (\circ) mostró los mejores resultados (90% en presencia de β -CDs y 80% en su ausencia (\bullet)). La presencia de γ -CDs (\square) no mostró mejor protección que β -CDs, de tal manera que se descartó su uso en las técnicas de liofilización y lecho fluido.

En el caso de la técnica de liofilización, los resultados se observan en las Figuras 4.11C y 4.11D. Como puede verse, ambas gráficas son similares. A 4 °C (Figura 4.11C), la cantidad de FR restante fue 60% tras 5 meses de almacenamiento con CDs y aproximadamente 45% en su ausencia. Un comportamiento similar se observó a 25 °C (Figura 4.11D). Como se observa, FR presentó alta termoestabilidad ya que el aumento de temperatura no afectó a la cantidad de este compuesto tras 5 meses de almacenamiento.

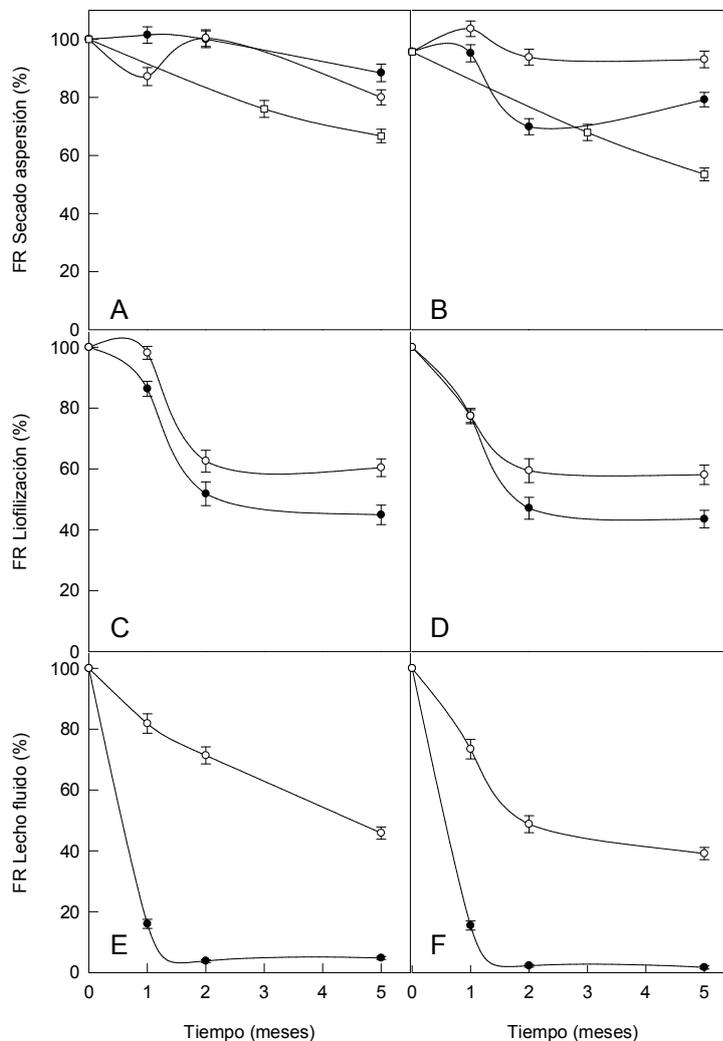


Figura 4.11. Efecto del tiempo y de la temperatura en la cantidad de FR en muestras con diferentes agentes encapsulantes MDs/HC/β-CDs (○), MDs/HC/γ-CDs (□), MDs/HC (●) y diferentes técnicas de secado (A) Secado por aspersión 4 °C (B) Secado por aspersión 25 °C (C) Liofilización 4 °C (D) Liofilización 25 °C (E) Lecho fluido 4 °C (F) Lecho fluido 25 °C.

Finalmente, respecto a la técnica de lecho fluido, los resultados de FR se muestran en la Figura 4.11E y 4.11F. A 4 °C, se obtuvo una gran disminución en el caso de MDs/HC/ β -CDs (○) y solo el 45% de FR permaneció en el polvo tras el tiempo de almacenamiento, mientras que este valor fue inferior al 10% en ausencia de CDs, lo que indica la importancia de la presencia de CDs en la protección de este compuesto. Los resultados obtenidos a 25 °C fueron similares a los obtenidos a 4 °C y las pérdidas en presencia/ausencia de CDs también fueron parecidas.

4.5.4.4. *Análisis del tamaño de partícula.*

La Figura 4.12 muestra la distribución del tamaño de partícula para las muestras obtenidas con los diferentes agentes encapsulantes. El proceso de encapsulación fue el factor que más afectó al tamaño de partícula, teniendo en cuenta que se usó la misma proporción de agentes encapsulantes para preparar las emulsiones que se llevaron al secador por aspersión, al liofilizador y al lecho fluido.

El tamaño de partícula más pequeño se obtuvo con el secado por aspersión. El parámetro $D_{[4:3]}$ fue 8.76 μm , valor que es similar al de otros compuestos encapsulados mediante esta técnica, como es el caso de la microencapsulación de aceite de café, el valor obtenido de tamaño de partícula osciló entre 7.88 y 13 μm (Frascareli y col., 2012). En el caso de la microencapsulación de lípidos mediante secado por aspersión, el diámetro fluctuó entre 8.1 y 17.9 μm (Strobel y col., 2016).

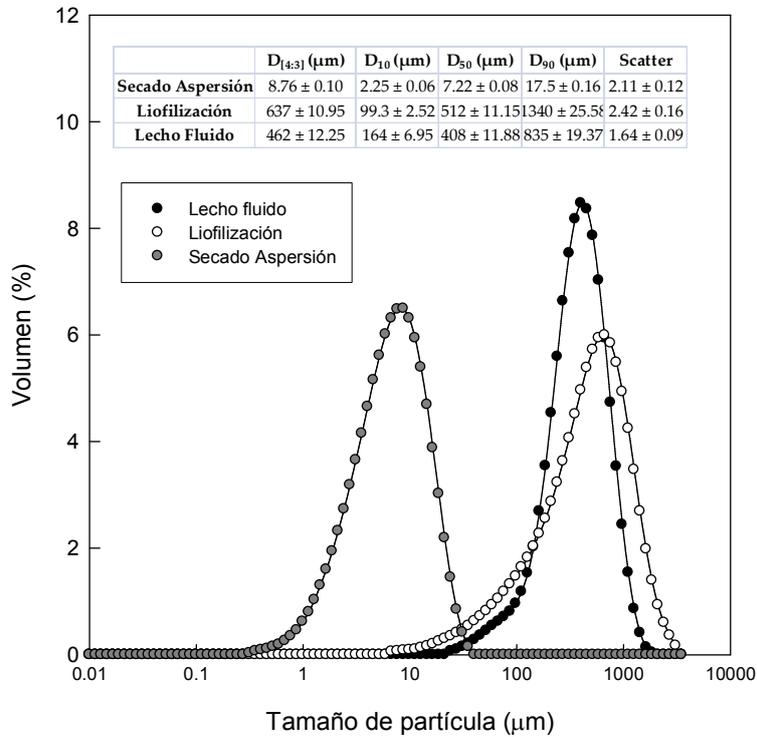


Figura 4.12. Distribución del tamaño de partícula de los diferentes polvos obtenidos mediante secado por aspersión, liofilización y lecho fluido. (Inset) Valores obtenidos en cada uno de los parámetros analizados.

El valor $D_{[4:3]}$ obtenido para el proceso de liofilización fue $637 \mu\text{m}$. El mayor tamaño obtenido en las micropartículas liofilizadas se debe a la baja temperatura a la que se realiza el proceso y la ausencia de fuerza para romper las gotas congeladas o alterar la superficie durante el secado (Chen, Chi y Xu, 2012). En concordancia con nuestros resultados, la microencapsulación de un extracto fenólico mediante liofilización generó un diámetro similar ($684 \mu\text{m}$) usando goma guar y povidexrosa como encapsulantes (Kuck y Zapata-Noreña, 2016).

Los resultados de lecho fluido dieron lugar a partículas con un diámetro intermedio entre secado por aspersión y liofilización ($D_{[4:3]} = 462 \mu\text{m}$).

Los valores “span” o de amplitud están relacionados con la distribución del tamaño de partícula y se calculan mediante la fórmula descrita en la sección de material y métodos. Valores bajos indican muestras con una distribución

homogénea, que es una propiedad muy deseable en este tipo de muestras (Fernandes, Borges y Botrel, 2014). Lecho fluido dio lugar a las muestras con mayor homogeneidad, con un valor span de 1.64, a continuación secado por aspersion con un valor de 2.11 y finalmente liofilización con un valor de 2.42.

4.5.4.5. Análisis morfológico de las muestras.

La estructura morfológica de los diferentes polvos obtenidos mediante secado por aspersion, liofilización y lecho fluido se analizó en el microscopio electrónico de barrido. Como se puede observar en la Figura 4.13, las diferentes tecnologías de secado dieron lugar a distintas morfologías: partículas suaves y redondeadas (Figura 4.13A) se obtuvieron mediante secado por aspersion. Esta forma de partícula es la más adecuada para la protección y retención de los compuestos volátiles.

Con el proceso de liofilización se obtuvieron estructuras amorfas tipo cristal (Figura 4.13B). Según Kaushik y Roos (2007), estas estructuras amorfas cristalinas que se forman en los procesos de deshidratación protegen a los compuestos encapsulados en su interior frente al calor y oxígeno.

La Figura 4.13C muestra la microestructura de las partículas obtenidas en el caso de lecho fluido: Morfologías amorfas e irregulares. La estructura resultante es difícil de comparar con otros resultados debido a la ausencia de trabajos de investigación donde se use lecho fluido para la microencapsulación de componentes alimentarios.

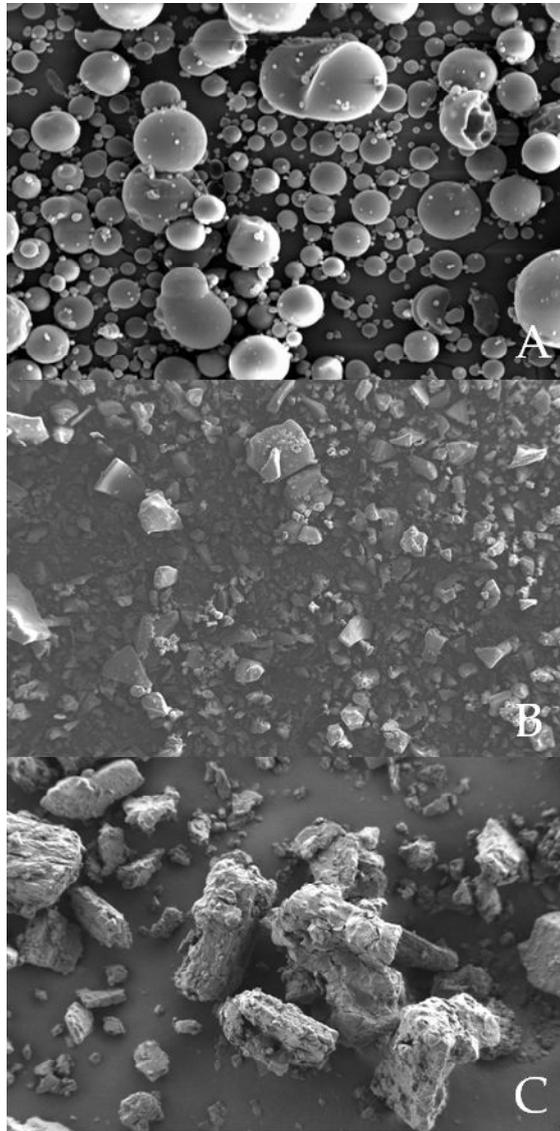


Figura 4.13. *Microfotografías de una muestra de secado por aspersión (A), liofilización (B) y lecho fluido (C).*

V. USO DE CICLODEXTRINAS
PARA LA ELIMINACIÓN DE
COLORANTES DE AGUAS DE
LA INDUSTRIA TEXTIL

CAPÍTULO V. USO DE CDs PARA LA ELIMINACIÓN DE COLORANTES DE AGUAS DE LA INDUSTRIA TEXTIL

5.1 INTRODUCCIÓN

El uso de agua en aplicaciones domésticas, industriales y en agricultura implica su contaminación. Hoy en día, el vertido de contaminantes en el medio ambiente es un serio problema que afecta tanto a la calidad del suelo como del agua. Estos contaminantes son rápidamente asimilados por la flora y fauna existente y muchos de ellos no sólo tienen efectos tóxicos en el medio ambiente, sino que también afectan al ser humano. Esto hace necesario un esfuerzo constante para proteger los recursos hídricos disponibles mediante la implementación de leyes más estrictas en este ámbito (Crini y Badot, 2010).

Existe una gran variedad de tratamientos para descontaminar aguas residuales, éstos incluyen coagulación/floculación, adsorción en carbones activos, oxidación, filtración mediante membranas o procesos de oxidación avanzada (Verma, Dash y Bhunia, 2012). Sin embargo, a pesar de su eficacia, muchos de estos procesos no pueden usarse a escala industrial por razones económicas.

Pequeñas y medianas empresas no cuentan con el presupuesto necesario para poder invertir en tratamientos adicionales del agua, no sólo por el alto coste de los equipos, sino también por el mantenimiento asociado a los mismos. Otro problema a resaltar es que las aguas residuales de la industria son difíciles de tratar debido a su variedad y composición (contaminantes orgánicos e inorgánicos). Los procesos de descontaminación propuestos hasta la fecha no son capaces de eliminar toda la carga contaminante presente en el agua. En la práctica, se usa una combinación de diferentes procesos para su eliminación con el objetivo de obtener la calidad de agua deseada de la forma más económica posible. Esto se debe a que no existe un tratamiento que sea capaz de eliminar todos los contaminantes de forma simultánea del agua a unos niveles adecuados. Otra dificultad que existe es la baja concentración de las moléculas o iones que están contaminando el agua. Por ello, existe una necesidad de desarrollar nuevos

tratamientos aceptables a nivel industrial que sean efectivos para un amplio rango de compuestos a bajas concentraciones (Ávila y col., 2015).

5.1.1. Uso de ciclodextrinas para descontaminar aguas residuales de la industria textil.

Gran parte de la investigación de los últimos años en el campo de reutilización de aguas residuales se ha centrado en el uso de diferentes polisacáridos que pueden ser obtenidos en grandes cantidades y que además son inocuos para el medio ambiente (Borgogna, Bellich y Cesaro, 2011). Especial atención se les ha prestado a las CDs, moléculas naturales derivadas del almidón (Hedges, 1998; Dodziuk, 2006).

Las numerosas propiedades de estos compuestos junto con su inocuidad para el ser humano han llevado su uso a la industria farmacéutica, biomedicina, biotecnología o industria textil. Las CDs pueden emplearse en su forma nativa o modificada. La gran versatilidad de estos compuestos se debe a su capacidad de formar complejos de inclusión con una amplia variedad de compuestos, de ahí que sean moléculas con un gran interés industrial (Shi y col., 2015; Izadmanesh y Ghasemi, 2016).

En los últimos años, se ha centrado el interés de estos compuestos en la descontaminación de aguas residuales. Las CDs nativas y todas sus modificadas se usan en la descontaminación de aguas residuales y acuíferos, mediante la encapsulación, separación y absorción de los contaminantes. Esto es debido principalmente al hecho de que las CDs, y en particular su cavidad hidrofóbica, pueden atrapar compuestos aromáticos y otras moléculas hidrofóbicas (Kumar y col., 2015).

Entre otros, los colorantes de tintado de telas son contaminantes habituales en las aguas residuales de la industria textil (Brillas y Martínez-Huitle, 2015). La contaminación del agua debida a estos colorantes es objeto de amplia investigación debido a la gran cantidad de agua que se necesita tratar. Diferentes estudios pusieron de manifiesto que existen más de 100.000 colorantes disponibles y la producción anual de aguas contaminadas debido a estos compuestos se eleva a 7×10^5 toneladas (Robinson y col., 2001). Estos colorantes son compuestos aromáticos complejos con estructuras de gran tamaño con un alto

grado de estabilidad química y biológica y con gran resistencia a la luz, microorganismos, etc. de tal manera que son muy resistentes a la degradación (Savin y Butnaru, 2008). Y estos colorantes forman complejos de inclusión con diferentes tipos de CDs, tanto nativas como modificadas (Yan y col., 2016).

Debido a la elevada solubilidad acuosa que presentan las CDs, éstas no pueden usarse directamente para la complejación de colorantes y posterior retirada. Es por tanto necesario la fabricación de polímeros de CDs o su inmovilización en soportes sólidos, con el fin de poder fijarlas y pasar las aguas residuales a su través. En la literatura, existen numerosos estudios acerca de la preparación, caracterización y aplicaciones de polímeros insolubles de CDs. Entre ellos, los obtenidos mediante copolimerización de CDs con agentes polimerizantes en medio alcalino han acaparado mucho la atención, debido a su facilidad de síntesis, alta capacidad de absorción y selectividad. Entre todas las reacciones, el entrecruzamiento químico usando epiclorohidrina (EPI), es el método más sencillo para producir polímeros de CDs insolubles con aplicaciones medioambientales (Mallard y col., 2015).

Como se mencionó anteriormente, las CDs son solubles en agua y por tanto deben ser procesadas en forma de polvo sólido antes de que se puedan usar en procesos de separación y absorción de diferentes compuestos. Debido a su estructura, las CDs tienen la capacidad de formar redes mediante entrecruzamiento por reacción directa entre los grupos hidroxilo de las CDs y el agente de acoplamiento para formar polímeros insolubles. El principal producto de la reacción entre CDs y el agente entrecruzante, como es el caso de EPI en medio alcalino, es una mezcla heterogénea de diversos éteres de glicerol. Renard y col. en 1997 demostraron que la reacción de las CDs con EPI bajo condiciones controladas, evitando la gelificación de la mezcla, da lugar a polímeros solubles con estructuras hiperramificadas. Esta estructura se confirmó mediante electrospray de ionización. La cavidad de las CDs mantiene su capacidad de formar complejos en este estado y los polímeros obtenidos son mucho más insolubles que las propias CDs. Si el grado de copolimerización es suficientemente alto, la matriz de CDs se hace insoluble en agua (Sainz-Rozas, Isasi y González-Gaitano, 2005). Estos materiales se obtienen mediante condensación usando agentes polimerizantes bi- o polifuncionales como

aldehídos, cetonas, isocianatos o epóxidos como EPI. Los polímeros que se obtienen pueden ser hidrofóbicos, hidrofílicos, iónicos o anfílicos.

5.1.2. Polímeros de CDs y EPI.

Entre todos los polímeros que pueden formarse, los más usados son los formados con CDs y EPI. EPI (1-cloro-2,3-epoxipropano) es el agente polimerizante más usado en la química de polisacáridos (Crini y Morcellet, 2002). Es un agente polimerizante bifuncional que contiene 2 grupos reactivos funcionales (Figura 5.1), que pueden formar enlaces con las moléculas de CDs (entrecruzamiento) y/o con ellos mismos (polimerización). El polímero resultante es una mezcla de unidades de CDs junto con gliceroles. Los enlaces resultantes entre las CDs son relativamente polares. Debido al hecho de que la red que se forma es altamente hidrofílica y se hincha fuertemente en agua, estos polímeros también son denominados geles o hidrogeles.

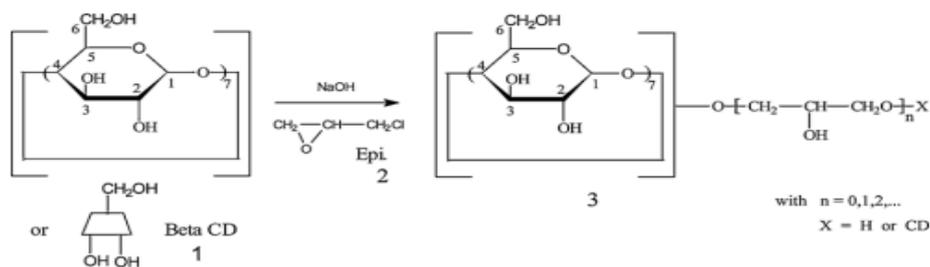


Figura 5.1. Polímeros insolubles de CDs usando EPI como agente polimerizante.

La reacción de entrecruzamiento entre las CDs y EPI es una reacción muy bien descrita en la literatura (Mocanu, Vizitiu y Carpov, 2001) además de ser un método relativamente sencillo de preparación. Sin embargo, aunque este método se desarrolló hace más de 60 años y es un método simple y sencillo de preparación, sigue interesando a la comunidad científica hoy en día.

La principal desventaja de EPI es su toxicidad. Este agente no es considerado respetuoso con el medio ambiente ya que es peligroso medioambientalmente y carcinogénico, por ello no sólo hay preocupación en la interacción que este compuesto puede tener con el medioambiente sino también en su posible contacto con el ser humano. Esto ha llevado a centrar las

investigaciones en la búsqueda de otros agentes polimerizantes. Sin embargo, hay que señalar que la presencia de moléculas de EPI sin reaccionar es muy improbable ya que EPI es muy reactiva y sufre procesos de hidrólisis en medio alcalino. Además, los polímeros que se producen con EPI son generalmente purificados antes de su uso (Crini y Morcellet, 2002).

Los ácidos policarboxílicos o los derivados del ácido cítrico son agentes polimerizantes menos problemáticos. También se han propuesto como solución derivados de diisocianato. En todos estos procesos, las reacciones ocurren entre el grupo -OH de las CDs y los grupos funcionales de los agentes polimerizantes.

5.1.3. Polímeros de quitosan.

Una alternativa a los polímeros de EPI se centra en el desarrollo de polímeros biodegradables, respetuosos con el medio ambiente y que necesiten menos tratamiento químico durante su producción. Se han desarrollado diferentes polímeros obtenidos de distintas fuentes como hongos (Damodaran y col., 2014), algas (He y Chen, 2014), bacterias (Kieu, Muller y Horn, 2011) y levaduras (Machado, Soares y Soares, 2010) para la eliminación y recuperación de diferentes contaminantes del agua. Se ha demostrado que estos sorbentes son más efectivos que las resinas en muchos casos. Además de ser efectivos, presentan bajo costo y están disponibles en grandes cantidades y, lo que es más importante, contienen en su estructura grupos funcionales como amino, carboxilo, hidroxilo y carbonilo (Wang y Chen, 2009).

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza tras la celulosa. Su producción estimada oscila entre 10^{10} y 10^{12} toneladas por año (Kumar, 2000). Es un polímero lineal de unidades de β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina. Chitosan es un polímero que se obtiene a partir de la deacetilación de la quitina. Este polímero contiene grupos polares diferentes y la presencia de estos grupos le proporciona al chitosan su capacidad de absorber compuestos presentes en el agua. Debido a su carga positiva en los grupos amino bajo condiciones ácidas, se le considera como un polímero catiónico, el cual puede ser fácilmente unido a moléculas cargadas negativamente. Además, chitosan es biocompatible y no tóxico para el ser humano y el medioambiente y además muestra actividad antimicrobiana y antioxidante (Muzzarelli, 2011). Estas

propiedades hacen de quitosan un biopolímero natural con aplicaciones en diferentes campos incluyendo farmacia y medicina (Ong y col., 2008), industria de alimentos (Aider, 2010), textil (Alonso y col., 2009) y de tratamiento de aguas (Hu y col., 2013).

Algunas variantes de los polímeros de quitosan incluyen la adición de CDs, dando lugar a polímeros quitosan-CDs. Incluso se pueden añadir partículas de hierro a estos polímeros dando lugar a sorbentes con propiedades magnéticas que presentan mejores propiedades a la hora de separarlos de las aguas residuales con las que están en contacto.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Reactivos.

α -, β -, γ -, HP- α -, HP- β - y HP- γ -CDs fueron suministradas por AraChem (Holanda), borohidruro de sodio, hidróxido de sodio, epíclorhidrina y acetona fueron suministrados por Sigma-Aldrich (España). El colorante Rubí Directo fue proporcionado por AITEX (Asociación de Investigación de la Industria Textil, Alcoy, España).

5.2.2. Preparación del polímero.

El proceso de preparación del polímero de CDs con EPI fue el mismo independientemente del tipo de CDs empleadas en la preparación. 60 mg de borohidruro se mezclaron con 24 g de CDs, a esto se adicionaron 24 mL de agua. Tras agitación durante 10 min. a 50 °C, se adicionaron 26 mL de hidróxido de sodio al 40% y se mantuvo en agitación durante 5 min. Tras este tiempo, se adicionaron 264 g de EPI, gota a gota. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 6 horas hasta que la disolución adquirió consistencia de polímero. El polímero se lavó con 100 mL de acetona durante 10 min. Tras este tiempo, el polímero se colocó en una placa Petri, que fue llevada a estufa donde se mantuvo durante toda la noche a 50 °C, para eliminar restos de acetona y para secar completamente el polímero.

5.2.3. Preparación del colorante.

La capacidad de absorción se investigó usando el colorante Rubí Directo (RD) BL como modelo de molécula huésped. RD es un colorante de tipo azoico (CAS 90880-77-6) cuya fórmula es $C_{33}H_{20}N_6Na_4O_{17}S_4$ y su peso molecular 992.77. La estructura del colorante se observa en la Figura 5.2.

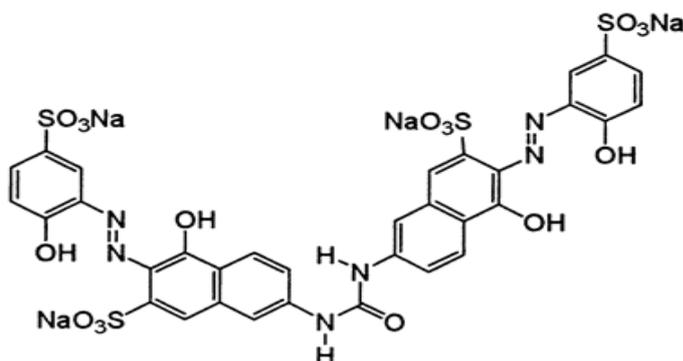


Figura 5.2. Estructura química del colorante Rubí Directo.

A partir de una concentración madre de colorante de 500 mg/L, se prepararon diferentes diluciones hasta llegar a las concentraciones: 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 300 mg/L que fueron evaluadas en términos de absorción por cada uno de los polímeros.

5.2.4. Análisis y evaluación de la capacidad de absorción.

La concentración de colorante se determinó usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603), mediante la medida de la absorbancia de la disolución antes y después del tratamiento con el polímero, a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia del colorante ($\lambda_{max} = 526 \text{ nm}$) (Figura 5.3).

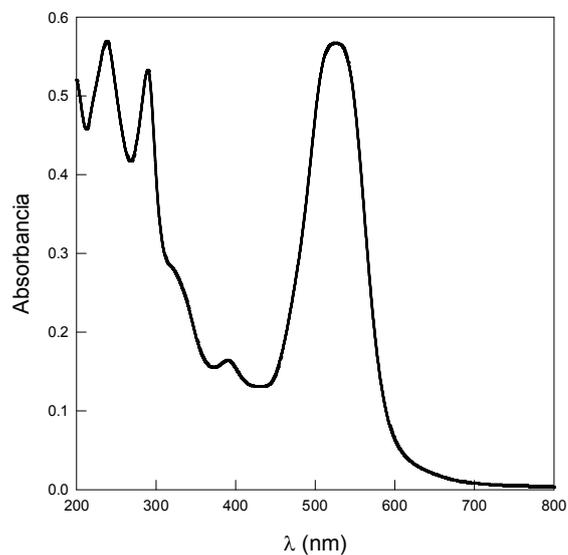


Figura 5.3. Espectro de absorción del colorante Rubí Directo.

A partir de las diferentes concentraciones de RD preparadas se determinó la recta de calibrado de dicho colorante como se observa en la Figura 5.4.

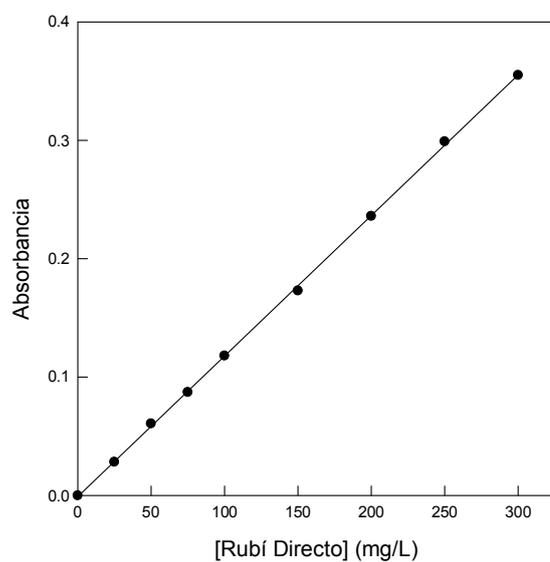


Figura 5.4. Recta de calibrado de Rubí Directo.

Los datos obtenidos fueron usados para calcular la capacidad de absorción del polímero. En muchos casos, fue necesaria la dilución de la muestra para obtener una absorbancia entre 0 y 1, que permitiera aplicar la ley de Lambert-Beer.

5.2.5. Experimentos de absorción.

Los datos experimentales se determinaron a 25 °C, variando la concentración de colorante en disolución de 25 a 300 mg/L. En cada experimento, se añadió 1 g de polímero a 50 mL de cada una de estas concentraciones de colorante. La mezcla se agitó en un multiagitador a una velocidad constante de 500 rpm. Cada 10 min se determinó la cantidad de colorante presente en la disolución hasta que se alcanzó el equilibrio y se obtuvo la máxima eliminación de colorante posible con 1 g de polímero. La fase sólida se separó mediante centrifugación para eliminar cualquier impureza que pudiera afectar a la medida posterior.

La cantidad de colorante absorbido en el equilibrio, q_e , se calculó a partir de la ecuación de balance de masa (5.1):

$$q_e = \frac{V(C_o - C_e)}{m} \quad (5.1)$$

donde C_o es la concentración inicial de colorante en la disolución (mg/L), C_e es la concentración de colorante en el equilibrio (mg/L), V es el volumen de cada una de las disoluciones de colorante usadas (L) y m es la masa de polímero empleada (g). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

5.2.6. Cinética de absorción.

En la literatura, se han descrito tres modelos cinéticos para los procesos de absorción:

- Modelo cinético de pseudo primer orden (Ho, 2004).
- Modelo cinético de pseudo segundo orden (Ho y McKay 1998).
- Modelo de difusión intrapartícula (Weber y Morris, 1963).

En el desarrollo de esta tesis, estos tres modelos fueron investigados, con el objetivo de encontrar aquellos que mejor se ajustaran a los datos experimentales obtenidos.

5.2.6.1. Modelo cinético de pseudo primer orden.

En 1898, Lagergren presentó la primera ecuación para la absorción de solutos a partir de una solución líquida en carbón (Lagergren, 1898). La ecuación de Lagergren fue la primera ecuación cinética para la absorción basada en la capacidad del sólido. Este modelo asume que la tasa de cambio de soluto admitida con el tiempo es directamente proporcional a la diferencia de la concentración de saturación y la cantidad de sólido admitido con el tiempo. Con el objetivo de distinguir la ecuación cinética basada en la capacidad de absorción de un sólido de una basada en la concentración de la solución, la ecuación de Lagergren también se ha denominado como ecuación de pseudo primer orden (5.2):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1 (q_e - q_t) \quad (5.2)$$

donde q_t y q_e son la cantidad absorbida a tiempo t y en el equilibrio (mg/g) y k_1 es la constante del modelo (min^{-1}). Tras integración y aplicación de $t=0$ a $t=t$ y $q_t=0$ a $q_t=q_t$, la forma integrada de la ecuación se transforma en:

$$\log\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = \frac{k_1}{2.303} t \quad (5.3)$$

Esta ecuación se puede reordenar con el objetivo de obtener su forma lineal:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t \quad (5.4)$$

La representación del $\log(q_e - q_t)$ frente al tiempo da lugar a una línea recta para la cinética de primer orden, que permite conocer la constante k_1 .

Cuando la absorción es precedida de difusión a través de una capa límite, la cinética, en la mayoría de los casos, sigue la ecuación de pseudo primer orden de

Lagergren. Si los resultados experimentales no siguen las ecuaciones anteriores, la absorción no es un proceso de difusión controlada y los datos difieren en dos aspectos importantes (Ho y McKay, 1998).

- $k_1 (q_e - q_t)$ no representa el número disponible de sitios de absorción.
- $\log q_e$ no es igual al intercepto de la representación de $\log (q_e - q_t)$ frente al tiempo.

Si esto sucede, la reacción no es de primer orden, independientemente de la magnitud del coeficiente de correlación. En la literatura se ha descrito que los datos no se ajustan bien con la ecuación en todo el rango de tiempo de contacto y es generalmente aplicable en las etapas iniciales del proceso de absorción pero no en las finales.

5.2.6.2. Modelo cinético de pseudo segundo orden.

El proceso de absorción puede ser descrito como un modelo de pseudo segundo orden. La ecuación diferencial es la siguiente (Ho y McKay, 1999):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad (5.5)$$

donde q_e es la cantidad de colorante absorbida en el equilibrio (mg/g), q_t es la cantidad de colorante absorbida a cada tiempo t (mg/g) y k_2 es la constante de equilibrio del modelo de absorción de pseudo segundo orden (g/mg min). Integrando la ecuación anterior para las condiciones $t=0$ a $t=t$ y $q_t=0$ a $q_t=q_t$ da lugar a:

$$\frac{1}{(q_e - q_t)} = \frac{1}{q_e} + k_2 t \quad (5.6)$$

Esta ecuación puede ser reordenada para obtener su forma lineal:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (5.7)$$

Los parámetros k_2 y q_e pueden ser obtenidos directamente del intercepto y la pendiente de la representación de t/q_t frente al tiempo. Si el modelo de pseudo segundo orden es aplicable, la representación da lugar a una relación lineal que permite calcular k_2 y q_e sin tener que conocer ningún parámetro de antemano. El segundo orden (y también el primero) se basan en la capacidad de absorción: sólo predice el comportamiento a lo largo del rango conjunto y establece que la quimiabsorción es la tasa de control.

5.2.6.3. Modelo de difusión intrapartícula.

En general, el mecanismo de eliminación de colorante mediante absorción en un polímero incluye las siguientes etapas.

- Migración del colorante de la solución a la superficie del absorbente (difusión).
- Difusión del colorante a través de la capa límite a la superficie del absorbente (film difusión).
- Transporte del colorante de la superficie al interior de los poros de la partícula (difusión intrapartícula).
- Absorción del colorante en un sitio activo del polímero (reacción química vía intercambio iónico, complejación y/o quelación).

La absorción de colorante está controlada tanto por la tasa de transporte de masa de la fase líquida como por la tasa de transporte de masa intrapartícula. De esta manera, la transferencia de masa difusiva se incorpora al proceso de absorción. En los estudios de difusión, la tasa puede ser expresada en términos de la raíz cuadrada del tiempo. La dependencia matemática de q_t frente a $t^{1/2}$ es obtenida si el proceso se considera que está influido por la difusión en las partículas y difusión convectiva en la solución. De acuerdo con el modelo de difusión intrapartícula propuesto por Weber y Morris (1963), la ecuación es:

$$q_t = k_i \sqrt{t} + C \quad (5.8)$$

donde q_t es la cantidad de soluto en la superficie del sorbente a tiempo t (mg/g), k_i la constante de la tasa de difusión intrapartícula (mg/g min^{1/2}), t es el tiempo

(min) y C es el intercepto (mg/g). Los valores de k_i se obtienen de las pendientes de la representación de q_t frente al tiempo.

Si el modelo de difusión intrapartícula está implicado en los procesos de absorción, la representación de la raíz cuadrada del tiempo frente a q_t daría lugar a una relación lineal y el modelo de difusión intrapartícula sería el que controlaría el proceso si esta línea pasara por el origen. Cuando los puntos no pasan por el origen, esto indica cierto nivel de control de la capa límite y por tanto este tipo de difusión no es la única que interviene en el proceso.

5.2.7. Equilibrio de absorción.

Las propiedades de absorción y los datos de equilibrio, conocidos como isotermas de absorción, describen como interactúan los contaminantes con los materiales absorbentes, y por ello son muy importantes a la hora de optimizar las condiciones de absorción de cada polímero evaluado. Con el objetivo de optimizar el diseño del sistema de absorción para eliminar colorantes de disoluciones, es importante establecer la correlación más adecuada para las curvas de equilibrio. Existen diferentes isotermas disponibles para el análisis de los datos de equilibrio obtenidos experimentalmente, incluyendo las isotermas de Freundlich, Langmuir, Toth, Temkin, Redlich-Peterson, Sips y Dubinin-Radushkevich. De todas estas, las dos isotermas más comunes son las de Freundlich y Langmuir. La de Langmuir es la isoterma de absorción mejor conocida de todas las existentes para el análisis de los datos experimentales (Ho, Porter y McKay, 2002).

En este apartado de la tesis, los datos experimentales de equilibrio de absorción obtenidos con Rubí Directo y polímeros de CDs se analizaron mediante las isotermas de Freundlich, Langmuir y Temkin.

5.2.7.1. Isoterma de Freundlich.

La isoterma de Freundlich es la primera descrita para explicar el proceso de absorción (Freundlich, 1906). El modelo se aplica al proceso de absorción en superficies heterogéneas con interacción entre las moléculas absorbidas y sugiere que la energía de absorción disminuye exponencialmente al completar todos los sitios del absorbente. Esta isoterma es un modelo empírico empleado para

describir sistemas heterogéneos y se expresa mediante la siguiente ecuación (Ho, Porter y McKay, 2002):

$$q_e = (K_F C_e)^{1/n_F} \quad (5.9)$$

donde q_e es la concentración de colorante en el equilibrio con el polímero (mg/g), C_e es la concentración de colorante en disolución (mg/L), K_F es la constante de Freundlich (L/g) relacionada con la energía de enlace y $1/n_F$ es el factor de heterogeneidad. n_F es una medida de la desviación de la linealidad de la absorción. Su valor indica el grado de no-linealidad entre la concentración de la disolución y la absorción, de tal manera que si el valor de n_F es igual a la unidad, la absorción es lineal, si el valor es inferior a la unidad, implica que el proceso de absorción es químico y si el valor está por encima de la unidad, la absorción es un proceso físicamente favorable. A partir de la expresión de Freundlich se puede obtener una ecuación lineal aplicando logaritmos en la ecuación anterior:

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n_F} \ln C_e \quad (5.10)$$

Por tanto, la representación del $\ln q_e$ frente al $\ln C_e$ se usó para generar el valor del intercepto (K_F) y la pendiente a partir de $1/n_F$.

5.2.7.2. Isoterma de Langmuir.

La isoterma de Langmuir se usa frecuentemente para estudiar el proceso de absorción de un contaminante de una disolución. El modelo de absorción se basa en las siguientes premisas (Ho, Porter y McKay, 2002):

- El proceso de absorción se da en lugares específicos y homogéneos dentro del polímero.
- Cada molécula de colorante ocupa un lugar.
- El polímero tiene una capacidad finita para la absorción (en el equilibrio, el punto de saturación se alcanza cuando no existe más capacidad de absorción).
- Todos los lugares son idénticos y energéticamente equivalentes (el polímero es estructuralmente homogéneo).

La ecuación de Langmuir es la siguiente:

$$q_e = \frac{x}{m} = \frac{K_L C_e}{1 + a_L C_e} \quad (5.11)$$

donde x es la cantidad de colorante absorbido (mg), m es la cantidad de polímero usado (g), C_e (mg/L) y q_e (mg/g) son la concentración en fase líquida y la concentración en fase sólida en el equilibrio respectivamente, K_L (L/g) y a_L (L/mg) son las constantes de Langmuir.

Las constantes de la isoterma de Langmuir (K_L y a_L) se evalúan mediante linearización de la ecuación anterior:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_L}{K_L} C_e \quad (5.12)$$

Representando C_e/q_e frente a C_e , es posible obtener el valor de K_L a partir del intercepto ($1/K_L$) y el valor de a_L a partir de la pendiente (a_L/K_L). La teórica capacidad monocapa es q_{\max} (máxima capacidad de absorción del polímero) y es numéricamente lo mismo que K_L/a_L .

La característica esencial de la isoterma de Langmuir se puede expresar en términos de una constante adimensional llamada factor de separación (R_L), también llamado parámetro de equilibrio, el cual se define mediante la siguiente ecuación (McKay, 1982):

$$R_L = \frac{1}{1 + a_L C_0} \quad (5.13)$$

donde C_0 es la concentración inicial (mg/L) y a_L es la constante de Langmuir relacionada con la energía de absorción (L/mg). El valor de R_L indica la forma de la isoterma, de tal manera que es desfavorable si R_L es mayor de 1, lineal si R_L es igual a 1 y favorable si el valor de R_L oscila entre 0 y 1. Si R_L es 0, el proceso es irreversible.

5.2.7.3. Isoterma de Temkin.

La isoterma de Temkin, considera el efecto de las interacciones indirectas entre el polímero en la isoterma de absorción y sugiere que debido a estas interacciones, el calor de absorción de todas estas moléculas en la capa disminuiría linealmente con la cobertura. La isoterma de Temkin se aplica generalmente mediante la siguiente ecuación:

$$q_e = \left(\frac{RT}{b_T} \right) \ln(a_T C_e) \quad (5.14)$$

La forma lineal de la ecuación anterior da lugar a:

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln a_T + \frac{RT}{b_T} \ln C_e \quad (5.15)$$

donde b_T es la constante de Temkin, relacionada con el calor de absorción (kJ/mol), a_T es la constante de la isoterma de Temkin (L/g), R es la constante de los gases (8.314 J/mol K) y T es la temperatura absoluta (°K).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El control del proceso de absorción de un absorbente, en este caso los diferentes polímeros de CDs y EPI como agente polimerizante, depende de diferentes características físico-químicas. En primer lugar, del tipo de polímero preparado, su estructura química y grupos funcionales y en segundo lugar de las características químicas de la molécula a absorber, así como su concentración y finalmente, también depende de la temperatura.

5.3.1. Efecto del tiempo de contacto.

5.3.1.1. α - y HP- α -CDs-EPI.

Los datos de absorción para la eliminación de Rubí Directo frente al tiempo de contacto a diferentes concentraciones de colorante (entre 25 y 300 mg/L) para los polímeros de α -CDs-EPI y HP- α -CDs-EPI se observan en la Figura 5.5. Todos los experimentos se llevaron a cabo a pH 7.0, agitación constante (500 rpm) y

cantidad fija de polímero. Como se observa en ambas figuras, la capacidad de absorción aumenta en todas las concentraciones hasta que se llega a un punto en el tiempo, en el que se alcanza un valor constante, es decir, se detiene la captación de colorante de la disolución por parte del polímero. Cuando se alcanza este punto, la cantidad de colorante absorbida por el polímero se encuentra en un estado de equilibrio dinámico con la cantidad de colorante desorbida del propio polímero. El tiempo necesario para alcanzar este punto, se denomina tiempo de equilibrio y la cantidad de colorante absorbido a dicho tiempo indica la máxima capacidad de absorción de ese polímero en las condiciones de estudio.

En todo el rango de concentraciones estudiadas (25-300 mg/L) se pueden distinguir diferentes fases en el proceso de absorción. El proceso de absorción aumenta rápidamente en los primeros minutos de contacto entre el colorante y el polímero, debido a la rápida unión que se produce entre el colorante y la superficie del polímero. La absorción es continua hasta que se llega a la fase de equilibrio, momento en el que permanece constante. Aproximadamente, a partir de 30 minutos de contacto todas las curvas se convierten en asintóticas. No se aprecia en ambas Figuras un aumento de colorante absorbido en el interior del polímero a partir de ese momento. El proceso de absorción puede considerarse rápido debido a la gran cantidad de colorante absorbido en el polímero en los primeros minutos de absorción. También se observa que a medida que la concentración de colorante aumenta, se produce un aumento de la captación de colorante por parte del polímero, lo que indica la fuerte interacción química existente entre el polímero y el colorante.

Como se aprecia en la Figura 5.5, en todas las concentraciones evaluadas, se observa que el polímero α -CDs-EPI presenta valores más altos de q_t que HP- α -CDs-EPI. Esto indica que el polímero preparado con α -CDs tiene una mayor capacidad de absorción de RD en cada una de las concentraciones analizadas.

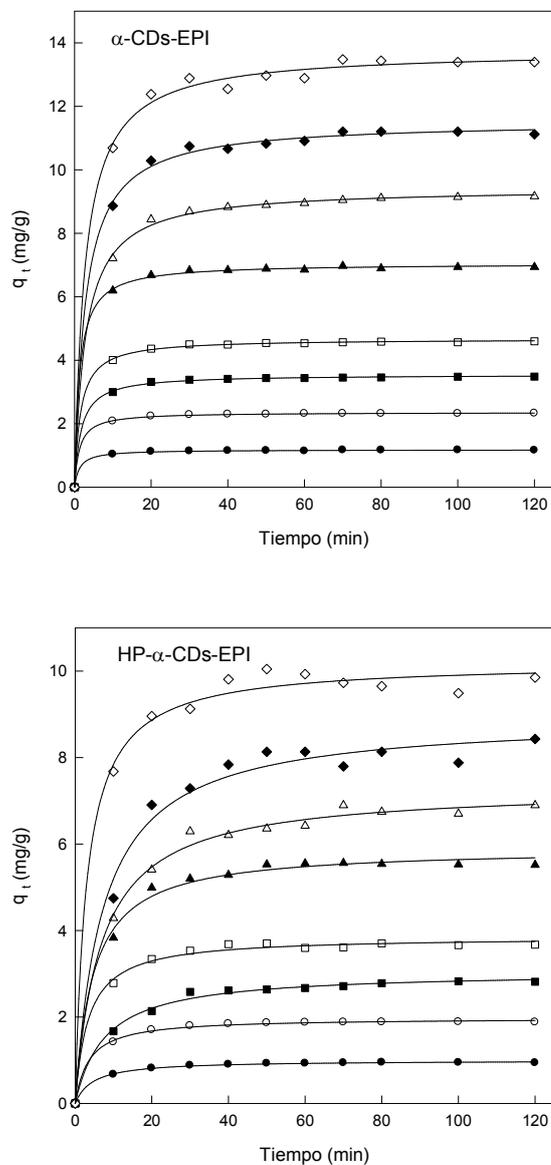


Figura 5.5. Efecto del tiempo de contacto en la cantidad de colorante absorbido por los polímeros α -CDs-EPI y HP- α -CDs-EPI a diferentes concentraciones 25 mg/L (●), 50 mg/L (○), 75 mg/L (■), 100 mg/L (□), 150 mg/L (▲), 200 mg/L (△), 250 mg/L (◆) y 300 mg/L (◇).

5.3.1.2. β - y HP- β -CDs-EPI.

Por lo que respecta a los datos de absorción para la eliminación de RD frente al tiempo de contacto a diferentes concentraciones de colorante, (entre 25 y 300 mg/L) para los polímeros de β -CDs-EPI y HP- β -CDs-EPI se observan en la Figura 5.6. Los resultados que se observan para estos dos polímeros son ligeramente diferentes a los observados en el de α - y HP- α -CDs-EPI. A bajas concentraciones de colorante (25, 50, 75 y 100 mg/L) la absorción se produce de forma rápida, alcanzándose el tiempo de equilibrio a la media hora de contacto. Sin embargo, con altas concentraciones de colorante (150, 200, 250 y 300 mg/L) la forma asintótica no es tan evidente y se necesita más tiempo para llegar al equilibrio (aproximadamente a los 60 minutos).

Analizando todas las curvas presentes en la Figura 5.6, se observa que la capacidad de absorción de RD por parte del polímero β -CDs-EPI es superior en todas las concentraciones evaluadas, respecto a la máxima capacidad de absorción que presenta el polímero HP- β -CDs-EPI. Los datos observados en este caso son similares a los comparados anteriormente para α - y HP- α -CDs-EPI, en los que con la CD nativa se obtuvieron mejores resultados de capacidad de absorción de colorante en todas las concentraciones.

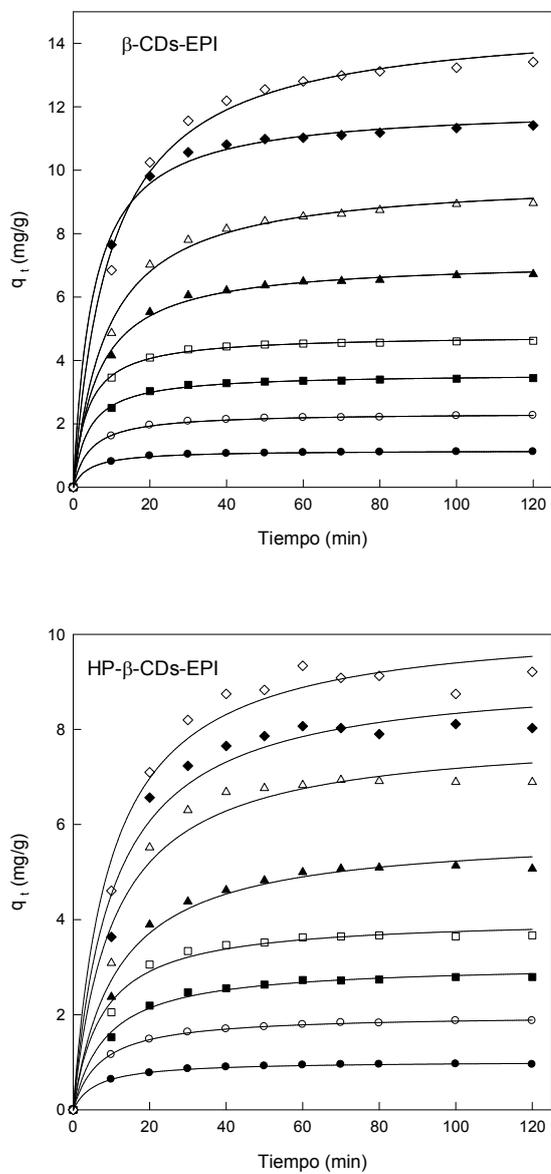


Figura 5.6. Efecto del tiempo de contacto en la cantidad de colorante absorbido por los polímeros β -CDs-EPI e HP- β -CDs-EPI a diferentes concentraciones 25 mg/L (●), 50 mg/L (○), 75 mg/L (■), 100 mg/L (□), 150 mg/L (▲), 200 mg/L (△), 250 mg/L (◆) y 300 mg/L (◇).

5.3.1.3. γ - y HP- γ -CDs-EPI.

Finalmente, por lo que respecta a los resultados del tiempo de contacto obtenidos con los polímeros γ -CDs-EPI y HP- γ -CDs-EPI se pueden observar en la Figura 5.7. En el caso del polímero preparado con γ -CDs, los resultados son claramente diferentes a los observados cuando el polímero se preparó con la CD modificada HP. En el caso de γ -CDs, a bajas concentraciones de colorante (hasta 100 mg/L), la absorción es rápida llegando a los 30 minutos al punto de equilibrio. Sin embargo, cuando la concentración de colorante fue superior, las curvas no mostraron la típica forma asintótica, sino que a medida que la concentración de colorante aumentó en la disolución, también lo hizo el tiempo de equilibrio. Punto que se alcanza prácticamente a partir de los 100 minutos de experimento. En el caso del polímero HP- γ -CDs-EPI, los resultados fueron diferentes ya que a todas las concentraciones estudiadas, el tiempo de equilibrio fue similar, llegando al mismo en los primeros 30 minutos de contacto.

A diferencia de los resultados de tiempo de contacto observados en los polímeros anteriores, no se observan las mismas diferencias en la máxima capacidad de absorción de RD por los polímeros γ - y HP- γ -CDs-EPI. En las ocho concentraciones evaluadas se observa que el valor de q_t es similar en estos dos polímeros (Figura 5.7).

Para estudiar el mecanismo de control que rige el proceso de absorción: superficie de absorción, transferencia de masa, difusión externa, difusión intrapartícula y reacción química, se evaluaron los modelos cinéticos de pseudo primer orden, de pseudo segundo orden así como el modelo de difusión intrapartícula con el objetivo de estudiar su ajuste a los datos experimentales.

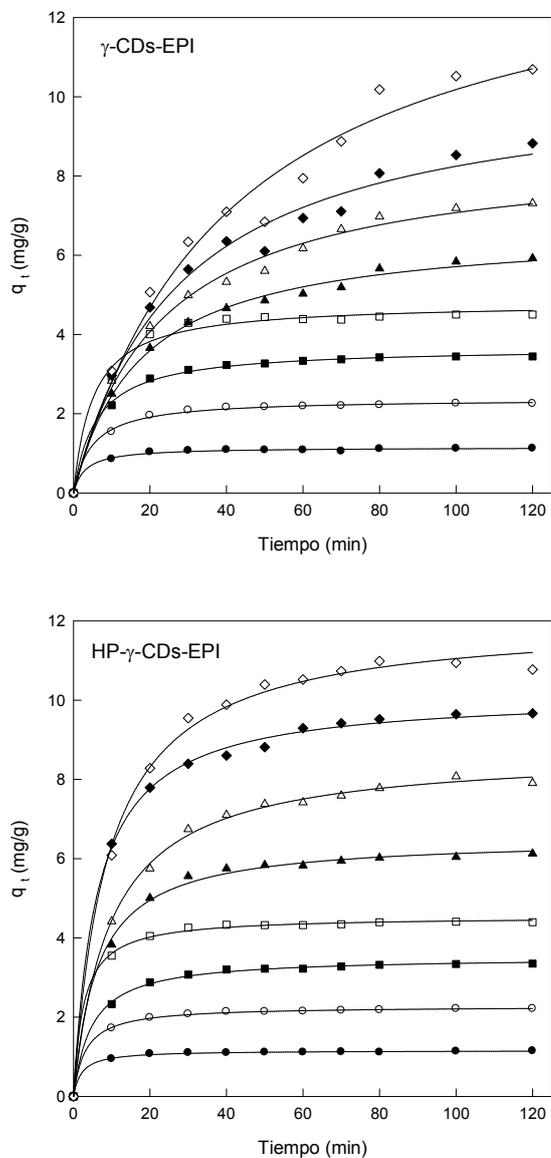


Figura 5.7. Efecto del tiempo de contacto en la cantidad de colorante absorbido por los polímeros γ -CDs-EPI e HP- γ -CDs-EPI a diferentes concentraciones 25 mg/L (●), 50 mg/L (○), 75 mg/L (■), 100 mg/L (□), 150 mg/L (▲), 200 mg/L (△), 250 mg/L (◆) y 300 mg/L (◇).

5.3.2. Cinética de absorción.

5.3.2.1. Modelo de pseudo primer orden.

La Figura 5.8, muestra el ajuste de los datos experimentales al modelo de pseudo primer orden para cada uno de los seis polímeros analizados en contacto con diferentes concentraciones de Rubí Directo. Los parámetros obtenidos para este modelo se observan en la Tabla 5.1. El ajuste de este modelo se estableció a partir del coeficiente de regresión lineal (R^2). Un valor de R^2 relativamente alto indica que los datos experimentales se ajustan de forma adecuada al modelo estudiado. En la Figura, la linealidad de la representación del $\log(q_e - q_t)$ frente al tiempo se estudió en los primeros 60 minutos de contacto. Los valores de R^2 estuvieron entre 0.777 y 0.876 para α -CDs-EPI, entre 0.904 y 0.978 para β -CDs-EPI, entre 0.853 y 0.980 para γ -CDs-EPI, entre 0.880 y 0.984 para HP- α -CDs-EPI, entre 0.950 y 0.991 para HP- β -CDs-EPI y finalmente entre 0.817 y 0.983 para HP- γ -CDs-EPI. Sin embargo, a pesar de que estos valores de R^2 son relativamente altos en algunos polímeros, el valor de q_e calculado con este modelo no se ajusta demasiado bien al valor de q_e experimental, como se observa en la Tabla 5.1. Si los datos calculados y experimentales de q_e no son similares, indica que los datos no se ajustan al modelo de pseudo primer orden de Lagergren. Si el valor que se obtiene del intercepto no es similar al $\log q_e$, la reacción no va a seguir este modelo, aunque los datos de R^2 sean elevados en algunas ocasiones. Además, el modelo de Lagergren se ajusta relativamente bien a los datos experimentales en los primeros minutos de absorción (60 min aproximadamente) momento a partir del cual los datos experimentales se alejan de los teóricos y el valor de R^2 disminuye considerablemente. Esto sugiere que el modelo de pseudo primer orden se ajusta bien en las etapas iniciales de absorción, aquellas en las que la absorción de colorante por parte del polímero es rápida. Por tanto, como algunos puntos tuvieron que obviarse para obtener un buen ajuste, este modelo no se consideró adecuado para estudiar la cinética de absorción de estos polímeros. Debido a estos resultados, se consideró apropiado estudiar el modelo de pseudo segundo orden con los datos experimentales obtenidos.

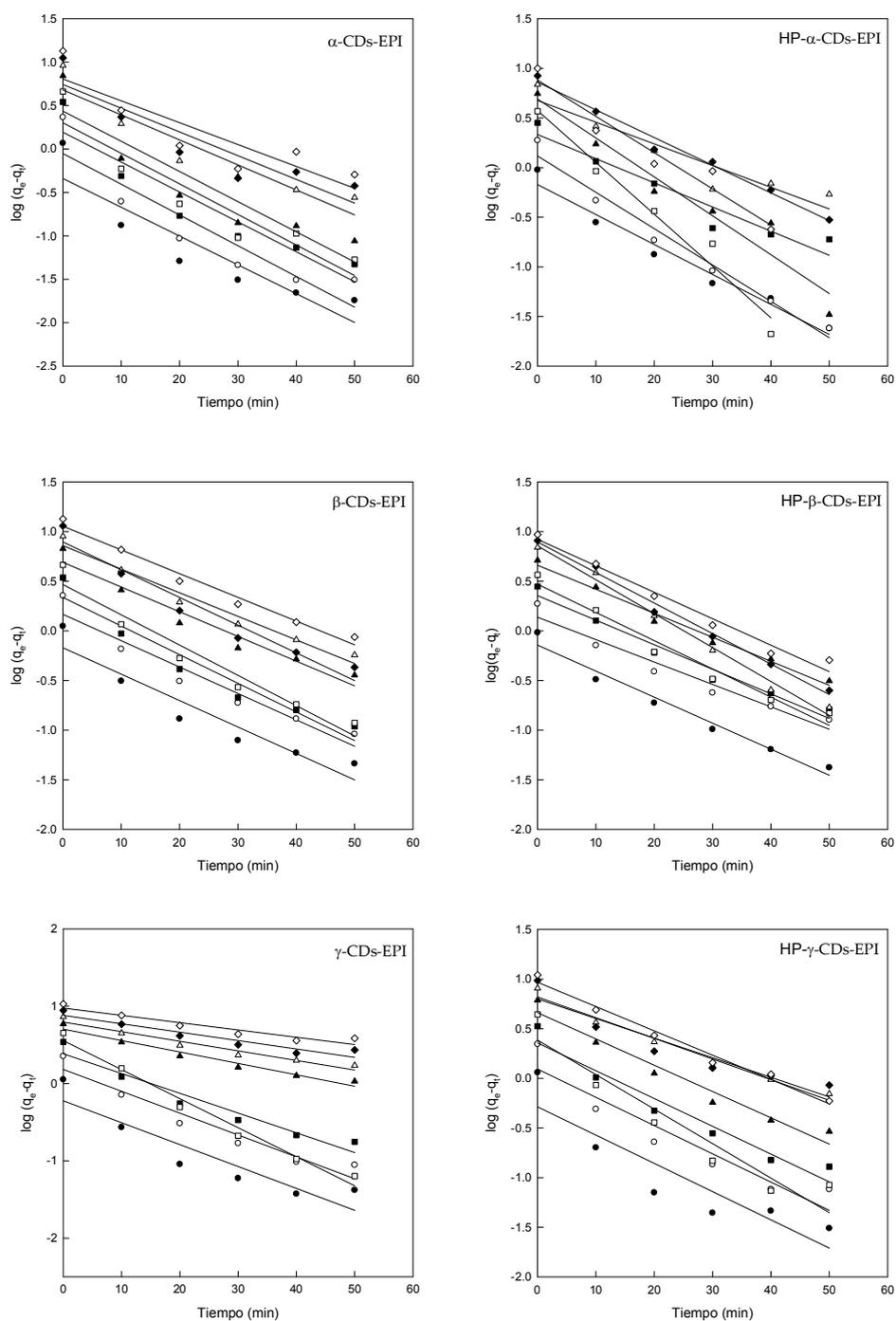


Figura 5.8. Representación gráfica del modelo cinético de pseudo primer orden para los diferentes polímeros empleados en la absorción de Rubi Directo a diferentes concentraciones 25 mg/L (●), 50 mg/L (○), 75 mg/L (■), 100 mg/L (□), 150 mg/L (▲), 200 mg/L (△), 250 mg/L (◆) y 300 mg/L (◇).

Tabla 5.1. k_1 , R^2 y valores de q experimentales y calculados mediante el modelo cinético de Lagergren para todos los polímeros usados.

		CONCENTRACIONES DE RUBÍ DIRECTO (mg/L)							
		25	50	75	100	150	200	250	300
α - EPI	k_1 (min ⁻¹)	0.076	0.081	0.079	0.080	0.080	0.066	0.062	0.058
	R^2	0.832	0.833	0.876	0.865	0.839	0.875	0.827	0.777
	q_e (exp)	1.168	2.327	3.485	4.598	6.971	9.165	11.204	13.478
	q_e (cal)	0.458	0.887	1.559	1.999	2.728	4.786	5.52	6.397
β - EPI	k_1 (min ⁻¹)	0.061	0.061	0.066	0.070	0.057	0.055	0.064	0.055
	R^2	0.904	0.934	0.93	0.943	0.948	0.968	0.944	0.978
	q_e (exp)	1.115	2.263	3.442	4.621	6.723	8.964	11.413	13.415
	q_e (cal)	0.676	1.465	2.167	2.924	4.897	7.211	7.852	11.324
γ - EPI	k_1 (min ⁻¹)	0.065	0.065	0.059	0.086	0.034	0.028	0.025	0.022
	R^2	0.853	0.935	0.941	0.980	0.962	0.947	0.905	0.909
	q_e (exp)	1.126	2.259	3.444	4.503	5.924	7.315	8.821	10.69
	q_e (cal)	0.597	1.52	2.421	3.589	5.035	6.223	7.585	9.462
HP- α - EPI	k_1 (min ⁻¹)	0.069	0.084	0.056	0.120	0.090	0.050	0.064	0.084
	R^2	0.967	0.976	0.922	0.969	0.938	0.88	0.984	0.942
	q_e (exp)	0.948	1.885	2.826	3.704	5.561	6.896	8.432	10.05
	q_e (cal)	0.676	1.309	2.152	3.749	4.897	4.742	7.244	7.603
HP- β - EPI	k_1 (min ⁻¹)	0.060	0.051	0.057	0.065	0.056	0.078	0.070	0.061
	R^2	0.970	0.950	0.969	0.967	0.985	0.990	0.991	0.977
	q_e (exp)	0.961	1.871	2.793	3.668	5.136	6.934	8.110	9.338
	q_e (cal)	0.719	1.367	2.259	2.944	4.570	6.309	7.834	8.336
HP- γ - EPI	k_1 (min ⁻¹)	0.065	0.065	0.064	0.080	0.061	0.048	0.045	0.056
	R^2	0.817	0.895	0.944	0.905	0.958	0.973	0.890	0.983
	q_e (exp)	1.146	2.213	3.352	4.408	6.129	8.076	9.667	10.985
	q_e (cal)	0.517	1.238	2.275	2.426	4.581	6.591	6.295	9.268

5.3.2.2. Modelo de pseudo segundo orden.

Como se observó en el modelo de pseudo primer orden, la representación del log $(q_e - q_t)$ frente al tiempo no mostró buenos resultados en todo el rango de medida (datos no mostrados). En la Figura 5.8 se muestran solamente los primeros 50 minutos de absorción y se observa que el modelo se ajusta perfectamente a este tiempo de contacto. La representación de t/q_t frente al tiempo dio lugar a líneas rectas en todos los casos y durante todo el rango de medida, como se observa en la Figura 5.9. Los valores de R^2 y q_e obtenidos indicaron que esta ecuación produce mejores resultados, como se observa en la Tabla 5.2. En la mayoría de los casos, los valores de R^2 obtenidos se encontraron en el rango de 0.99 o superior. Además, el valor de q_e experimental se ajustó mucho mejor al valor de q_e teórico que en el caso anterior. Estos resultados indican que el proceso de absorción en estos polímeros está regido por la cinética de pseudo segundo orden para todo el tiempo de medida, lo que apoya que se trata de un proceso de quimisorción. La absorción del colorante se produce probablemente mediante reacciones de intercambio en superficie hasta que todos los sitios funcionales en superficie quedan ocupados, de tal manera que se produce una difusión de las moléculas de colorante al interior de la red polimérica donde se producen interacciones del tipo complejos de inclusión, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.

Con el objetivo de distinguir las constantes obtenidas para los 2 modelos, k_1 y k_2 se representaron frente a la concentración inicial de colorante. Como se aprecia en las Figuras 5.10 y 5.11, en ninguno de los casos se observó una relación lineal entre la constante y la concentración de colorante. En general, a medida que aumentó la concentración de colorante en la disolución, se produjo una disminución del valor de la constante. Tal y como señala Azizian (2004), la tendencia general es que, al aumentar la concentración inicial de soluto, la correlación de los datos experimentales al modelo de pseudo primer orden aumenta, mientras que disminuye para el modelo de pseudo segundo orden. Sin embargo, una vez que se ha producido la fase de absorción rápida, es decir, a tiempos de contacto menores, el modelo de pseudo segundo orden es el que mejor se adapta ya que los datos experimentales son muy similares a los datos teóricos calculados con este modelo, mientras que esto no ocurre en el modelo de pseudo primer orden.

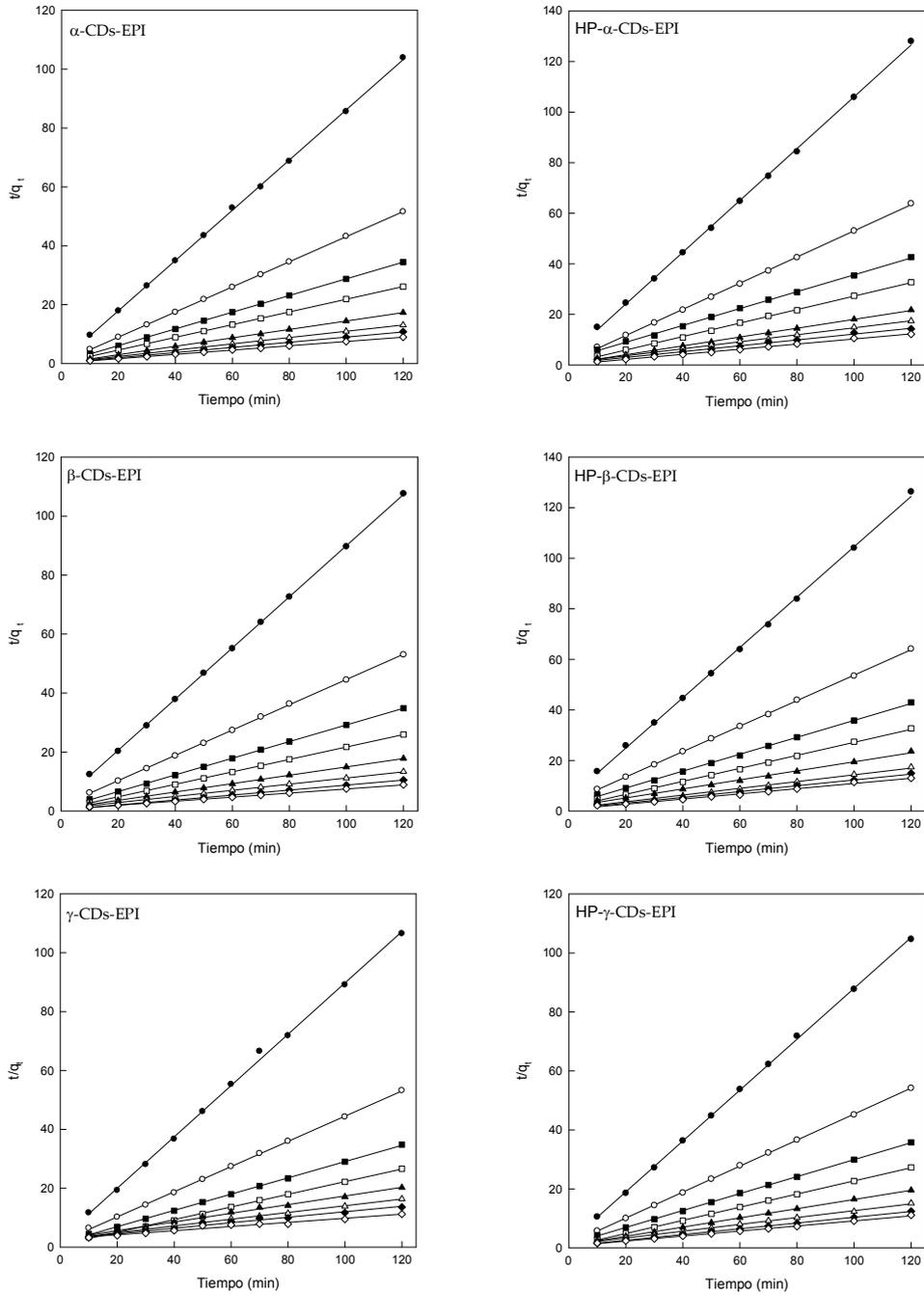


Figura 5.9. Representación gráfica del modelo cinético de pseudo segundo orden para los diferentes polímeros empleados en la absorción de Rubi Directo a diferentes concentraciones 25 mg/L (●), 50 mg/L (○), 75 mg/L (■), 100 mg/L (□), 150 mg/L (▲), 200 mg/L (△), 250 mg/L (◆) y 300 mg/L (◇).

Tabla 5.2. k_2 , R^2 y valores de q experimentales y calculados mediante el modelo cinético de pseudo segundo orden para todos los polímeros usados.

		CONCENTRACIONES DE RUBÍ DIRECTO (mg/L)							
		25	50	75	100	150	200	250	300
α - EPI	k_2 (g/mg min)	0.82	0.43	0.19	0.16	0.14	0.041	0.036	0.027
	R^2	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	q_e (exp)	1.168	2.327	3.485	4.598	6.971	9.165	11.204	13.478
	q_e (cal)	1.173	2.347	3.533	4.651	7.042	9.433	11.494	13.888
β - EPI	k_2 (g/mg min)	0.232	0.104	0.082	0.068	0.024	0.0133	0.0197	0.0082
	R^2	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998
	q_e (exp)	1.115	2.263	3.442	4.621	6.723	8.964	11.413	13.415
	q_e (cal)	1.153	2.336	3.546	4.761	7.092	9.615	11.834	14.471
γ - EPI	k_2 (g/mg min)	0.293	0.104	0.053	0.059	0.008	0.0049	0.003	0.0016
	R^2	0.998	0.999	0.999	0.999	0.996	0.995	0.983	0.966
	q_e (exp)	1.126	2.259	3.444	4.503	5.924	7.315	8.821	10.69
	q_e (cal)	1.148	2.341	3.623	4.672	6.849	8.771	10.869	14.492
HP- α - EPI	k_2 (g/mg min)	0.292	0.209	0.048	0.127	0.057	0.022	0.020	0.064
	R^2	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.995	0.998
	q_e (exp)	0.948	1.885	2.826	3.704	5.561	6.896	8.432	10.05
	q_e (cal)	0.976	1.934	3.0	3.759	5.747	7.246	8.695	9.91
HP- β - EPI	k_2 (g/mg min)	0.2	0.074	0.045	0.044	0.019	0.0176	0.0149	0.0154
	R^2	0.999	0.999	0.999	0.998	0.996	0.993	0.993	0.993
	q_e (exp)	0.961	1.871	2.793	3.668	5.136	6.934	8.110	9.338
	q_e (cal)	1.0	1.988	2.994	3.906	5.617	7.518	8.771	9.803
HP- γ - EPI	k_2 (g/mg min)	0.416	0.147	0.068	0.11	0.029	0.0125	0.0145	0.0115
	R^2	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.998
	q_e (exp)	1.146	2.213	3.352	4.408	6.129	8.076	9.667	10.985
	q_e (cal)	1.16	2.272	3.484	4.504	6.41	8.695	10.309	11.764

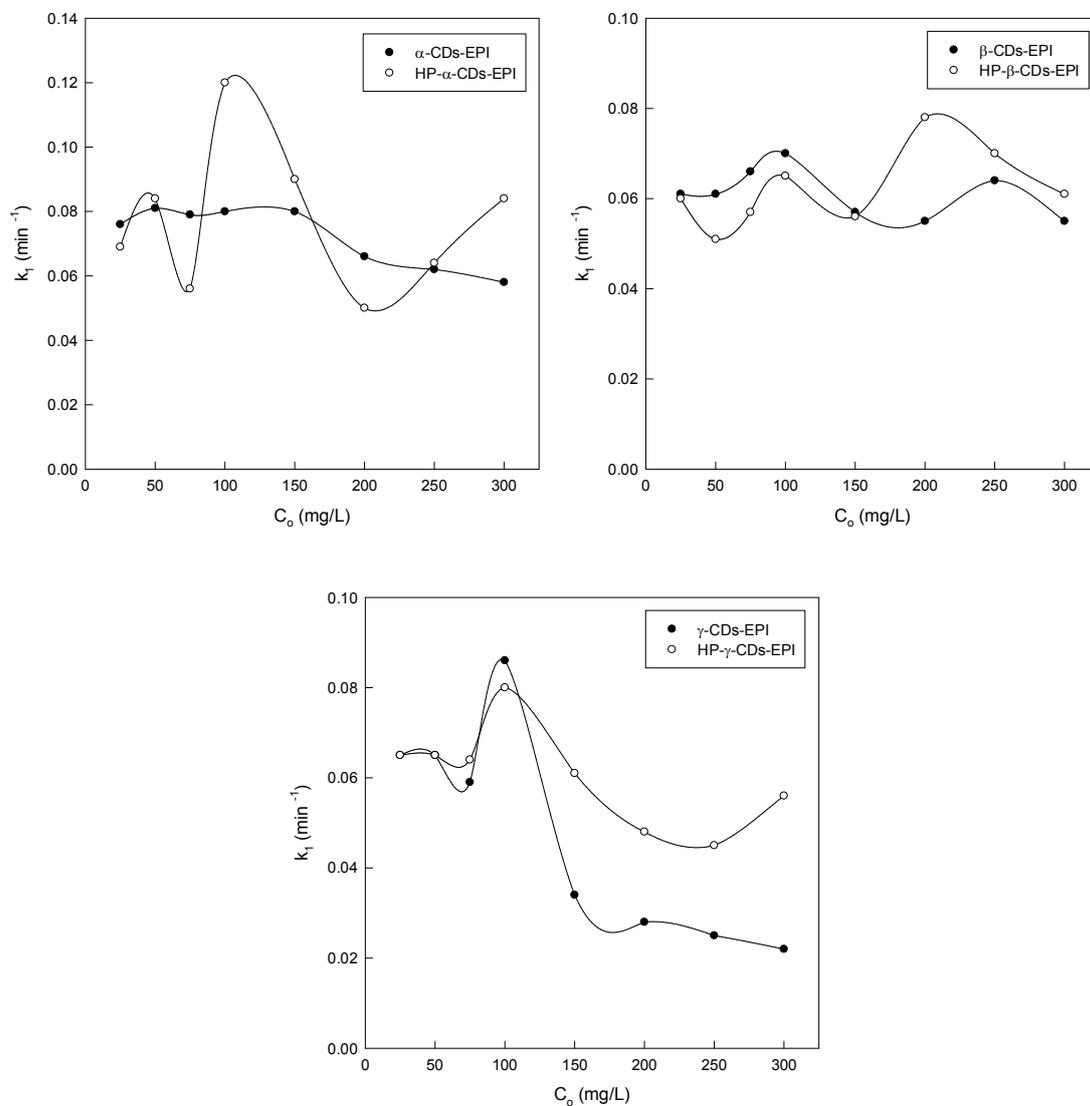


Figura 5.10. Representación de la constante k_1 frente a la concentración de colorante inicial.

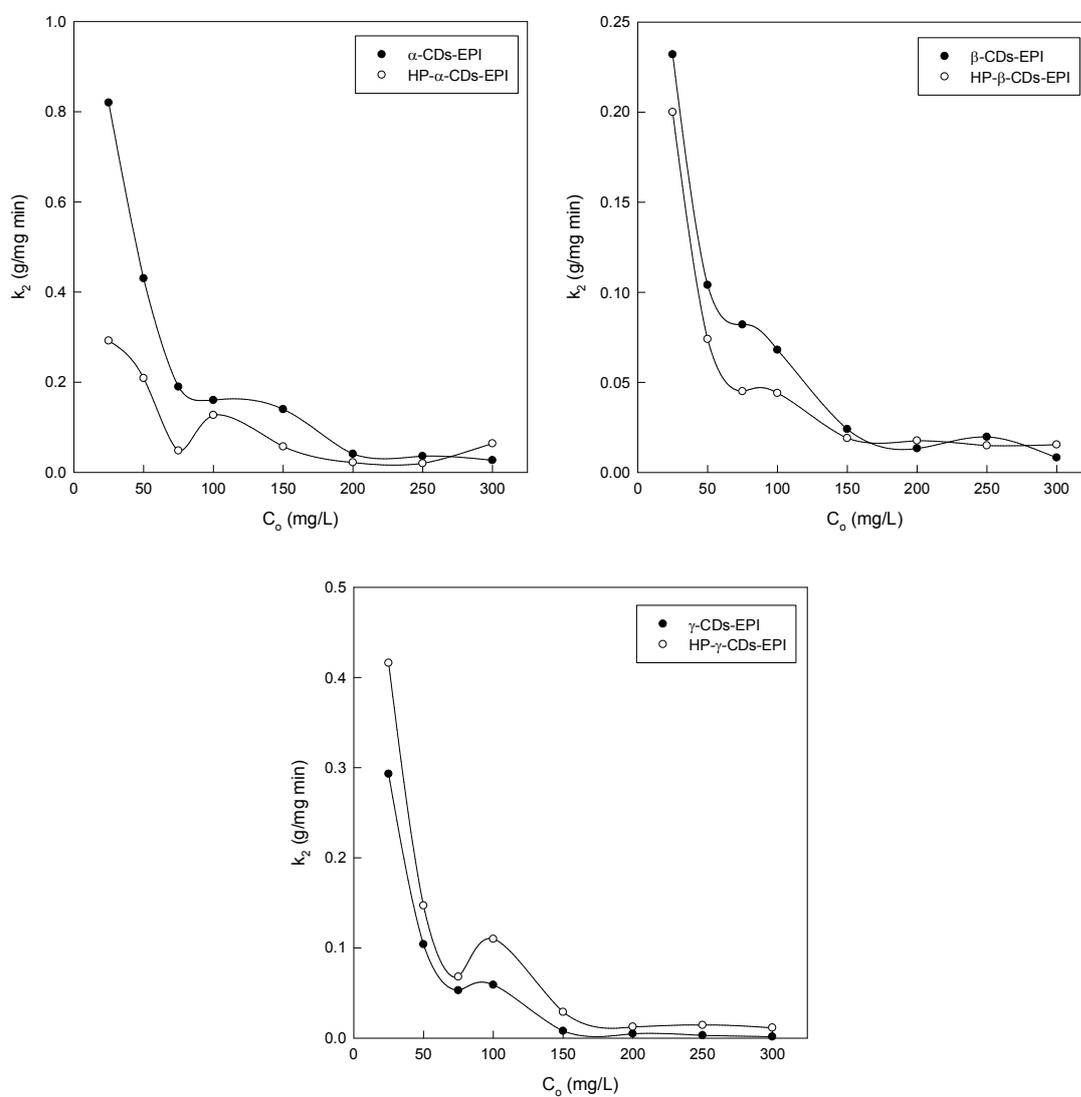


Figura 5.11. Representación de la constante k_2 frente a la concentración de colorante inicial.

La absorción es un proceso con varias etapas entre las que se incluyen el transporte de las moléculas de colorante de la fase acuosa a la superficie del polímero, seguido de una difusión de las moléculas de colorante al interior de la red de polímero. Los experimentos llevados a cabo, nos permiten estudiar si este proceso de paso del colorante a la red polimérica es el proceso que controla la velocidad del mismo. Este posible efecto se estudió gráficamente representando la cantidad de colorante absorbido frente a la raíz cuadrada del tiempo (Figura 5.12). Es lo que se conoce como modelo de difusión intrapartícula. Los resultados cinéticos de este modelo pueden ser usados para determinar si la difusión de partículas es el paso limitante de la velocidad para la absorción del colorante en el interior del polímero.

5.3.2.3. Modelo de difusión intrapartícula.

La Figura 5.12, muestra la cantidad de colorante absorbido frente a la raíz cuadrada del tiempo para los seis polímeros estudiados y las diferentes concentraciones de colorante empleadas. En el caso de α - y HP- α -CDs-EPI, las curvas obtenidas muestran dos zonas, la primera zona curvada de la representación, indica el efecto de la capa límite, mientras que la segunda zona corresponde con una zona lineal debido a la difusión intrapartícula. Se observan resultados similares en los polímeros β - e HP- β -CDs-EPI.

Las diferencias con este modelo se aprecian en los polímeros γ - y HP- γ -CDs-EPI donde se distinguen tres zonas que representan los diferentes procesos de absorción cuando la concentración inicial de colorante en la disolución fue superior a 150 mg/L. La primera fase se debe a la absorción en superficie y la rápida difusión externa (difusión de la capa límite). La segunda zona, que es lineal, indica la etapa de absorción gradual donde la difusión intrapartícula controla el proceso. La meseta final es la etapa de equilibrio, en la que la difusión intrapartícula comienza a disminuir debido a la baja concentración de colorante que queda en disolución.

La pendiente de la zona lineal da lugar a la constante de difusión intrapartícula (k_i), mientras que el intercepto de cada curva es proporcional al espesor de la capa límite. Los valores de k_i observados para cada una de las concentraciones se observan en la Tabla 5.3. En general, se observó que estos valores aumentaron a medida que aumentó la concentración de colorante. Los valores de R^2 fueron muy dispares entre sí para cada concentración y polímero.

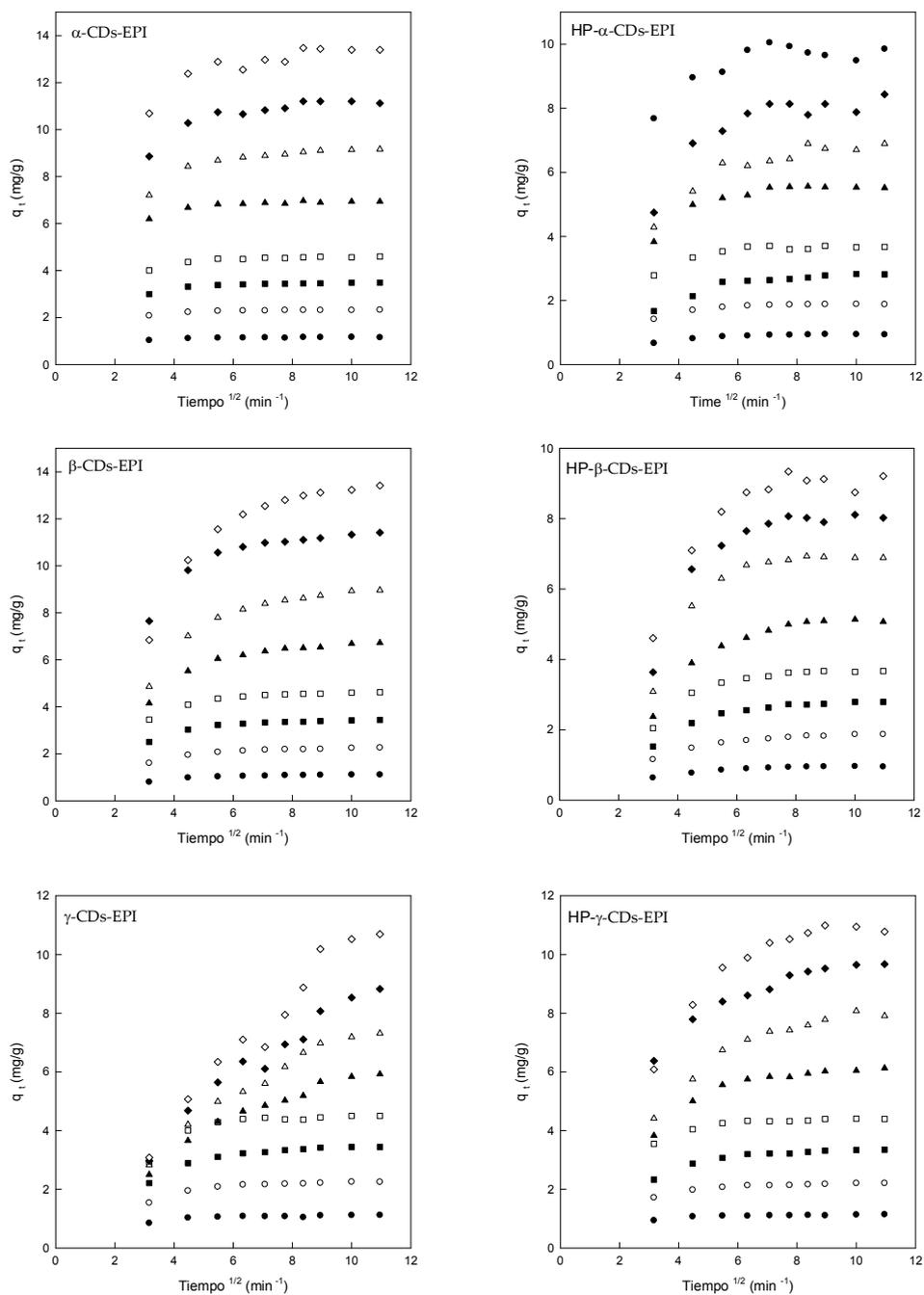


Figura 5.12. Representación gráfica del modelo de difusión intrapartícula para los diferentes polímeros empleados en la absorción de Rubí Directo a diferentes concentraciones 25 mg/L (●), 50 mg/L (○), 75 mg/L (■), 100 mg/L (□), 150 mg/L (▲), 200 mg/L (△), 250 mg/L (◆) y 300 mg/L (◇).

Sin embargo, los resultados obtenidos con este modelo no pasan por el origen, los resultados para cada polímero tienen interceptos diferentes en el rango de 1.1 y 11.9 mg/g para α -CDs-EPI, entre 0.8 y 6.7 mg/g para β -CDs-EPI, entre 0.8 y 3.1 mg/g para γ -CDs-EPI, entre 0.8 y 9.4 mg/g para HP- α -CDs-EPI, entre 0.6 y 4.8 mg/g para HP- β -CDs-EPI y entre 0.9 y 5.8 mg/g para HP- γ -CDs-EPI. Esto indica que la difusión intrapartícula está implicada en el proceso de absorción, pero no es el único mecanismo implicado, de tal manera que otros mecanismos también son importantes en el proceso. Esto confirma que el mecanismo de absorción es un proceso de varias etapas como son: la absorción en la superficie externa del polímero, la difusión al interior de la red polimérica así como intercambio iónico y formación de complejos de inclusión. Los valores de C obtenidos (q_e) informan del espesor de la capa límite, cuánto más grande es este valor C , más grande es el efecto de la capa límite. Esto significa que un aumento en el valor de C , indica qué cantidad de colorante se ha absorbido en la capa límite. Como se observa en la Tabla 5.3, este valor aumenta con la concentración de colorante, excepto en el caso de γ -CDs-EPI, en este polímero, a partir de 150 mg/L se produce una disminución del valor del intercepto. Se ha observado que las desviaciones observadas en el modelo de difusión intrapartícula principalmente ocurren a altas concentraciones de colorante. Estas desviaciones del modelo pueden deberse a la repulsión entre las moléculas de colorante y/o entre las moléculas de polímero/colorante debido a la alta densidad de concentración (Crini y Peindy, 2006).

Teniendo en cuenta los datos observados en los tres modelos cinéticos analizados, el modelo de pseudo segundo orden es el que mejor coeficiente de correlación ofrece para todos los polímeros y concentraciones analizadas así como el que mejor relación establece entre los datos de q_e obtenidos experimentalmente con los datos de q_e calculados de forma teórica.

Tabla 5.3. k_i , R^2 y valores de q experimentales y calculados con el modelo de difusión intrapartícula para todos los polímeros usados.

		CONCENTRACIONES DE RUBÍ DIRECTO (mg/L)							
		25	50	75	100	150	200	250	300
α - EPI	$k_i(\text{mg/g min}^{1/2})$	0.004	0.007	0.017	0.018	0.021	0.0886	0.102	0.148
	R^2	0.447	0.800	0.946	0.812	0.607	0.933	0.705	0.626
	q_e (exp)	1.168	2.327	3.485	4.598	6.971	9.165	11.204	13.478
	q_e (cal)	1.114	2.247	3.301	4.398	6.716	8.259	10.15	11.921
β - EPI	$k_i(\text{mg/g min}^{1/2})$	0.033	0.069	0.097	0.122	0.273	0.444	0.384	0.711
	R^2	0.730	0.751	0.708	0.708	0.745	0.760	0.698	0.75
	q_e (exp)	1.115	2.263	3.442	4.621	6.723	8.964	11.413	13.415
	q_e (cal)	0.807	1.6	2.529	3.481	4.139	4.779	7.796	6.735
γ - EPI	$k_i(\text{mg/g min}^{1/2})$	0.025	0.074	0.133	0.148	0.417	0.573	0.719	0.993
	R^2	0.622	0.701	0.747	0.575	0.931	0.952	0.959	0.960
	q_e (exp)	1.126	2.259	3.444	4.503	5.924	7.315	8.821	10.69
	q_e (cal)	0.879	1.569	2.205	3.153	1.735	1.568	1.302	0.458
HP- α - EPI	$k_i(\text{mg/g min}^{1/2})$	0.010	0.013	0.049	0.013	0.053	0.128	0.127	0.0362
	R^2	0.721	0.677	0.943	0.179	0.507	0.734	0.477	0.053
	q_e (exp)	0.948	1.885	2.826	3.704	5.561	6.896	8.432	10.05
	q_e (cal)	0.837	1.749	2.302	3.532	5.026	5.519	6.917	9.412
HP- β - EPI	$k_i(\text{mg/g min}^{1/2})$	0.037	0.082	0.138	0.166	0.298	0.382	0.440	0.471
	R^2	0.77	0.816	0.74	0.661	0.726	0.606	0.615	0.633
	q_e (exp)	0.961	1.871	2.793	3.668	5.136	6.934	8.110	9.338
	q_e (cal)	0.613	1.094	1.513	2.16	2.379	3.506	4.111	4.879
HP- γ - EPI	$k_i(\text{mg/g min}^{1/2})$	0.019	0.052	0.109	0.086	0.243	0.421	0.393	0.551
	R^2	0.667	0.748	0.737	0.649	0.729	0.832	0.865	0.761
	q_e (exp)	1.146	2.213	3.352	4.408	6.129	8.076	9.667	10.985
	q_e (cal)	0.959	1.719	2.329	3.611	3.831	3.958	5.897	5.818

5.3.3. Equilibrio de absorción.

La distribución de colorante entre el polímero y la disolución en el equilibrio se estudió mediante diferentes modelos. Algunos de los modelos más comunes y empleados para este estudio son las isothermas de Freundlich, Langmuir y Temkin.

5.3.3.1. Isotherma de Freundlich.

La representación del $\ln q_e$ frente al $\ln C_e$ da lugar a la representación gráfica de la isoterma de Freundlich. En los seis polímeros estudiados se obtuvo una representación lineal de esta isoterma como se observa en la Figura 5.13. A partir de la línea recta obtenida se calculan los parámetros K_F , n_F y el coeficiente de correlación R^2 .

Para α -CDs-EPI, el valor de la constante de Freundlich (K_F) fue 0.838 (L/g), mientras que para HP- α -CDs-EPI el valor fue 1.082 (L/g). En el caso de los polímeros preparados con β -CDs y su forma modificada, los valores de K_F fueron 0.511 y 0.272 (L/g) respectivamente. Por lo que respecta a γ - y HP- γ -CDs-EPI, los valores fueron 0.992 y 0.818 (L/g) respectivamente (Tabla 5.4).

Además de este parámetro, también se calcula a partir de la representación, el valor del exponente de la isoterma de Freundlich (n_F), para α -CDs-EPI fue 1.207, para HP- α -CDs-EPI 3.086, para β -CDs-EPI 1.028, para HP- β -CDs-EPI 1.305, para γ -CDs-EPI 1.893 y finalmente para HP- γ -CDs-EPI fue 1.626 (Tabla 5.4). Cuando el valor del exponente de Freundlich se encuentra entre 1 y 10 indica que el proceso de absorción es favorable, aspecto que queda confirmado con los resultados obtenidos, ya que en todos los casos el valor de n_F fue superior a 1.

Finalmente, respecto al coeficiente de correlación (R^2) observado para cada uno de los polímeros los resultados fueron: para α -CDs-EPI fue 0.989, para HP- α -CDs-EPI 0.980, para β -CDs-EPI 0.971, para HP- β -CDs-EPI 0.991, para γ -CDs-EPI 0.920 y finalmente para HP- γ -CDs-EPI fue 0.982 (Tabla 5.4). El ajuste de los datos experimentales a este modelo es bueno ya que los valores de R^2 oscilaron entre 0.920 y 0.991.

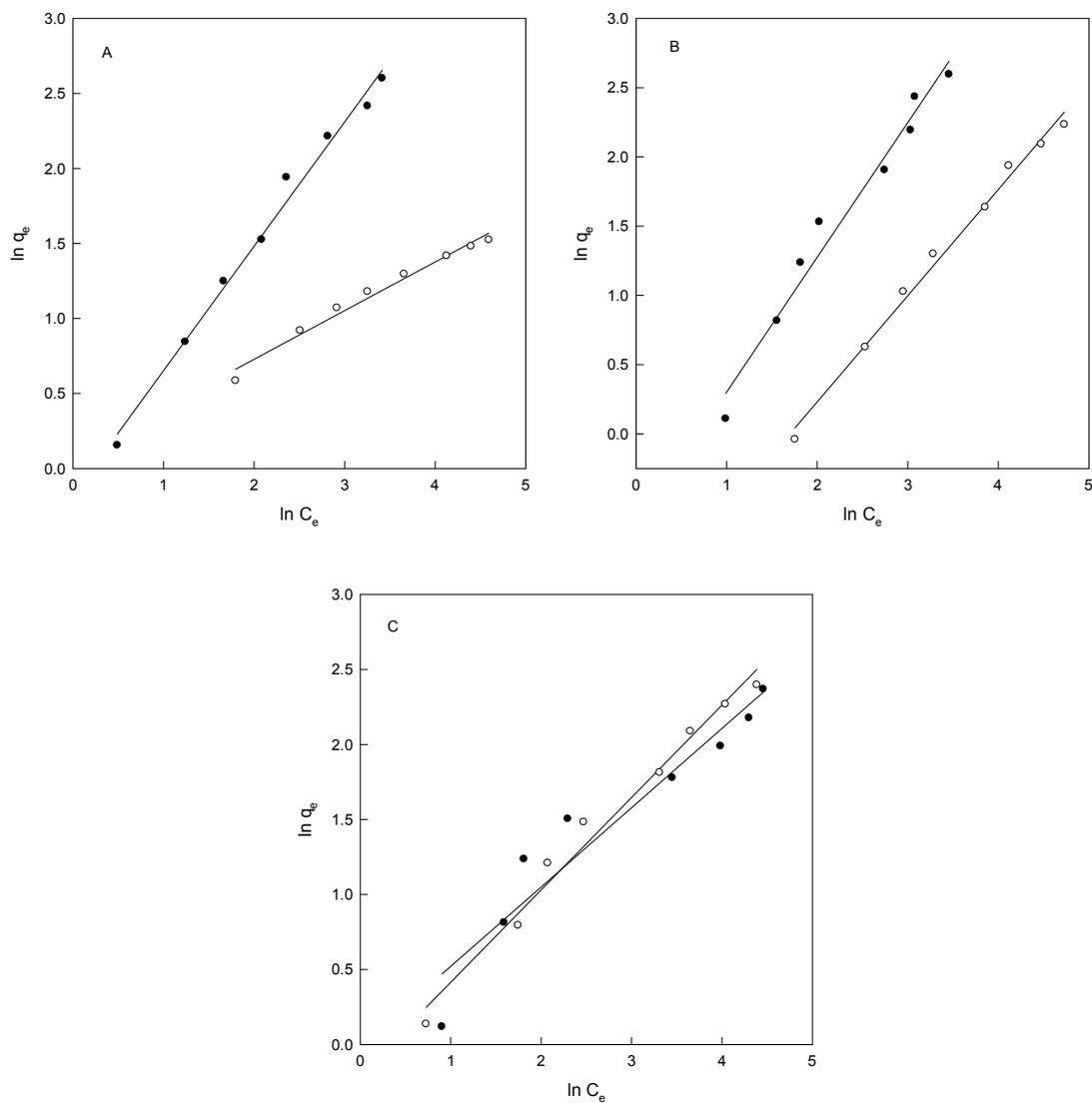


Figura 5.13. Representación gráfica de la isoterma de Freundlich. (A) α -CDs-EPI (●), HP- α -CDs-EPI (○). (B) β -CDs-EPI (●), HP- β -CDs-EPI (○). (C) γ -CDs-EPI (●), HP- γ -CDs-EPI (○).

5.3.3.2. Isoterma de Langmuir.

Los datos experimentales obtenidos también se ajustaron a la isoterma de Langmuir. La representación de C_e/q_e frente a C_e dio lugar a una línea recta en todos los casos, cuya pendiente fue a_L/K_L , el intercepto fue $1/K_L$ y en la que K_L/a_L da lugar a un parámetro que se denomina q_{max} , que es la máxima capacidad de absorción del polímero (mg/g) (Figura 5.14). Todas las constantes obtenidas para la isoterma de Langmuir se observan en la Tabla 5.4. De todos los parámetros obtenidos mediante la isoterma de Langmuir, uno de los que más información proporciona es q_{max} , que se obtiene de dividir las dos constantes del modelo (K_L y a_L).

Comparando el valor de q_{max} entre α -CDs-EPI y HP- α -CDs-EPI, observamos que fue 31.50 y 23.41 mg/g. De tal manera que α -CDs-EPI presenta mejor capacidad de absorción de RD que su forma modificada. Por lo que respecta a β -CDs-EPI y HP- β -CDs-EPI, los valores fueron 107.52 y 18.16 mg/g respectivamente lo que indica que nuevamente la forma natural tiene mejor capacidad de absorción que su forma modificada. Finalmente, la capacidad de absorción de los polímeros preparados con γ -CDs fue similar ya que en el caso de la forma nativa fue 11.92 mg/g y en el de la forma modificada 14.60 mg/g. Estos valores de q_{max} son del mismo orden que otros polímeros que se encuentran descritos en la literatura científica (Kumar, Sivanesan y Ramamurthi 2005). Por lo que respecta a los valores de R^2 , son similares a los obtenidos con la isoterma de Feundlich aunque en general son menores, lo que indica que los datos se ajustan peor a la isoterma de Langmuir.

El análisis de la influencia de la isoterma de Langmuir en si el proceso de absorción es favorable o desfavorable, se lleva a cabo mediante el estudio de una constante adimensional denominada factor de separación (R_L). Se ha observado que valores de R_L que se encuentren en el rango entre 0 y 1 confirman que el proceso de absorción de colorante por parte del polímero es un proceso favorable. Los resultados de R_L obtenidos para los seis polímeros se observan en la Figura 5.15. En todos los casos, los valores oscilaron entre 0 y 1 indicando que el proceso fue favorable. En la Figura 5.15, también se observa que los valores más elevados de R_L se corresponden con las concentraciones más bajas de colorante en disolución, lo que señala que la absorción es más favorable a bajas concentraciones.

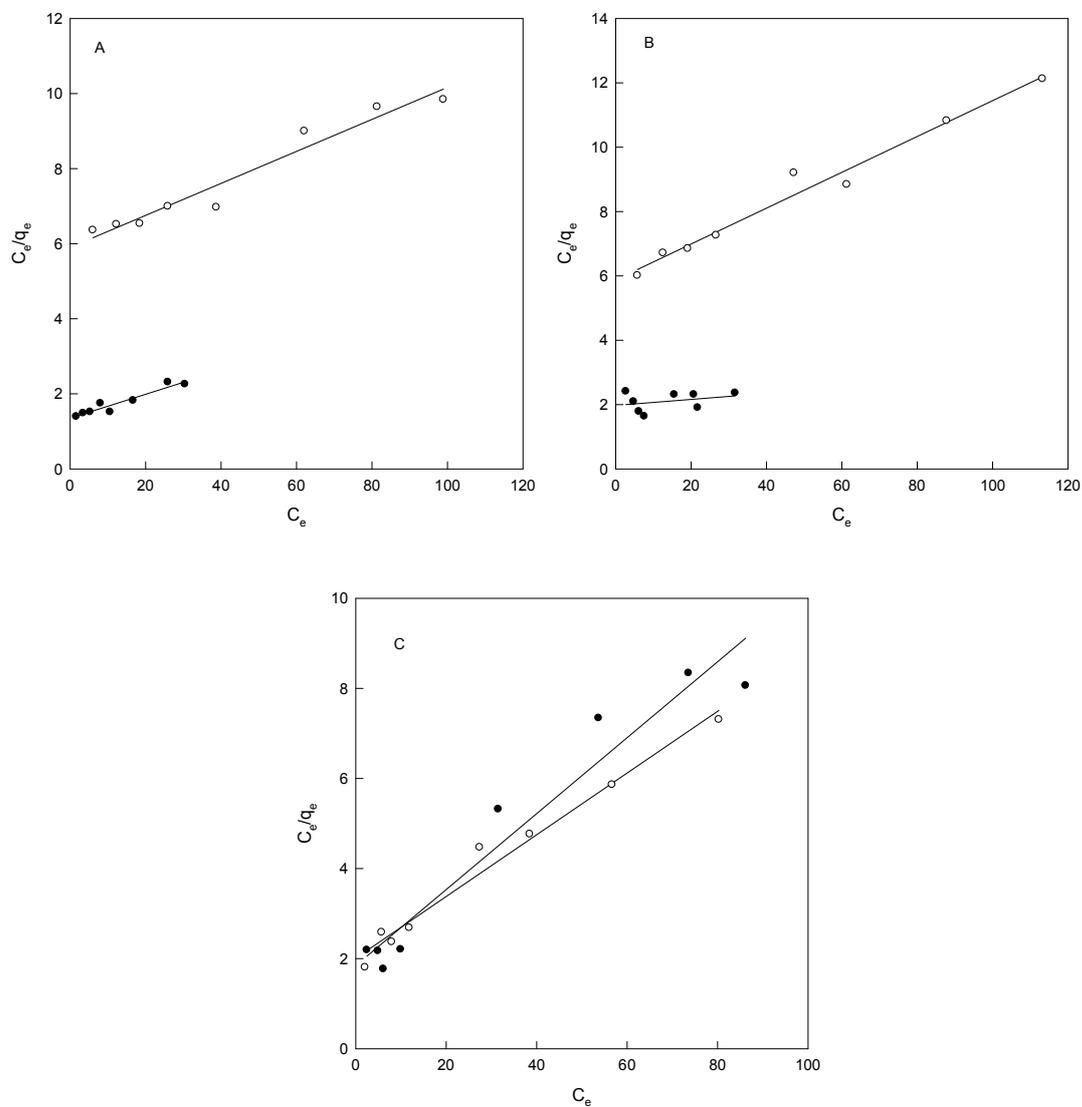


Figura 5.14. Representación gráfica de la isoterma de Langmuir. (A) α -CDs-EPI (●), HP- α -CDs-EPI (○). (B) β -CDs-EPI (●), HP- β -CDs-EPI (○). (C) γ -CDs-EPI (●), HP- γ -CDs-EPI (○).

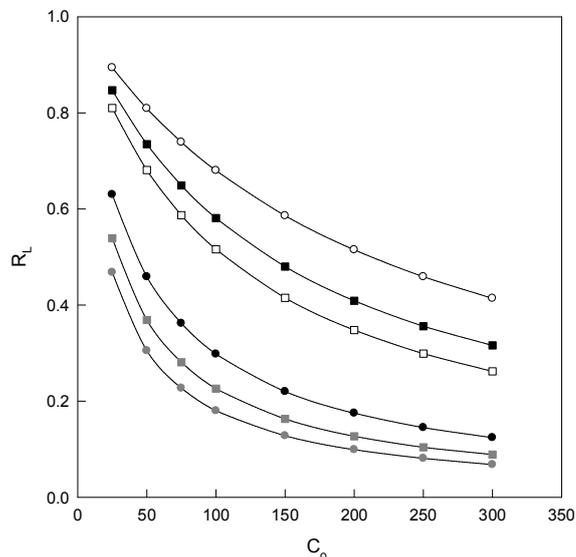


Figura 5.15. Factor de separación observado en los seis polímeros. α -CDs-EPI (●), HP- α -CDs-EPI (■), β -CDs-EPI (○), HP- β -CDs-EPI (□), γ -CDs-EPI (●), HP- γ -CDs-EPI (■).

La energía libre (ΔG) del proceso de absorción a 25 °C se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_L \quad (5.16)$$

donde T es la temperatura (K), R es la constante de los gases (8.314 J mol/K) y K_L es la constante de Langmuir. Los valores de ΔG calculados usando esta ecuación fueron: -0.746 kJ/mol para α -CDs-EPI, 4.40 kJ/mol para HP- α -CDs-EPI, -1.68 kJ/mol para β -CDs-EPI, 4.38 kJ/mol para HP- β -CDs-EPI, 1.52 kJ/mol para γ -CDs-EPI y 1.72 para HP- γ -CDs-EPI. Los valores negativos de energía libre indican que el proceso de absorción por parte del polímero es espontáneo y esto confirma la afinidad del polímero por dicho colorante. Estos valores negativos se observan en el caso de α -CDs-EPI y β -CDs-EPI.

Tabla 5.4. Valores obtenidos con el estudio de las diferentes isotermas para cada uno de los polímeros.

Isoterma	Parámetros	α -EPI	HP- α -EPI	β -EPI	HP- β -EPI	γ -EPI	HP- γ -EPI
Freundlich	K_F	0.838	1.082	0.511	0.272	0.992	0.818
	n_F	1.207	3.086	1.028	1.305	1.893	1.626
	R^2	0.989	0.980	0.971	0.991	0.920	0.982
Langmuir	q_{max}	31.5	23.41	107.52	18.16	11.92	14.6
	K_L	0.74	0.169	0.506	0.17	0.541	0.498
	a_L	0.0235	0.00721	0.0047	0.00936	0.0454	0.0341
	ΔG	-0.746	4.40	-1.68	4.38	1.52	1.72
	R^2	0.913	0.950	0.105	0.976	0.942	0.977
	R_L	0.629- 0.124	0.847- 0.316	0.894- 0.414	0.810- 0.262	0.468- 0.068	0.539- 0.089
Temkin	a_T	0.540	0.157	0.359	0.167	0.604	0.480
	b_T	0.586	0.765	0.500	0.853	1.053	0.890
	R^2	0.931	0.944	0.929	0.945	0.946	0.955

5.3.3.3. Isoterma de Temkin.

Finalmente, los datos experimentales de equilibrio se analizaron mediante la isoterma de Temkin para estudiar su ajuste a esta isoterma. La ecuación de la isoterma de Temkin asume que el calor de absorción de todas las moléculas en la capa disminuye linealmente con la cobertura debido a las interacciones entre polímero y colorante, así como que la absorción está caracterizada por una distribución uniforme de las energías de enlace, hasta un máximo de energía de enlace.

La representación gráfica de q_e frente a $\ln C_e$ (Figura 5.16) permite obtener la forma lineal de la isoterma de Temkin así como los parámetros b_T y a_T a partir de la pendiente y el intercepto respectivamente. Los parámetros obtenidos con la isoterma de Temkin así como los valores del coeficiente de regresión se observan en la Tabla 5.4.

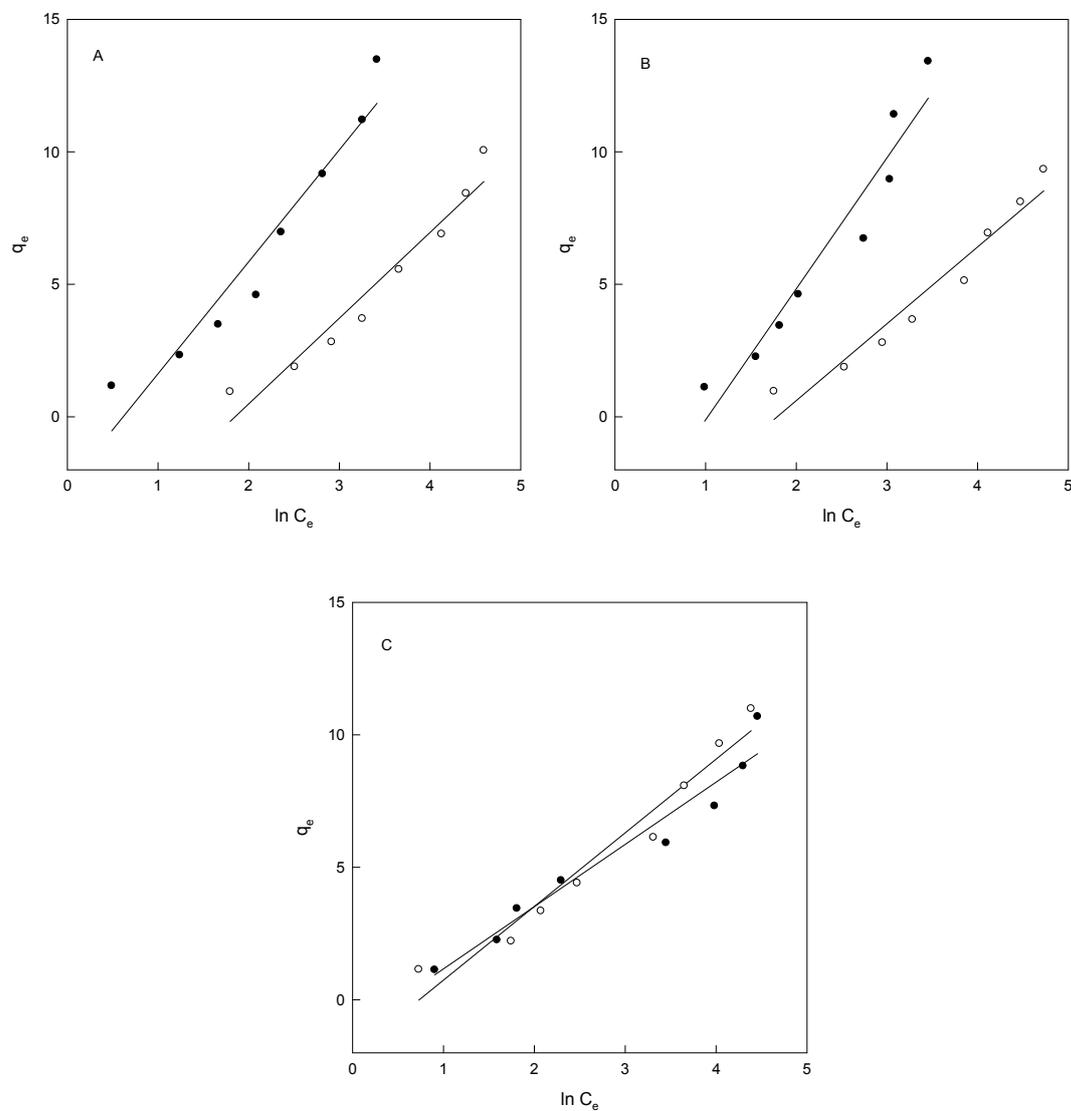


Figura 5.16. Representación gráfica de la isoterma de Temkin. (A) α -CDs-EPI (●), HP- α -CDs-EPI (○). (B) β -CDs-EPI (●), HP- β -CDs-EPI (○). (C) γ -CDs-EPI (●), HP- γ -CDs-EPI (○).

A partir de la isoterma de Temkin, el rango de energías de enlace para el mecanismo de intercambio iónico se ha descrito que se encuentra en el rango entre 8 y 16 kJ/mol, mientras que el proceso de físico absorción presenta valores de energía inferiores a -40 kJ/mol (Hu y col., 2011). Los valores de b_T obtenidos

para los diferentes polímeros fueron: 0.586 kJ/mol para α -CDs-EPI, 0.765 kJ/mol para HP- α -CDs-EPI, 0.500 kJ/mol para β -CDs-EPI, 0.853 kJ/mol para HP- β -CDs-EPI, 1.053 kJ/mol para γ -CDs-EPI y 0.890 kJ/mol para HP- γ -CDs-EPI. Estos valores indican que en el proceso de absorción están implicados tanto procesos físicos como de quimisorción.

Por lo que respecta a los valores de R^2 obtenidos con el modelo de Temkin, los valores oscilaron entre 0.929 y 0.955. Estos resultados indican que el ajuste de los datos experimentales con este modelo es bueno y similar al obtenido con Langmuir, pero es la isoterma de Freundlich la que mejor ajusta los datos experimentales obtenidos al modelo.

VI. CONCLUSIONES

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. Queda demostrado en POD de lombarda y col blanca, que las CDs no actúan directamente sobre los grupos funcionales de los aminoácidos de estas enzimas, que son las responsables del pardeamiento de frutas y hortalizas. La acción inhibidora que muestran las CDs sobre esta actividad enzimática se debe al atrapamiento del sustrato en la cavidad interna de las CDs, retirándolo así del medio de reacción. El estudio de esta inhibición sirve como método para calcular la constante de complejación entre un sustrato concreto y un tipo de CDs.

La diferente naturaleza de las dos isoenzimas estudiadas en lombarda y en col blanca, una soluble (con superficie hidrofílica) y otra ligada a membrana (con superficie hidrofóbica), no implica diferente comportamiento para interaccionar con las CDs. A pesar de que sí mostraron diferencias en cuanto a parámetros cinéticos o termoestabilidad.

2. La presencia de CDs como complemento en la mezcla de agentes encapsulantes de aroma de fresa, tiene un efecto protector sobre los componentes volátiles del aroma durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. Este efecto protector es dependiente del compuesto analizado y de la técnica de secado utilizada en el proceso de encapsulación, siendo la técnica de lecho fluido la que más lo evidencia. En el caso del aroma de fresa, el compuesto mejor protegido por las CDs es alcohol bencílico.

3. Los polímeros de CDs y EPI pueden utilizarse con éxito en la eliminación del colorante Rubí Directo de aguas residuales de tintado de textiles. Los estudios cinéticos demuestran que el proceso de absorción de Rubí Directo por los distintos polímeros de CDs estudiados, es rápido y uniforme y en él están implicados la quimisorción y la difusión intrapartícula. Este es un proceso complejo en el que intervienen, además de la presencia de CDs para formar complejos de inclusión, interacciones de intercambio iónico por la presencia de grupos carboxilo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acar, B., Sadikoglu, H., Doymaz, I. (2015). Freeze-drying kinetics and diffusion modeling of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 142-149.
- Agrawal, P.B., Ali, K., & Warmoeskerken, M.M.C.G. (2010). Inkjettable β -cyclodextrin based release system for cotton textiles, in Autex 2010 World Textile Conference. Vilnius, Lithuania.
- Aguiar-Rocha, G., Fávaro-Trindade, C.S., Ferreira-Grosso, C.R. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 37-42.
- Ahuja, I., Rohloff, J., Bones, A. M. (2010). Defense mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 311-348.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. *LWT—Food Science and Technology*, 43, 837–842.
- Ajila, C.M., & Prasada Rao, U.J.S. (2009). Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 60, 36-44.
- Almenar, E., Auras, R., Rubino, M., Harte, B. (2007). A new technique to prevent the main post harvest diseases in berries during storage: inclusion complexes β -cyclodextrin-hexanal. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 164–172.
- Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J.D., Shirai, K. (2009). Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydrate Polymers*, 77, 536–543.

- Andreas, J., Dalmolin, M.C., de Oliveira, I.B. Barcellos, I.O (2010). Applications of cyclodextrins in textil processes. *Quimica Nova*, 33, 929-937.
- Anthon, G.E. & Barrett, D.M. (2002). Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4119-4125.
- Arima, H., Motoyama, K., Irie, T. (2011). Recent findings on safety profiles of cyclodextrins, cyclodextrin conjugates, and polypseudorotaxanes. In: Bilensoy, E. (Ed.), *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*. Wiley, Hoboken. Chapter 5.
- Astray, G., González-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23, 1631-1640.
- Atteia, O., Estrada, E.D. Bertin, H. (2013). Soil flushing: a review of the origin of efficiency variability. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 379-389.
- Ávila, C., Bayona, J.M., Martín, I., Salas, J.J., García, J. (2015). Emerging organic contaminant removal in a full-scale hybrid constructed wetland system for wastewater treatment and reuse. *Ecological Engineering*, 80, 108-116.
- Awad, A.C., Bennink, M.R., Smith, D.M. (1997). Composition and functional properties of cholesterol reduced egg yolk. *Poultry Science*, 76, 649-653.
- Ayala-Zavala, J.F., Del-Toro-Sánchez, L., Álvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A. (2008). High relative humidity in-package of fresh-cut fruits and vegetables: advantage or disadvantage considering microbiological problems and antimicrobial delivering systems? *Journal of Food Science*, 73, 41-47.
- Azizian, S. (2004). Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 276, 47-52.
- Bae, H.Y., Kim, S.Y., Kwak, H.S. (2008). Comparison of cholesterol-reduced Camembert cheese using cross-linked β -cyclodextrin to regular Camembert cheese during storage. *Milchwissenschaft*, 63, 153-156.
- Bagheri, L., Madadlou, A., Yarmand, M., Mousavi, M.E. (2014). Spray-dried alginate microparticles carrying caffeine-loaded and potentially bioactive nanoparticles. *Food Research International*, 62, 1113-1119.

- Barros, F.A.R.d., & Stringheta, P.C. (2006). Microencapsulamento de antocianinas- uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimenticio. *Biotechnologia Ciencia e Desenvolvimento*, 36, 18-24.
- Bernardes, A., Textor, L.C., Santos, J.C., Cuadrado, N.H., Kostetsky, E.Y., Roig, M. G., Bavro, V.N. Muniz, J.R.C., Shnyrov, V.L., Polikarpov, I. (2015). Crystal structure analysis of peroxidase from the palm tree *Chamaerops excelsa*. *Biochimie*, 111, 58-69.
- Bhaskara-Amrit, U.R., Agrawal, P.B., Warmoeskerken, M.M.C.G. (2011). Applications of beta-cyclodextrins in textiles. *Autex Research Journal*, 11, 94-101.
- Bhatia, M., Ahuja, M., Mehta, H. (2015). Thiol derivatization of Xanthan gum and its evaluation as a mucoadhesive polymer. *Carbohydrate Polymers*, 131, 119-124.
- Bhattacharya, A., Li, Y., Wade, K.L., Paonessa, J.D., Fahey, J.W., Zhang, Y. (2010). Allyl isothiocyanate-rich mustard seed powder inhibits bladder cancer growth and muscle invasion. *Carcinogenesis*, 31, 2105–2110.
- Bhusari, S.N., Muzaffar, K., Kumar, P. (2014). Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technology*, 266, 354-364.
- Bilensoy, E. (2011). *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics and Biomedicine. Current and Future Industrial Applications*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ.
- Bilensoy, E., & Hincal, A.A. (2009). Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6, 1161-1173.
- Bimbenet, J.J., Bonazzi, C., Dumoulin, E. (2002). Drying of foodstuffs. Drying'2002 – In: *Proceeding of the 13th international drying symposium* pp. 64–80.
- Binello, A., Cravotto, G., Nano, G.M., Spagliardi, P. (2004). Synthesis of chitosan-cyclodextrin adducts and evaluation of their bitter-masking properties. *Flavour Fragrance Journal*, 19, 394–400.
- Binello, A., Robaldo, B., Barge, A., Cavalli, R., Cravotto, G. (2008). Synthesis of cyclodextrin-based polymers and their use as debittering agents. *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 2549–2557.

- Björkman, M., Klingen, I., Birch, A. N. E., Bones, A. M., Bruce, T. J. A., Johansen, T. J., Meadow, R., Molmann, J., Seljasen, R., Smart, L. E., Stewart, D. (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health-Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, 72, 538-556.
- Bodor, N., Drustrup, J., Wu, W. (2000). Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of a novel soft corticosteroid, loteprednol etabonate. *Pharmazie*, 55, 206-209.
- Bonomo, R., Cucinotta, V., Alessandro, F., Impellizzeri, G., Maccarrone, G., Rizzarelli, E., Vecchio, G. (1993). Coordination properties of 6-deoxy-6-[1-(2-amino) ethylamino]- β -cyclodextrin and the ability of its copper(II) complex to recognize and separate amino acid enantiomeric pairs. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 15, 167-180.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 1604-1607.
- Borges, A., Serra, S., Cristina-Abreu, A., Saavedra, M.J., Salgado, A., Simoes, M. (2014). Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and in vitro cytotoxicity. *Biofouling*, 30, 183-195.
- Borgogna, M., Bellich, B., Cesàro, A. (2011). Marine polysaccharides in microencapsulation and application to aquaculture: "From sea to sea". *Marine Drugs*, 9, 2572-2604.
- Borreguero, A.M., Valverde, J.L., Rodríguez, J.F., Barber, A.H., Cubillo, J.J., Carmona, M. (2011). Synthesis and characterization of microcapsules containing Rubitherm®RT27 obtained by spray drying. *Chemical Engineering Journal*, 166, 384-390.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brandariz, I., & Iglesias, E. (2013). Local anesthetics: acid-base behaviour and inclusion with cyclodextrins. *Current Organic Chemistry*, 17, 3050-3063.
- Brewster, M.E., & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645-666.

- Brillas, E., & Martínez-Huitle, C.A. (2015). Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 166, 603-643.
- Buffo, R.A., Probst, K., Zehentbauer, G., Luo, Z., Reineccius, G.A. (2002). Effects of agglomeration on the properties of spray-dried encapsulated flavours. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 292-299.
- Buffo, R.A. & Reineccius, G.A. (2001). Comparison among assorted drying processes for the encapsulation of flavors. *Perfumer and Flavorist*, 26, 58-67.
- Bule, M.V., Singhal, R.S., Kennedy, J.F. (2010). Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improve stability. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1290-1296.
- Buschmann, H.J., & Schollmeyer, E. (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *Journal of Cosmetic Science*, 53, 185-192.
- Busto, M.D., Owusu-Apenten, R.K., Robinson, D.S., Wu, Z., Casey, R., Hughes, R. K. (1999). Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermal stability. *Food Chemistry*, 65, 323-329.
- Cabanes, J., Escribano, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Jiménez-Atiénzar, M. (2007). Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. cv. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bounds forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10446-10451.
- Cabral-Marques, H.M. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 313-326.
- Cai, Y.Z., & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Sciences*, 65, 1248-1252.
- Cai, Y., Gaffney, S.H., Lilley, T.H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C.M., Haslam, E. (1990). Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions*, 2, 2197-2209.
- Caliceti, P., Salmaso, S., Bersani, S. (2010). Polysaccharide-based anticancer prodrugs. In *Macromolecular Anticancer Therapeutics*; Reddy, L. H., Couvreur, P., Eds.; Springer: New York, p 163.

- Carneiro, H.C.F., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115, 443-451.
- Carvalho, A.G.S., Silva, V.M., Hubinger, M.D. (2014). Microencapsulation by spray drying of emulsified green coffee oil with two-layered membranes. *Food Research International*, 61, 236-245.
- Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B.E., Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT-Food Science and Technology*, 62, 242-248.
- Cevallos, P.A.P., Buera, M.P., Elizalde, B.E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99, 70-75.
- Cheginí, G.R., & Ghobadian, B. (2007). Spray dryer parameters for fruit juice drying. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3, 230-236.
- Chen, C., Chi, Y.J., Xu, W. (2012). Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2342-2352.
- Chen, H., Zhang, Y., Zhong, Q. (2015). Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering*, 144, 93-102.
- Chilajwar, S.V., Pednekar, P.P., Jadhav, K.R., Gupta, G.J.C., Kadam, V.J. (2014). Cyclodextrin-based nanosponges: a propitious platform for enhancing drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11, 111-120.
- Chisari, M., Barbagallo, R.N., Spagna, G. (2007). Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stores strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3469-3476.
- Chisari, M., Bargallo, P., Spagna, G. (2008). Characterization and role of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fres-cut melon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 132-138.

- Choi, S.J., & Geckeler, K.E. (2007). A novel polycondensate containing cyclodextrin and lactose: Synthesis, metal-complexing properties, and degradation. *Polymer*, 48, 1445–1449.
- Coleman, A.W., Nicolis, I., Keller, N., Dalbiez, J.P. (1992). Aggregation of cyclodextrins: an explanation of the abnormal solubility of β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 13, 139–143.
- Concheiro, A., & Álvarez-Lorenzo, C. (2013). Chemically cross-linked and grafted cyclodextrin hydrogels: from nanostructures to drug-eluting medical devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1188–1203.
- Correa-Betanzo, J., Padmanabhan, P., Corredig, M., Subramanian, J., Paliyath, G. (2015). Complex formation of blueberry (*Vaccinium angustifolium*) anthocyanins during freeze drying and its influence on their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 2935–2946.
- Costa, P., Medronho, B., Gonçalves, S., Romano, A. (2015). Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. *Industrial Crops and Products*, 70, 341–346.
- Cramer, F. (1952). Einschlußverbindungen. *Angewandte Chemie*, 64, 437–447.
- Cramer, F., Saenger, W., Spatz, H.C. (1967). Inclusion compounds. XIX.^{1a} The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics. *Journal of the American Chemical Society*, 89, 14–20.
- Cravotto, G., Binello, A., Baranelli, E., Carraro, P., Trotta, F. (2006). Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Current Nutrition and Food Science*, 2, 343–350.
- Criado, M. N., Martínez, A., Rodrigo, D. (2016). Control of polyphenoloxidase and peroxidase activities in mango and papaya juice by pulsed electric field and stevia rebaudiana bertonii extract combined process. In *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies* (pp. 128–131).
- Crini, G. (2014). Review: A history of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 114, 10940–10975.
- Crini, G., & Badot, P.M. (2010). Sorption processes and pollution. Besançon France. Presses Univ. Franche-Comté; p. 497.

- Crini, G. & Morcellet, M.J. (2002). Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *Journal of Separation Science*, 25, 789-813.
- Crini, G., & Peindy, H.N. (2006). Adsorption of CI Basic Blue 9 on cyclodextrin-based material containing carboxylic groups. *Dyes and Pigments*, 70, 204-211.
- Dahili, L.A., Kelemen-Horváth, I., Feczko, T. (2015). 2,4-Dichlorophenol removal by purified horseradish peroxidase enzyme and crude extract from horseradish immobilized to nano spray dried ethyl cellulose particles. *Process Biochemistry*, 50, 1835-1842.
- Dalal, S., & Gupta, M.N. (2010). Purification and characterization of a peroxidase isozyme from Indian turnip roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5545-5552.
- Damodaran, D., Vidya Shetty, K., Raj Mohan, B. (2014). Uptake of certain heavy metals from contaminated soil by mushroom–*Galerina vittiformis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 414–422.
- Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P., Zarkesh-Esfahani, H. (2012). Effect of additives on freeze drying and storage of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1101-1107.
- Das, S.K., Rajabalaya, R., David, S., Gani, N., Khanam, J., Nanda, A. (2013). Cyclodextrins-The molecular container. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4, 1694-1720.
- Dass, C.R., Jessup, W., Apolipoproteins, A.I. (2000). Cyclodextrins and liposomes as potential drugs for the reversal of atherosclerosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 731–61.
- Davis, F., & Higson, S. (2011). Cyclodextrins. In *Macrocycles. Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications*; Davis, F., Higson, S., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: United Kingdom, Chapter 6.
- de Barros Fernandes, R.V., Vilela, S., Alvarenga, D. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101, 524-532.
- Dekker M., Verkerk R., Jongen, W.M.F. (2000). Predictive modelling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates in cabbage. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 174–181.

- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses. *Process Biochemistry*, 39, 1033–1046.
- Demian, F.D., & Makris, D.P. (2015). Effect of side-chain structure on the oxidizability of o-diphenol acids by a crude potato peel polyphenol oxidase. *Chemical Engineering Communications*, 202, 1-5.
- Deng, Q., Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M., Orlien, V., Grimi, N., Vorobiev, E., Lebovka, N., Barba, F.J. (2015). The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: extraction, degradation, and applications. *Food Engineering Reviews*, 7, 357-381.
- Denter, U., & Schollmeyer, E. (1996). Surface modification of synthetic and natural fibres by fixation of cyclodextrin derivatives. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 25, 197-202.
- De Pauw, P., Dewettinck, K., Arnaut, F., Huyghebaert, A. (1996). Microencapsulation improves the action of bakery ingredients. *Voedingsmiddelentechnologie*, 29, 38–40.
- Desai, K.G.H., & Park, H.Y. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- Dewettinck, K., & Huyghebaert, A. (1999). Fluidized bed coating in food technology. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 163-168.
- Dezarn, T.J. (1998). Food ingredient encapsulation. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* (edited by S.J. Risch & G.A. Reineccius). Pp. 74–86. ASC Symposium Series 590. Washington, DC: American Chemical Society.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.
- Dinkova-Kostova, A.T., & Kostov, R.V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 18, 337–347.
- Dixon, G. R. (2007). *Vegetable Brassicas and related crucifers*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.
- Dodziuk, H. (2006). *Cyclodextrins and their Complexes*. Chemistry. Analytical Methods, Applications; Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany.

- Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., Cenquier, J., Świrydow, E. (2015). Selected properties of microencapsulated oil powders with commercial preparations of maize OSA starch and trehalose, *Journal of Food Engineering*, 152, 72-84.
- Dong, H.Q., Li, Y.Y., Shi, D.L. (2011). Cyclodextrins/Polymer based (pseudo) polyrotaxanes for biomedical application. *Progress in Chemistry*, 23, 914-922.
- Dong, X., & Kahmann, R. (2009). Battle for survival: plants and their allies and enemies. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 387-389.
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B. Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452-490.
- Drusch, S. (2007). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 21, 1223-1228.
- Drusch, S., & Schwarz, K. (2006). Microencapsulation properties of two different types of *n*-octenylsuccinate-derivatised starch. *European Food Research and Technology*, 222, 155-164.
- Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendárez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. Var. *esculenta*, D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1574-1579.
- Dufour, V., Stahl, M., Rosenfeld, E., Stintzi, A., Baysse, C. (2013). Insights into the mode of action of benzyl isothiocyanate on *Campylobacter jejuni*. *Applied Environmental Microbiology*, 79, 6958–6968.
- Egner, P.A., Chen, J.G., Wang, J.B. y col. (2011). Bioavailability of sulforaphane from two broccoli sprout beverages: results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer Prevention Research*, 4, 384–395.
- Estevinho, B.N., Damas, A.M., Martins, P., Rocha, F. (2014). Microencapsulation of β -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. *Food Research International*, 64, 134-140.
- Fahey, J. (2006). Method of extraction of isothiocyanates into oil from glucosinolate-containing plants and method of producing products with

- oil containing isothiocyanates extracted from glucosinolate-containing plants, Patent No. US 20060127996 A1.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Research International*, 48, 478-483.
- Fathi, M., Martín, A., McClements, D.J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 39, 18-39.
- Fernandes, R.V.B., Borges, S.V., Botrel, D.A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of Rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101, 524-532.
- Ferreres, F., Sousa, C., Valentao, P., Seabra, R. M., Pereira, J.A., Andrade, P.B. (2007). Tronchuda cabbage seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 101, 549-558.
- Finney, J., Buffo, R., Reineccius, G. A. (2002). Effects of type of atomization and processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors. *Journal of Food Sciences*, 67, 1108-1114.
- Font, R., del Rio-Celestino, M., Cartea, E., Haro-Bailon, A. (2005). Quantification of glucosinolates in leaves of leaf rape by near-infrared spectroscopy. *Phytochemistry*, 66, 175-185.
- Fortea, M.I., López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Carreño, J. Nuñez-Delicado, E. (2009). Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chemistry*, 113, 1008-1014.
- Fortea, M. I., López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Hernández-Sánchez, P., Zafrilla, M. P., Martínez-Cachá, A., Núñez-Delicado, E. (2011). Kinetic characterization and termal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidase. *Food Chemistry*, 127, 1091-1096.
- Fortea, M.I., Pellicer, J.A., Serrano-Martínez, A., López-Miranda, S., Lucas-Abellán, C., Núñez-Delicado, E. (2012). Red cabbage (*Brassica oleracea*) as a new source of high-thermostable peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10641-10648.

- Fowke, J.H., Chung, F.L., Jin, F., Qi, D., Cai, Q., Conaway C., Cheng J., Shu X., Gao Y., Zheng W. (2003). Urinary isothiocyanate levels, Brassica, and human breast. *Cancer Research*, 63, 3980-3986.
- Frascareli, E.C., Silva, V.M., Tonon, R.V., Hubinger, M.D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 413-424.
- French, D., Knapp, D.W., Pazur, J.H. (1950). Studies on the Schardinger dextrans. VI. The molecular size and structure of the γ -dextrin. *Journal of the American Chemical Society*, 72, 5150-5152.
- French, D., Pulley, A.O., Whelan, W.J. (1963). Preparation of Schardinger Dextrans on a Larger-than-laboratory Scale. *Starch*, 15, 280-284.
- French, D., & Rundle, R.E. (1942). The molecular weights of the Schardinger alpha and beta dextrans. *Journal of the American Chemical Society*, 64, 1651-1653.
- Freudenberg, K., Blomqvist, G., Ewald, L., Soff, K. (1936). Hydrolyse und acetolyse der stärke und der Schardinger-dextrine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 69, 1258-1266.
- Freudenberg, K., & Cramer, F. (1948). Die konstitution der Schardinger-dextrine α -, β - und γ -. *Z Naturforsch. B*, 3, 464- 468.
- Freudenberg, K., & Jacobi, R. (1935). Über schardingers dextrine aus stärke. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 518, 102-108.
- Freudenberg, K., Plankenhorn, E., Knauber, H. (1947a). Schardinger dextrans from starch. *Chemistry & Industry*, 48, 731-735.
- Freudenberg, K., Plankenhorn, E., Knauber, H. (1947b). Über schardingers dextrine aus stärke. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 558, 1-10.
- Freundlich, H.M.F. (1906). Über die adsorption in lasungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57, 385-470.
- Frey, C. (2014). Fluid bed coating-based microencapsulation. In A. Gaonkar, N. Vasisht, A. Khare & R. Sobel (Eds), *Microencapsulation in the food industry* San Diego: Academic Press, pp 65-80.
- Fromming, K.H., & Szejtli, J. (1994). *Cyclodextrins in pharmacy*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Fu, Y., Liu, L., Guo, Q.X. (2002). A theoretical study on the inclusion complexation of cyclodextrins with inorganic cations and anions. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 43, 223-229.

- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A. Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18, 549–579.
- García-Tejeda, Y.V., Salinas-Moreno, Y., Martínez-Bustos, F. (2014). Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food and Bioprocess Processing*, 94, 717-726.
- Gawish, S.M., Ramadan, A.M., Mosleh, S., Morcellet, M., Martel, B. (2006). Synthesis and characterization of novel biocidal cyclodextrin inclusion complexes grafted onto polyamide-6 fabric by a redox method. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 2586-2593.
- Gecchele, E., Schillberg, S., Merlin, M., Pezzotti, M., Avesani, L. (2014). A downstream process allowing the efficient isolation of a recombinant amphiphilic protein from tobacco leaves. *Journal of Chromatography B*, 960, 34-42.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Goffman, F.D., & Möllers, C. (2000). Changes in tocopherol and plastochromanol-8 contents in seeds and oil of oilseed rape during storage as influenced by temperature and air oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1605-1609.
- Gonçalves da Rosa, C., Borges, C.D., Zambiasi, R.C., Nunes, M.R., Benvenuti, E.V., Rickes da Luz, S., D'Avila, R.F., Rutz, J.K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46, 138-146.
- González-Gaitano, G., Rodríguez, P., Isasi, J.R., Fuentes, M., Tardajos, G., Sánchez, M. (2002). The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44, 101–105.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
- Goula, A.M., & Adamopoulos, K.G. (2012). A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food and Bioprocess Processing*, 90, 639-652.

- Goyal, A.K., Johal, E.S., Rath, G. (2011). Nanotechnology for water treatment. *Current Nanoscience*, 7, 640-654.
- Goyeneche, R., Di Scala, K., Roura, S., (2013). Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish (*Raphanus sativus* Var. *sativus*). *LWT – Food Science and Technology*, 54, 57–62.
- Guo, R., & Wilson, L.D. (2013). Cyclodextrin-based microcapsule materials-their preparation and physicochemical properties. *Current Organic Chemistry*, 17, 14-21.
- Gupta, C., Chawla, P., Arora, S., Tomar, S.K., Singh, A.K. (2015). Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method-Milk fortification. *Food Hydrocolloids*, 43, 622-628.
- Hădărugă, N. G., Hădărugă, D.I., Bandur, G.N., Riviș, A., Pârvu, D., Lupea, A. X. (2008). Protection and controlled release of fatty acids and essential oils by nanoencapsulation in cyclodextrins (a review). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 14, 381-389.
- Hamasaki, K., Ikeda, H., Nakamura, A., Ueno, A., Toda, F., Suzuki, I., Osa, T. (1993). Fluorescent sensors of molecular recognition. Modified cyclodextrins capable of exhibiting guest-responsive twisted intramolecular charge transfer fluorescence. *Journal of The American Chemical Society*, 115, 5035–5040.
- Hapiot, F., Tilloy, S. Monflier, E. (2009). Cyclodextrins as supramolecular hosts for organometallic complexes. *Chemical Reviews*, 106, 767-781.
- Hara, H., & Hashimoto, H. (2002). Japan Kokai, JP 2002029901.
- Hashimoto, H. (2006). Cyclodextrin applications in food, cosmetic, toiletry, textile and wrapping material fields. In *Cyclodextrins and Their Complexes. Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, Chapter 16, p 452.
- He, J., & Chen, J.P. (2014). A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource Technology*, 160, 67–78.
- Hebeish, A., El Shafei, A., Shaarawy, S. (2009). Synthesis and characterization of multifunctional cotton containing cyclodextrin and butylacrylate moieties. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 48, 839-850.

- Hedges, R.A. (1998). Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 2035–2044.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F., Romani, A. (2005). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, 99, 464-469.
- Hernández-Sánchez, P., López-Miranda, S., Lucas-Abellán, C., Núñez-Delicado, E. (2012). Complexation of eugenol (EG), as main component of clove oil and as pure compound, with [Beta]-and HP-[Beta]-CDs. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 716-723.
- Hidalgo-Cuadrado, N., Pérez-Galende, P., Manzano, T., Garcia de María, C., Shnyrov, V.L., Roig, M.G. (2012). Screening of postharvest agricultural wastes as alternative sources of peroxidases: Characterization and kinetics of a novel peroxidase from lentil (*Lens culinaris* L.) stubble. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4765-4772.
- Hiner, A.N.P., Hernández-Ruiz, J., Arnao, M.B., García-Cánovas, F., Acosta, M. (1996). A comparative study of the purity, enzyme activity and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 655-662.
- Ho, Y.S. (2004). Citation review of Lagergren kinetic rate equation on adsorption reactions. *Scientometrics*, 59, 171-177.
- Ho, Y.S., & McKay, G. (1998). A comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents. *Process Safety and Environmental Protection*, 76, 332-340.
- Ho, Y.S., & McKay, G. (1999). A kinetic study of dye sorption by biosorbent waste product pith. *Resources, Conservation and Recycling*, 25, 171-193.
- Ho, Y.S., Porter, J.F., McKay, G. (2002). Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ion onto peat: copper, nickel and lead single component systems. *Water, Air and Soil Pollution*, 141, 1-33.
- Hu, C.Y., Lo, S.L., Chang, C.L., Chen, F.L., Wu, Y.D., Ma, J.L. (2013). Treatment of highly turbid water using chitosan and aluminum salts. *Separation and Purification Technology*, 104, 322–326.
- Hu, X., Wang, J., Liu, Y., Li, X., Zeng, G., Bao, Z., Zeng, X., Chen, A., Long, F. (2011). Adsorption of chromium (VI) by ethylenediamine-modified cross-

- linked magnetic chitosan resin: isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 306–314.
- Huang, L., Gerber, M., Lu, J., Tonelli, A.E. (2001). Formation of a flame retardant-cyclodextrin inclusion compound and its application as a flame retardant for poly (ethylene terephthalate). *Polymer Degradation and Stability*, 71, 279-284.
- Hundre, S.Y., Karthik, P., Anandharamakrishnan, C. (2015). Effect of whey protein isolate and β -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. *Food Chemistry*, 174, 16-24.
- Ibrahim, K.E., & Juvik, J.A. (2009). Feasibility for improving phytonutrient content in vegetable crops using conventional breeding strategies: case study with carotenoides and tocopherols in sweet corn and broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4636-4644.
- Ibrahim, N.A., E-Zairy, W. R., Eid, B. M. (2010). Novel approach for improving disperse dyeing and UV-protective function of cotton-containing fabrics using MCT- β -CD. *Carbohydrate Polymer*, 79, 839-846.
- Indrawati, A., Van Loey, A.M., Ludikhuyze, L.R., Hendrickx, M.E. (1999). Single, combined, or sequential action of pressure and temperature on lipoxygenase in green beans (*Phaseolus Vulgaris* L.): a kinetic inactivation study. *Biotechnology Progress*, 15, 273-277.
- Irvin, P. L., Pfeffer, P. E., Doner, L. W., Sapers, G. M., Brewster, J. D., Nagahashi, G., Hicks, K.B. (1994). Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclo-maltoligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chloro-genic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydrate Research*, 256, 13–27.
- Izadmanesh, Y., & Ghasemi, J. B. (2016). Thermodynamic study of β -cyclodextrin-dye inclusion complexes using gradient flow injection technique and molecular modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 165, 54-60.
- Jacquot, M., & Perneti, M. (2003). Spray coating and drying processes. In: Cell Immobilization Biotechnology (Eds. Nedovic, U. & Willaert, R.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 343-356.

- Jadhav, P., Petkar, B., Pore, Y., Kulkarni, A., Burade, K. (2013). Physicochemical and molecular modeling studies of cefixime-L-arginine-cyclodextrin ternary inclusion compounds. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1317-1325.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26, 816-835.
- Jin, H.Y., Xia, F., Zhao, Y.P. (2012). Preparation of hydroxypropyl methyl cellulose phthalate nanoparticles with mixed solvent using supercritical antisolvent process and its application in coprecipitation of insulin. *Advanced Powder Technology*, 23, 157-163.
- Jouquand, C., Ducruet, V., Giampaoli, P. (2004). Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chemistry*, 85, 467-474.
- Jung, T.H., Ha, H.J., Ahn, J., Kwak, H.S. (2008). Development of cholesterol-reduced mayonnaise with crosslinked β -cyclodextrin and added phytosterol. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 28, 211-217.
- Jung, T.H., Kim, J.J., Yu, S.H., Ahn, J., Kwak, H.S. (2005). Properties of cholesterol-reduced butter and effect of gamma linolenic acid added butter on blood cholesterol. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18, 1646-1654.
- Kanakdande, D., Bhosale, R., Singhal, R. (2007). Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers*, 67, 536-541.
- Karakhanov, E.A. Maximov, A.L. (2010). Molecular imprinting technique for the design of cyclodextrin based materials and their application in catalysis. *Current Organic Chemistry*, 14, 1284-1295.
- Karathanos, V.T., Mourtzinis, I., Yannakopoulou, K., Andrikopoulos, N.K. (2007). Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 101, 652-658.
- Karrer, P. (1920). Zur kenntnis der polysaccharide I. Methylierung der stärke. *Helvetica Chimica Acta*, 3, 620-625.
- Kaushik, V., & Roos, Y.H. (2007). Limonene encapsulation in freeze drying of gum arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT-Food Science and Technoogy*, 40, 1381-1391.
- Kayaci, F., & Uyar, T. (2012). Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanoweb: prolonged

- shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chemistry*, 133, 641-649.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S. (2015). Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate Polymers*, 131, 264-272.
- Khan, A.R., Forgo, P., Stine, K.J., D'Souza, V.T. (1998). Methods for selective modifications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 1977-1996.
- Kharatmol, P.P., & Pandit, A.B. (2012). Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassica oleracea* var. capitata). *Journal of Biochemical Technology*, 4, 531-540.
- Kieu, H.T., Muller, E., Horn, H. (2011). Heavy metal removal in anaerobic semicontinuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water Resources*, 45, 3863-3870.
- Kim, J.J., Jung, T.H., Ahn, J., Kwak, H.S. (2006). Properties of cholesterol-reduced butter made with β -cyclodextrin and added evening primrose oil and phytosterols. *Journal of Dairy Science*, 89, 4503-4510.
- Kim, S.H., Kim, H.Y., Kwak, H.S. (2007). Cholesterol removal from lard with crosslinked β -cyclodextrin. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20, 1468-1472.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E.A., McClements, D. J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39, 449-457.
- Komiyama, M., & Monflier, E. (2006). Cyclodextrin catalysis. In *Cyclodextrins and Their Complexes. Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, Chapter 4, p 93.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 62, 923-933.
- Koo, O.M.Y. (2011). Application challenges and examples of new excipients in advanced drug delivery systems. *American Pharmaceutical Reviews*, 14, 60-68.

- Kozłowski, C.A., & Sliwa, W. (2008). The use of membranes with cyclodextrins units in separation processes: recent advances. *Carbohydrate Polymers*, 74, 1-9.
- Kozłowski, C.A., & Sliwa, W. (2010). Use of cyclodextrin polymers in separation of organic species. Polymer Science and Technology Series; Nova Science Publishers, Inc.: New York.
- Kratky, O., & Porod, G. (1949). Diffuse small-angle scattering of X-rays in colloid systems. *Journal of Colloid Science*, 4, 35-70.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Hafiz, A.M.M., Hafeza, A.B., Rao, S.R.M. (2009). Study on retention of bioactive components of *Morinda citrifolia* L. using spray-drying. *Journal of Applied Sciences*, 9, 3092-3097.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray drying. *Chemical Engineering Research and Design*, 90, 622-632.
- Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61, 95-102.
- Krishnan, S., Krishirsagar, A.C., Singhal, S. (2005). The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of food flavour agent. *Carbohydrate Polymers*, 62, 309-315.
- Kuck, L.S., & Zapata-Noreña, C.P. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 194, 569-576.
- Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Kumar, A., Sharma, G., Naushad, M., Thakur, S. (2015). SPION/ β -cyclodextrin core-shell nanostructures for oil spill remediation and organic pollutant removal from waste water. *Chemical Engineering Journal*, 280, 175-187.
- Kumar, K.V., Sivanesan, S., Ramamurthi, V. (2005). Adsorption of malachite green onto *Pithophora* sp., a fresh water algae: equilibrium and kinetic modelling. *Process Biochemistry*, 40, 2865-2872.
- Kurkov, S.V., & Loftsson, L. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 30, 167-180.

- Kuwabara, N., Takaku, H., Oku, S., Kopure, Y. (1988). Japan Kokai, JP 88 267 246.
- Kuzuya, A., Ohnishi, T., Wasano, T., Nagaoka, S., Sumaoka, J., Ihara, T., Jyo, A., Komiyama, M. (2009). Efficient guest inclusion by β -cyclodextrin attached to the ends of DNA oligomers upon hybridization to various DNA conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 20, 1643–1649.
- Kwak, H.S., Kim, S.H., Kim, J.H., Choi, H.J., Kang, J. (2004). Immobilized β -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk. *Archives of Pharmacial Research*, 27, 873–877.
- Lagergren, S. (1898). Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 24, 1-39.
- Lamers, M. (2007). Steuerung der Trenneigenschaften polymerer Membranen durch supramolekulare Komplexbildung mit Cyclodextrinen, Doctor Thesis, Heinrich-Heine Universität, Dusseldorf.
- Landy, D., Mallard, I., Ponchel, A., Monflier, E., Fourmentin, S. (2012). Cyclodextrins for remediation technologies. In *Environmental Chemistry for a Sustainable World: Nanotechnology and Health Risk*; Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D., Eds.; Springer Verlag: Berlin, p 47.
- Lavery, C.B., Macinnis, M.C., MacDonald, J., Williams, J.B., Spencer, C.A., Burke, A.A., Irwin, D.J.G., D’Cunha, G.B. (2010). Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8471-8476.
- Lee, S.Y., & Krochta, J.M. (2002). Accelerated shelf life testing of whey protein coated peanuts analyzed by static gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2022-2028.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Y., Csoregi, E., Sakharov, I. Y. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sciences*, 163, 1011-1019.
- Li, J.J., Zhao, F., Li, J. (2011). Polyrotaxanes for applications in life science and biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 427-443.
- Li, W., Liu, X., Yang, Q., Zhang, N., Du, Y., Zhu, H. (2015). Preparation and characterization of inclusion complex of benzyl isothiocyanate extracted from papaya seed with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 184, 99-104.

- Lin, L.Z., & Harnly, J.M. (2009). Identification of the phenolic components of collard greens, kale and Chinese broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7401-7408.
- Linarés, E., Larré, C., Popineau, Y. (2001). Freeze or spray-dried gluten hydrolysates. 1. Biochemical and emulsifying properties as a function of drying process. *Journal of Food Engineering*, 48, 127-135.
- Liu, B., Zhu, X., Zeng, J., Zhao, J. (2013). Preparation and physicochemical characterization of the supramolecular inclusion complex of naringin dihydrochalcone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Research International*, 54, 691-696.
- Liu, F., Zhao, J.H., Wen, X., Ni, Y.Y. (2015). Purification and structural analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from Fuji apple. *Food Chemistry*, 183, 72-77.
- Liu, J., Mendoza, S., Román, R., Lynn, M., Xu, R., Kaifer, A. (1999). Cyclodextrin-modified gold nanospheres. Host-guest interactions at work to control colloidal properties. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 4304-4305.
- Liu, X. D., Furuta, T., Yoshii, H., Linko, P., Coumans, W. J. (2000). Cyclodextrin encapsulation to prevent the loss of l-menthol and its retention during drying. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 1608-1613.
- Liu, Z., Zhou, J., Zeng, Y., Ouyang, X. (2004). The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering*, 65, 391-396.
- Loftsson, T., & Brewster, M.E. (2014). Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 3019-3032.
- Loftsson, T., Brewster, M.E., Másson, M. (2004). Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *American Journal of Drug Delivery*, 2, 261-275.
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935.
- López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Hernández-Sánchez, P., Guardiola, L., Pérez-Sánchez, H., Fortea, I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E. (2016). Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace. *Food Chemistry*, 203, 379-385.

- López-Nicolás, J.M., & García-Carmona, F. (2007). Use of cyclodextrins as secondary antioxidants to improve the colour of fresh pear juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6330–6338.
- López-Nicolás, J.M., Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. (2007). Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: the use of maltosyl-b-cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chemistry*, 101, 1164–1171.
- López-Nicolás, J.M., Pérez-López, A.J., Carbonell-Barrachina, A., García-Carmona, F. (2007a). Use of natural and modified cyclodextrins as inhibiting agents of peach juice enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5312–5319.
- López-Nicolás, J.M., Pérez-López, A.J., Carbonell-Barrachina, A., García-Carmona, F. (2007b). Kinetic study of the activation of banana juice enzymatic browning by the addition of maltosyl-b-cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9655–9662.
- López-Nicolás, J.M., Rodríguez-Bonilla, P., García-Carmona, F. (2014). Cyclodextrins and antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 251-276.
- Lubbers, S., Landy, P., Voilley, A. (1998). Retention and release of aroma compounds in food containing proteins. *Journal of Food Technology*, 52, 68–74.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E. (2008). Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food Chemistry*, 111, 262-267.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E. (2007a). Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chemistry*, 104, 39-44.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E. (2007b). Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 255-259.
- Lucas-Abellán, C., Guillén, I., Mercader-Ros, M.T., Serrano-Martínez, A., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J.A. (2014). Fluorimetric determination of sulphathiazole in honey by means the formation of CDs inclusion complexes. *Carbohydrate Polymers*, 103, 87-93.

- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M.T., Zafrilla, M.P., Gabaldón, J.A. Núñez-Delicado, E. (2011). Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1255-1260.
- Macaev, F., Boldescu, V., Geronikaki, A., Sucman, N. (2013). Recent advances in the use of cyclodextrins in antifungal formulations. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13, 2677-2683.
- Machado, M.D., Soares, E.V., Soares, H.M. (2010). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: chemical speciation as a tool in the prediction and improving of treatment efficiency of real electroplating effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 180, 347-353.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release-a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21.
- Mallard, I., Baudelet, D., Castiglione, F., Ferro, M., Panzeri, W., Ragg, E., Mele, A. (2015). Polydisperse methyl β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers: variable contact time ^{13}C CP-MAS solid-state NMR characterization. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 11, 2785-2794.
- Mantegna, S., Binello, A., Boffa, L., Giorgis, M., Cena, C., Cravotto, G. (2012). A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, 130, 746-750.
- Marquard, D.W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of Society for Industrial and Applied Mathematics*, 11, 431-441.
- Martinot, J.L.S. (2012). Warmi, natural alternative for the treatment of menopause. Patent No. US 20120277171 A1.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 108-123.
- Mascheroni, E., Fuenmayor, C.A., Cosio, M.S., Di Silvestro, G., Piergiovanni, L., Mannino, S., Schiraldi, A. (2013). Encapsulation of volatiles in nanofibrous polysaccharide membranes for humidity-triggered release. *Carbohydrate Polymers*, 98, 17-25.

- Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67, 2318–2331.
- McKay, G. (1982). Adsorption of dyestuffs from aqueous solutions with activated carbon I: Equilibrium and batch contact-time studies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 759–772.
- McNamee, B.F., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M. (2001). Effect of partial replacement of gum Arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3385–3388.
- Mdluli, K.M. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delgado, E. (2010). Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry*, 118, 769–773.
- Messner, M., Kurkov, S.V., Jansook, V., Loftsson, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 387, 199–208.
- Mishra, P., Mishra, S., Mahanta, C.L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 252–258.
- Mocanu, G., Vizitiu, D., Carpov A. (2001). Cyclodextrins polymers. *Journal of Bioactive Compatible Polymer*, 16, 315–342.
- Moore, S.A., Ai, Y., Chang, F., Jane, J.L. (2015). Effects of alpha-amylase reaction mechanisms on analysis of resistant-starch contents. *Carbohydrate Polymers*, 115, 465–471.
- Morillo, E. (2006). Application of cyclodextrins in agrochemistry. In *Cyclodextrins and Their Complexes. Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, Chapter 16, p 459.
- Morin-Crini, N., & Crini, G. (2013). Environmental applications of water insoluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Progress in Polymer Science*, 38, 344–368.

- Mujumdar, A.S. & Devahastin, S. (2000). Fluidized bed drying. In: *Developments in Drying Vol. 1: Food Dehydration* (edited by A.S. Mujumdar & S. Suvachittanont). Bangkok: Kasetsart University Press, pp. 59–111.
- Muzzarelli, R.A.A. (2011). Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1433–1445.
- Myers, D. (2006). *Surfactant science and technology*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Nadarajah, D., Han, J.H., Holley, R.A. (2005a). Use of mustard flour to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 257–267.
- Nadarajah, D., Han, J.H., Holley, R.A. (2005b). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 269–279.
- Nadeem, H.S., Torun, M., Özdemir, F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1626-1635.
- Naska, A., Fouskakis, D., Oikonomou, E., Almeida, M.D.V., Berg, M.A., Gedrich, K., Moreiras, O., Nelson, M., Trygg, K., Turrini, A., Remaut, A.M., Volatier, J.L., Trichopoulou, A. (2005). Dietary patterns and their socio-demographic determinants in 10 European countries: data from the DAFNE databank. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60, 181-190.
- Nazari, K., Mahmudi, A., Shahrooz, M., Khodafarin, R., Moosavi-Movahedi, A.A. (2005). Suicide-peroxide inactivation of horseradish peroxidase in the presence of Sodium n-Dodecyl Sulphate: A study of the enzyme deactivation kinetics. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 285-292.
- Nelson, D.P. & Kiesow, L.A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C. *Analytical Biochemistry*, 49, 474-478.
- Nostro, P.L., Fratoni, L., Ridi, F., Baglioni, P. (2003). Surface treatments on Tencel fabric: Grafting with β -cyclodextrin. *Journal of Applied Polymer Science*, 88, 706-715.
- Numanoglu, U., Sen, T., fer Tarimci, N., Kartal, M., Koo, O.M.Y., Önyüksel, H. (2007). Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance

- materials: linalool and benzyl acetate. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 8, 1-9.
- Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona F. (1997). Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2830-2835.
- Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F., López- Nicolás, J.M. (2005). Effect of organic farming practices on the level of latent polyphenol oxidase in grapes. *Journal of Food Science*, 70, 74-78.
- Nussinovitch, A. (2003). Hydrocolloids in flavour encapsulation. In: Nussinovitch, A. (Ed.), *Water-Soluble Polymer Applications in Foods*. Blackwell Science, Oxford, pp. 93-113.
- Ong, S.Y., Wu, J., Moochhala, S.M., Tan, M.H., Lu, J. (2008). Development of a chitosanbased wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*, 29, 4323-4332.
- Onsa, G.H., Bin Saari, N., Selamat, J., Bakar, J. (2004). Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry*, 85, 365-376.
- Osorio, C., Forero, D.P., Carriazo, J.G. (2011). Characterization and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. *Food Research International*, 44, 1174-1181.
- Papadakis, S.E., Gardeli, C., Tzia, C. (2006). Spray drying of raisinjuice concentrate. *Drying Technology*, 24, 173-180.
- Patil, V., Chauhan, A.K., Singh, R.P. (2014). Optimization of the spray drying process for developing guava powder using response surface methodology. *Powder Technology*, 253, 230-236.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. Millan F. (2004). Brassica carinata protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chemistry*, 88, 337-346.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y., Zhao, G. (2013). Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray dried purple sweet potato flours. *LWT-Food Science and Technology*, 51, 348-355.
- Pellicer, J.A., Lucas-Abellán, C., Serrano-Martínez, A., López-Miranda, S., Núñez-Delicado, E., Fortea, M. I. (2016). Kinetic characterization and

- thermal properties of two acidic peroxidases from white cabbage (*Brassica Oleracea* L.). *Journal of Food Biochemistry*. In press.
- Pérez-Masiá, R., López-Nicolás, R., Periago, M.J., Ros, G., Lagaron, J.M., López-Rubio, A. (2015). Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 168, 124-133.
- Popat, A., Karmakar, S., Jambhrunkar, S., Xu, C., Yu, C. (2014). Curcumin-cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 520-527.
- Pringsheim, H. (1923). Polysaccharide zweiter Ordnung. In *Die Polysaccharide* (pp. 50-230). Springer Berlin Heidelberg.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L. (2008). Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24, 361-375.
- Quek, S.Y., Chok, N.K., Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering Processes*, 46, 386-392.
- Quispe-Condori, S., Saldaña, M.D.A., Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1880-1887.
- Radu, C.D., Parteni, O., Ochiuz, L. (2016). Applications of cyclodextrins in medical textiles—review. *Journal of Controlled Release*, 224, 146-157.
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S., Rajabzadeh, G. (2015). Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, 51, 327-337.
- Rajendiran, N., & Jenita, M. J. (2015). Encapsulation of 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid and 4-hydroxy-3, 5-dimethoxy benzoic acid with native and modified cyclodextrins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1349-1357.
- Rao, V.M., Haslam, J.L., Stella, V.J. (2001). Controlled and complete release of a model poorly water-soluble drug, prednisolone, from hydroxypropyl

- methylcellulose matrix tablets using (SBE)(7 m)-beta-cyclodextrin as a solubilizing agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 807-816.
- Rask, L., Andreasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer, J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology*, 42, 93-113.
- Rasmann, S., & Agrawal, A. (2009). Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy and antagonism between resistance traits. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 473-478.
- Regalado, C., Pérez-Arvizu, O., García-Almendárez, B.E., Whitaker, J. R. (1999). Purification and properties of two acidic peroxidases from Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 23, 435-450.
- Rekharsky, M.V., & Inoue, Y. (1998). Complexation thermodynamics on cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 1875-1918.
- Renard, E., Barnathan, G., Deratani, A., Sébille B. (1997). Polycondensation of cyclodextrins with epichlorohydrin. Influence of reaction conditions on the polymer structure. *Macromolecular Symposium*, 122, 229-234.
- Resina, M., Macanas, J., de Gyves, J., Munoz, M. (2006). Zn(II), Cd(II) and Cu(II) separation through organic-inorganic hybrid membranes containing di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid or di-(2-ethylhexyl) dithiophosphoric acid as a carrier. *Journal of Membrane Science*, 268, 57-64.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77, 247-255.
- Rodríguez-Cabrera, N.A., Regalado, C., García-Almendárez, B.E. (2011). Cloning, heterologous expression and properties of a recombinant active turnip peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7120-7126.
- Rodríguez-López, J.N., Espín, J.C., del Amor, F., Tudela, J., Martínez, V., Cerdá, A., García-Cánovas, F. (2000). Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melon* L.) cultivated under different salinity conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1537-1541.
- Roos, A.A., Edlund, U., Sjöberg, J., Albertsson, A.C., Stalbrand, H. (2008). Protein release from galactoglucomannan hydrogels: influence of substitutions

- and enzymatic hydrolysis by β -mannanase. *Biomacromolecules*, 9, 2104-2110.
- Rosenkranz, K., Kasper, M.M., Werther, J., Brunner, G. (2008). Encapsulation of irregularly shaped solid forms of proteins in a high-pressure fluidized bed. *Journal of Supercritical Fluids*, 46, 351-357.
- Rossi, S., Bonini, M., Lo Nostro, P., Baglioni, P. (2007). Self-assembly of β -cyclodextrin in water. 2. Electron spin resonance. *Langmuir*, 23, 10959-10967.
- Rudzka-Nowak, A., & Piechota, M. (2011). Anaesthetic management of a patient with myasthenia gravis for abdominal surgery using sugammadex. *Archives of Medical Science*, 7, 361-364.
- Ruso, J.M., Deo, N., Somasundaran, P. (2004). Complexation between dodecyl sulfate surfactant and zein protein in solution. *Langmuir*, 20, 8988-8991.
- Sahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A., Özdemir, F. (2013). Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 52, 31-38.
- Sahin-Nadeem, H., Torun, M., Ozdemir, F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1626-1635.
- Saikia, S., Mahnot, N.K., Mahanta, C.L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chemistry*, 171, 144-152.
- Sainz-Rozas, P.R., Isasi, J.R., Gonzalez-Gaitano, G. (2005). Binding of dibenzofuran and its derivatives to water-soluble -cyclodextrin polymers. *Journal of Photochemistry Photobiology A, Biology*, 173, 248-257.
- Sakakibara, S., Sugisawa, K., Matsui, F., Sengoku, K. (1985). Jpn. Pat., JP 851 248 075.
- Sand, D.M., & Schlenk, H. (1961). Acylated cyclodextrins as polar stationary phases for gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 33, 1624-1625.
- Santos, E.H., Kamimura, J.A., Hill, L.E., Gomes, C.L. (2015). Characterisation of carvacrol-beta cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for

- antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Science and Technology*, 60, 583-592.
- Sardi, E., & Tordai, E. (2005). Determination of fully N-methylated compound in different cabbage and beetroot varieties. *Acta Biologica Szegediensis*, 49, 43-45.
- Sasaki, K., & Takahashi, T. (2002). A flavonoid from *Brassica rapa* flower as UV-absorbing nectar guide. *Phytochemistry*, 61, 339-343.
- Savin, I.I., & Butnaru, R. (2008). Wastewater characteristics in textile finishing mills. *Environmental Engineering and Management Journal*, 7, 859-864.
- Schardinger, F. (1903). Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 6, 865-880.
- Schmidt, B.V.K.J., Hetzer, M., Ritter, H., Barner-Kowollik, C. (2014). Complex supramolecular architecture design via cyclodextrin host/guest complexes. *Progress in Polymer Science*, 39, 235-249.
- Schneiderman, E., & Stalcup, A.M. (2000). Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography*, 745, 83-102.
- Secouard, S., Grisel, M. Malhiac, C. (2007). Flavour release study as a way to explain xanthan-galactomannan interactions. *Food Hydrocolloids*, 2, 1237-1244.
- Semeraro, P., Rizzi, V., Fini, P., Matera, S., Cosma, P., Franco, E., García, R., Ferrándiz, M., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J.A., Fortea, I., Pérez, E., Ferrándiz, E. (2015). Interaction between industrial textile dyes and cyclodextrins. *Dyes and Pigments*, 119, 84-94.
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., del Amor, F.M., Nuñez-Delicado, E. (2008). Kinetic characterization and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107, 193-199.
- Shahidi, F., & Han, X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547.
- Shaikh, J., Bhosale, R., Singhal, R. (2006). Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*, 94, 105-110.
- Shi, Y., Ng, S.C., Wu, Z., Wang, Y. (2015). Preparation of a permethylated β -cyclodextrin chiral stationary phase by one-pot hydrosilylation and

- immobilization at the C2 position for chiral high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 38, 3669-3676.
- Shim, S.Y., Ahn, J., Kwak, H.S. (2003). Functional properties of cholesterol-removed whipping cream treated by β -cyclodextrin. *Journal of Dairy Science*, 86, 2767-2772.
- Shin, I.S., Han, J.S., Choi, K.D., Chung, D.H., Choi, G., Ahn, J. (2010). Effect of isothiocyanates from horseradish (*Armoracia rusticana*) on the quality and shelf life of tofu. *Food Control*, 21, 1081-1086.
- Silva, K.A., Coelho, M.A.Z., Calado, V.M.A., Rocha-Leao, M.H.M. (2013). Olive oil and lemon salad dressing microencapsulated by freeze drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50, 569-574.
- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 20, 341-359.
- Siro, I., Fenyvesi, E., Szente, L., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., Orgovanyi, J., Senyi, J., Barta, J. (2006). Release of alpha-tocopherol from antioxidative low-density poly-ethylene film into fatty food simulant: influence of complexation in beta-cyclodextrin. *Food Additives and Contaminants*, 23, 845-853.
- Snowdon, R., Lühs, W., Friedt, W. (2007). Oilseed rape. *Oilseeds*, 2, 55-114.
- Sobel, R.M. (2012). Proteins and gums as microencapsulating agents. ITF Pre-Annual Meeting Short Course: Microencapsulation in Food Applications. June 24-25, Las Vegas, NV, pp. 122-132.
- Sojo, M.M., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. (1999). Cyclodextrins as activator and inhibitor of banana pulp polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 518-523.
- Sootitiantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., Linko, P. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated α -limonene by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 107-114.
- Sopade, P.A., Halley, P.J., Cichero, J.A.Y., Ward, L.C.J., Liu, J. Varlively, S. (2008). Rheological characterization of food thickeners marketed in Australia in various media for the management of dysphagia. III. Fruit juice as a dispersing medium. *Journal of Food Engineering*, 86, 604-615.

- Steed, J.W., & Atwood, J.L. (2009). Molecular guests in solution. In *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: United Kingdom, Chapter 6, p 307.
- Steinbrecher, A., & Linseisen, J. (2009). Dietary intake of individual glucosinolates in participants of the EPIC-Heidelberg cohort study. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54, 87-96.
- Strobel, S.A., Scher, H.B., Nitin, N., Jeoh, T. (2016). *In situ* cross-linking of alginate during spray drying to microencapsulate lipids in powder. *Food Hydrocolloids*, 58, 141-149.
- Su, Y.L., Fu, Z.Y., Zhang, J.Y., Wang, W.M., Wang, H., Wang, Y.C., Zhang, Q.J. (2008). Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*, 184, 114-121.
- Sudha, L. K., Sukumar, R., Uma Rao, K. (2014). Evaluation of activation energy (E_a) profiles of nanostructured alumina polycarbonate composite insulation materials. *International Journal of Materials Mechanics and Manufacturing*, 2, 96-100.
- Suha, O.A., Babiker, E. M., Babiker, E.E. (2013). Thermostability at different pH levels of peroxidase extracted from four vegetables. *International Food Research Journal*, 20, 715-719.
- Sulaiman, A., Soo, M.J., Yoon, M.M., Farid, M., Silva, F.V. (2015). Modeling the polyphenoloxidase inactivation kinetics in pear, apple and strawberry purees after high pressure processing. *Journal of Food Engineering*, 147, 89-94.
- Sultanbawa, Y. (2011). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. In: Mendez-Vilas A (ed) *Formatex Research Center, Spain*, pp 1084–1093.
- Šukalović, V.H.T., Vuletić, M., Marković, K., Antić, T.C., Vučinić, Ž. (2015). Comparative biochemical characterization of peroxidases (class III) tightly bound to the maize root cell walls and modulation of the enzyme properties as a result of covalent binding. *Protoplasma*, 252, 335-343.
- Suzuki, J. (1975). Japan Kokai, JP 7 569 100.
- Sworn, G. (2009). Xanthan gum. In: Phillips, G.O. and Williams, P.A. *Handbook of Hydrocolloids*, Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 186-203.

- Szejtli, J. (1979). Molecular encapsulation of volatile, easily oxydizable flavour substances by cyclodextrins. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 101, 27–46.
- Szejtli, J. (1982). Cyclodextrins and their inclusion complexes, Akademiai Kiadó, Budapest.
- Szejtli, J. (1985). Cyclodextrins: a new group of industrial basic materials. *Nahrung*, 29, 911-924.
- Szejtli, J. (1995). Selectivity/structure correlation in cyclodextrin chemistry. *Supramolecular Chemistry*, 6, 217–223.
- Szejtli, J. (1997). Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal of Materials Chemistry*, 7, 575–587.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chemical Reviews*, 98, 1743-1753.
- Szejtli, J. (2003). Cyclodextrins in the textile industry. *Starch-Stärke*, 55, 191-196.
- Szejtli, J., Szektli, M., Szente, L. (1978). Hung. Pat. 180556; 180557.
- Szejtli, J., & Szente, L. (2005). Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61, 115-125.
- Szente, L., & Szejtli, J. (1988). Flavor encapsulation. Washington DC: American Chemical Society.
- Szente, L., & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137–142.
- Takeda Chem. Ind. Ltd.(1981). Japan Kokai, JP 81 127 058.
- Tamamoto, L.C., Schmidt, S.J., Lee, S.Y. (2010). Sensory properties of ginseng solutions modified by masking agents. *Journal of Food Science*, 75, 341-347.
- Tandjaoui, N., Tassist, A., Abouseoud, M., Couvert, A., Amrane, A. (2015). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Brassica rapa* peroxidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 208-213.
- Tang, W., & Ng, S.C. (2008). Facile synthesis of mono-6-amino-6-deoxy-[alpha]-, [beta]-, [gamma]-cyclodextrin hydrochlorides for molecular recognition, chiral separation and drug delivery. *Nature Protocols*, 3, 691–697.
- Tao, F., Hill, L.E., Peng, Y., Gomes, C.L. (2014). Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for

- antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 247-255.
- Tarimci, N. (2011). Cyclodextrins in the cosmetic field. In *Cyclo-dextrins in Pharmaceutics, Cosmetics and Biomedicine*; Bilensoy, E., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: London, Chapter 7, p 131.
- Tassone, E.E., Lipka, A.E., Tomasi, P., Lohrey, G.T., Qian, W., Dyer, J.M., Gore, M.A., Jenks, M.A. (2016). Chemical variation for leaf cuticular waxes and their levels revealed in a diverse panel of *Brassica napus* L. *Industrial Crops and Products*, 79, 77-83.
- Tasirin, S.M., Puspasari, I., Lun, A.W., Chai, P.V., Lee, W.T. (2014). Drying of kaffir lime leaves in a fluidized bed dryer with inert particles: Kinetics and quality determination. *Industrial Crops and Products*, 61, 193-201.
- Tejashri, G., Amrita, B., Darshana, J. (2013). Cyclodextrin based nanosponges for pharmaceutical use: A review. *Acta Pharmaceutica*, 63, 335-358.
- Tonelli, J. (2008). Cyclodextrins as a means to nanostructure and functionalize polymers. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 60, 197-202.
- Tong, J., & Chen, L.G. (2013). Review: preparation and application of magnetic chitosan derivatives in separation processes. *Analytical Letters*, 46, 2635-2656.
- Tonon, R.V. (2009). Secagem por atomização do suco de açaí: influencia das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Doutorado em Engenharia de Alimentos.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 88, 411-418.
- Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, 44, 282-289.
- Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemical Reviews*, 8, 269-282.

- Tran, L.T., Taylor, J.S., Constabel, C.P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics*, 13, 395-406.
- Turchiuli, C., Jimenez-Munguia, M.T., Hernandez-Sanchez, M., Cortes-Ferre, H., Dumoulin, E. (2014). Use of different supports for oil encapsulation in powder by spray drying. *Powder Technology*, 255, 103-108.
- Uekama, K., Hrayama, F., Irie, T. (1998) Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Reviews*, 98, 2045-2076.
- Uekama, K., Hieda, Y., Hirayama, F., Arima, H., Sudoh, M., Yagi, A., Terashima, H. (2001). Stabilizing and solubilizing effects of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin on prostaglandin E1 analogue. *Pharmaceutical Research*, 18, 1578-1585.
- Utsuki, T., Brem, H., Pitha, J., Loftsson, T., Kristmundsdottir, T., Tyler, B.M. (1996). Potentiation of anticancer effects of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl alpha-cyclodextrin. *Journal of Controlled Release*, 40, 251-260.
- Uyar, T., Balan, A., Toppare, L., Besenbacher, F. (2009). Electrospinning of cyclodextrin functionalized poly (methyl methacrylate)(PMMA) nanofibers. *Polymer*, 50, 475-480.
- Valero, E., Varón, R., García-Carmona, F. (1992). Kinetic study of effect of metabisulphite on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 904-908.
- Van de Manakker, F., Vermonden, T., Van Nostrum, C.F., Hennink, W.E. (2009). Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties and pharmaceutical/biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10, 3157-3175.
- Vasisht, N. (2014). Factors and mechanisms in microencapsulation. In: Gaonkar, A.G., Vasisht, N., Khare, A.R., Sobel, R. (Eds). *Microencapsulation in the food industry. A practical implementation guide*. Academic Press, London, pp. 15-24.
- Velasco, P., Francisco, M., Cartea, M.E. (2011). In: Watson RR, Preedy VR (eds) *Bioactive foods and extracts: cancer treatment and prevention*. CRC Press, pp 3-31.

- Venturini, C.D.G., Nicolini, J., Machado, C. Machado, V.G. (2008). Nonstoichiometric gelation of cyclodextrins and included planar guests. *Langmuir*, 24, 11902-11910.
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., Schrijver, R. D., Hansen, M., Gerhäuser, C., Mithen, R., Dekker, M. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 219-265.
- Verma, A.K., Dash, R.R., Bhunia, P. (2012). A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *Journal of Environmental Management*, 93, 154–168.
- Vetter, W., & Bester, K. (2006). Gas chromatographic enantioseparation of chiral pollutants - Techniques and results. In *Chiral Separation*; Busch, K. W., Busch, M. A., Eds.; Elsevier: The Netherlands, Chapter 6, p 131.
- Vidovic, S.S., Vlastic, J.Z., Vastag, Z.G., Zekovic, Z.P., Popovic, L.M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*, 258, 209-215.
- Villalonga, R., Cao, R., Fragoso, A. (2007). Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology. *Chemical Reviews*, 107, 3088-3116.
- Voncina, B. (2011). Application of cyclodextrins in textile dyeing. In *Textile Dyeing*; Hauser, P., Ed.; InTech: Tijek, Croatia, Chapter 17, p 373.
- Voncina, B., & Le Marechal, A. (2005). Grafting of cotton with β -cyclodextrin via poly (carboxylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 1323-1328.
- Voncina, B., & Vivod, V. (2013). Cyclodextrins in textile finishing. In *Textile Dyeing*; Günay, M., Ed.; InTech: Tijek, Croatia, Chapter 3, p 53.
- Voncina, B., Vivod, V., Chen, W. (2009). Surface modification of PET fibers with the use of β -cyclodextrin. *Journal of Applied Polymer Science*, 113, 3891-3895.
- Wang, C., & Chen, S. (2004). Anchoring β -cyclodextrin to retain fragrances on cotton by means of heterobifunctional reactive dyes. *Coloration Technology*, 120, 14-18.
- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27, 195–226.

- Wang, W., & Zhou, W. (2015). Characterisation of spray dried soy sauce powders made by adding crystalline carbohydrates to drying carrier. *Food Chemistry*, 168, 417-422.
- Wang, Y.F., Shao, J.J., Wang, Z.L., Lu, Z.X. (2012). Study of allicin microcapsules in β -cyclodextrin and porous starch mixture. *Food Research International*, 49, 641-647.
- Weber, W.J. & Morris, J.C. (1963). Kinetics of adsorption on carbon from solution. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 89, 31-60.
- Wen, P., Zhu, D.H., Wu, H., Zong, M.H., Jing, Y.R., Han, S.Y. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*, 59, 366-376.
- Wenz, G. (2009). Recognition of monomers and polymers by cyclodextrins. *Advances in Polymer Science*, 222, 204-254.
- Wenz, G., Han, B.H. Muller, A. (2006). Cyclodextrin rotaxanes and polyrotaxanes. *Chemical Reviews*, 106, 782-817.
- West, C. (2014). Enantioselective separations with supercritical fluids-review. *Current Analytical Chemistry*, 10, 99-120.
- Williams, P.A., & Phillips, G.O. (2009). Gum arabic. In: Phillips, G.O, Williams, P.A. (Eds), *Handbook of Hydrocolloids*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 252-273.
- Wood, W.E. (2001). Improved aroma barrier properties in food packaging with cyclodextrins. TAPPI – Polymers, Laminations and Coatings Conference 367–377.
- Wu, Y., Zou, L., Mao, J., Huang, J., Liu, S. (2014). Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydrate Polymers*, 102, 497-503.
- Wurr, D.C.E., Fellows, J.R. Phelps, K. (1996). Investigating trends in vegetable crop response to increasing temperature associated with climate change. *Scientia Horticulturae*, 66, 255-263.
- Xiao, Y., Ng, S.C., Tan, T.T.Y., Wang, Y.J. (2012). Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1269, 52-68.

- Yan, J., Zhu, Y., Qiu, F., Zhao, H., Yang, D., Wang, J., Wen, W. (2016). Kinetic, isotherm and thermodynamic studies for removal of methyl orange using a novel β -cyclodextrin functionalized graphene oxide-isophorone diisocyanate composites. *Chemical Engineering Research and Design*, 106, 168-177.
- Yang, J., Liu, Y., Wang, H., Liu, L., Wang, W., Wang, C., Wang, Q., Liu, W. (2012). The biocompatibility of fatty acid modified dextran-arginine bioconjugate gene delivery vector. *Biomaterials*, 33, 604-613.
- Yatsu, F.K.J., Koester, L.S., Lula, I., Passos, J.J., Sinisterra, R., Bassani, V.L. (2013). Multiple complexation of cyclodextrin with soy isoflavones present in an enriched fraction. *Carbohydrate Polymers*, 98, 726-735.
- Young, O.A., Gupta, R.B., Sadooghy-Saraby, S. (2012). Effects of cyclodextrins on the flavor of goat milk and its yogurt. *Journal of Food Science*, 77, 122-127.
- Yuan, C., Lu, Z., Jin, Z. (2014). Characterization of an inclusion complex of ethyl benzoate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 152, 140-145.
- Yuliani, S., Torley, P. J., D'Arcy, B., Nicholson, T., Bhandari, B. (2006). Extrusion of mixtures of starch and d-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food Research International*, 39, 318-331.
- Zbicinski, I., Delag, A., Strumillo, C., Adamiec, J. (2002). Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying. *Chemical Engineering Journal*, 86, 207-216.
- Zhang, Y., Jiang, X.G., Yao, J. (2001). Nasal absorption enhancement of insulin by sodium deoxycholate in combination with cyclodextrins. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22, 1051-1056.
- Zhang, J., & Ma, P.X. (2013). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1215-1233.
- Zhao, Q., Kuang, W., Fang, M., Sun-Waterhouse, D., Liu, T., Long, Z., Zhao, M. (2015). Frozen, chilled and spray dried emulsions for whipped cream: Influence of emulsion preservation approaches on product functionality. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 287-293.

-
- Zhu, G., Xiao, Z., Zhou, R., Zhu, Y. (2014). Study of production and pyrolysis characteristics of sweet orange flavour- β -cyclodextrin inclusion complex. *Carbohydrate Polymers*, 105, 75-80.