

Producción de Ciclodextrinas a partir de Almidón de Yuca y Mucílago de Cacao

María Fernanda Mercado Villamizar

Trabajo de Grado para optar al título de Químico

Director

Julio Roberto Pinzón Joya

PhD en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

"No se inquieten por nada; más bien, en toda ocasión, con oración y ruego, presenten sus peticiones a Dios y denle gracias. Y la paz de Dios, que sobrepasa todo entendimiento, cuidará sus corazones y sus pensamientos en Cristo Jesús."

Filipenses 4:6-7

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme culminar mi carrera y brindarme el conocimiento, la sabiduría y la seguridad ante cada paso de mi vida. Agradezco a mi familia, mi padre José Luis, mi abuela María, mis dos hermanos y a mi madre por ser las columnas y bases de mi vida, por apoyarme y brindarme tanto amor y confianza y sobre todo gracias por escucharme y aconsejarme. Una familia unida es dichosa si teme al Señor y siempre está tomado de su mano.

Agradezco a mi director y guía el profesor Julio Pinzón, por brindarme la confianza y conocimiento necesario para el desarrollo de mi proyecto de grado.

Agradezco al grupo de investigación GIFTEX y al proyecto NEXTCOA, dirigidos por el profesor Cristián Blanco, por recibirme en su grupo y por brindarme la mejor formación académica.

Agradezco a mis compañeros del grupo Bleidy, Deisy, Luis Miguel, Jesús, Tatiana, Yesica, Juliana, María y a los compañeros pasantes de UNISUCRE Dinais y Carlos, por brindarme cariño, palabras de apoyo y confianza y sobre todo, una verdadera amistad. También agradezco a mis compañeros que me acompañaron durante toda la carrera e hicieron el camino más fácil, en especial cuando se está bien acompañado, a Claudia, Daniela, Andrea, Vanessa, Jhon Diego, Juan, Deiby y Marlon, un gran cariño y aprecio a ustedes.

Tabla de Contenido

Introducción	19
1. Objetivos	21
2. Marco referencial	22
2.1. Mucílago de cacao	22
2.2. Almidón	24
2.3. Ciclodextrinas	26
2.4. Enzimas	31
3. Antecedentes	36
4. Diseño metodológico	40
4.0.1. Producción de ciclodextrinas a partir de almidón de yuca	40
4.0.2. Producción de ciclodextrinas a partir de mucílago de cacao	42
4.0.3. Estudio de la ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTasa)	44
4.0.3.1. Determinación de proteína	44
4.0.3.2. Cinética enzimática	45
4.1. Caracterización de ciclodextrinas por resonancia magnética nuclear (RMN)	45
4.1.1. Espectrometría de masas	46

5. Resultados y análisis	48
5.1. Almidón de yuca	48
5.2. Mucílago de cacao	54
5.3. Cinética enzimática	58
5.3.1. Determinación de proteína	58
5.3.2. Michaelis-Menten	59
5.3.2.1. Almidón de yuca	59
5.3.2.2. Mucílago de cacao	62
5.4. Caracterización de CDs por RMN	64
5.4.1. Resultados para núcleo ^1H	64
5.4.2. Resultados para núcleo ^{13}C	67
5.5. Caracterización de CDs por HPLC	71
5.5.1. Método para caracterización de azúcares	71
5.5.2. Método para caracterización de CDs	78
5.6. Caracterización de CDs por espectrometría de masas	85
5.6.1. MS-MALDI-TOF	85
5.6.2. MS-ESI-IT	88
6. Conclusiones	93
Referencias Bibliográficas	94

Lista de Figuras

Figura 1.	Estructura del almidón.	25
Figura 2.	Estructura cóncava de las ciclodextrinas.	28
Figura 3.	Derivados de uso farmacéutico de las CDs. (A) β -CD sulfobutil éter. (B) Hidroxipropilo β -CD.	30
Figura 4.	Curva de calibración de β -CD acomplejada con fenolftaleína.	48
Figura 5.	Concentración β -CD (mg/mL) a partir de almidón de yuca versus pH de solución.	50
Figura 6.	Concentración β -CD (mg/mL) partiendo de almidón de yuca versus el tiempo de reacción.	51
Figura 7.	Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de β -CD a partir de almidón.	53
Figura 8.	Gráfica de interacción media de β -CD versus concentración de almidón de yuca a diferentes concentraciones de CGTasa.	53
Figura 9.	Concentración de β -CD (mg/mL) a partir de mucílago de cacao versus el pH de solución.	55
Figura 10.	Concentración β -CD partiendo de mucílago de cacao versus el tiempo de reacción.	56

Figura 11.	Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de β -CD a partir de mucílago de cacao.	57
Figura 12.	Gráfica de interacción media de β -CD versus concentración de mucílago de cacao a diferentes concentraciones de CGTasa.	58
Figura 13.	Curva de calibración albúmina sérica (BSA).	59
Figura 14.	Cinética enzimática de Michaelis-Menten del almidón de yuca	60
Figura 15.	Gráfico Lineweaver-Burk para el almidón de yuca.	61
Figura 16.	Cinética enzimática de Michaelis-Menten del mucílago de cacao.	62
Figura 17.	Gráfico Lineweaver-Burk para el mucílago de cacao	63
Figura 18.	Estructura de la glucopiranososa enumerada con sus respectivos protones .	64
Figura 19.	Espectro $^1\text{H-NMR}$ de estándar α -CD. Disolvente: D_2O (400 mHz)	64
Figura 20.	Espectro $^1\text{H-NMR}$ de estándar β -CD. Disolvente: D_2O (400 mHz)	65
Figura 21.	Espectro $^1\text{H-NMR}$ de estándar γ -CD. Disolvente: D_2O (400 mHz)	66
Figura 22.	Estructura de la glucopiranososa enumerada con los repectivos núcleos de carbono analizados.	68
Figura 23.	Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ de α -CD. Disolvente: D_2O (400 mHz)	68
Figura 24.	Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ de β -CD. Disolvente: D_2O (400 mHz)	69
Figura 25.	Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ de γ -CD. Disolvente: D_2O (400 mHz)	70
Figura 26.	Curva de calibración de fructosa.	72
Figura 27.	Coefficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración de fructosa.	73
Figura 28.	Curva de calibración de glucosa.	74

Figura 29.	Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración de glucosa.	75
Figura 30.	Curva de calibración de sacarosa.	76
Figura 31.	Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración de sacarosa.	77
Figura 32.	Cromatograma estándares de α , β y γ -CD.	78
Figura 33.	Curva de calibración de estándar α -CD.	79
Figura 34.	Curva de calibración de estándares β -CD.	80
Figura 35.	Curva de calibración de estándares γ -CD.	81
Figura 36.	Coeficiente de variación versus concentración de α -CD.	82
Figura 37.	Coeficiente de variación versus concentración de β -CD.	83
Figura 38.	Coeficiente de variación versus concentración de γ -CD.	83
Figura 39.	Cromatograma de la solución final de mucílago con CDs.	84
Figura 40.	Espectro de masas MALDI-TOF estándares de α , β y γ -CD.	86
Figura 41.	Espectro de masas MALDI-TOF de almidón de yuca.	86
Figura 42.	Espectro de masas MALDI-TOF de CDs a partir de almidón de yuca.	87
Figura 43.	Espectro de masas MALDI-TOF de mucílago de cacao.	87
Figura 44.	Espectro de masas MALDI-TOF de CDs a partir de mucílago de cacao.	88
Figura 45.	Espectro de masas ESI-IT estándar de α -CD.	89
Figura 46.	Espectro de masas ESI-IT estándar de β -CD.	89
Figura 47.	Espectro de masas ESI-IT estándar de γ -CD.	90
Figura 48.	Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para la molécula de almidón.	91

Figura 49. Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para las CDs obtenidas a partir de
almidón.

91

Figura 50. Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para mucílago de cacao.

92

Figura 51. Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para mucílago de cacao.

92

Lista de Tablas

Tabla 1.	Departamentos de Colombia con mayor producción de cacao en el 2018	23
Tabla 2.	Composición química del mucílago de cacao	24
Tabla 3.	Características fisicoquímicas del almidón de yuca, trigo, papa y maíz.	25
Tabla 4.	Propiedades fisicoquímicas de las α , β , γ -CD	30
Tabla 5.	Características fisicoquímicas de las enzimas α -amilasa y CGTasa	35
Tabla 6.	Producción de β -CD a partir de diferentes crudos de almidón	38
Tabla 7.	Variabilidad de pH en la producción de CDs a partir de almidón de yuca	41
Tabla 8.	Condiciones generales del diseño experimental descrito para la producción de CDs a partir de almidón de yuca	42
Tabla 9.	Condiciones generales del diseño experimental descrito para la producción de CDs a partir de mucílago de cacao	43
Tabla 10.	Curva de calibración BSA	44
Tabla 11.	Condiciones ensayos realizados por HPLC para método de azúcares	45
Tabla 12.	Condiciones ensayos realizados por HPLC para método de CDs.	46
Tabla 13.	Condiciones utilizadas en espectrometría de masas ESI-IT	47
Tabla 14.	Concentración β -CD a partir de almidón de yuca variando el pH.	49
Tabla 15.	Concentración de β -CD a partir de almidón de yuca según el tiempo de reacción.	50

Tabla 16.	Resultados diseño experimental aplicado a concentración de β -CD a partir de almidón de yuca.	52
Tabla 17.	Concentración β -CD a partir de mucílago de cacao variando el pH.	54
Tabla 18.	Resultados diseño experimental aplicado a concentración de β -CD a partir de mucílago de cacao	57
Tabla 19.	Asignación de señales $^1\text{H-NMR}$ de α -CD.	65
Tabla 20.	Asignación de señales $^1\text{H-NMR}$ de β -CD.	66
Tabla 21.	Asignación de señales $^1\text{H-NMR}$ de γ -CD.	67
Tabla 22.	Asignación de señales $^{13}\text{C-NMR}$ de α -CD	69
Tabla 23.	Asignación de señales $^{13}\text{C-NMR}$ de β -CD	70
Tabla 24.	Asignación de señales $^{13}\text{C-NMR}$ de γ -CD	71
Tabla 25.	Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de la fructosa.	72
Tabla 26.	Determinación de la repetibilidad del método para curva de fructosa.	73
Tabla 27.	Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de glucosa.	74
Tabla 28.	Determinación de la repetibilidad del método para curva de glucosa.	75
Tabla 29.	Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de sacarosa.	76
Tabla 30.	Determinación de la repetibilidad del método para curva de sacarosa.	77
Tabla 31.	Cálculos de los cromatogramas de estándares de CDs para validación del método.	79
Tabla 32.	Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de α -CD.	80
Tabla 33.	Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de β -CD.	81
Tabla 34.	Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de γ -CD.	82

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Permiso/licencia para uso de de la Figura 2	102

Glosario

Ciclodextrinas Son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de glucopiranosas unidos mediante enlaces glucosídicos α -(1→4), que le confiere a la molécula forma de cono truncado con cavidad hidrofóbica y corteza exterior hidrofílica (Fourmentin et al. (2018)).

Almidón Contiene dos tipos de polímeros de glucosa, los cuales forman cadenas largas de D-glucosa con enlaces α -(1→4) (amilosa) y otros con enlaces α -1,4 en conjunto con residuos de glucosa ramificados por enlaces α -(1→6) (amilopectina) (Bermiller and Whistler (2009)).

Oligosacáridos Consiste en cadenas cortas de unidades o residuos de monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos (Osborn et al. (2000)).

Enzima Son proteínas catalizadoras que incrementan la velocidad de la reacción química y no son consumidas durante la reacción (Campbell and Farrell (2011)).

CGTasa siglas que corresponden a la enzima ciclodextrin glucosiltransferasa (EC 2.4.1.19), la cual cataliza las reacciones de transferencia glicosil intermolecular e intramolecular (Pócsi et al. (1998)).

Transglicosilación Transferencia de un residuo de azúcar de un glucósido a otro (Okotore (2015)).

Resumen

Título: Producción de ciclodextrinas a partir de almidón de yuca y mucílago de cacao *

Autor: María Fernanda Mercado Villamizar **

Palabras Clave: Ciclodextrinas, oligosacáridos, mucílago de cacao, almidón de yuca, ciclodextrin glucosiltransferasa.

Descripción: Las ciclodextrinas (CDs) son macromoléculas solubles en agua utilizadas en la industria alimentaria, agrícola, ambiental, textil, farmacéutica y cosmética. CDs tienen una estructura cóncava con cavidad no polar y corteza exterior polar que le confiere propiedades de encapsulación. La cáscara del cacao y el mucílago corresponde al 92% de la masa del fruto del cacao y éstos son desechados durante la producción de cacao. El mucílago contiene principalmente agua, sacarosa, glucosa y fructosa, pero también contiene oligosacáridos lineales y ramificados similares a los del almidón. Con el fin de aprovechar este residuo agrícola, el mucílago de cacao fue estudiado como sustrato para la producción de ciclodextrinas mediante la acción de la enzima ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTase Amano, Japón). Para la producción de CDs a partir de almidón se determinó que las condiciones óptimas son pH de 8,0, tiempo de reacción de 120 min, temperatura de incubación 55°C, concentración de almidón 0,025 g/mL y 138,6 U/g. Al cambiar de sustrato por mucílago las condiciones óptimas determinadas fueron pH 6,0, tiempo de reacción 60 min, temperatura de incubación 55°C, 1,0 g/mL de concentración de mucílago y 3000 U/g de CGTasa. Las CDs fueron obtenidas en bajas concentraciones y su formación ocurrió por la acción de la CGTasa en los oligosacáridos presentes en el mucílago de cacao.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Julio Roberto Pinzón Joya, PhD en Química.

Abstract

Title: Production of cyclodextrin from cassava starch and cocoa mucilage *

Author: María Fernanda Mercado Villamizar **

Keywords: Cyclodextrins, Oligosaccharides, Cocoa Mucilage, Cassava Starch, Cyclodextrin Glycosyltransferase.

Description: Cyclodextrins are water soluble macromolecules widely used in food, agricultural, environmental, textile, pharmaceutical and cosmetic industries. They have a concave structure with a non polar cavity and a polar exterior that confers their encapsulation properties. Cocoa shells and mucilage correspond to 92% by mass of the cocoa fruit and those components are lost during cocoa production. Mucilage contains mainly water, saccharose, glucose and fructose but also contains linear and branched oligosaccharides analogs to starch. In order to take advantage of this agricultural waste; cocoa mucilage was studied as substrate for the production of cyclodextrins by the action of the cyclodextrin glucosyl transferase (CGTase Amano, Japan). For the production of CDs from starch it was determined that the optimal conditions are pH 8.0, reaction time 120 min, incubation temperature 55 °C, concentration of starch 0.025 g / mL and 138.6 U / g. When changing substrate for a lot, the optimal conditions determined were pH 6.0, reaction time on 60 min, incubation temperature on 55 °C, 1.0 g / mL of mucilage concentration and 3000 U / g of CGTase. Cyclodextrins were successfully obtained in low concentrations and their formation occurred by the action of the CGTase on the oligosaccharides present in cocoa mucilage.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Julio Roberto Pinzón Joya, Doctorado en Química.

Introducción

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos producidos principalmente por la síntesis enzimática selectiva entre la enzima ciclodextrin glucosil transferasa (CGTasa) y el almidón como sustrato. Estas moléculas están constituidas por unidades de glucosa representadas en forma de silla rígida y unidas por enlaces glucosídicos α -(1→4), que les permite conservar su estructura en forma de cono truncado con cavidad hidrofóbica y corteza exterior hidrofílica (Szente et al. (2016)). Las CDs se utilizan principalmente en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. La producción de esta molécula inicia con el tratamiento del almidón a altas temperaturas con el fin de disminuir su viscosidad. Luego, se realiza el proceso de liberación de las glucosas libres junto con otros oligosacáridos y finalmente, se enfría el producto hasta lograr la temperatura adecuada para que no se afecte la actividad enzimática al adicionar la CGTasa (Szejtli (2004)). Dicho proceso produce una mezcla de α , β y γ -CD, que posteriormente son separadas mediante técnicas preparativas (Jindrich et al. (1995)).

El almidón es un polisacárido compuesto de monómeros de α -D-glucosa unidos mediante puentes acetales α -glucosídicos (MacFaddin (2003)), además de ser parte de la reserva energética de la mayoría de vegetales, el almidón también es la principal fuente dietética de glúcidos utilizable. Una de sus propiedades más relevantes es su capacidad para formar dextrinas mediante la ruptura parcial de su estructura ya sea mediante la hidrólisis enzimática o al ser sometido a altas temperaturas (Mason et al. (2009)). La enzima CGTasa tiene la capacidad de formar α -(1→4)-

glucanos a partir de almidón, función fundamental para la producción de CDs. La producción de cacao genera 92 % de residuo orgánico constituido por cáscara y mucílago de cacao. Las CDs son sintetizadas a partir de almidón; sin embargo, la propuesta de investigación realizada se basó en cambiar el sustrato almidón por los oligosacáridos presentes en el mucílago de cacao. La síntesis de CDs se realizó partiendo de 1,0 g/mL de solución de mucílago y 3000U/g de CGTasa, obteniendo 0,6301 mg/mL. Dicha concentración es bastante menor comparada con 2,461 mg/mL obtenida a partir de una solución 0,025 g/mL de almidón de yuca y 138,6 U/g de CGTasa.

1. Objetivos

Objetivo general

Estudiar y optimizar la producción de ciclodextrinas utilizando almidón de yuca y mucílago de cacao como sustratos.

Objetivos específicos

Optimizar las condiciones de pH, concentración del sustrato, concentración de enzima y temperatura para la producción de ciclodextrinas.

Cuantificar la producción de α , β y γ ciclodextrinas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Purificar y caracterizar las ciclodextrinas por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

2. Marco referencial

En el presente capítulo se realizó la revisión bibliográfica de las ciclodextrinas, el proceso enzimático que conlleva su producción y la definición de los sustratos utilizados.

2.1. Mucílago de cacao

El cacao pertenece a la familia Malvaceae, subfamilia *Sterculioidea*, género *Theobroma* y especie *Theobroma cacao* L.. Su nombre científico fue descrito por primera vez en 1753 por el botánico sueco Carl Linnaeus en su libro *Species Plantarum*. Su nombre griego *Theobroma* significa alimento de los dioses y *cacao* se deriva del náhuatl (lenguaje azteca) palabra xocolatl, de xococ (amargo) y atl (agua) (Rojas and Sánchez (2013)). El cacao ha sido utilizado como alimento por más de 2000 años, fue alimento y fuente de riqueza para los indígenas Mayas y Aztecas radicados en Centroamérica. Luego, fue llevado a Europa por los españoles después del descubrimiento de América y de esta manera llegó a las isla del Caribe, Asia, Oceanía y África. Actualmente, el cacao es un producto potencialmente industrializado por todo el mundo, con una producción mundial de 4,8 millones de toneladas. Los principales países exportadores de este fruto son Costa de Marfil, Ghana, Holanda, Nigeria e Indonesia y los países que más demandan este producto son Holanda, Estados Unidos, Alemania, Malasia y Bélgica (Center (2014)).

En el 2018 Colombia produjo 56.867 toneladas de cacao, de los cuales 23.574 toneladas fueron producidos por el departamento de Santander, que corresponden al 41,45 % de la producción nacional. Las regiones con mayor producción de esta materia prima son Santander, Antioquia,

Arauca, Huila, Tolima, Nariño y Cesar (Tabla 1) según los datos reportados en el 2018 por la Federación Nacional de Cacaoteros.

Tabla 1

Departamentos de Colombia con mayor producción de cacao en el 2018

Departamento	Producción
Santander	23 574
Antioquia	4905
Arauca	4478
Huila	4466
Tolima	4108
Nariño	3376
Cesar	1902

El fruto de cacao está principalmente constituido por granos de cacao en su interior (8%), mucílago y cáscara (92%). El mucílago es un subproducto que se obtiene de la fermentación enzimática del cacao. Está compuesto principalmente por azúcares solubles y pectina (Tabla 2). Además, es una excelente fuente de fibra dietaria soluble (Joshi (2016)). Debido a su alto contenido de ácido cítrico, el pH inicial es de 3,6 lo cual favorece el crecimiento de las levaduras y proporciona un bajo nivel de oxígeno. Durante el proceso de fermentación, la especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene la habilidad de tolerar altas concentraciones de etanol, esta habilidad la clasifica en la especie de levadura dominante más utilizada en los procesos de fermentación (Abarca et al. (2010)).

El mucílago de cacao ha demostrado ser una fuente agrícola de gran utilidad en la elaboración de mermelada (Anvoh et al. (2009)), vinagre (Solieri and Giodici (2009)), bebidas alcohólicas (Tinh et al. (2016)), celulosa bacteriana (Duran and Cabezas (2019)) y jaleas. Con el fin de aprovechar parte de los desechos producidos por la cosecha de cacao, se estudió la posibilidad de convertir

Tabla 2

Composición química del mucílago de cacao

Composición	Porcentaje
Agua	79,2 - 84,2
Sustancias secas	15,8 - 20,8
Ácidos no volátiles	0,77 - 1,50
Ácidos volátiles	0,02 - 0,04
Glucosa	5,32 - 11,6
Sacarosa	0,11 - 0,90
Pectina	5,00 - 6,90
Proteína	0,42 - 0,50
Ceniza	0,40 - 0,50
Proteína	6,05 - 6,13
Grasa	2,11 - 2,13
Extracto libre de nitrógeno	72,4 - 75,6

los oligosacáridos presentes en el mucílago de cacao en CDs, dándole un valor agregado y utilidad al desecho agrícola.

2.2. Almidón

El almidón es un polisacárido compuesto por una mezcla de amilosa y amilopectina (Figura 1). La amilosa está constituida por enlaces α -(1→4) de polímeros de glucosa y la amilopectina por enlaces α -(1→4) de polímeros de glucosa ramificados con enlaces α -(1→6). Estas moléculas tienen la capacidad de separarse entre sí al calentar el almidón natural en butanol acuoso y dejar enfriar hasta que se forme una suspensión, en el cual la amilopectina queda suspendida y la amilosa en el precipitado (Allinger (1973)). El contenido de amilosa presente es un factor clave que determina la calidad del almidón.

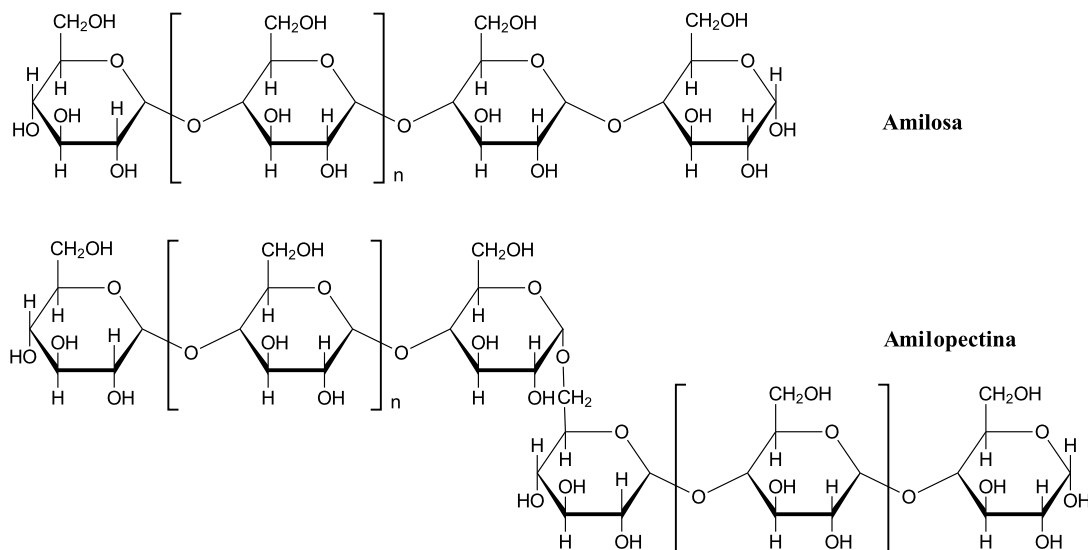


Figura 1. Estructura del almidón.

La composición del almidón de yuca comparada con otros almidones (Tabla 3) fue estudiada originalmente por Swinkels (1985). Dicho trabajo demostró los bajos niveles de materia residual, bajo contenido de amilosa y alto contenido de amilopectina en el almidón de yuca.

Tabla 3
Características fisicoquímicas del almidón de yuca, trigo, papa y maíz.

Propiedades	Yuca	Trigo	Papa	Maíz
Diámetro del gránulo	4 - 35	1 - 45	5 - 100	2 - 30
Humedad al 65 %	13	13	19	13
% Lípidos en sustrato seco	0,1	0,8	0,05	0,7
% Proteínas	0,1	0,4	0,06	0,7
% Ceniza	0,2	0,2	0,4	0,1
% Fósforo	0,01	0,06	0,08	0,02
% Contenido de amilosa	17	28	21	28
% Contenido de amilopectina	83	72	79	72

Actualmente el almidón es materia prima de gran interés debido a su capacidad de convertirse en unidades de glucosa mediante la acción enzimática sin formar subproductos. Uno de los estudios más significativos de la utilidad del almidón es la elaboración de alcohol como una alternativa de biocombustibles (Castaño P and Mejía G (2008)). Este proceso puede realizarse por sacarificación-fermentación simultánea, sacarificación enzimática-fermentación independiente o por fermentación alcohólica utilizando microorganismos con capacidad amilolítica (la de mayor rendimiento en la producción de alcohol). En Colombia, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ha diseñado un sistema para producir etanol hidratado. La planta refinadora tiene la capacidad de producir 300 litros de biocombustible por día (Díaz (2012)).

2.3. Ciclodextrinas

La producción de dextrinas a partir de almidón de papa fue realizada por primera vez en 1891 por el científico Villier, quien utilizó *Bacillus amylobacter* para fermentar el almidón y como resultado obtuvo el carbohidrato $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$, el cual denominó celulosina (Villier (1891)).

Años después, Schardinger trabajó con bacterias anaeróbicas causantes del deterioro de alimentos con el fin de observar su actividad en la fermentación del almidón, de esta manera obtuvo dos componentes, uno en mayor cantidad del otro, los cuales denominó dextrinas cristalinas (Schardinger (1903)). Posteriormente, los estudios sobre dichos componentes continuaron y los denominó α -dextrina y β -dextrina. Además, observó que no sólo podían derivarse del almidón de papa sino también de almidón de maíz y de trigo (Schardinger (1911)).

En 1935, Freudenberg y Jacobi, además de proponer la estructura de la γ -CD, sugirieron

que las ciclodextrinas podrían presentarse en diferentes tamaños y podrían describirse como oligosacáridos cíclicos formados por unidades de glucosa (Freudenberg and Jacobi (1935)). Asimismo, Freudenberg, junto con sus colaboradores Cramer y Planinger, fueron los primeros en desarrollar la patente dedicada a esta molécula en 1953 (Freudenberg et al. (1953)).

A partir de 1970, la aplicación y estudio de las ciclodextrinas fue abordado por varios campos de la ciencia, especialmente aplicados a la ingeniería enzimática. Se realizaron estudios con cepas *Bacilli*, cepas del género *Micrococcus* y del género *Klebsiella* (Sicard et al. (1987)). Todo enfocado a biomoléculas que estén relacionadas a la producción de ciclodextrin glucosil transferasa (CGTasa), la cual ya había sido estudiada por su capacidad de separar un giro de la hélice de polisacáridos y unir los dos extremos del fragmentos para formar una dextrina cíclica (Saenger (1980)).

Las ciclodextrinas, también conocidas como dextrinas de Schardinger son oligosacáridos cíclicos que constan de seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho (γ -CD) unidades de glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α -(1 \rightarrow 4). Estructuralmente, las CDs están constituidas por dos aberturas en los extremos de la molécula, donde una es más amplia que la otra debido a la disposición de los grupos hidroxilos primarios y secundarios. Además, su forma está regida por una cavidad hidrofóbica (interior) en forma de cono truncado y una parte exterior hidrofílica (Figura 2). La disposición de los hidroxilos primarios permite la rotación libre, lo que ocasiona una reducción en el diámetro efectivo de la cavidad. En cambio, la rotación libre de los hidroxilos secundarios, interviene en la formación del tamaño de cavidad más amplio.

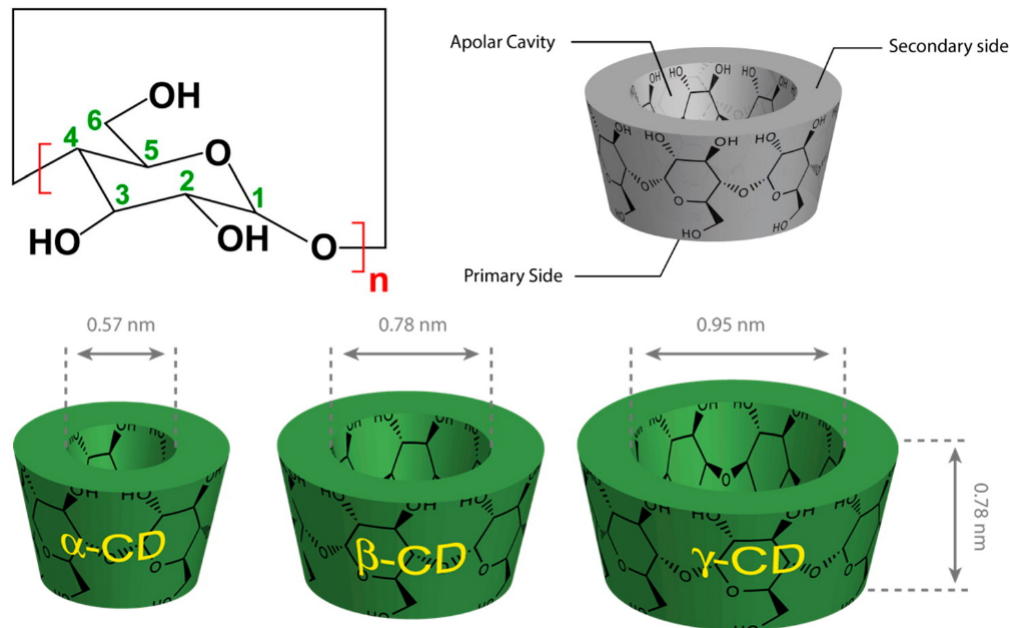


Figura 2. Estructura cónica de las ciclodextrinas.

FUENTE: Reimpreso (adaptado) con permiso de Crini, G. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 10940-10975. Copyright 2014. American Chemical Society. (Anexo A).

El tamaño de la cavidad y la forma de la estructura de la CDs está directamente relacionada con las propiedades y tipos de enlaces que éstas pueden realizar (Tabla 4). Por ejemplo, la γ -CD posee una estructura no coplanar, que le confiere mayor solubilidad respecto a las otras CDs (Ahmed et al. (2012)). Por otra parte, la β -CD puede formar enlaces intramoleculares de puentes de hidrógeno y en consecuencia, su cavidad es más estrecha, le confiere mayor rigidez y menos solubilidad. Finalmente, la α -CD sólo puede formar cuatro de los seis posibles puentes de hidrógeno ya que posee una unidad de glucopiranososa en forma distorsionada, esto les confiere menos rigidez a la α -CD que la β -CD (Parkin (2018)). Las CDs son macromoléculas solubles en agua, esta propiedad se debe a los grupos hidroxilo que posee en su superficie. El orden creciente de solubilidad

de las CDs es $\beta < \alpha < \gamma$. En la Tabla 4 están representados los valores de ΔH° (solución) y ΔS° (solución), los cuales presentan acciones favorables o desfavorables en la solubilidad de las CDs.

La industria farmacéutica se enfoca en aprovechar la capacidad de las CDs de formar complejos, no sólo para aumentar la solubilidad de los fármacos, sino además, mejorar su disponibilidad y estabilidad. Estudios recientes, han demostrado que las sustituciones de los grupos hidroxilo que forman puentes de hidrógeno en las CDs en los derivados de las mismas ofrecen mayor solubilidad al sistema complejante. Los derivados de mayor interés en la industria farmacéutica (Figura 3) son hidroxipropilo β -CD, β -CD metilado al azar, β -CD sulfobutil éter y CD ramificado con maltosil- β -CD (Brewster and Loftsson (2007)).

La mayoría de las aplicaciones de las CDs se basan en su capacidad de formar complejos supramoleculares con una amplia variedad de compuestos (Parkin (2018)). Incluyendo los aditivos utilizados en alimentos los cuales son protegidos en sus cavidades evitando que se descompongan o contaminen. Entre estos compuestos cabe mencionar agentes saborizantes (Qi and Hedges (2018)), terpenoides, antioxidantes, azúcares (Szejtli (2004)), aceites esenciales, vitaminas y otros. Las CDs también se pueden utilizar en la formación de emulsiones estables para formar aderezos, colorantes artificiales y otros evitando así su descomposición.

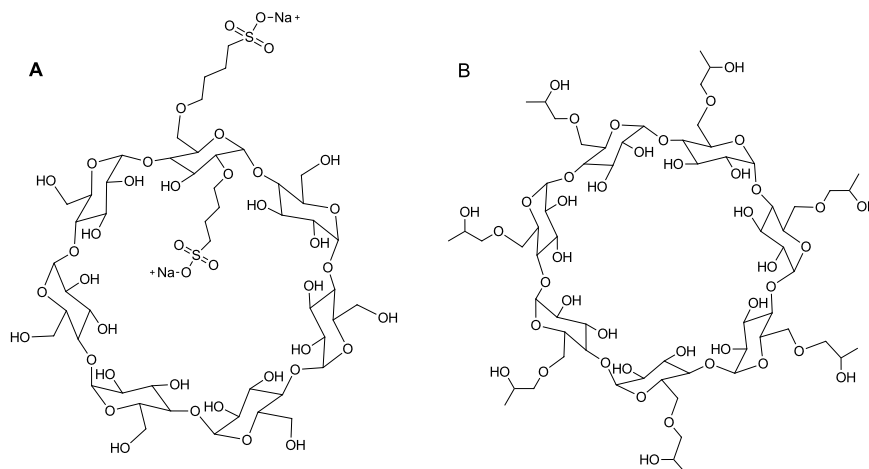


Figura 3. Derivados de uso farmacéutico de las CDs. (A) β -CD sulfobutil éter. (B) Hidroxipropilo β -CD.

Tabla 4
Propiedades fisicoquímicas de las α , β , γ -CD

Propiedad	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Fórmula molecular	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masa molecular	972,85	1134,99	1297,14
Diámetro de la cavidad (nm)	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
Volumen aproximado de la cavidad (nm ³)	0,174	0,262	0,427
Forma cristalina en agua	Platos hexagonales	Paralelogramos monoclinicos	Prisma cuadrático
α_D (25°C)	150±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
pK _a (25°C)	12,33	12,20	12,08
ΔH° (solución) kJ mol ⁻¹	32,10	34,78	32,35
ΔS° (solución) J mol ⁻¹ K ⁻¹	57,75	48,96	61,52

Como la α -CD no tiene olor, ni sabor, es térmicamente estable, tolera un amplio rango de condiciones de pH y es soluble en agua. Por tal razón se usa en la industria como aditivo a alimentos semisólidos y se adiciona a bebidas con el propósito de incorporar fibra dietaria. De las aplicaciones de las CDs más utilizadas en la industria está la adición a quesos y carnes (Kwak et al. (2003)) para aumentar la retención de agua y longevidad de los productos. Además, es utilizado en plásticos para reducir la pérdida de aroma (Szente and Fenyvesi (2018)) y en agricultura actúa como fungicida (Gao et al. (2019)). Sin embargo, el costo actual aún impide su amplia aplicación en la industria alimenticia.

Las CDs se utilizan como excipientes en formulaciones farmacéuticas para mejorar la solubilidad, la estabilidad y la biodisponibilidad de una forma que no es posible con otros ingredientes inactivos. Por lo tanto, estas macromoléculas son reconocidas como excipientes esenciales para la formulación de ciertos medicamentos por lo que no pueden ser fácilmente reemplazados por otras sustancias. Las CDs pueden almacenar y transportar compuestos hidrofóbicos en solución acuosa o a través de la sangre hasta las membranas lipofílicas de las células. De esta forma, es posible entregar medicamentos en un target específico, bien sea que se suministre por vía oral o por administración parenteral (Loftsson and Duchene (2007)).

2.4. Enzimas

El proceso de conversión de CDs a partir de oligosacáridos de cadena corta se basa en un proceso enzimático de dos pasos: hidrólisis enzimática del almidón y ciclación enzimática de mal-

todextrinas. La hidrólisis del almidón se realizaba mediante hidrólisis ácida y altas temperaturas, pero este proceso requiere gasto excesivo de energía y reactivos ácidos. Actualmente, la industria alimentaria ha buscado diferentes alternativas que requieran menor tiempo de reacción y mayor efectividad de los productos de dicha hidrólisis. La hidrólisis enzimática se realiza por la acción de enzimas con efecto catalítico, causando el rompimiento de enlaces glucosídicos del almidón. Las enzimas que se encargan de hidrolizar o sintetizar enlaces glucosídicos pueden ser las siguientes:

- α -amilasa (EC 3.2.1.1): Se encarga de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4.
- Pululanasa (EC.3.2.1.41) o isoamilasa (EC 3.2.1.68): Su función es hidrolizar enlaces glucosídicos α -1,6.
- Ciclodextrin glucanotransferasa (EC 2.4.1.19): Tiene la capacidad de formar transglicosilación de enlaces glucosídicos α -1,4.
- α -1,4-D-glucano α -6-D(α -1,4-D-glucano)-transferasa: Se encarga de formar transglicosilación de enlaces glucosídicos α -1,6.

La amilasa fue aislada por primera vez en 1833 por los científicos Anselme Payen y Jean-Francois Persoz (Payen and Persoz (1833)). En 1930, Ohlsson descubrió otro tipo de amilasa, la β -amilasa, de allí concluyó que al mantener la acidez natural de la cebada de malteada y al proporcionar calor (70°C) durante 15 minutos, la β -amilasa se inactivaría inmediatamente y se produciría α -amilasa, esta conclusión ha sido fundamental para múltiples procesos industriales (Ohlsson (1930)). Los inhibidores de la α -amilasa fueron reportados por Marshall and Lauda (1975) al estudiar la faseolamina, una glicoproteína proveniente de los frijoles (*Phaseolus vulgaris*) con actividad

inhibitoria en la α -amilasa de origen animal y sin actividad inhibitoria en las enzimas provenientes de plantas, bacterias u hongos .

La α -amilasa (EC 3.2.1.1) denominada sistemáticamente como 1,4-alfa-D-glucan glucano-hidrolasa, se encuentra principalmente en la saliva y el páncreas humano. Es una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces internos α -1,4 glucosídicos para producir una mezcla de maltosa, malttriosa y oligosacáridos ramificados de seis a ocho unidades de glucosa. Esta glicoproteína está constituida por una cadena polipeptídica de aproximadamente 475 residuos aminoácidos y contiene dos grupos tiol libres, cuatro puentes disulfuro y un Ca^{2+} estrechamente unido. La α -amilasa es considerada una metaloenzima de calcio ya que depende de la presencia de un cofactor de metal para su estabilidad. Como activador para esta enzima funciona el cloruro y para brindar estabilidad a ésta los iones calcio (Sundarram and Murthy (2014)).

La función principal de la α -amilasa es hidrolizar los alimentos, en especial los que contienen alto contenido de almidón para convertirlos en disacáridos o trisacáridos. Así, esta enzima participa en el ciclo de producción de energía del cuerpo. La α -amilasa producida en las glándulas salivares tiene la capacidad de hidrolizar carbohidratos simples En cambio la α -amilasa producida en el páncreas hidroliza los carbohidratos complejos, de esta manera se realiza un mejor tratamiento de los carbohidratos digeridos.

Las amilasas se clasifican según el tipo de enlace en que actúan:

- α -amilasa: Su función principal es hidrolizar los enlaces glucosídicos internos α -1,4 generalmente presentes en almidón u oligosacáridos de bajo peso molecular como la glucosa y maltosa. En humanos, todas las formas isómeras de esta enzima se encuentran en el cromosoma 1p21 (AMY1A).
- β -amilasa: Es sintetizada por bacterias, plantas y hongos. Esta enzima es la encargada de hidrolizar el segundo enlace glucosídico α -1,4, separando dos unidades de glucosa (maltosa). Además, se caracteriza por ser la responsable de producir el sabor dulce de las frutas después de madurar al romper el almidón en maltosa.
- γ -amilasa: Se encarga de hidrolizar enlaces glucosídicos α -1,6, actuando justo en el extremo no reductor de la amilosa y la amilopectina para producir unidades de glucosa.

Además de utilizar enzimas para la hidrólisis del almidón, es necesario estudiar el comportamiento de las unidades de glucosa obtenidas para evaluar su capacidad de ciclarse, es decir, de formar CDs. La enzima encargada de realizar esta función es la ciclodextrin glucosil transferasa (CGTasa, EC 2.4.1.19). Esta enzima hace parte de la familia más grande de glucósido hidrolasas (Leemhuis et al. (2009)). La CGTasa proviene generalmente por especies del género *Bacillus*: *B. circulans*, *B. macerans*, *B. subtilis* u otros microorganismos como *Klebsiella pneumoniae*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Thermococcus* sp., *Brevibacterium* sp., entre otros (Stan-kovic Slavisa et al. (2016)). La CGtasa es la única enzima capaz de usar el hidroxilo libre en el extremo reductor del intermedio de la cadena de azúcares como aceptor formando así un oligosacárido cíclico. La primera visión de su estructura en 3D fue propuesta en 1991 por Klein y Schulz

Klein and Schulz (1991).

Las enzimas α -amilasa y CGTasa comprenden ciertas características fisicoquímicas que permiten su óptimo funcionamiento y actividad de reacción (Tabla 5).

Tabla 5
Características fisicoquímicas de las enzimas α -amilasa y CGTasa

Propiedad	α-amilasa	CGTasa
Masa molecular (Da)	51 000	67 000
Punto isoeléctrico	3,8	5,4
pH óptimo	5,5 - 10,0	5,4 - 5,8
Temperatura óptima (°C)	50	60
k_m (mg/mL)	1,4	5,7

3. Antecedentes

El almidón es el sustrato principal para la producción de CDs mediante la acción enzimática. En 1976 Nakamura propuso producir CDs bajo condiciones muy específicas: inició con la mezcla de 0,2 mL de almidón y 50 μ L de solución buffer de 0,5 M y pH 7,0. Luego, la mezcla fue incubada con 20 μ L de enzima purificada a 45°C por varios períodos. Después tomaron alícuotas de 15 μ L para ser pasadas por el papel filtro y posteriormente secadas para inactivar la enzima. Procedieron a adicionar en forma de spray solución de glucoamilasa para seguidamente dejar secar el papel a 50°C, de esta manera se hidrolizaban los sacáridos que no se habían convertido en CDs. Este estudio se realizó con el fin de analizar la mezcla de CDs producidas por películas de rayos X (Nakamura and Horikoshi (1976)). Actualmente el mejor método para cuantificar estas moléculas es mediante la técnica de HPLC.

En 1990, el científico Raja junto a sus asociados se basaron en esta misma metodología para producir CDs. Usaron concentraciones de 5, 8 y 10 (% p/v) de almidón de yuca, la reacción la realizaron a $70\pm 2^\circ\text{C}$ y en un rango de pH de 5,5 - 6,0. La precipitación fue realizada mediante la adición de bromobenceno o cloroformo (1% p/v) a temperatura ambiente. Luego filtraron la mezcla y fue secada al vacío. De dicho estudio concluyeron que la ciclación de las unidades de glucosa inicia después de haber transcurrido 8 h de incubación (Raja et al. (2018)).

En 1995 Kim propone realizar un tratamiento térmico para producir eficientemente las CDs

a partir de almidón de maíz. Inició realizando la mezcla de almidón 10% en solución buffer de fosfato de sodio de 50 mM y pH 6,0. Luego, trató la solución a varias temperaturas en intervalos de 1 a 2 h. Posteriormente, adicionó 480 U g⁻¹ de CGTasa a 50°C por 30 min. Kim concluyó que para producir 50% de CDs y 5,22 mg de CDs por unidad de enzima, las condiciones óptimas son: calentamiento a 65°C, 1 h de tiempo de calentamiento, concentración del sustrato de 7,5% p/v y cantidad de enzima 48 U g⁻¹ (Kim et al. (1995)). En 1997, el mismo autor complementa los resultados antes obtenidos y propone producir CDs sin realizar pretratamiento. Él utiliza menos CGTasa (22 U g⁻¹) y trabaja en la misma temperatura y la misma concentración del sustrato. Sin embargo, sus resultados son más óptimos, obteniendo 12,8 mg de CDs por unidad de enzima (Kim et al. (1997)).

El método propuesto por Kim fue de gran utilidad para investigaciones posteriores, en especial, aquellas que querían aislar CDs específicas. El investigador Rajput, propuso realizar la producción de β -CD a partir de almidones crudos de maíz, papa y sagú, usando doble concentración de CGTasa. Realizó la mezcla de 100 mg/mL en 10 mL de solución buffer de fosfato (50 mM, pH 6,0) y 100 μ L de la enzima (9,6 U/L) y la incubó a 60°C. Después realizó la centrifugación de la solución y el sobrenadante fue analizado por el método de fenoltaleína para estimar la producción de β -CD (Rajput et al. (2016)). De esta investigación se concluyó que el almidón que más producía β -CD era el que provenía del sagú (Tabla 6).

La temperatura y concentración de sustrato y enzima son las variables que determinan la eficiencia de producción de CDs, por eso los investigadores han enfocado en hacer más óptimo este

Tabla 6

Producción de β -CD a partir de diferentes crudos de almidón

Fuente de almidón	Producción de β -CD (mg/L)	
	1 h	2 h
Papa	4,19	8,43
Maíz	3,73	7,89
Sagú	4,22	8,91

proceso. Zhekova et al. (2006) realizó la variación de parámetros al usar como sustrato el almidón de maíz nativo y el almidón de papa soluble. Las soluciones de sustrato se prepararon en buffer de fosfato de pH 7,0. Luego se disolvieron en baño de vapor de agua. Las soluciones resultantes se enfriaron hasta alcanzar los 45°C y le adicionaron la enzima CGTasa (2,0 U/g), esta reacción se realizó en Erlenmeyer de 100 mL con un agitador recíproco durante 20 h. Además, se inactivó la CGTasa al someterla a baño María durante 10 minutos. El autor considera que las condiciones óptimas para producir CDs son: concentración de almidón de 50 mg/mL y la enzima 2,0 U/g. Además, concluye que la producción de esta molécula no depende sólo de las condiciones de reacción, sino también se debe evaluar la inhibición del producto y la capacidad de la enzima de transformar diferentes tipos de CDs entre sí.

En el 2014, basándose en las primeras investigaciones, Blanco y sus asociados estudiaron la producción de CDs a partir del aislamiento de *Bacillus Lehensis* del almidón de yuca (Blanco et al. (2014)). El proceso se basó en precipitar la enzima usando 80% de sulfato de amonio y suspendiendo la mezcla en 40 mL de solución buffer de tris-HCl (5 mM, pH 8,0). Para producir CDs iniciaron tomando 5 mL de la solución de enzima purificada (0,035 mg/mL) en 5 mL de 1%(p/v)

de almidón de yuca, dicha solución se preparó en solución bufer tris-HCl y seguidamente se realizó la incubación a 55°C y pH 8,0. Luego las muestras se retiraron e inactivaron a 100°C durante 0, 22, 35 y 42 h . Finalmente centrifugaron la solución resultante a 8800 g por 10 min y analizaron el sobrenadante por la técnica de HPLC. Aunque este estudio no se enfocó en la cuantificación de las CDs resultantes sino en la actividad enzimática y condiciones de la enzima, los investigadores lograron obtener α , β y γ -CD de 0,32-6,33-1,12 (g/L) respectivamente.

Sin embargo, el almidón de papa y de maíz no son los únicos sustratos utilizados para producir CDs. El almidón de amaranto, proveniente del grano *Amaranthus cruentus*, también tiene la capacidad de producir CDs. El proceso consiste en suspender el almidón en 50 mL de solución buffer de citrato 0,02 M, para que la concentración total del almidón sea 70 g/L. La suspensión obtenida se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Luego se enfría a 49°C y se adiciona 1 mL de solución de CGTasa. Finalmente se incuba la mezcla con 0,05 mL de tolueno a 49°C por 24 h. Utilizando este método, el autor concluye que el amaranto es un excelente sustrato para producir CDs, es muy susceptible a las amilasas y tiene gran contenido de amilopectina, los resultados finales demostraron la producción de 6,46 g/L de α -CD, 6,13 g/L de β -CD y 2,98 g/L de γ -CD (Urban et al. (2012)).

4. Diseño metodológico

Variabilidad de las condiciones para la preparación de ciclodextrinas

4.0.1. Producción de ciclodextrinas a partir de almidón de yuca. Inicialmente se realizó la producción de ciclodextrinas partiendo de una solución de almidón 0,01 g/mL preparado en solución buffer Tris-HCl 0,05 M y pH 8,0, como lo sugiere Blanco et al. (2014). Adicionalmente, se preparó una solución de enzima ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTasa) 27,72 U/g, también en buffer Tris-HCl. De cada solución se tomó 5,0 mL y se mezcló en un tubo de ensayo junto a 1,0 mL de CaCl_2 50 mM. La solución resultante fue incubada a 55°C durante 2 horas. Luego se dejó la solución en baño maría a 100°C durante 10 minutos y en baño de hielo por 5 minutos.

Posteriormente la solución fue filtrada a 0,45 μm y se corroboró la conversión del almidón a ciclodextrinas por espectrometría de masas MS-MALDI-TOF utilizando como matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) en relación 1:1 %v/v. Para la cuantificación de β -CD presente en la solución se utilizó el método colorimétrico propuesto por Makela et al. (1988). Se preparó una solución de fenolftaleína 3,0 mM en Na_2CO_3 600 mM, la cual sirvió como compuesto complejante de la β -CD presente en la solución formando un color rosado. Para calcular la concentración de β -CD se realizó una curva de calibración en un rango de concentración de 0,843 - 1,884 mg/mL. Por cada 10 mL de solución de ciclodextrinas se le adicionó 700 μL de fenolftaleína y su absorbancia fue medida a $\lambda=553$ nm en el espectrofotómetro de UV Vis Thermo Scientific GENESYS 10S.

Teniendo el método de cuantificación de β -CD por espectroscopía UV-Vis, se procedió a estudiar la producción de β -CD a diferentes pH (Tabla 7).

Tabla 7

Variabilidad de pH en la producción de CDs a partir de almidón de yuca

Buffer	pH
Glicina HCl	3,0
Acetato de sodio	4,0
Fosfato	6,0
Tris-HCl	8,0
Glicina NaOH	10,0

Además se midió la concentración de β -CD según el tiempo de reacción. Para ello, se preparó 50 mL de solución de almidón 0,01 g/mL y se mezcló con 50 mL de CGTasa (27,72 U/g), preparados ambos en buffer Tris-HCl. Además, se adicionó 17 mL de CaCl₂ 50 mM. La solución fue incubada a 55°C y se tomaron alícuotas de 5,0 mL cada 30 minutos durante 3 horas. Cada alícuota se transfirió a tubos de ensayos, los cuales se calentaron a 100 °C en baño maría durante 10 minutos con el fin de inactivar la enzima y luego se llevó a baño de hielo durante 5 minutos. Se adicionó 400 μ L de fenolftaleína a cada tubo de ensayo y se midió la absorbancia a 553 nm.

Posteriormente, se elaboró un diseño experimental 2^2 , tomando como variables dependientes la concentración de sustrato (almidón) y enzima (CGTasa), siendo la variable de respuesta la concentración de β -CD. Las condiciones del diseño experimental están descritas en la Tabla 8.

Tabla 8

Condiciones generales del diseño experimental descrito para la producción de CDs a partir de almidón de yuca

Concentración de sustrato	0,005 - 0,045 g/mL
Concentración de enzima	27,72 - 138,6 U/g
Buffer	Tris HCl 0,05 M; pH 8,0
Tiempo de reacción	120 min
Temperatura de incubación	55°C

4.0.2. Producción de ciclodextrinas a partir de mucílago de cacao. La producción de CDs se realizó siguiendo la metodología utilizada a partir de almidón de yuca. Se preparó una solución 1,0 g/mL de mucílago en agua y CGTasa de 5000 U/g. En un tubo de ensayo se mezcló 5,0 mL de cada solución y 1,0 mL de CaCl_2 50 mM. Luego se incubó la solución durante 120 min a 55°C, se calentó a 100 °C en baño maría durante 10 minutos y en baño de hielo por 5 minutos. Se corroboró la presencia de CDs en la solución por MS-MALDI-TOF utilizando la misma matriz que el ensayo realizado para almidón.

Después de corroborar la presencia de ciclodextrinas en la solución, se procedió a realizar

la extracción líquida de las CDs con el fin de que el resto de analitos presentes no intervinieran en la formación del complejo con fenolftaleína. Para ello se añadió etanol (agente precipitante de CDs) en igual proporción al volumen final de la solución. Luego se centrifugó la solución a 4°C y 7000 rpm durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1,0 mL de agua Tipo I al precipitado y se dejó en ultrasonido durante 1,0 h. Al solubilizar las CDs resultantes, se filtró a 0,45 μm y se adicionó 60 μL de fenolftaleína. La β -CD tiene la capacidad de acomplejar la fenolftaleína. La absorbancia se midió a 553 nm, siendo las soluciones menos coloreadas las de mayor concentración de β -CD.

Tabla 9

Condiciones generales del diseño experimental descrito para la producción de CDs a partir de mucílago de cacao

Concentración de sustrato	0,5 - 1,0 g/mL
Concentración de enzima	1000 - 5000 U/g
Buffer	Fosfato 0,05 M; pH 6,0
Tiempo de reacción	1 hora
Temperatura de incubación	55°C

Luego se midió la concentración de β -CD variando el pH de la solución (Tabla 7). Además, se estudió la variación de concentración de β -CD en diferente tiempo de reacción. Esto se realizó tomando alícuotas de 5,0 mL cada 30 minutos durante 3,0 h, partiendo de la mezcla de 50 mL de lixiviado de mucílago de cacao 1,0 g/mL, 50 mL de CGTasa 5000 U/g en buffer fosfato 0,05 M pH 6,0 y 10 mL de CaCl_2 50 mM. A cada alícuota se le realizó el mismo proceso de inactivación de enzima de los ensayos con almidón. Teniendo las condiciones iniciales establecidas, se procedió a

realizar un diseño experimental 2², realizando cada medida por triplicado, siguiendo el rango de concentración de la Tabla 9.

4.0.3. Estudio de la ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTasa).

4.0.3.1. Determinación de proteína. Se realizó por el método de Biuret (Gornall et al. (1949)). Se disolvió 0,0712 g de CuSO₄ · 5H₂O y 0,3011 g de sal de Rochelle en 25 mL de agua. Posteriormente, se adicionó 15 mL de NaOH 10% p/v y se aforó la solución a 50 mL. Para inhibir la reducción del cobre, se adicionó además 0,0507 g de KI, siendo la solución resultante azul claro. Luego se realizó una curva estándar de proteína con albúmina sérica (BSA) en un rango de concentración 0,0 - 5,0 mg/mL como muestra en la Tabla 10:

Tabla 10
Curva de calibración BSA

N° Patrón	μL BSA (±0,1 μL)	μL H ₂ O (±0,1 μL)	Concentración (μg/μL)
Blanco	0,0	2000	0,0
1	200	1800	1,0
2	400	1600	2,0
3	600	1400	3,0
4	800	1200	4,0
5	1000	1000	5,0

De cada patrón se tomó 500μL, se mezcló con 750μL del reactivo de Biuret y se midió la absorbancia a 540 nm. Luego se procedió a determinar la cantidad de proteína de la CGTasa adquirida comercialmente al mezclar 500 μL de enzima y 750 μL del reactivo de Biuret, calentando durante 5 minutos la solución a 37°C. Posteriormente se tomó una alícuota de 500 μL y se mezcló con 500 μL de agua Tipo I. De igual forma se midió la absorbancia a 540 nm.

4.0.3.2. Cinética enzimática. La cinética de la enzima CGTasa se estudió mediante el método propuesto por Michaelis-Menten. Para ello se evaluó el comportamiento de la velocidad de reacción a medida que aumentaba la concentración del sustrato, tomando como constante la concentración de enzima. El rango de concentración de sustrato para el ensayo con almidón fue de 0,3 - 1,8 % p/v y para mucílago de cacao fue de 0,2 - 1,0 g/mL. Los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones en que se realizó el diseño experimental. Finalmente se graficó la curva de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, calculando a partir de éstas la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis (K_m).

4.1. Caracterización de ciclodextrinas por resonancia magnética nuclear (RMN)

Se realizó RMN a los estándares de α , β y γ -CD. Se analizaron los núcleos ^1H y ^{13}C a 400 mHz y las muestras fueron preparadas en D_2O .

Cuantificación de ciclodextrinas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Las condiciones utilizadas en el equipo de HPLC para elaborar el método cromatográfico de azúcares son las siguientes:

Tabla 11

Condiciones ensayos realizados por HPLC para método de azúcares

Columna	Vertex Plus Saule 250 × 4,6 m Eurospher II 100-5 NH_2
Fase móvil	ACN:H ₂ O 75:25
Volumen de inyección	10 μL
Flujo	1,0 mL/min
Estándares	Fructosa, glucosa y sacarosa
Rango de concentración	0,2 - 5,0 mg/mL
Detector	Índice de refracción Knauer Azura RID 2.1 L

Las condiciones cromatográficas utilizadas para medir los estándares de CDs y la solución final de mucílago de cacao con CDs están descritas en la Tabla 12.

Tabla 12

Condiciones ensayos realizados por HPLC para método de CDs.

Columna	Vertex Plus Saule 250 × 4,6 m Eurospher II 100-5 NH ₂
Fase móvil	ACN:H ₂ O 60:40
Volumen de inyección	50 µL
Flujo	1,2 mL/min
Estándares	α-CD, β-CD, γ-CD
Rango de concentración	0,02 - 2,0 mg/mL
Detector	Índice de refracción Knauer Azura RID 2.1 L

Toda muestra fue filtrada a 0,45 µm antes de ser inyectada al equipo de HPLC.

Caracterización de ciclodextrinas por espectrometría de masas

4.1.1. Espectrometría de masas. Para determinar las masas de las CDs obtenidas se utilizó la técnica analítica de espectrometría de masas ESI-IT (*Electrospray ionization*) con las condiciones descritas en la Tabla 13. Además se utilizó MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*), mezclando 1,0 µL de analito y 1,0 µL de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) (10 mg/mL) como matriz.

Tabla 13

Condiciones utilizadas en espectrometría de masas ESI-IT

ESI-IT	
Polaridad del ion	Positivo
<i>Scan</i>	700 - 2000 m/z
Energía del capilar	5000 V
Presión del gas	12 bar
Flujo gas de secado	5 L/min
Temperatura de gas	300°C
Inyección	5 μ L/min
ICC <i>Target</i>	200000
Tiempo <i>scan</i>	200 ms

5. Resultados y análisis

5.1. Almidón de yuca

Según lo consultado en la literatura, la β -CD es la ciclodextrina que se produce con mayor concentración en solución, partiendo de almidón como sustrato. Teniendo en cuenta lo anterior se eligió la cuantificación de β -CD por el método colorimétrico propuesto por Makela et al. (1988), construyendo así la siguiente curva de calibración:

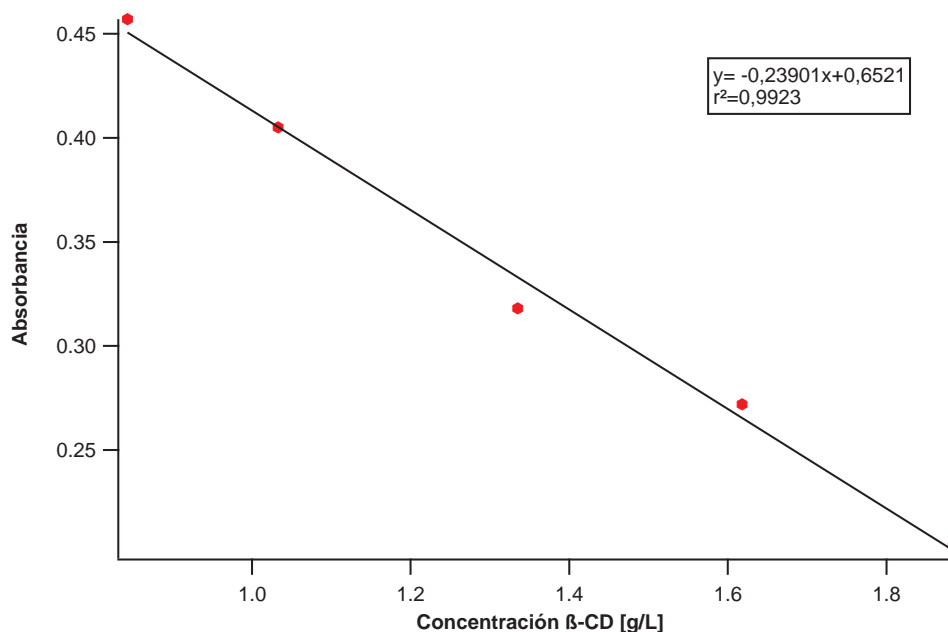


Figura 4. Curva de calibración de β -CD acomplexada con fenolftaleína.

$$y = -0,2390x + 0,6521 \quad (1)$$

Para calcular la concentración de β -CD (x) se reemplazó la absorbancia medida (y) por UV-Vis a 553 nm en la Ecuación 1.

Las condiciones experimentales para producir β -CD en mayor proporción se estudiaron variando el pH y tiempo de reacción. Se evaluó la concentración β -CD en un rango de pH de 3,0 a 10,0 y se demostró que el pH óptimo para producir mayor concentración de β -CD es 8,0 con buffer Tris-HCl (Figura 5) durante 120 min de reacción (Figura 6) :

Tabla 14

Concentración β -CD a partir de almidón de yuca variando el pH.

Buffer	pH	Concentración β-CD (mg/mL)
Glicina HCl	3,0	0,3783
Acetato de sodio	4,0	0,2069
Fosfato	6,0	1,114
Tris-HCl	8,0	2,301
Glicina NaOH	10,0	0,2454

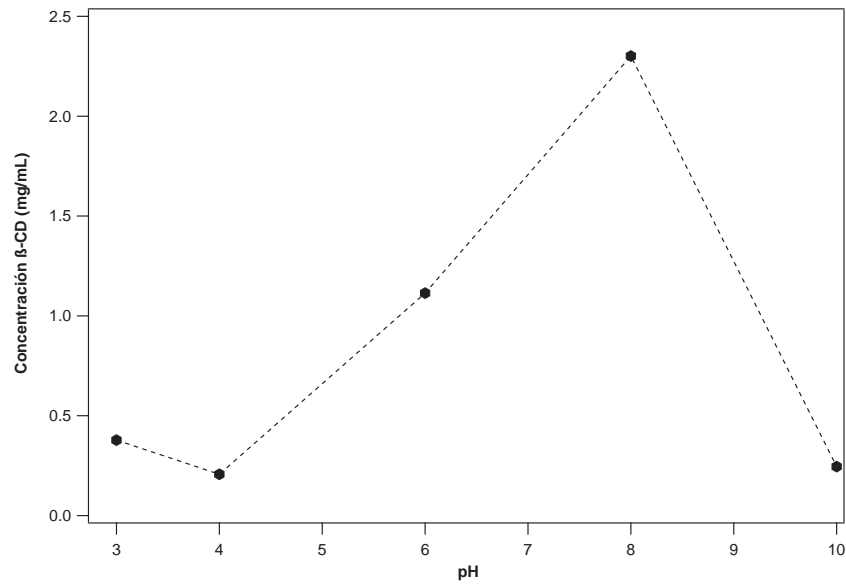


Figura 5. Concentración β -CD (mg/mL) a partir de almidón de yuca versus pH de solución.

Tabla 15

Concentración de β -CD a partir de almidón de yuca según el tiempo de reacción.

Tiempo (min)	Absorbancia a 553 nm	Concentración β -CD (mg/mL)
30	0,554	0,396
60	0,259	1,58
90	0,214	1,76
120	0,173	1,93
150	0,163	1,97
180	0,141	2,06

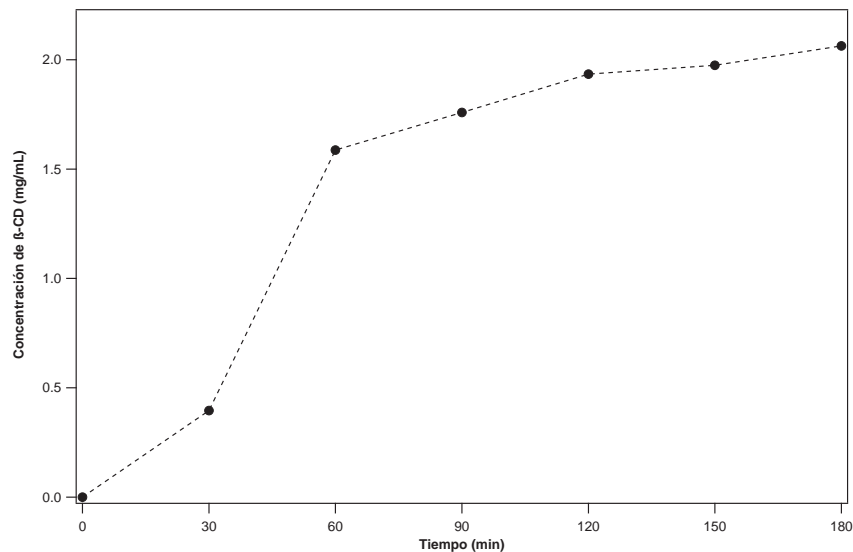


Figura 6. Concentración β -CD (mg/mL) partiendo de almidón de yuca versus el tiempo de reacción.

De la Figura 6 se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de interacción entre el sustrato y la enzima, se producirá mayor concentración de β -CD. Después de 120 minutos, la concentración de β -CD se mantiene casi constante. En este punto, el tiempo de reacción es suficiente para obtener un óptimo valor de concentración de β -CD, sin necesidad de utilizar más tiempo y energía en la reacción.

Posteriormente se realizó el diseño experimental 2^2 , variando la concentración de sustrato y enzima. Todos los ensayos se realizaron en buffer Tris-HCl pH 8,0 y el tiempo de reacción fue de 120 min. La concentración de β -CD se estimó como variable de respuesta del diseño y los resultados obtenidos están reportados en la Tabla 16.

Tabla 16

Resultados diseño experimental aplicado a concentración de β -CD a partir de almidón de yuca.

Concentración enzima (U/g)	Concentración sustrato (g/mL)		
	0,005	0,025	0,045
27,72	1,866	2,155	1,632
	2,004	2,130	1,749
	1,912	2,167	1,724
83,18	1,945	2,464	2,193
	1,966	2,188	1,874
	2,029	2,151	2,121
138,6	1,862	2,414	2,101
	1,871	2,461	1,925
	2,046	2,477	2,054

El diseño experimental se analizó mediante el programa estadístico *Statgraphics 18*. El análisis dio como resultado el diagrama de Pareto de la Figura 7, estimando así la significancia estadística de los efectos. La gráfica de Pareto representa el impacto de las variables dependientes respecto a la variable de respuesta. El análisis se basa en que todo gráfico que supere la línea vertical de error estándar será significativo estadísticamente a un nivel de confianza de 95%. En consecuencia, tanto la concentración de sustrato (A) como de enzima (B) son significativos, siendo A la variable más significativa. Además, al evaluar la interacción entre las variables independientes respecto a la variable de respuesta se observó que las líneas no son paralelas, lo que significa que la concentración de β -CD y almidón dependen del valor de concentración de CGTasa.

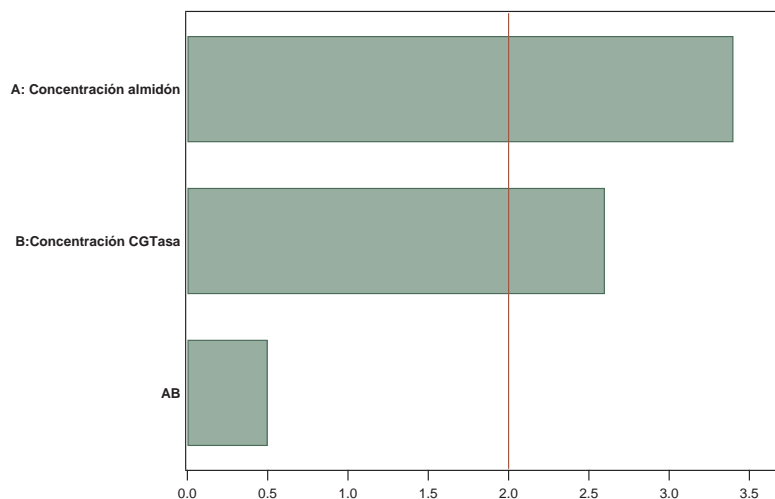


Figura 7. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de β -CD a partir de almidón.

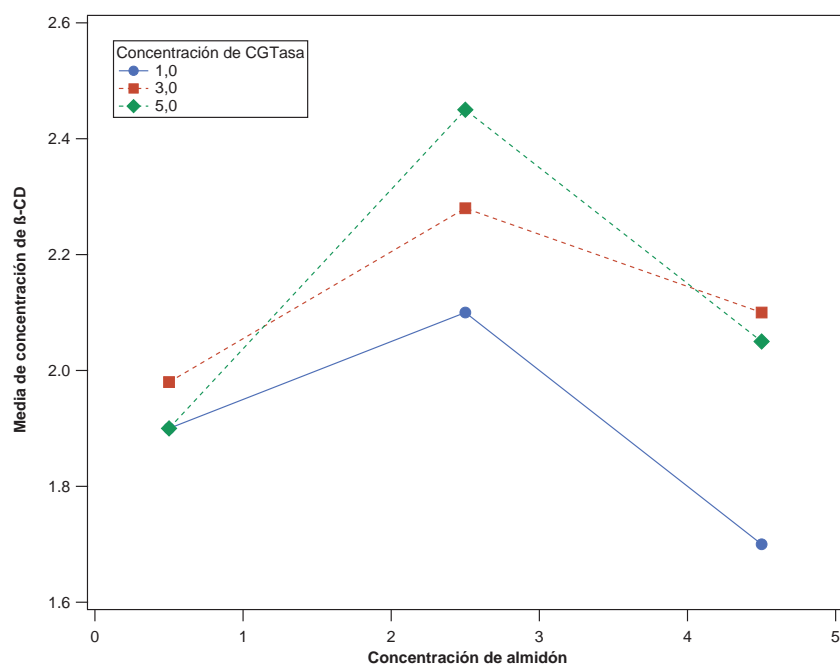


Figura 8. Gráfica de interacción media de β -CD versus concentración de almidón de yuca a diferentes concentraciones de CGTasa.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en la Tabla 16 se puede estimar que para obtener

el valor máximo de concentración de β -CD es necesario partir de una solución de almidón de yuca de 2,5 % p/v y CGTasa 5,0 mg/mL. Estos valores son muy cercanos a los recomendados por *Statgraphics*, el cual calculó la óptima respuesta de concentración de β -CD 2,453 mg/mL partiendo de una solución de almidón 2,616 % p/v y CGTasa 4,177 mg/mL.

5.2. Mucílago de cacao

Al igual que los cálculos aplicados a los resultados de β -CD a partir de almidón de yuca, se utilizó la Ecuación 1 para determinar la concentración de β -CD utilizando el mucílago de cacao como sustrato. El rango de pH y tiempo de reacción estudiado fue el mismo que el utilizado en las soluciones de almidón.

Tabla 17

Concentración β -CD a partir de mucílago de cacao variando el pH.

Buffer	pH	Concentración β -CD (mg/mL)
Glicina HCl	3,0	0,5674
Acetato de sodio	4,0	0,4315
Fosfato	6,0	1,981
Tris-HCl	8,0	0,6362
Glicina NaOH	10,0	1,079

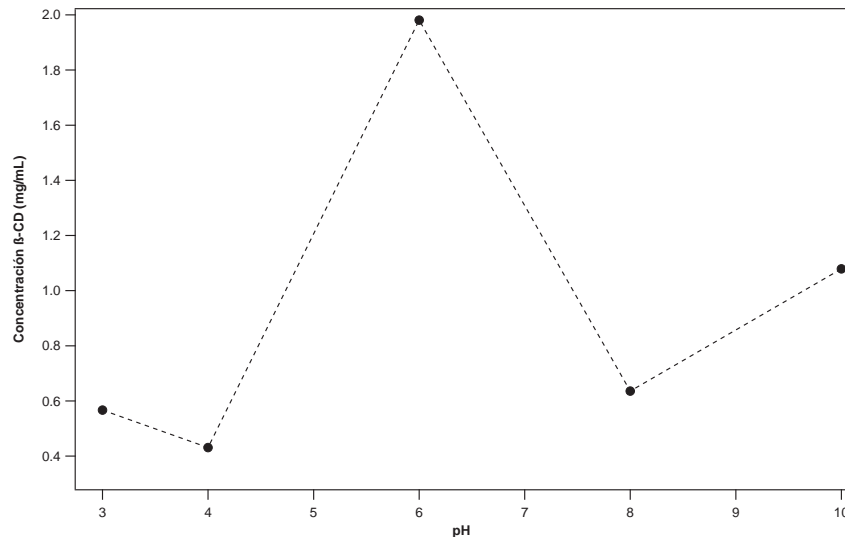


Figura 9. Concentración de β -CD (mg/mL) a partir de mucílago de cacao versus el pH de solución.

La Figura 9 representa el cambio de la concentración de β -CD producida a partir de mucílago de cacao 1,0 g/mL y CGTasa 5000 U/g respecto al pH de solución. Los ensayos se realizaron en el rango de concentración descrito en la Tabla 17. El buffer de fosfato a pH 6,0 indicó ser el mejor medio para obtener mayor concentración de β -CD. La Figura 10 representa el cambio de la concentración de β -CD producida a partir de mucílago de cacao en solución a diferentes tiempos de reacción. En el gráfico se muestra que el mejor tiempo de reacción es 60 min, ya que produce la mayor concentración de CD y se observa la disminución de la β -CD a medida que el sustrato interactúa por más tiempo con la enzima.

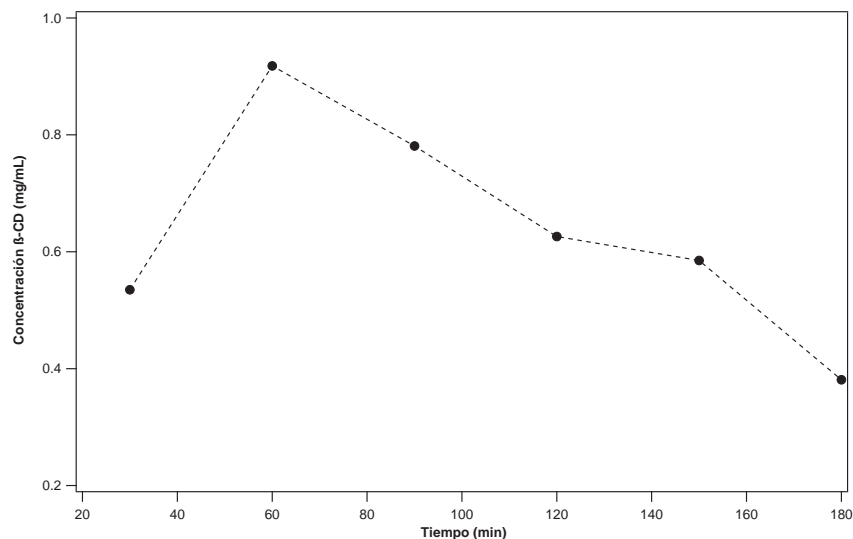


Figura 10. Concentración β -CD partiendo de mucílago de cacao versus el tiempo de reacción.

Teniendo el tiempo de reacción y pH adecuado para producir β -CD a partir de mucílago, se procedió a realizar un diseño experimental 2^2 . Las variables independientes del diseño fueron la concentración de mucílago (sustrato) y CGTasa (enzima) y la variable de respuesta la concentración de β -CD. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

El análisis del diseño experimental del mucílago se realizó de igual manera que el descrito anteriormente para el almidón de yuca. El diagrama de Pareto estandarizado (Figura 11) demostró que sólo la concentración de sustrato es significativa en la producción de β -CD, partiendo de mucílago de cacao como sustrato. Además, al evaluar la interacción entre las variables dependientes y la media de la variable de respuesta (Figura 12) se puede observar que las líneas no son paralelas, esto indica que la concentración de β -CD depende de la concentración de mucílago. Finalmente se analizó las concentraciones óptimas para producir mayor concentración de β -CD, estimando que 1,0 g/mL de mucílago en solución y 3000 U/g de concentración de CGTasa produce 0,6301

Tabla 18

Resultados diseño experimental aplicado a concentración de β -CD a partir de mucílago de cacao

Concentración enzima (U/g)	Concentración sustrato (g/mL)		
	0,50	0,75	1,0
1000	0,4517	0,5320	0,5041
	0,4680	0,5366	0,5134
	0,4784	0,5343	0,5215
3000	0,4784	0,4691	0,6472
	0,4877	0,4563	0,6030
	0,4854	0,4563	0,6402
5000	0,6169	0,6519	0,5541
	0,6181	0,6740	0,5553
	0,5867	0,6821	0,5634

mg/mL de β -CD. Estos valores determinados experimentalmente demostraron ser muy cercanos a los valores calculados por el programa *Statgraphics 18*, en el cual se optimizó la respuesta para producir 0,6192 mg/mL de β -CD, partiendo de 1,0 g/mL de mucílago y 2981,1 U/g de CGTasa.

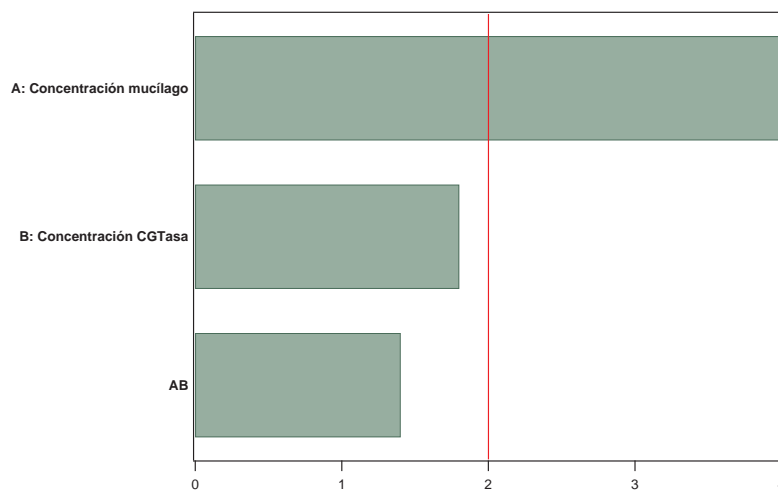


Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de β -CD a partir de mucílago de cacao.

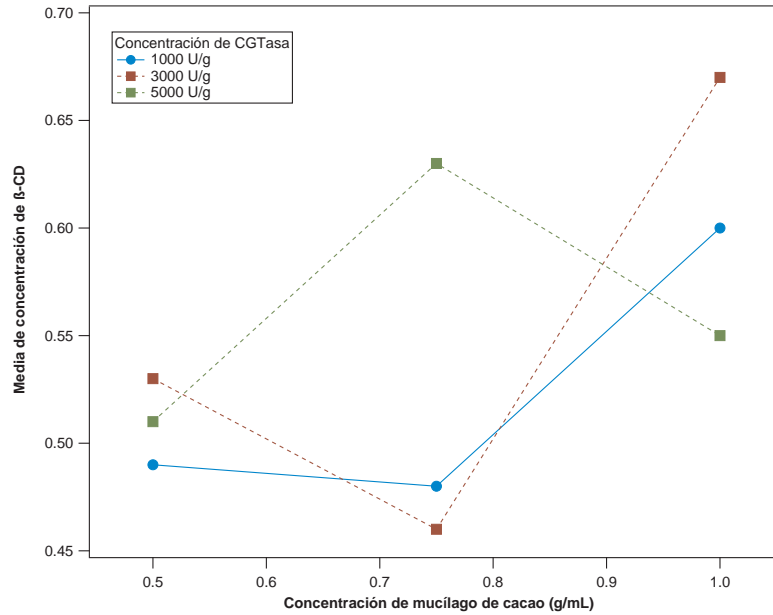


Figura 12. Gráfica de interacción media de β -CD versus concentración de mucílago de cacao a diferentes concentraciones de CGTasa.

5.3. Cinética enzimática

5.3.1. Determinación de proteína. La determinación de proteína en la CGTasa se realizó midiendo la absorbancia de la enzima a 540 nm e interpolando el resultado en la curva de calibración del patrón suero de albúmina sérica bovina (BSA) de la Figura 13.

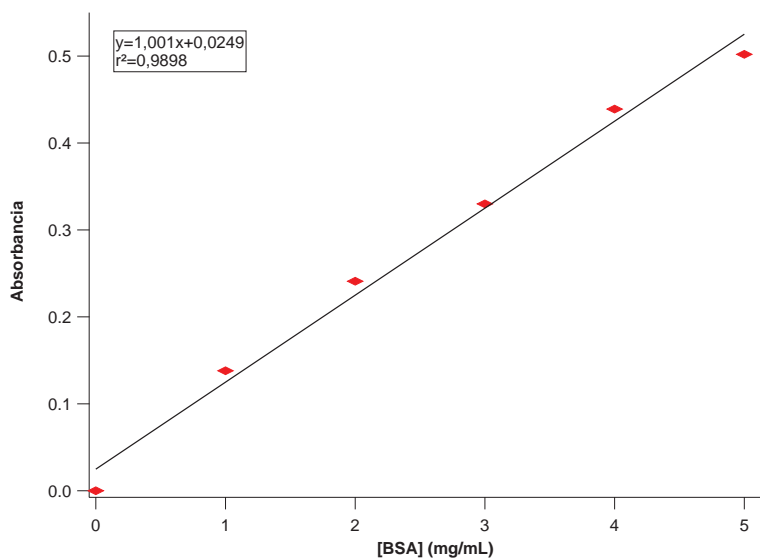


Figura 13. Curva de calibración albúmina sérica (BSA).

De la curva de calibración se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 1,001x + 0,0249 \quad (2)$$

El método de Biuret se basa en la reacción del enlace $-\text{CO}-\text{NH}-$ de la cadena polipeptídica con sulfato de cobre en medio alcalino. Esta reacción se observó por el cambio de coloración de la solución de azul claro a púrpura. La absorbancia obtenida fue de 0,458. Al interpolar en la curva de calibración y aplicar el factor de dilución, se obtuvo una concentración de proteína de 2163 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.2. Michaelis-Menten.

5.3.2.1. Almidón de yuca.

Con el fin de analizar la cinética enzimática de la CG-Tasa, se evaluó su comportamiento al aumentar la concentración de sustrato $[\text{S}]$, tanto en almidón

de yuca como en mucílago de cacao. La Figura 14 muestra la tendencia de Michaelis-Menten al graficar la velocidad inicial (mM/min) versus la concentración de almidón (mM). De la gráfica se pudo observar que en el rango de 0,0 - 2,0 mM la velocidad inicial se comporta directamente proporcional a la concentración de sustrato y la reacción es de primer orden. Sin embargo, a medida que aumenta [S], la enzima (la cual es constante) se sobresatura de sustrato y la velocidad ya no depende de éste. En dicho punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima.

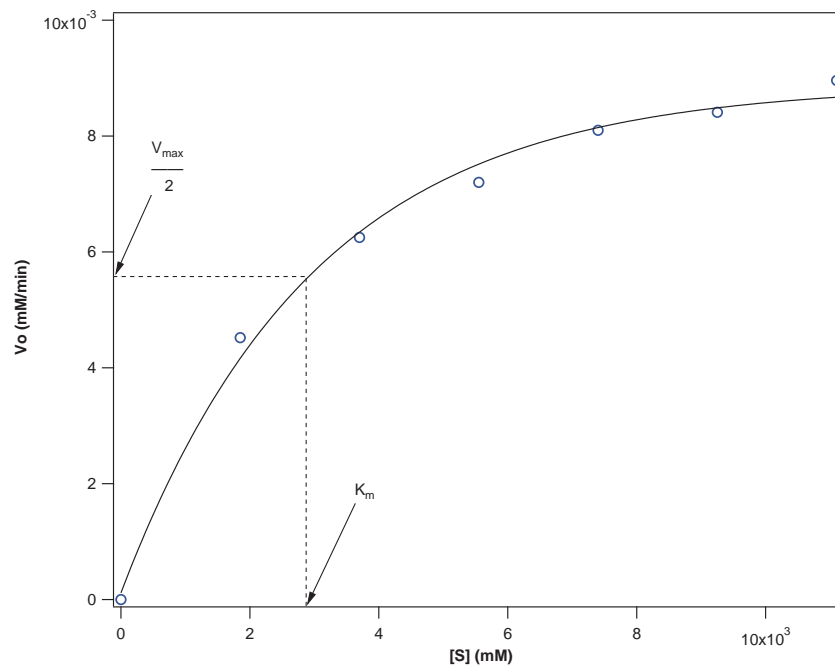


Figura 14. Cinética enzimática de Michaelis-Menten del almidón de yuca

Para determinar la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis (K_m) se calculó el inverso de los valores graficados en la Figura 14, obteniendo la tendencia de Lineweaver-Burk (Figura 15).

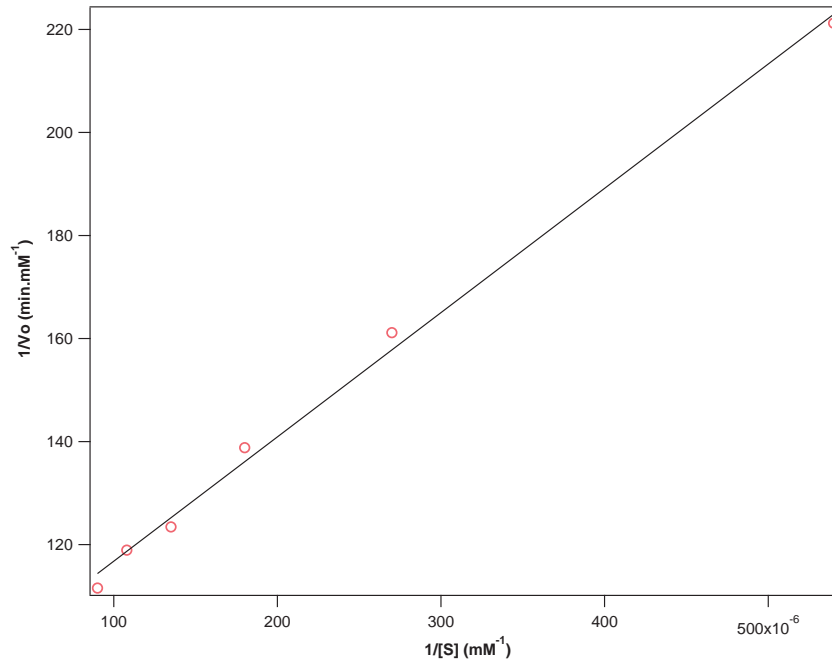


Figura 15. Gráfico Lineweaver-Burk para el almidón de yuca.

La ecuación lineal que representa la Figura 15 es la siguiente, con un coeficiente de detrmición de 0,9960:

$$y = 2,4126 \times 10^5 x + 92,648 \quad (3)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

Al utilizar el doble recíproco de Lineweaver-Burk, se determinó el valor de K_m con el recíproco negativo del intercepto x y el valor de V_{max} con el inverso del intercepto y . En base a la ecuación de Lineweaver-Burk (Ecuación 4), se reemplazó los valores de la Ecuación 3 obteniendo

0,0107 mM/min de V_{max} y $2,604 \times 10^3$ mM de K_m .

5.3.2.2. Mucílago de cacao. El comportamiento de la enzima CGTasa al cambiar de sustrato se estudió al medir la cinética enzimática en el rango de concentración de sustrato [S] que aparece en la Figura 16. La reacción de primer orden se puede observar en la concentración inicial, hasta 3000 mM. En este rango la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Sin embargo, a mayor [S], la tendencia de la gráfica deja de ser lineal y la velocidad dejará de depender de la [S].

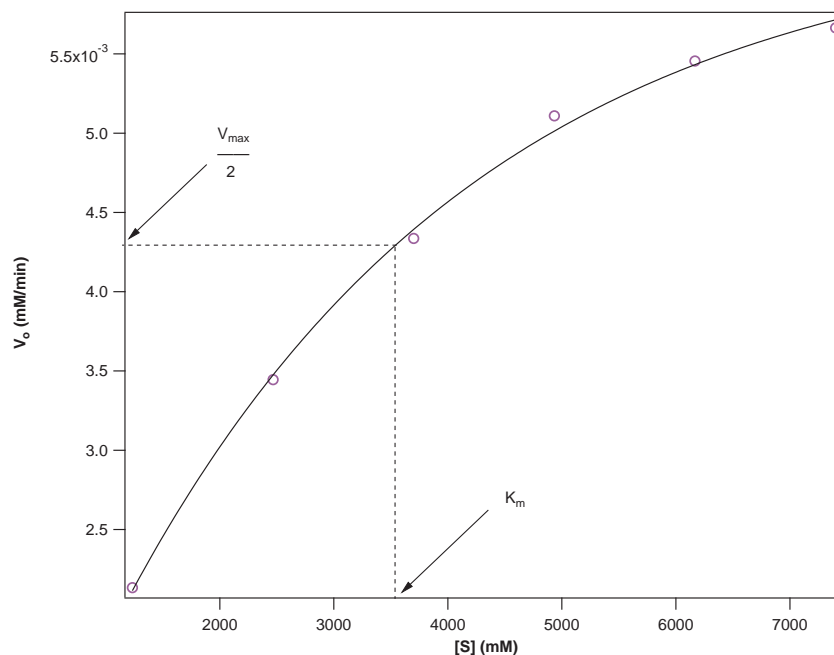


Figura 16. Cinética enzimática de Michaelis-Menten del mucílago de cacao.

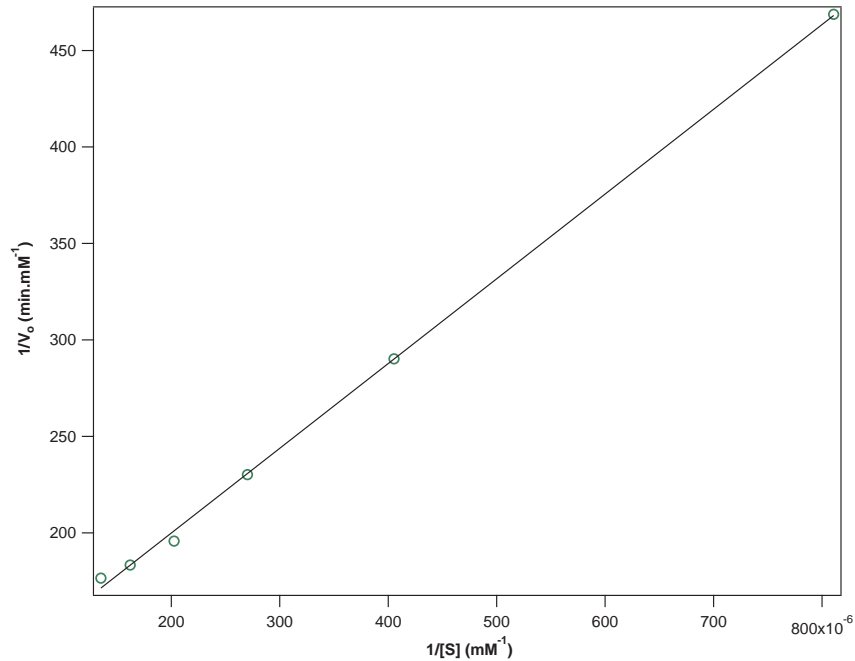


Figura 17. Gráfico Lineweaver-Burk para el mucílago de cacao

De igual forma se calculó el inverso de [S] y V_o , obteniendo la Figura 17 y la siguiente ecuación lineal, con un coeficiente de determinación de 0,9991:

$$y = 4,3923 \times 10^5 x + 112,06 \quad (5)$$

Al reemplazar los valores anteriores en la Ecuación 4, se calculó V_{max} y K_m , dando como resultado $8,923 \times 10^{-3}$ mM/min y $3,919 \times 10^3$ mM, respectivamente. Comparando las constantes de Michaelis obtenidas se puede estimar que la enzima al actuar en el mucílago se saturará en un tiempo mayor que al actuar en el almidón. Esto sucede porque la enzima encuentra en el sitio activo menos sustrato (maltodextrinas) para interaccionar cuando se encuentra con el mucílago.

5.4. Caracterización de CDs por RMN

5.4.1. Resultados para núcleo ^1H . Se enumeró los protones de la unidad de glucopiranososa para la asignación de las señales como se muestra en la Figura 18.

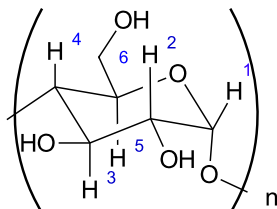


Figura 18. Estructura de la glucopiranososa enumerada con sus respectivos protones .

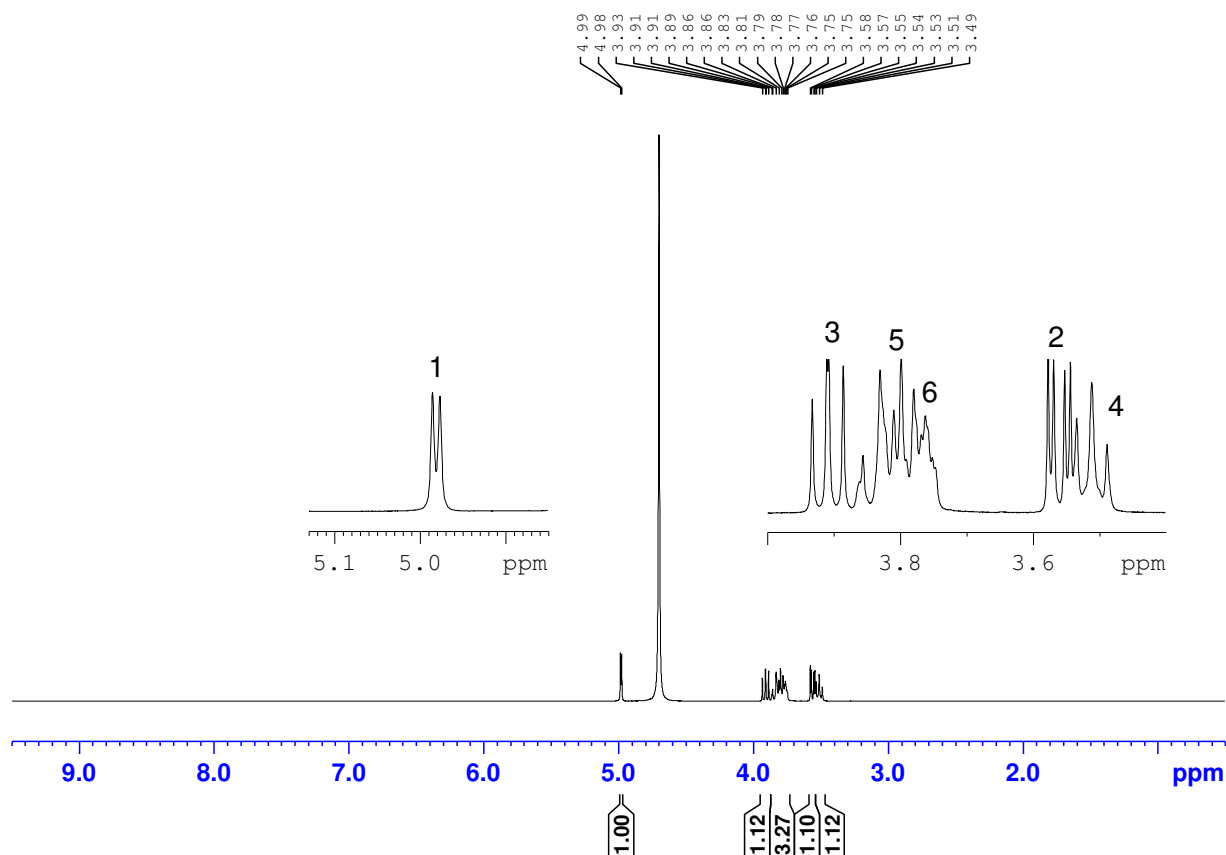


Figura 19. Espectro ^1H -NMR de estándar α -CD. Disolvente: D_2O (400 MHz)

Tabla 19

Asignación de señales $^1\text{H-NMR}$ de $\alpha\text{-CD}$.

δ (ppm)	Integral	Asignación
4,98	1	Protón en la posición 1 en la unidad de glucopiranososa
3,90	1	Protón en la posición 3 en la unidad de glucopiranososa
3,81	1	Protón en la posición 5 en la unidad de glucopiranososa
3,78	3	Protón en la posición 6 en la unidad de glucopiranososa
3,58	1	Protón en la posición 2 en la unidad de glucopiranososa
3,51	1	Protón en la posición 4 en la unidad de glucopiranososa

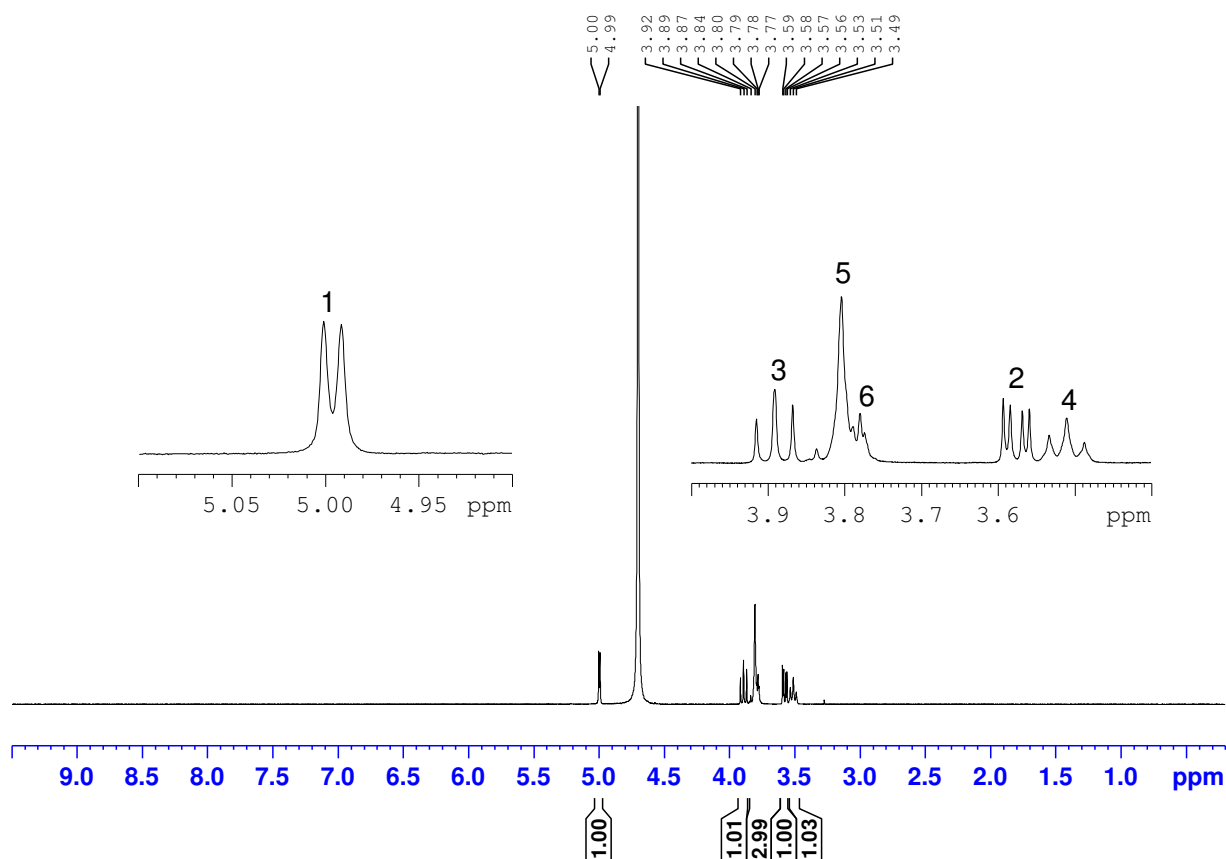


Figura 20. Espectro $^1\text{H-NMR}$ de estándar $\beta\text{-CD}$. Disolvente: D_2O (400 MHz)

Tabla 20

Asignación de señales $^1\text{H-NMR}$ de $\beta\text{-CD}$.

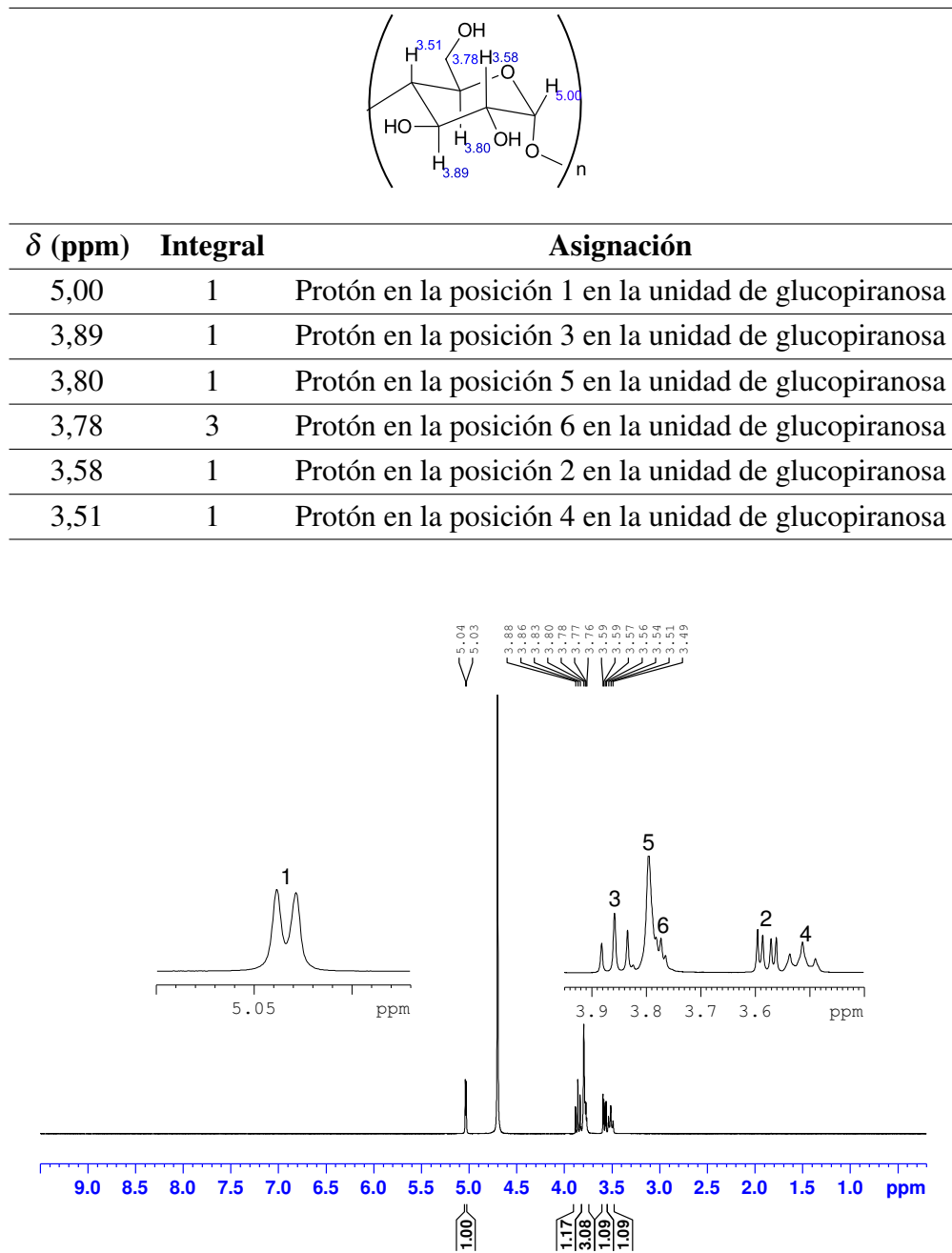
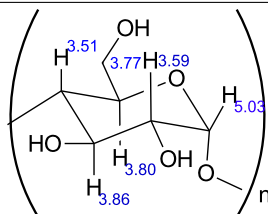


Figura 21. Espectro $^1\text{H-NMR}$ de estándar $\gamma\text{-CD}$. Disolvente: D_2O (400 MHz)

Las señales de $-\text{OH}$ no se observaron en los espectros de $^1\text{H-NMR}$ debido al intercambio

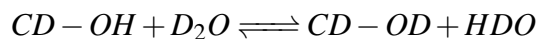
Tabla 21

Asignación de señales $^1\text{H-NMR}$ de $\gamma\text{-CD}$.



δ (ppm)	Integral	Asignación
5,03	1	Protón en la posición 1 en la unidad de glucopiranososa
3,86	1	Protón en la posición 3 en la unidad de glucopiranososa
3,80	1	Protón en la posición 5 en la unidad de glucopiranososa
3,77	3	Protón en la posición 6 en la unidad de glucopiranososa
3,59	1	Protón en la posición 2 en la unidad de glucopiranososa
3,51	1	Protón en la posición 4 en la unidad de glucopiranososa

que ocurre entre el hidrógeno y el deuterio:



5.4.2. Resultados para núcleo ^{13}C . Se enumeró los carbonos de la estructura de glucopiranososa como indica la Figura 22.

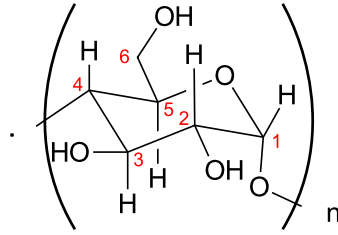


Figura 22. Estructura de la glucopiranosu enumerada con los respectivos núcleos de carbono analizados.

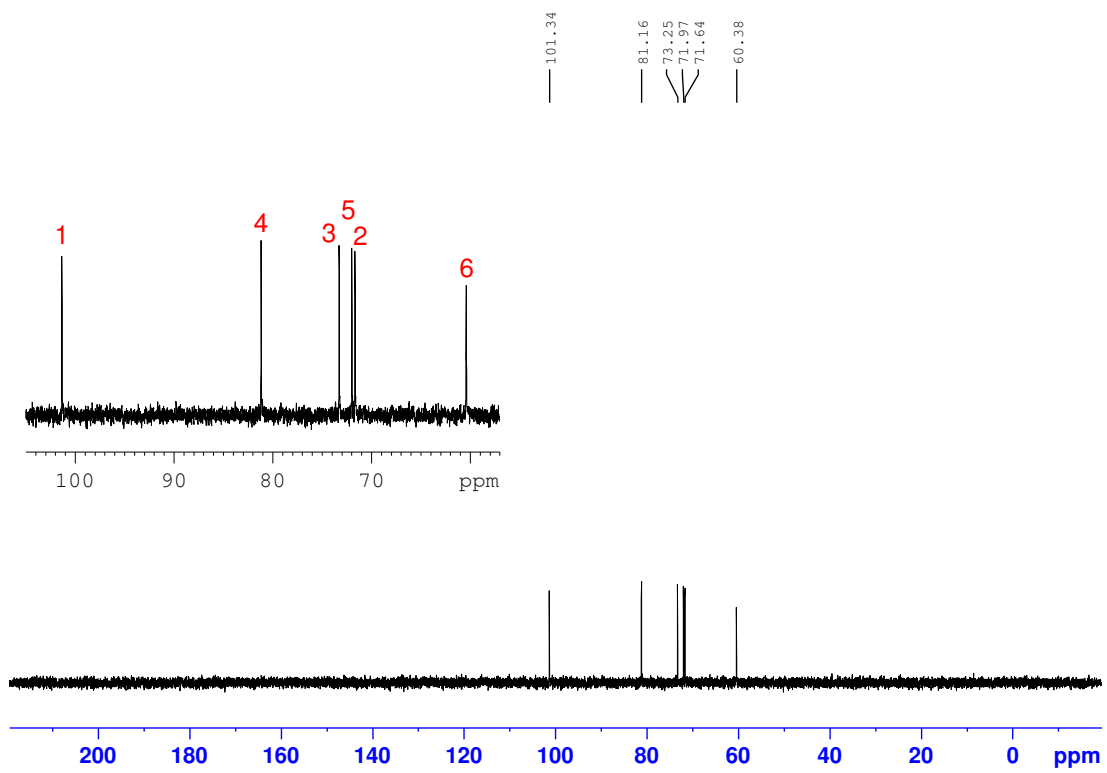
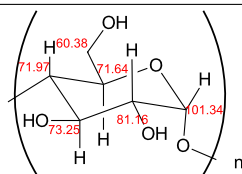


Figura 23. Espectro ^{13}C -NMR de α -CD. Disolvente: D_2O (400 MHz)

Tabla 22

Asignación de señales $^{13}\text{C-NMR}$ de $\alpha\text{-CD}$



δ (ppm)	Asignación
101,34	Carbono en la posición 1 de la unidad de glucopiranososa
81,16	Carbono en la posición 4 de la unidad de glucopiranososa
73,25	Carbono en la posición 3 de la unidad de glucopiranososa
71,97	Carbono en la posición 5 de la unidad de glucopiranososa
71,64	Carbono en la posición 2 de la unidad de glucopiranososa
60,38	Carbono en la posición 6 de la unidad de glucopiranososa

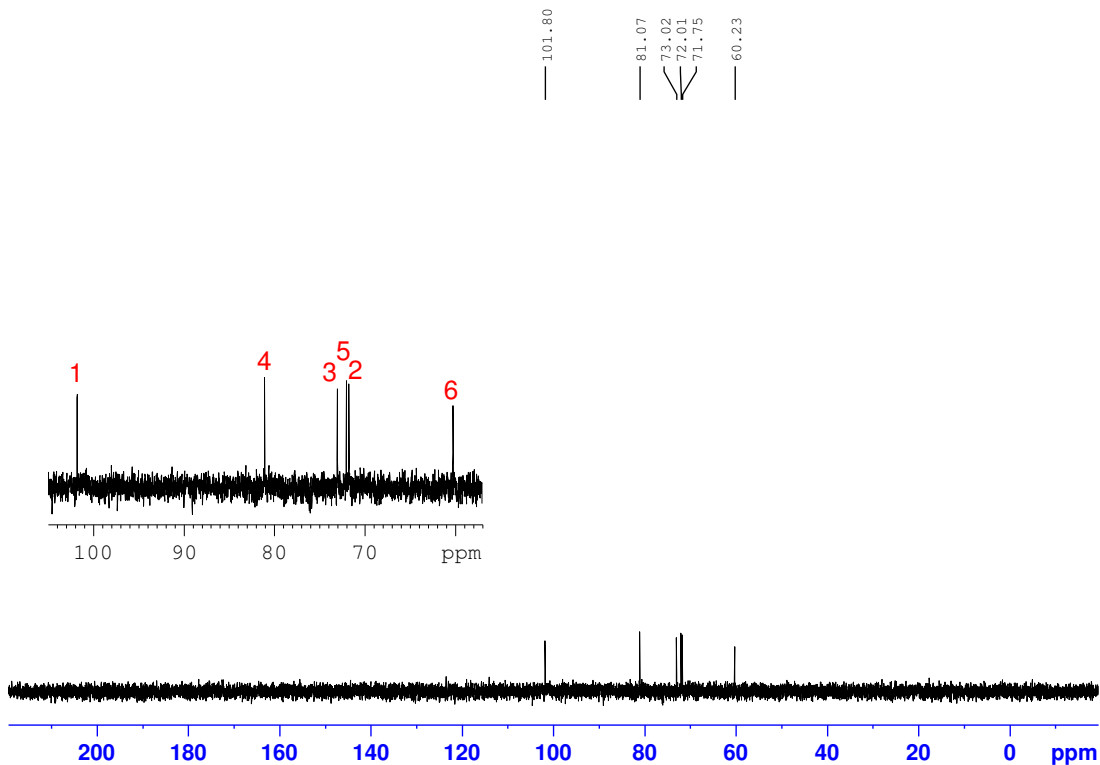
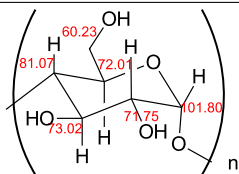


Figura 24. Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ de $\beta\text{-CD}$. Disolvente: D_2O (400 MHz)

Tabla 23

Asignación de señales $^{13}\text{C-NMR}$ de $\beta\text{-CD}$



δ (ppm)	Asignación
101,80	Carbono en la posición 1 de la unidad de glucopiranososa
81,07	Carbono en la posición 4 de la unidad de glucopiranososa
73,02	Carbono en la posición 3 de la unidad de glucopiranososa
72,01	Carbono en la posición 5 de la unidad de glucopiranososa
71,75	Carbono en la posición 2 de la unidad de glucopiranososa
60,23	Carbono en la posición 6 de la unidad de glucopiranososa

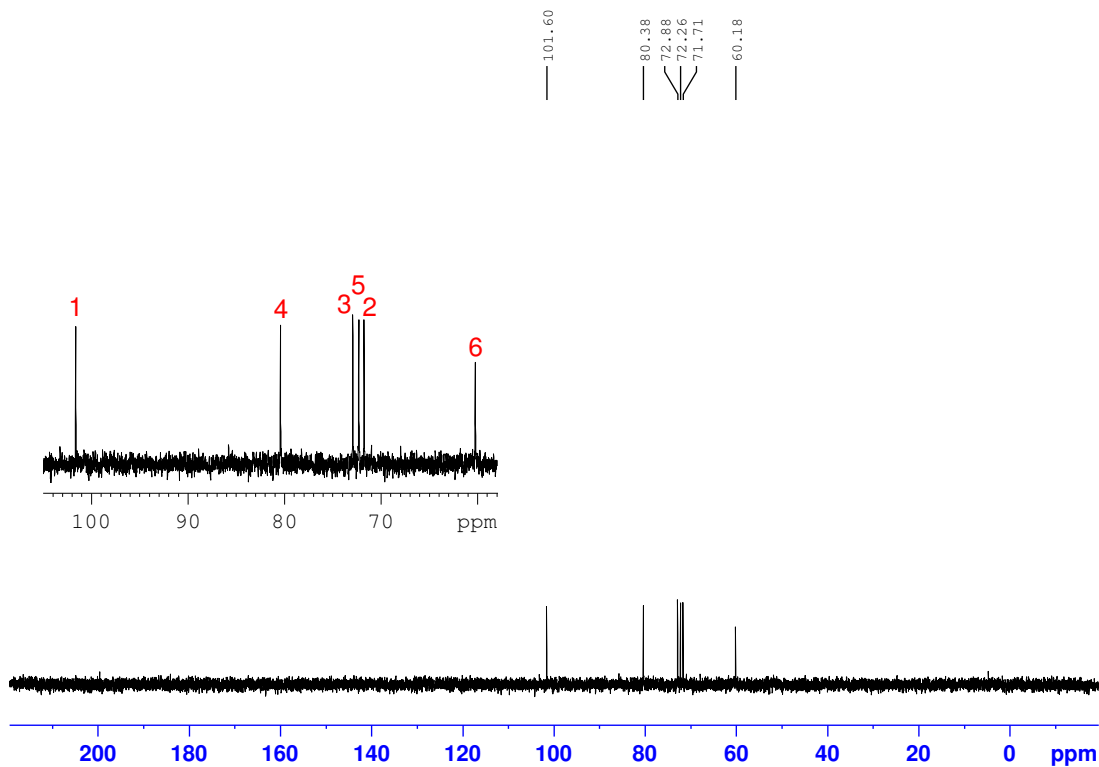
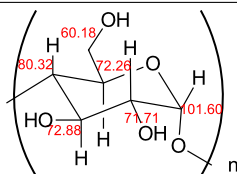


Figura 25. Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ de $\gamma\text{-CD}$. Disolvente: D_2O (400 MHz)

Tabla 24

Asignación de señales ^{13}C -NMR de γ -CD



δ (ppm)	Asignación
101,60	Carbono en la posición 1 de la unidad de glucopiranososa
80,32	Carbono en la posición 4 de la unidad de glucopiranososa
72,88	Carbono en la posición 3 de la unidad de glucopiranososa
72,26	Carbono en la posición 5 de la unidad de glucopiranososa
71,71	Carbono en la posición 2 de la unidad de glucopiranososa
60,18	Carbono en la posición 6 de la unidad de glucopiranososa

Los carbonos fueron asignados según la literatura (Schneider et al. (1998)). De esta manera se utilizó Resonancia Magnética Nuclear de ^1H -NMR y ^{13}C -NMR para caracterizar los estándares de CDs mediante la asignación de señales en los espectros. El mismo análisis no se realizó para la solución de CDs en mucílago obtenida debido a que contenía baja concentración de CDs. La técnica de HPLC preparativo se utilizó con el fin de separar y purificar las CDs presentes en la solución. Sin embargo, de las fracciones de CD separadas y retoevaporadas no se obtuvo suficiente para el análisis de RMN. Además, se determinó que los compuestos obtenidos aún contenían impurezas debido a su coloración amarillo claro y no blanca (propiedad del compuesto puro).

5.5. Caracterización de CDs por HPLC

5.5.1. Método para caracterización de azúcares. Inicialmente se realizó el método para determinar azúcares en la solución de CDs en mucílago. Para ello se evaluó la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa en un rango de 0,2 - 5,0 mg/mL, obteniendo las siguientes

curvas de calibración:

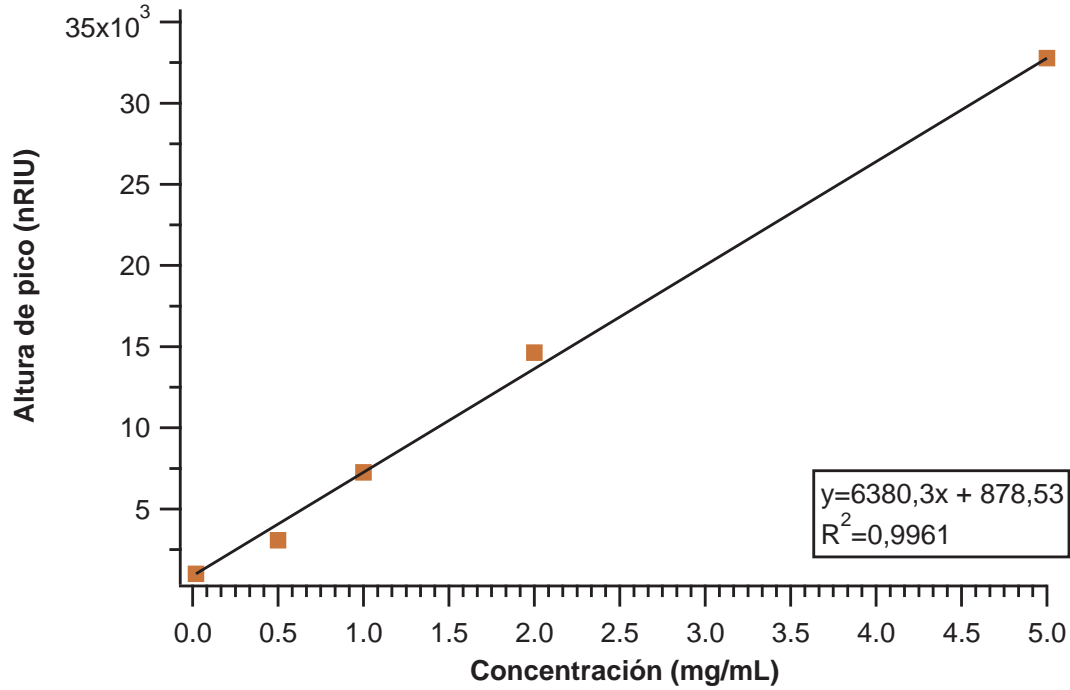


Figura 26. Curva de calibración de fructosa.

Tabla 25

Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de la fructosa.

Concentración (mg/mL)	Desviación estándar (s)	Promedio de área \bar{X}	%RSD
0,2	1781,9	18376,6	9,7
0,5	2485,1	42174	5,9
1,0	3101,7	83936,7	3,7
2,0	2856,7	167562,3	1,7
5,0	3782,7	440412,8	0,9

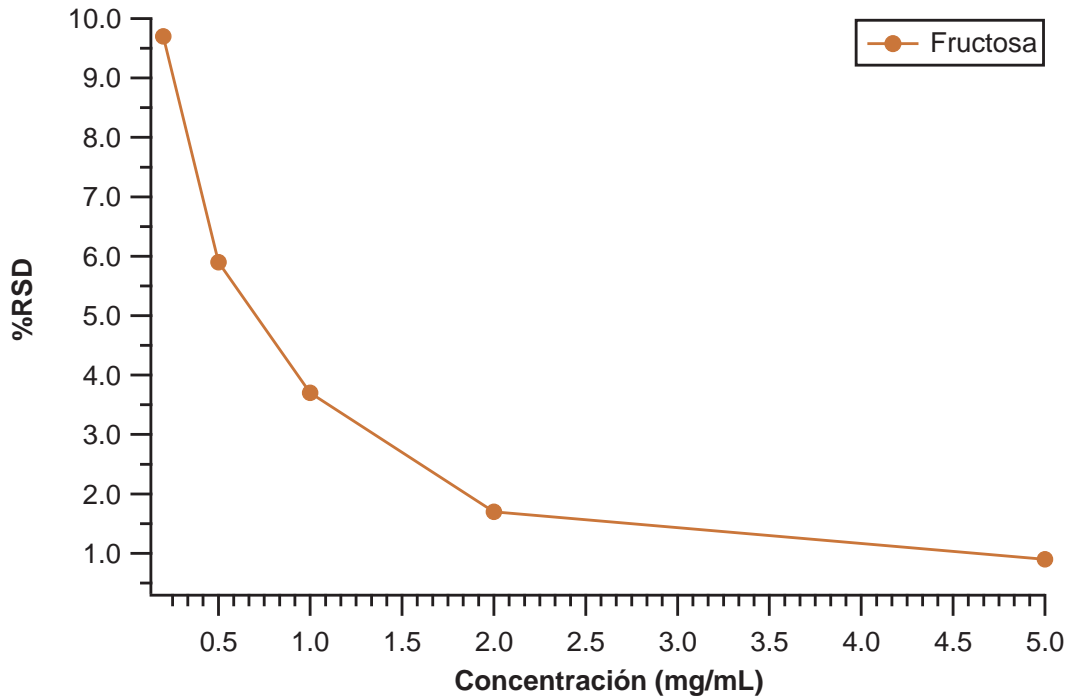


Figura 27. Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración de fructosa.

Tabla 26

Determinación de la repetibilidad del método para curva de fructosa.

Concentración (mg/mL)	%RSD	<i>r</i>
0,2	13,1	36,7
0,5	13,4	37,5
1,0	5,50	15,4
2,0	4,90	13,7
5,0	2,10	5,90

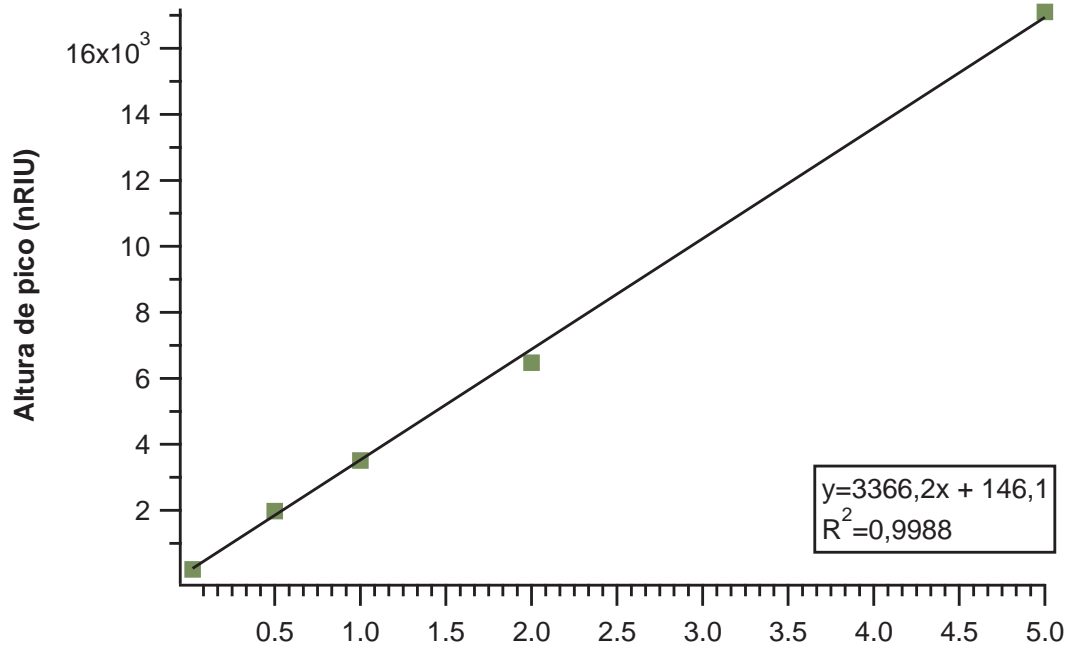


Figura 28. Curva de calibración de glucosa.

Tabla 27

Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de glucosa.

Concentración (mg/mL)	Desviación estándar (s)	Promedio de área \bar{X}	% RSD
0,2	1514,9	11601	13,1
0,5	3364,2	25071,9	13,4
1,0	2839,8	51687,5	5,50
2,0	4905,8	100389,5	4,90
5,0	5910,5	275496,3	2,01

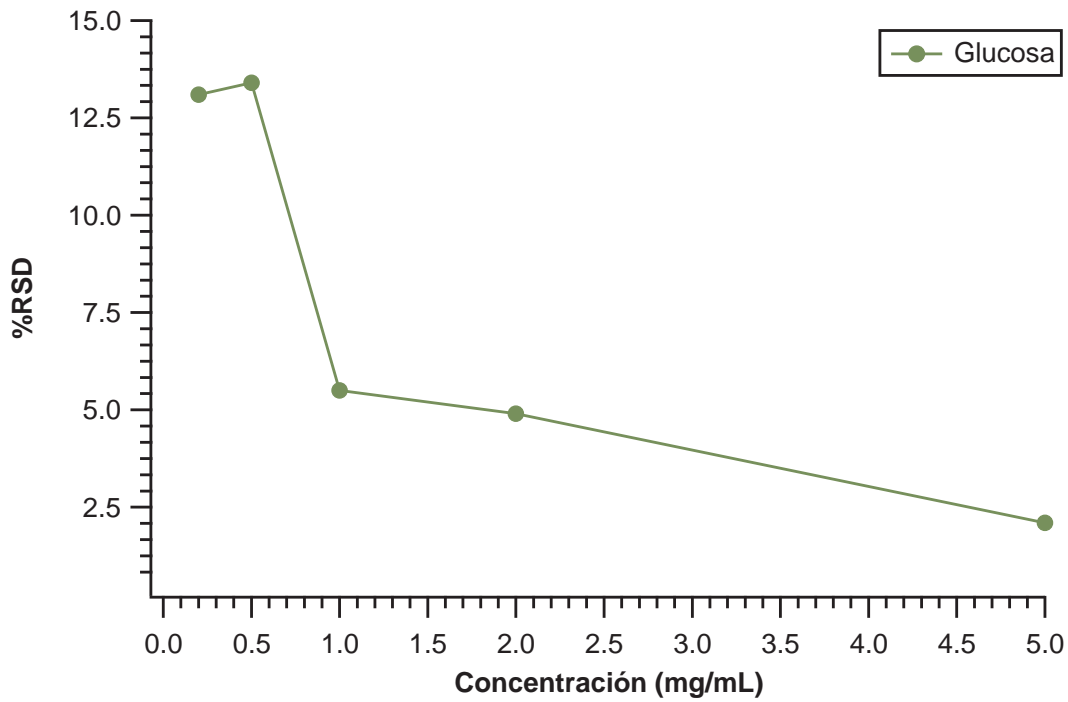


Figura 29. Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración de glucosa.

Tabla 28

Determinación de la repetibilidad del método para curva de glucosa.

Concentración (mg/mL)	%RSD	<i>r</i>
0,2	11,0	30,8
0,5	4,9	13,7
1,0	1,9	5,3
2,0	2,6	7,3
5,0	2,1	5,9

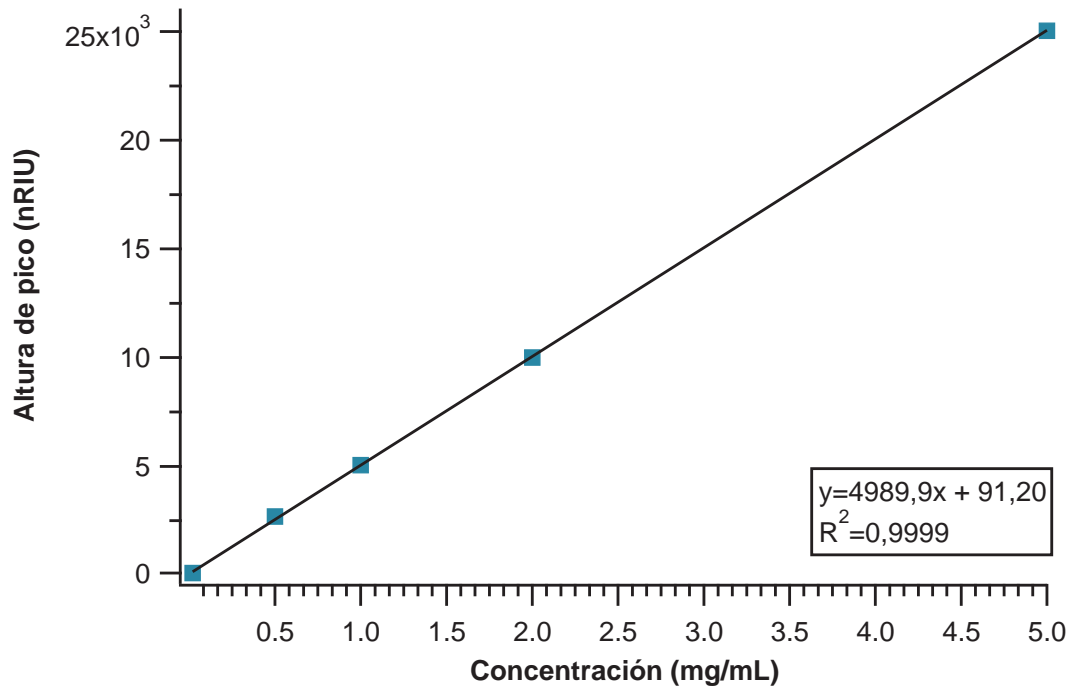


Figura 30. Curva de calibración de sacarosa.

Tabla 29

Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de sacarosa.

Concentración (mg/mL)	Desviación estándar (s)	Promedio de área \bar{X}	%RSD
0,2	1840	16681,4	11,0
0,5	2237,5	45354,2	4,9
1,0	1676,5	86379,4	1,9
2,0	4557,5	172790	2,6
5,0	9637,1	449300,7	2,1

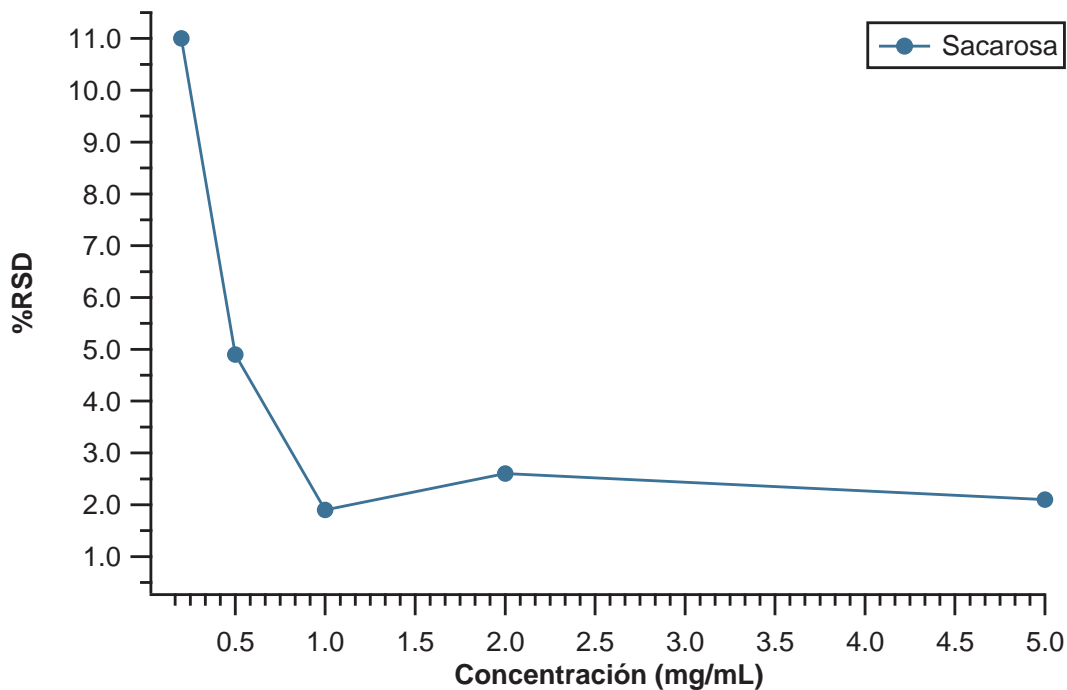


Figura 31. Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración de sacarosa.

Tabla 30

Determinación de la repetibilidad del método para curva de sacarosa.

Concentración (mg/mL)	%RSD	<i>r</i>
0,2	9,7	27,2
0,5	5,9	16,5
1,0	3,7	10,4
2,0	1,7	4,8
5,0	0,9	2,5

Cada patrón de fructosa, glucosa y sacarosa, en el rango de concentración de 0,2 - 5,0 mg/mL fue inyectado 6 veces. La desviación relativa calculada para las curvas de calibración de los azúcares no superaban el 15%, esto indica reproducibilidad media y una precisión aceptable del método.

5.5.2. Método para caracterización de CDs. Inicialmente se realizó ensayos preliminares de la separación de CDs por HPLC. Los estándares se prepararon en ACN:H₂O (60:40). Los estándares se desarrollaron mejor a dicha concentración en comparación a los ensayos realizados con ACN:H₂O 50:50 y 70:30.

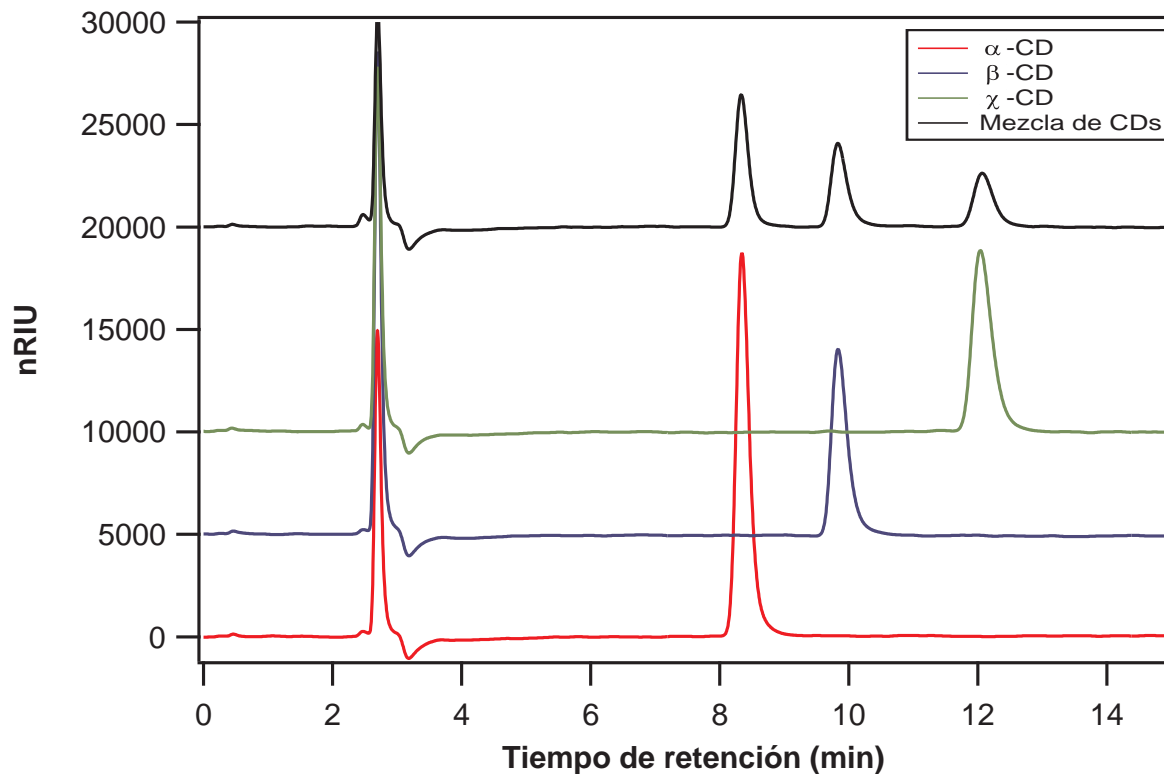


Figura 32. Cromatograma estándares de α , β y γ -CD.

Posteriormente se realizó el cálculo del factor de retención, factor de selectividad, número de platos y resolución (Tabla 31). Además se graficó las curvas de calibración de cada CD y se calculó la desviación estándar y desviación relativa:

Tabla 31

Cálculos de los cromatogramas de estándares de CDs para validación del método.

Estándar	t_R (min)	$W_{1/2}$ (min)	N	t_R (min)	k'	α	R_s
α	8,345	0,2324	7143	2,696	2,095	1,26 (α, β)	3,14
β	9,385	0,2789	6889	2,696	2,648	1,65 (α, γ)	6,25
γ	12,041	0,3480	6632	2,698	3,463	1,31 (β, γ)	3,73

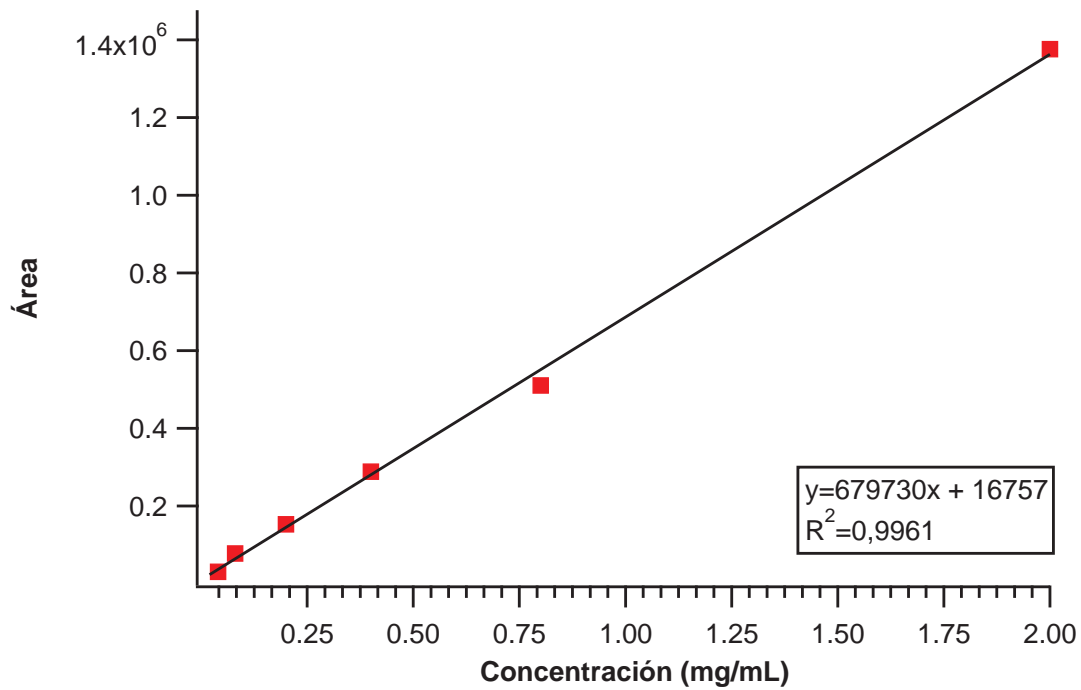


Figura 33. Curva de calibración de estándar α -CD.

Tabla 32

Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de α -CD.

Concentración (mg/mL)	Desviación estándar (s)	Promedio de área \bar{X}	%RSD
0,04	619,66	26234	6,47
0,08	2990,20	51973	5,75
0,2	8210,14	126974	2,36
0,4	31450,77	254080	1,24
0,8	5395,06	464034	1,16
2,0	7198,55	1366168	0,53

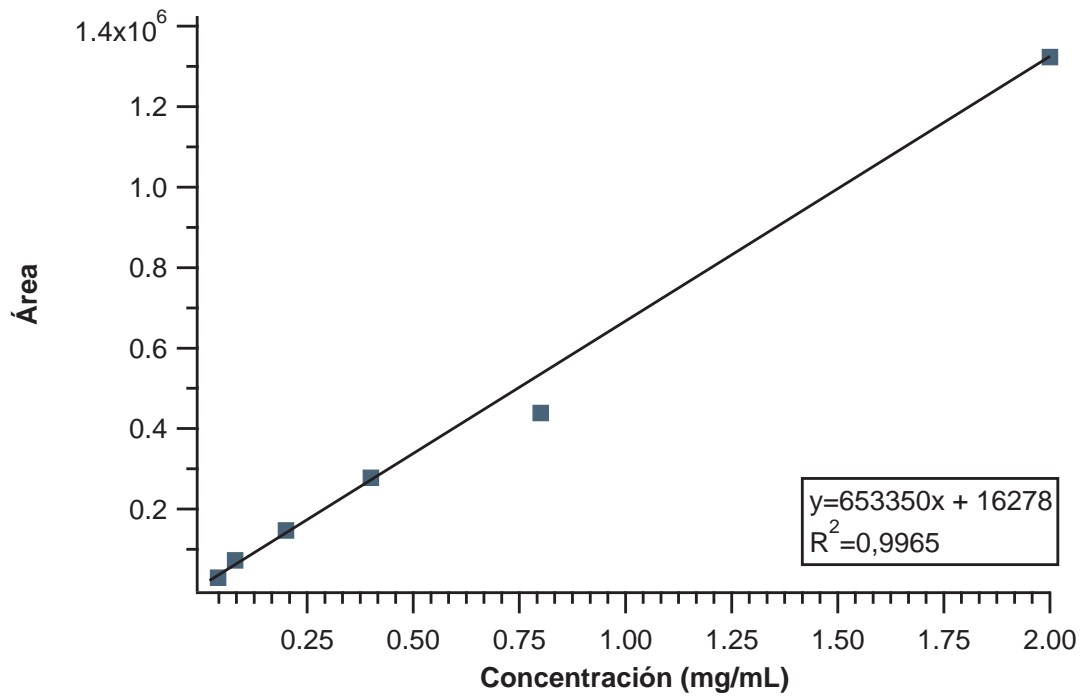


Figura 34. Curva de calibración de estándares β -CD.

Tabla 33

Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de β -CD.

Concentración (mg/mL)	Desviación estándar (s)	Promedio de área \bar{X}	%RSD
0,04	2734,35	22417	12,20
0,08	5542,85	51803	10,70
0,2	7781,13	117597	6,62
0,4	6970,24	245804	2,84
0,8	10951,78	449017	2,44
2,0	6293,86	1311641	0,48

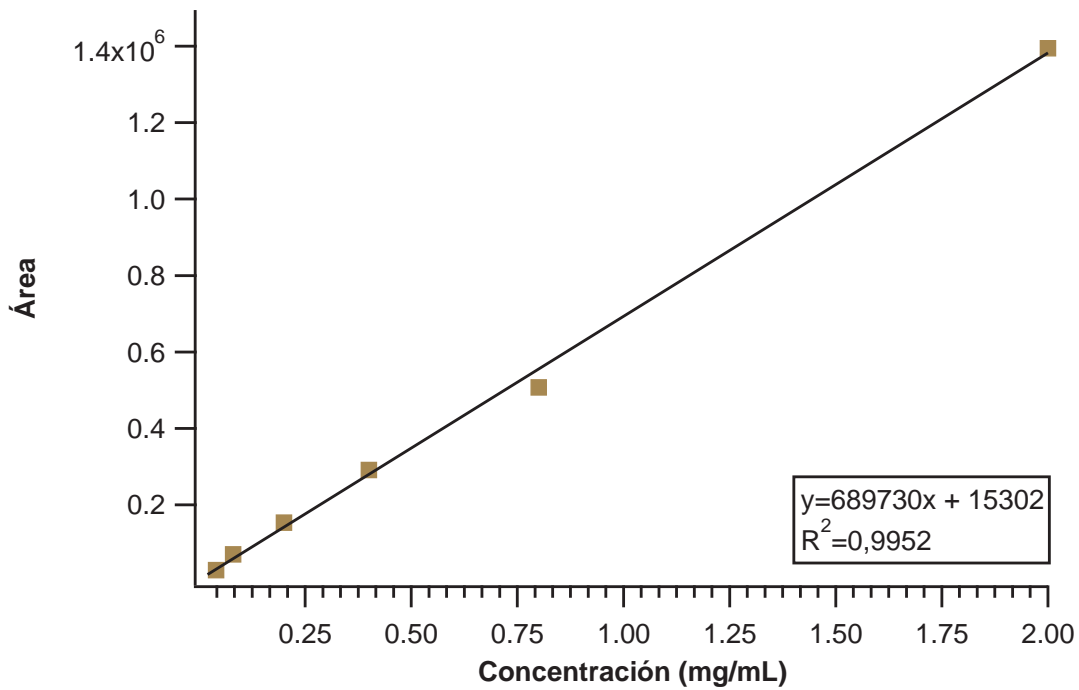


Figura 35. Curva de calibración de estándares γ -CD.

Además se graficó el área de precisión versus la concentración de CDs:

Tabla 34

Desviación estándar y porcentaje de desviación relativa de la curva de γ -CD.

Concentración (mg/mL)	Desviación estándar (s)	Promedio de área \bar{X}	%RSD
0,04	6179,22	22958	26,92
0,08	14255,73	61074	23,34
0,2	4577,88	135608	3,38
0,4	4383,42	259904	1,69
0,8	4971,22	465969	1,07
2,0	9309,63	1390093	0,67

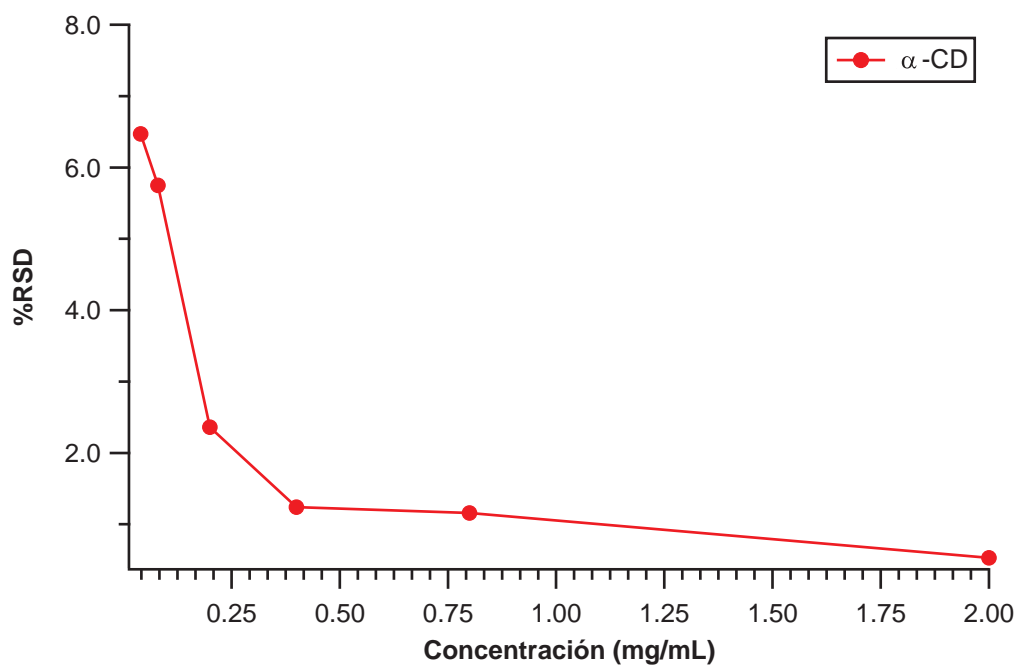


Figura 36. Coeficiente de variación versus concentración de α -CD.

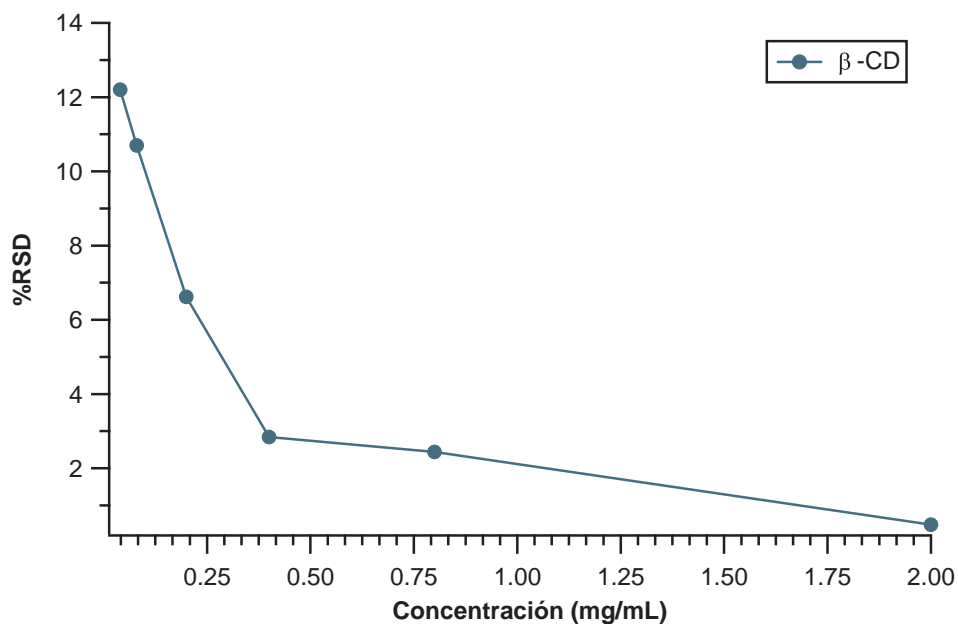


Figura 37. Coeficiente de variación versus concentración de β -CD.

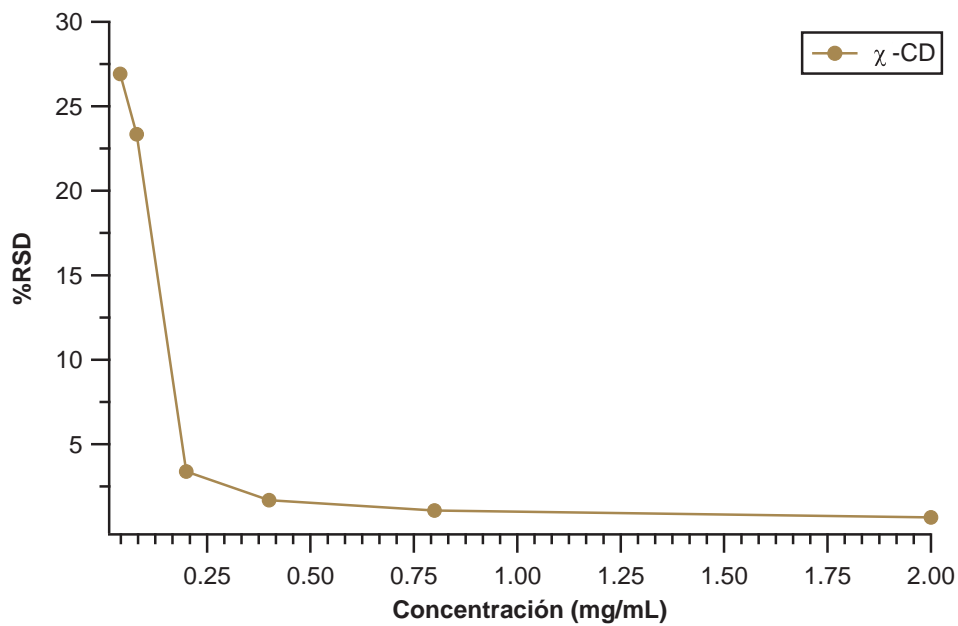


Figura 38. Coeficiente de variación versus concentración de γ -CD.

Los patrones de CDs en el rango de 0,04 - 2,0 mg/mL fueron inyectados 3 veces. La des-

viación relativa estándar calculada para valores de concentración mayores a 0,4 mg/mL no superó el 5%, lo que indica buena reproducibilidad y una precisión aceptable del método.

Las CDs en solución de mucílago se analizaron por HPLC bajo las mismas condiciones cromatográficas utilizadas en los métodos para CDs.

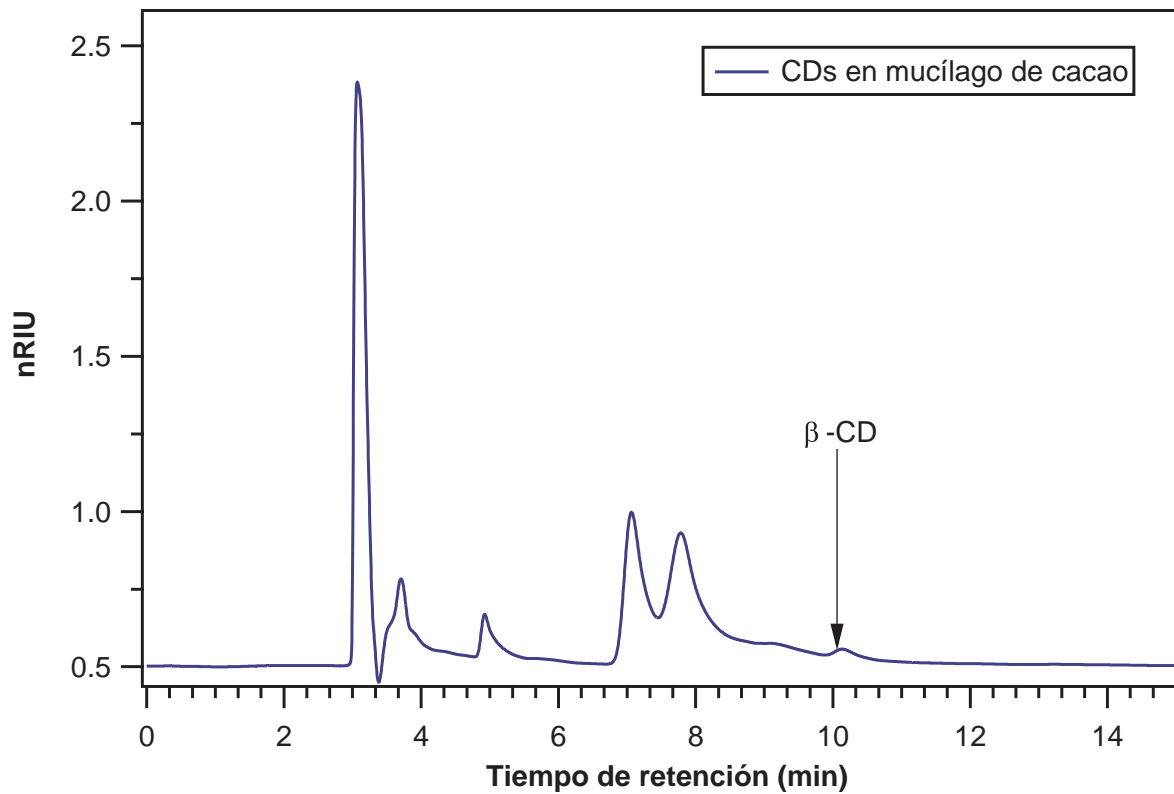


Figura 39. Cromatograma de la solución final de mucílago con CDs.

En el cromatograma de la Figura 39 se puede observar que los picos aparecen en un orden tres veces menor que los picos de los cromatogramas realizados a los estándares de CDs y azúcares. Las concentraciones no fueron calculadas debido a que las señales se encontraban por debajo

del límite de detección del método: Área $0,2 \times 10^6$ - $1,4 \times 10^6$ y rango de concentración 0,04 - 2,0 mg/mL.

5.6. Caracterización de CDs por espectrometría de masas

5.6.1. MS-MALDI-TOF. Inicialmente se tomó el espectro de la mezcla de estándares de α , β y γ -CD (Figura 40). Se utilizó matriz DHB para todas las muestras. Posteriormente, se estudió el espectro de masas del almidón sin tratar (Figura 41) y el almidón convertido en CDs (Figura 42). En los espectros se puede observar que las primeras señales con mayor abundancia corresponden a α -CD ($m/z=995,74$), β -CD ($m/z=1157,59$) y γ -CD ($m/z=1319,46$), todas corresponden al ion molecular con aducto de sodio $[\text{Na}]^+$. Las siguientes señales corresponden a las CDs consecutivas δ -CD, ϵ -CD, ζ -CD, etc., aumentando así sucesivamente una unidad de glucopirano-sa por CD.

Posteriormente se realizó el estudio del mucílago antes y después de realizar la conversión a CDs, Figura 43 y 44 respectivamente. De los espectros se puede observar la conversión de los oligosacáridos iniciales del mucílago a β y γ -CD.

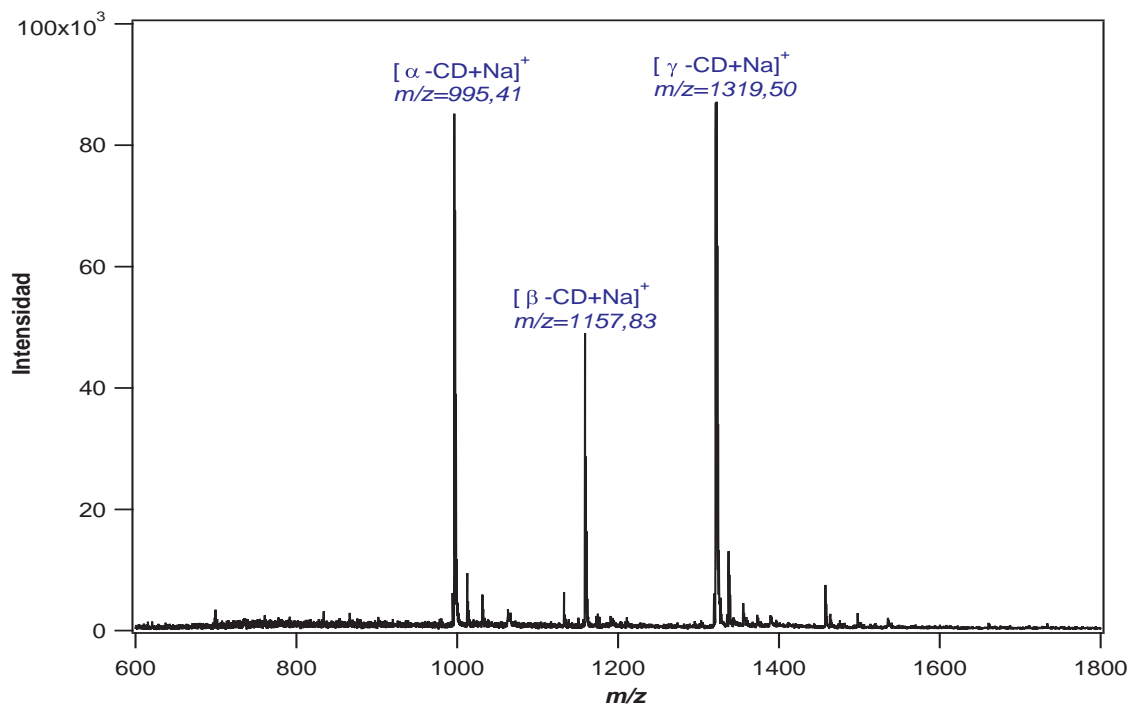


Figura 40. Espectro de masas MALDI-TOF estándares de α , β y γ -CD.

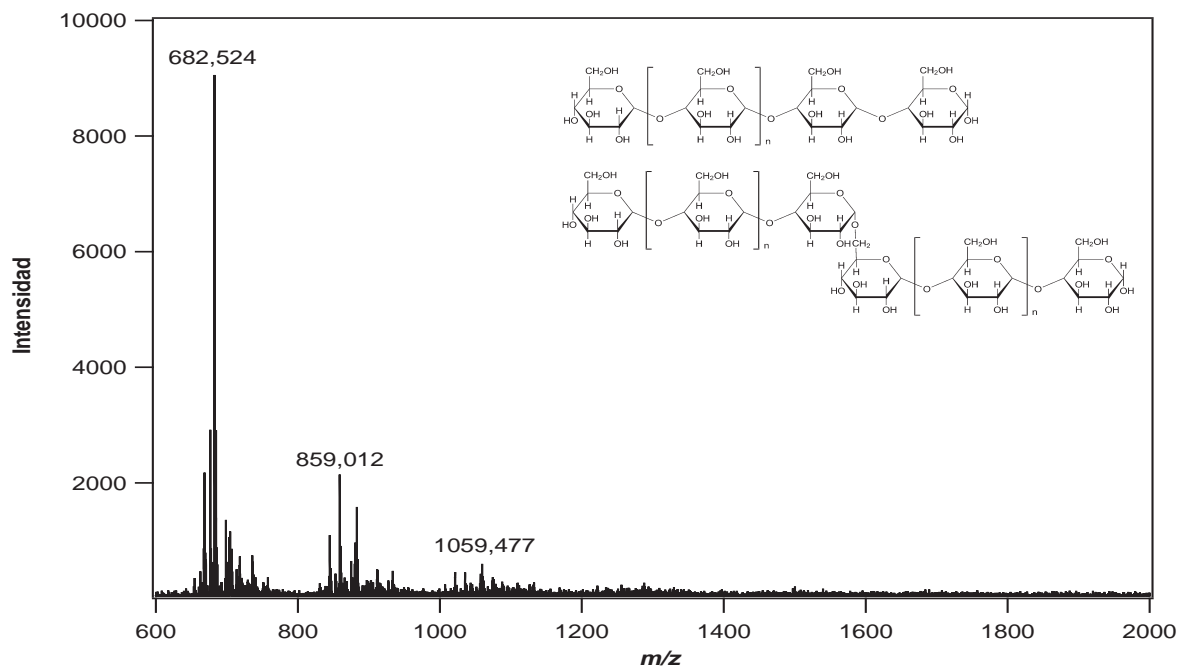


Figura 41. Espectro de masas MALDI-TOF de almidón de yuca.

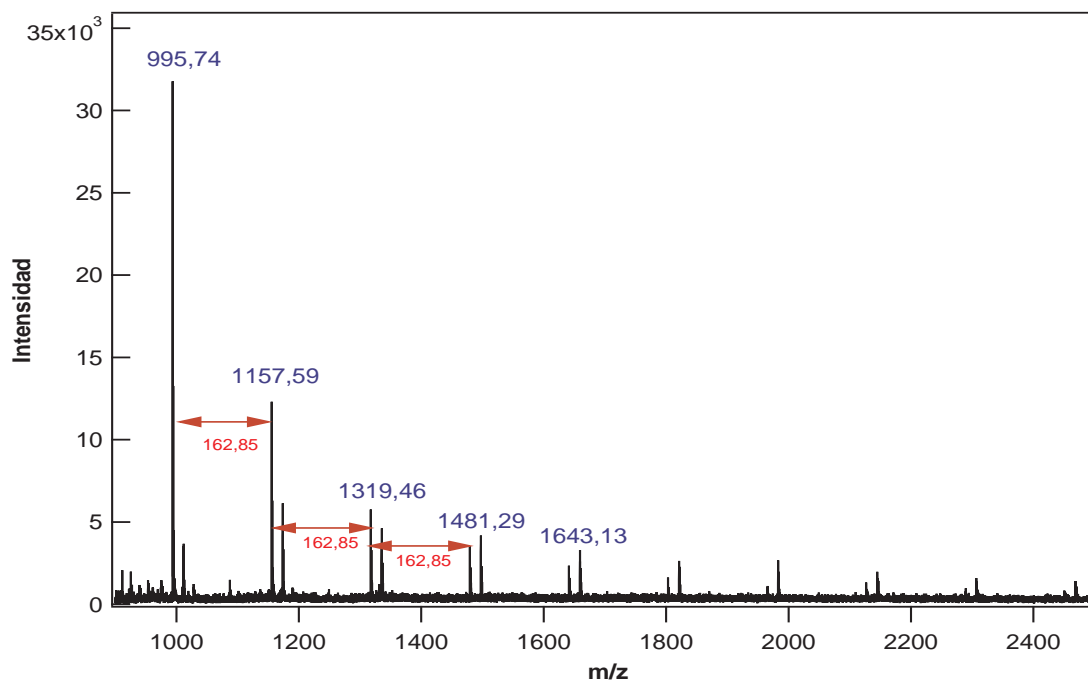


Figura 42. Espectro de masas MALDI-TOF de CDs a partir de almidón de yuca.

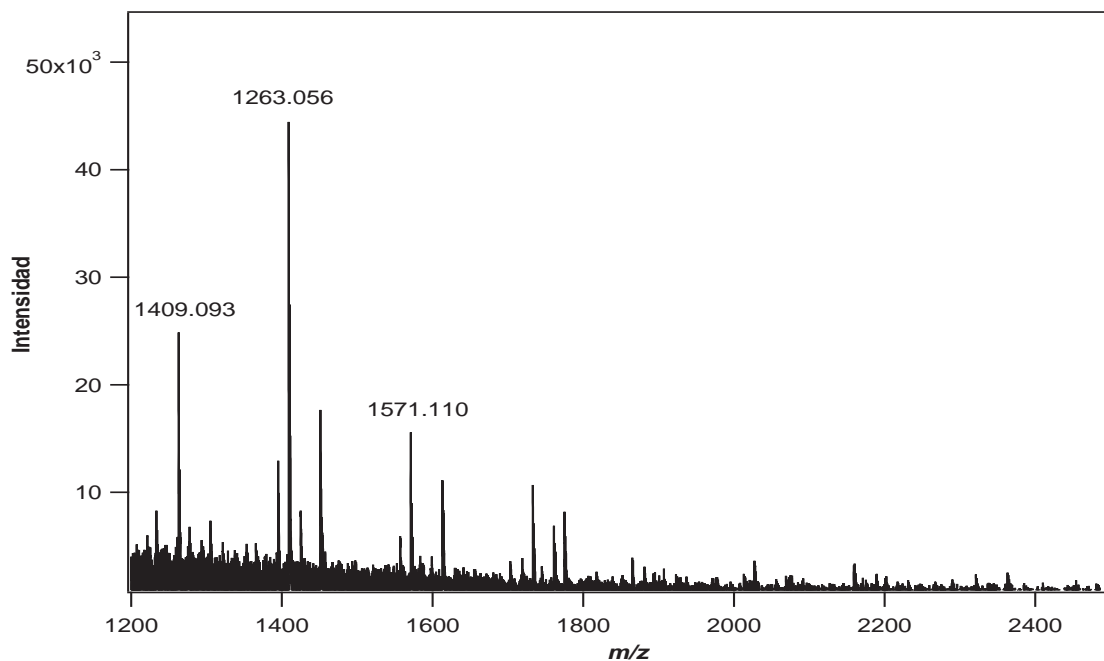


Figura 43. Espectro de masas MALDI-TOF de mucílago de cacao.

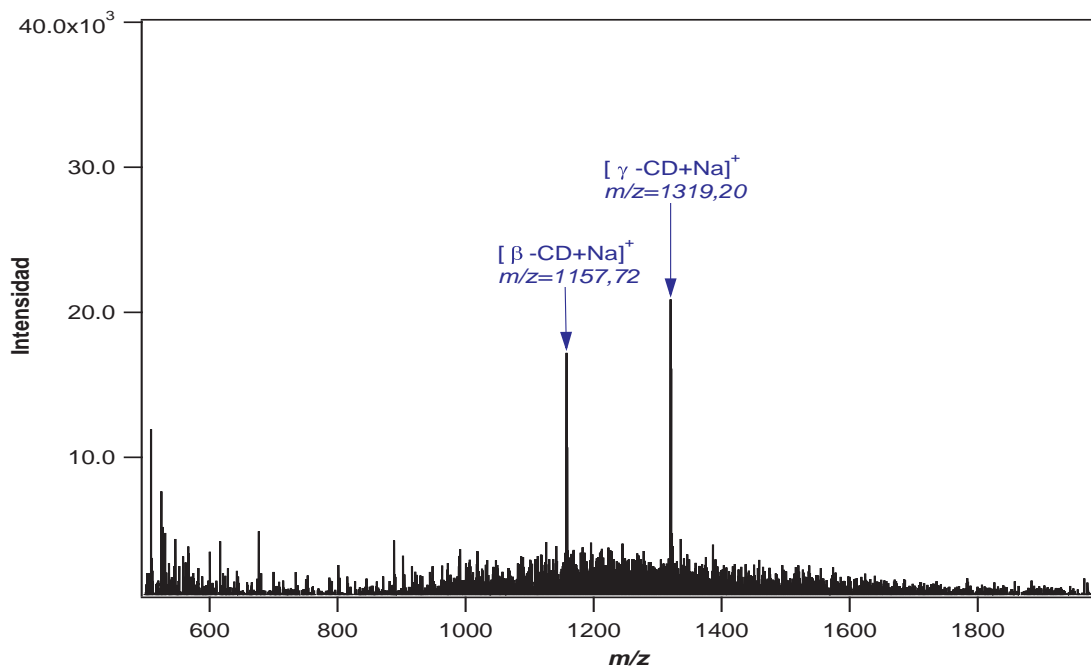


Figura 44. Espectro de masas MALDI-TOF de CDs a partir de mucílago de cacao.

5.6.2. MS-ESI-IT. Los estándares, sustratos y CDs obtenidas también fueron analizados por espectrometría de masas ESI-IT. La Figura 45 muestra el espectro en modo positivo de α -CD con $m/z= 995,38$ que corresponde al ion molecular con aducto de sodio $[M+Na^+]$. Este aducto también está presente en los espectros de los estándares de β -CD y γ -CD, Figura 46 y 47 respectivamente.

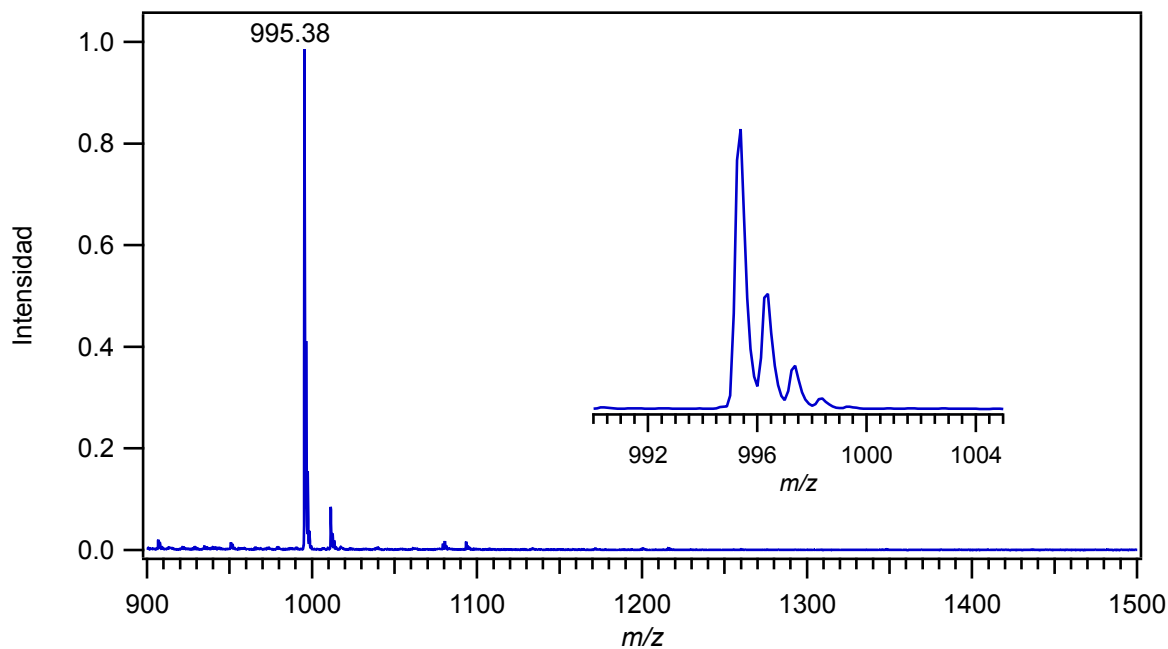


Figura 45. Espectro de masas ESI-IT estándar de α -CD.

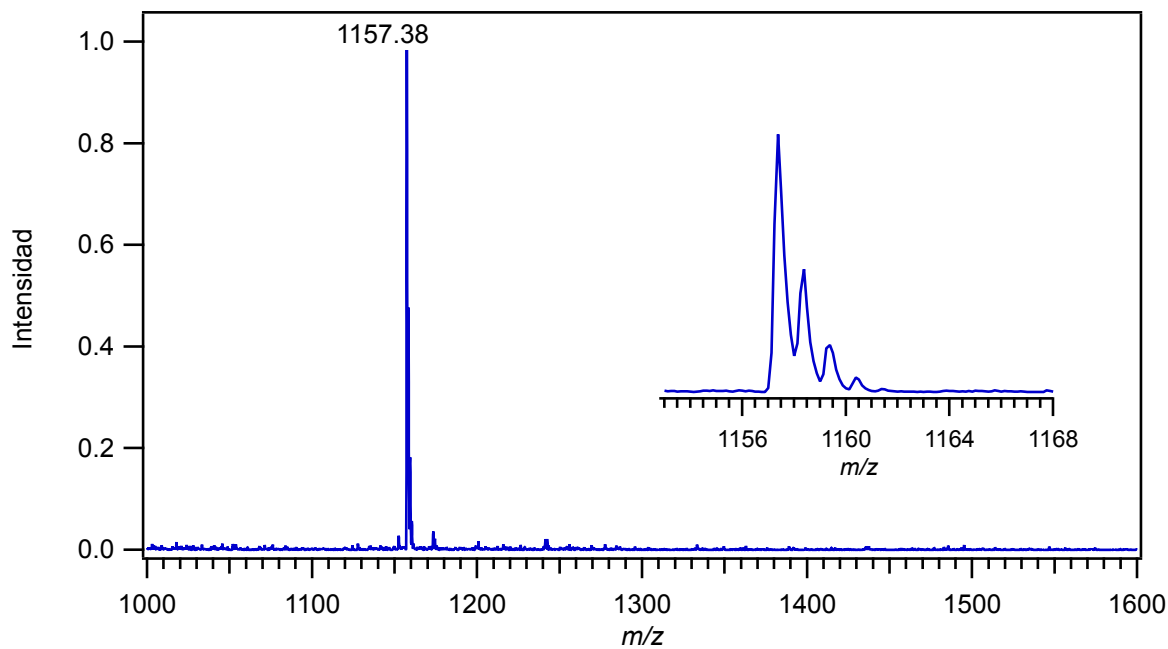


Figura 46. Espectro de masas ESI-IT estándar de β -CD.

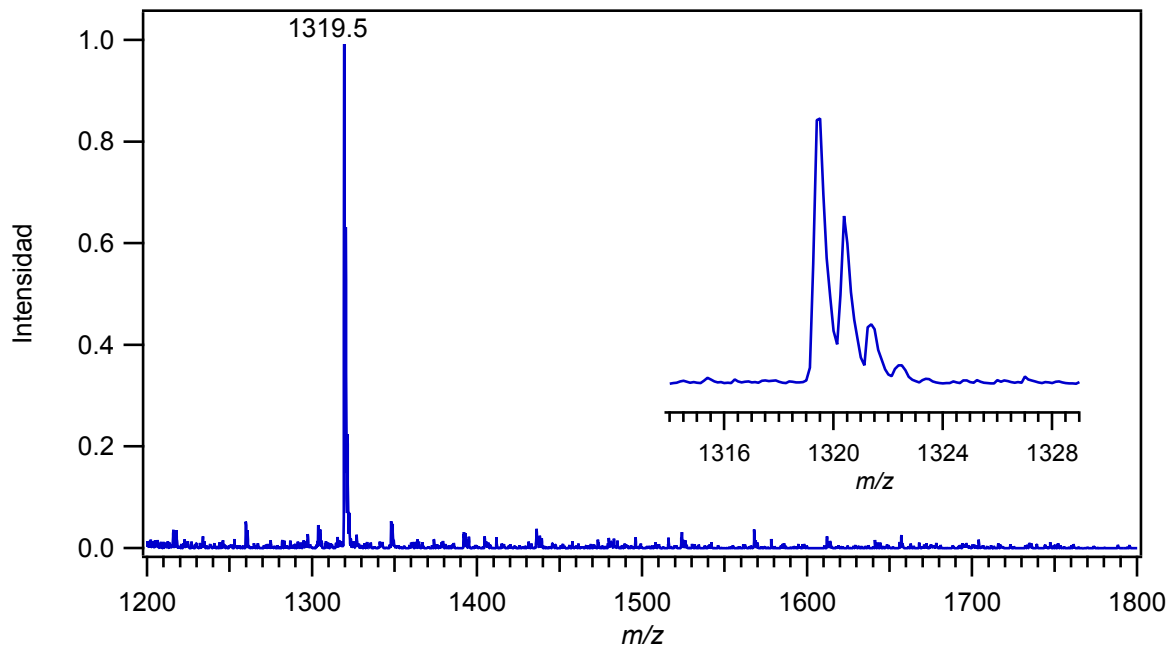


Figura 47. Espectro de masas ESI-IT estándar de γ -CD.

La Figura 48 muestra el espectro de masas del almidón antes de ser tratado. La Figura 49 muestra el resultado de la solución de CDs a partir de almidón. En el espectro están señalados los picos con mayor abundancia que corresponden a α y β -CD con aducto de sodio y acomplejada con Tris-HCl, respectivamente. De esta manera se comprobó la conversión del almidón a CDs.

La Figura 50 muestra el espectro de masas del mucílago de cacao. Este sustrato está compuesto principalmente por azúcares simples como fructosa, glucosa y sacarosa. Además contiene oligosacáridos con estructura similar a la del almidón que permitió la conversión de mucílago a CDs. La Figura 51 muestra (con poca abundancia) la α -CD como resultado de la conversión enzimática del mucílago a CDs en solución.

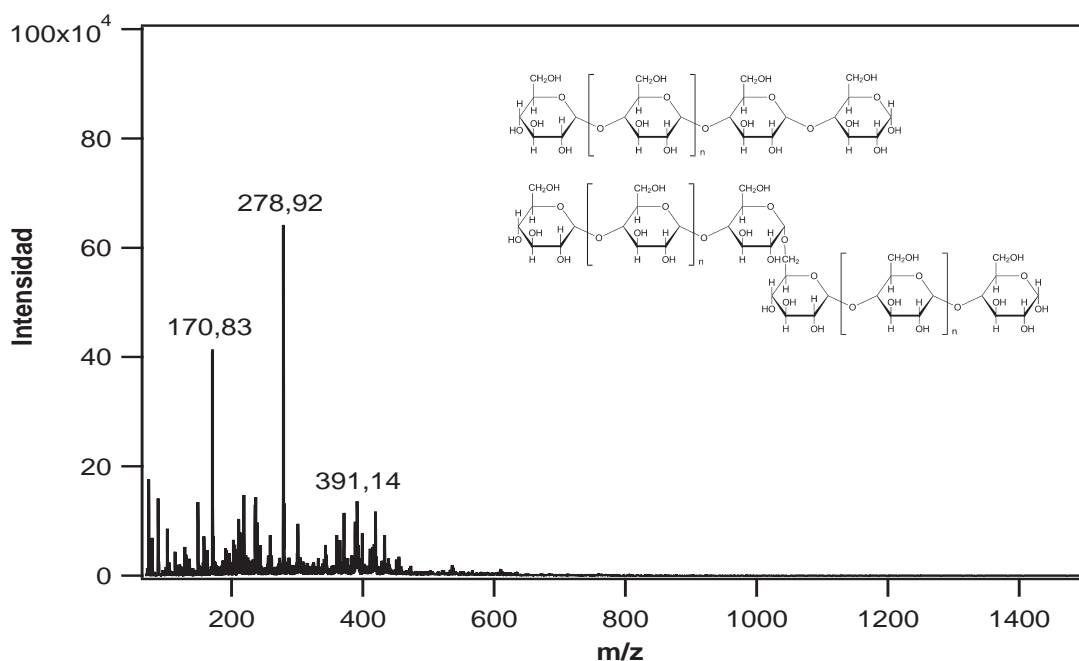


Figura 48. Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para la molécula de almidón.

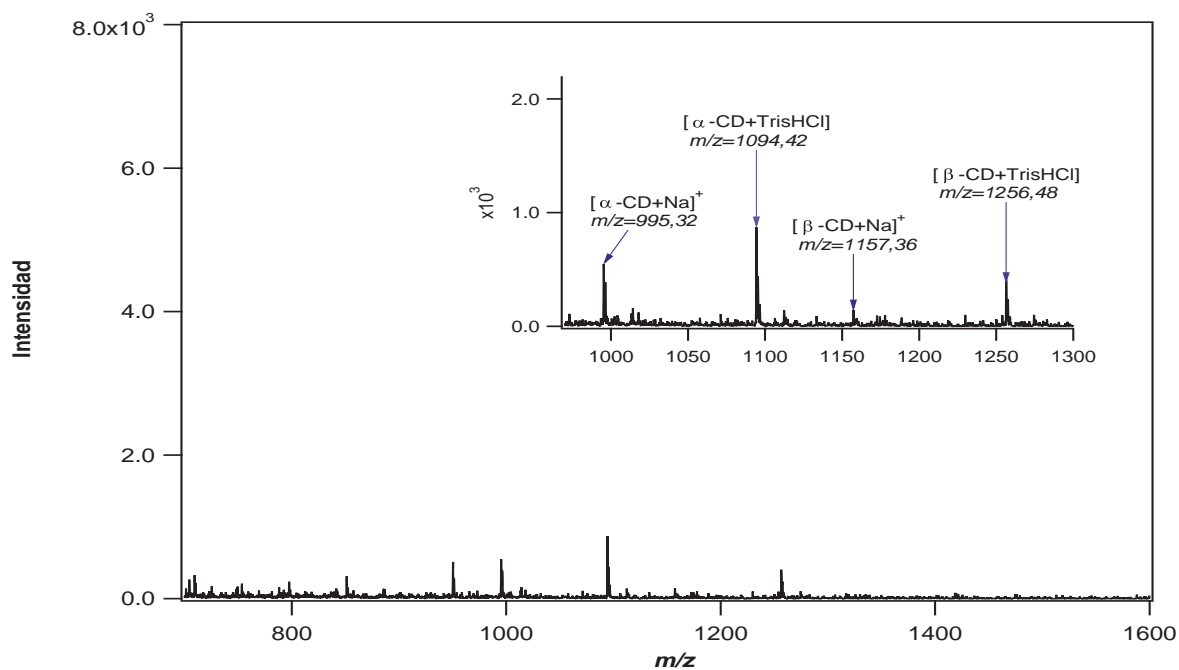


Figura 49. Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para las CDs obtenidas a partir de almidón.

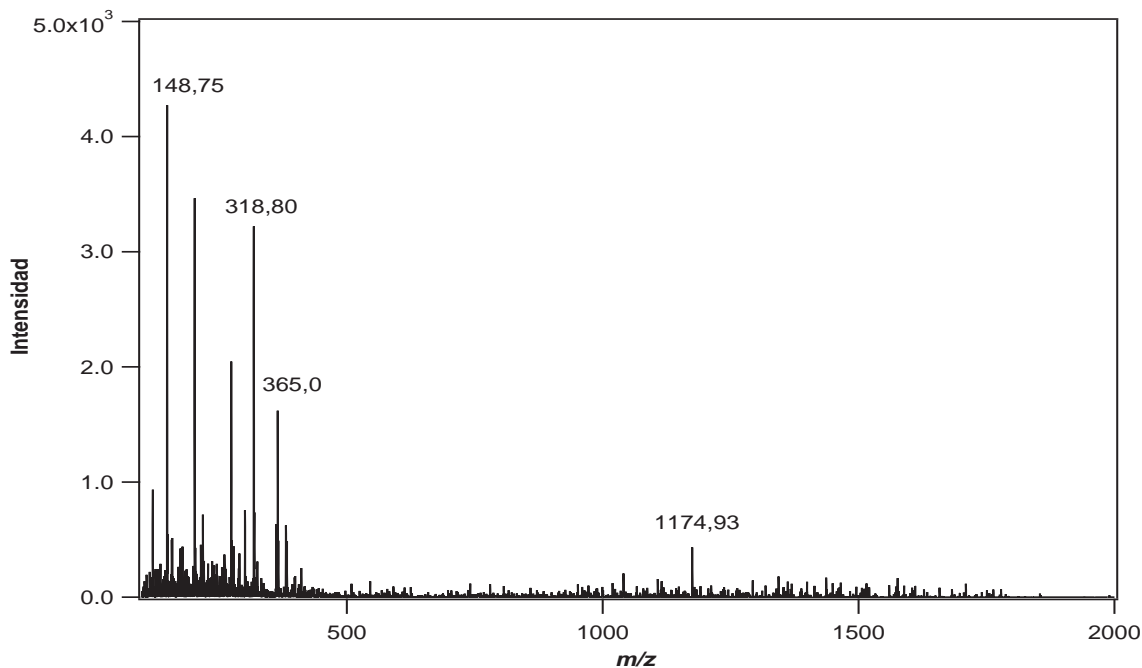


Figura 50. Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para mucílago de cacao.

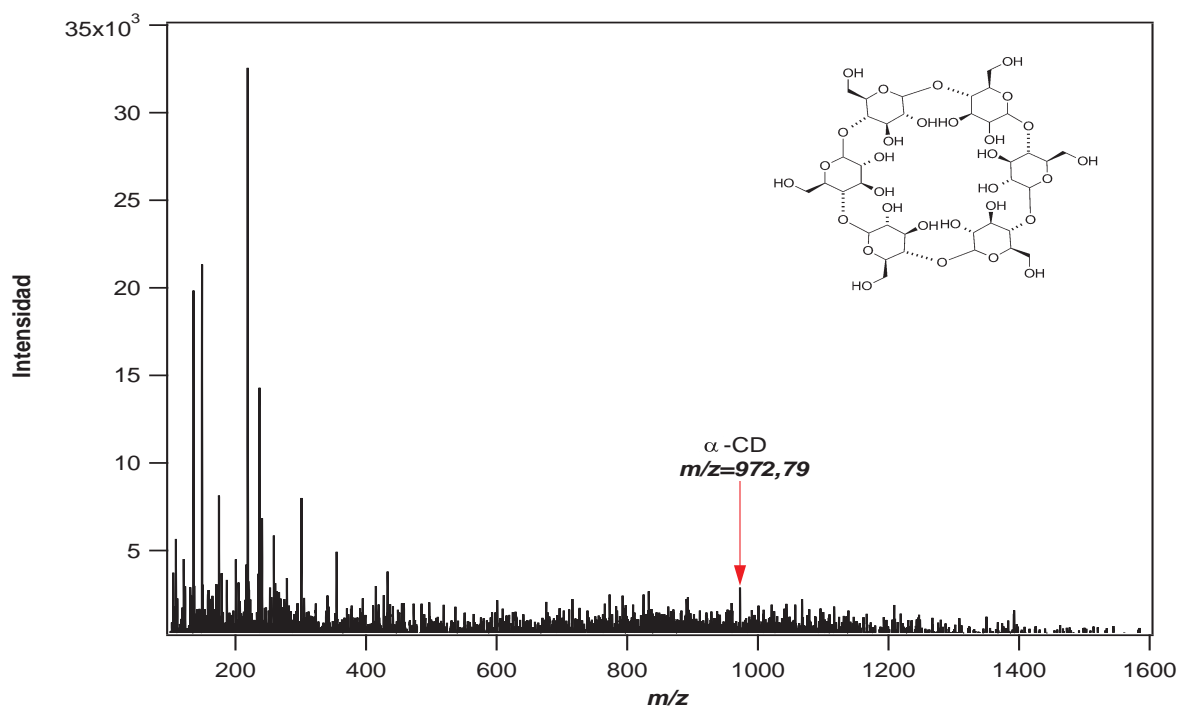


Figura 51. Espectro de masas ESI-IT en modo positivo para mucílago de cacao.

La caracterización por espectrometría de masas permitió identificar las CDs como producto final en la conversión enzimática del almidón y el mucílago de cacao. Sin embargo, en los espectros se puede observar que los sustratos y las CDs obtenidas de éstos presentan señales con mayor abundancia utilizando MS-MALDI-TOF.

6. Conclusiones

El mucílago de cacao puede ser utilizado como sustrato para la obtención de CDs ya que es una fuente rica en oligosacáridos compuestos por unidades de glucosa unidos mediante enlaces α -1,4 que probablemente se encuentren en el exudado en forma de maltodextrinas. Sin embargo, su bajo rendimiento no lo convierte en un producto comercial viable comparado con las CDs obtenidas a partir de almidón. La concentración de sustrato demostró ser el factor principal para la producción de CDs. Con base en los resultados del diseño experimental se demostró que el buffer de Tris-HCl a pH 8,0 y 120 min de reacción entre solución de almidón de yuca a 2,5 % p/v y 5,0 mg/mL de CGTasa son las mejores condiciones para producir CDs a partir de almidón. En cambio el mucílago de cacao demostró la óptima producción de CDs a partir de mucílago 1,0 g/mL, CGTasa 2981,1 U/g, 60 min de reacción y buffer de fosfato pH 6,0.

Las ciclodextrinas (α , β y γ) y los azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) fueron caracterizados mediante la técnica analítica HPLC. Sin embargo, la solución final de CDs en mucílago no se caracterizó por cromatografía ya que no se encontraba en el rango del límite de detección de los métodos realizados. Los ensayos realizados por RMN permitieron la caracterización de los estándares de CDs por $^1\text{H-NRM}$ y $^{13}\text{C-NRM}$. Las CDs obtenidas se observaron por espectrometría

de masas ESI-IT y MALDI-TOF, comparando los sustratos antes y después de ser tratados con la enzima CGTasa.

Referencias Bibliográficas

- Abarca, D., Martínez Espinosa, R., Jose Muñoz, J., Paulina Torres, M., and Vargas, G. (2010). *Residuos de Café, Cacao y Cladodio de Tuna: Fuentes Promisorias de Fibra Dietaria*, volume 23.
- Ahmed, J., Tiwari, B., Imam, S., and Rao, M. (2012). *Starch-based polymeric materials and nanocomposites: chemistry, processing, and applications*. Taylor & Francis.
- Allinger, N. (1973). *Química orgánica*. Number v. 1. Reverté.
- Anvoh, K., Bi, A. Z., and Gnakri, D. (2009). Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(2):129–133.
- Bermiller, J. and Whistler, R. (2009). *Starch: chemistry and technology*. Academic Press.
- Blanco, K., Moraes, F., Bernardi, N., Vettori, M., Monti, R., and Contiero, J. (2014). *Cyclodextrin production by bacillus lehensis isolated from cassava starch: characterisation of a novel enzyme*, volume 32.
- Brewster, M. E. and Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7):645–666.
- Campbell, M. and Farrell, S. (2011). *Biochemistry*. Cengage Learning.
- Castaño P, H. I. and Mejía G, C. E. (2008). Producción de etanol a partir de almidón de yuca

utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultáneas (ssf). *Vitae*, 15:251–258.

Center, I. T. (2014). Proexport colombia: promoción de turismo, inversión y exportaciones. oportunidades de mercado para exportar mercado colombiano.

Díaz, M. (2012). *La yuca en el Caribe colombiano: De cultivo ancestral a agroindustrial*.

Duran, D. and Cabezas, J. (2019). Evaluación del mucílago de cacao como fuente de carbono para producción de celulosa bacteriana. Undergraduate Thesis.

Fourmentin, S., Crini, G., and Lichtfouse, E. (2018). *Cyclodextrin fundamentals, reactivity and analysis*, volume 16. Springer.

Freudenberg, K., Cramer, F., and Plienigen, H. (1953). Herstellung von einschlußverbindungen physiologisch wirksamer organischer verbindungen.

Freudenberg, K. and Jacobi, R. (1935). Über schärdingers dextrine aus stärke. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 518(1):102–108.

Gao, S., Liu, Y., Jiang, J., Ji, Q., Fu, Y., Zhao, L., Li, C., and Ye, F. (2019). Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Molecular Liquids*, 293:111513.

Gornall, A., Bardawill, C., and David, M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry*, 177(2):751–766.

- Jindrich, J., Josef, P., and Lindberg, B. (1995). Separation of cyclodextrins and their derivatives by thin-layer and preparative column chromatography. *Carbohydrate Research*, 275(1):1–7.
- Joshi, V. (2016). *Indigenous Fermented Foods of South Asia*. Fermented Foods and Beverages Series. CRC Press.
- Khun, R. (1925). Mechanism of the action of amylases. constitution of starch. *Liebig's Ann*, (443):1–71.
- Kim, T.-J., Kim, B.-C., and Lee, H.-S. (1995). Production of cyclodextrins using moderately heat-treated cornstarch. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(12):1057–1061.
- Kim, T.-J., Kim, B.-C., and Lee, H.-S. (1997). Production of cyclodextrin using raw corn starch without a pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(7):506–509.
- Klein, C. and Schulz, G. E. (1991). Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 217(4):737–750.
- Kwak, H., Jung, C., Shim, S. Y., and Ahn, J. (2003). Removal of cholesterol from cheddar cheese by beta-cyclodextrin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50:7293–8.
- Leemhuis, H., Kelly, R. M., and Dijkhuizen, L. (2009). Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(PMC2804789):823–835.

- Loftsson, T. and Duchene, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2):1–11.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana.
- Makela, M. J., Korpela, T. K., Puisto, J., and Laakso, S. V. (1988). Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, specificity, and conversion mixture applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1):83–88.
- Marshall, J. and Lauda, C. (1975). Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean , phaseolus vulgaris. *Journal of biological chemistry*, pages 8030–8037.
- Mason, W. R., BeMiller, J., and Whistler, R. (2009). Chapter 20 - starch use in foods. In *Starch (Third Edition)*, pages 745–795. Academic Press, San Diego.
- Nakamura, N. and Horikoshi, K. (1976). Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyl-transferase of an alkalophilic bacillus sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(9):1785–1791.
- Ohlsson, E. (1930). *Z. physiol Chem.*, 89.
- Okotore, R. (2015). *Essentials of enzymology*. Xlibris Corporation.

- Osborn, H., Khan, T., and Ltd, M. C. T. L. E. (2000). *Oligosaccharides: their synthesis and biological roles*. Oxford University Press.
- Parkin, I. P. (2018). Supramolecular chemistry. *Appl. Organometal. Chem.*, 15(3):236–236.
- Payen, A. and Persoz, J.-F. (1833). Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels. *Annales de chimie et de physique*, 53:73–92.
- Pócsi, I., Nógrády, N., Lipták, A., and Szentirmai, A. (1998). Cyclodextrins are likely to induce cyclodextrin glycosyltransferase production in bacillus macerans. *Folia Microbiologica*, 43(1):71–74.
- Qi, Z. H. and Hedges, A. R. (2018). Use of cyclodextrins for flavors. In *Flavor Technology*, volume 610 of *ACS Symposium Series*, pages 231–243. American Chemical Society.
- Raja, K. C. M., Sreedharan, V. P., Prema, P., and Ramakrishna, S. V. (2018). Cyclodextrin from cassava (*manihot esculenta crantz*) starch isolation and characterization as bromobenzene and chloroform chlrathrates. *Starch/Starke*, 42(5):196–198.
- Rajput, K. N., Patel, K. C., and Trivedi, U. B. (2016). Beta-cyclodextrin production by cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphile microbacterium terrae knr 9 using different starch substrates. *Biotechnology Research International*, 2016(PMC5015009):2034359.
- Rojas, F. and Sánchez, E. (2013). *Guía ambiental para el cultivo de cacao*. Federación nacional de cacaoteros. Fondo nacional del cacao, segunda edition.

- Saenger, W. (1980). Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 19(5):344–362.
- Schardinger, F. (1903). Über thermophile bakterien aus verschiedenen speisen und milch. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genumittel*, 6(19):865–880.
- Schardinger, F. (1911). Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus starkekleister durch microben. *Zentrebl. Bakteriöl. Parasitenkd.*, 29(29):188–197.
- Schneider, H.-J., Hacket, F., Rudiger, V., and Ikeda, H. (1998). Nmr studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews*, 98(5):1755–1786.
- Sicard, P. J., Saniez, M. H., and Freres, R. (1987). Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of enzymatic reaction products. *D. Duchêne*, pages 77–103.
- Solieri, L. and Giodici, P. (2009). *Vinegars of the world*. Springer Science & Business Media, ilustrada edition.
- Stankovic Slavisa, Pesic Dragan, Beric Tanja, and Simic Draga (2016). Determination of cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic bacillus circulans strain b-65.
- Sundarram, A. and Murthy, T. P. K. (2014). Alpha-amylase production and applications: A review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4):166–175.

- Swinkels, J. J. M. (1985). Composition and properties of commercial native starches. *Starch/Starke*, 37(1):1–5.
- Szejtli, J. (2004). *Chemical and functional properties of food saccharides: 17. cyclodextrins*.
- Szente, L. and Fenyvesi, E. (2018). Cyclodextrin-enabled polymer composites for packaging. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(29954121):1556.
- Szente, L., Szeman, J., and Sohajda, T. (2016). Analytical characterization of cyclodextrins: history, official methods and recommended new techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 130:347–365.
- Tinh, N. T. T., An, N. T., Hoa, H. T. T., and Tuoi, N. T. (2016). A study of wine fermentation from mucilage of cocoa beans (*theobroma cacao* l.). *Dalat University Journal of Science*, 6:387–397.
- Urban, M., Beran, M., Adámek, L., Drahorád, J., Molík, P., and Matušová, K. (2012). Cyclodextrin production from amaranth starch by cyclodextrin glycosyltransferase produced by *paenibacillus macerans* ccm 2012. *Czech Journal of Food Science*, 30(1).
- Villier, M. (1891). Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus*, pages 536–537.
- Zhekova, B., Pishtiyski, I., and Stanchev, V. (2006). Investigation on cyclodextrin production with cyclodextrin glucanotransferase from *bacillus megaterium*. *Food technology biotechnology*, 46(3):328–334.

Apéndices

Apéndice A. Permiso/licencia para uso de de la Figura 2

24/1/2020

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®



Home



Help



Email Support



Maria Mercado ▾

Review: A History of Cyclodextrins

Author: Grégorio Crini

Publication: Chemical Reviews

Publisher: American Chemical Society

Date: Nov 1, 2014

Copyright © 2014, American Chemical Society



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
 - If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
 - Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
 - Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
 - One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.
- If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

