



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

18
ZET

FACULTAD DE QUIMICA

**DISMINUCION DEL SABOR AMARGO EN EL JUGO
DE TORONJA CON CICLODEXTRINAS**



T E S I S

EXAMENES DE TITULO DE MAESTRO
FAC. DE QUIMICA

Que para obtener el Título de:

QUIMICA DE ALIMENTOS

Presenta:

MARIA DE LOURDES INGALLS CRUZ

MEXICO, D. F.

1995.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

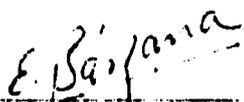
JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: PROF. EDUARDO BARZANA GARCIA
VOCAL: PROF. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA CANALES
SECRETARIO: PROF. RAUL AGUILAR CABALLERO
1er. SUPLENTE: PROF. MARTIN MACOUZET GARCIA
2do. SUPLENTE: PROFA. MA. VICTORIA COUTIÑO COVARRUBIAS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

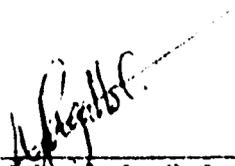
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM, LABORATORIO 314.

ASESOR DEL TEMA:



Dr. Eduardo Barzana Garcia

SUSTENTANTE:



Maria de Lourdes Ingalls Cruz.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Bárzana García por su colaboración y recomendaciones en la elaboración de esta Tesis.

Al M. en C. Alberto Ingalls Cruz por todo su apoyo y ayuda incondicional.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el apoyo financiero otorgado para la elaboración del presente trabajo de tesis, a través del Proyecto IN203391.

INDICE

Introducción	1
Capítulo I. Generalidades	4
1.1 Ciclodextrinas	5
1.1.1 Formas y dimensiones	5
1.1.2 Propiedades de las ciclodextrinas	9
1.1.3 Características de encapsulación de las ciclodextrinas	9
1.1.4 Efectos biológicos de la β -ciclodextrina	12
1.1.5 Aplicaciones de la β -ciclodextrina	15
1.2 Particularidades del jugo de toronja	17
1.2.1 Naringina	17
1.2.2 Limonina	19
1.2.3 Otros métodos para eliminar el sabor amargo en jugo de toronja	20
Capítulo II. Materiales y métodos	23
2.1 Método experimental	24
2.2 Materiales	31
Capítulo III. Resultados y discusión	33
Capítulo IV. Conclusiones y recomendaciones	57
Bibliografía	62

INTRODUCCION

La toronja es considerada como la fruta que se procesa más fácilmente; y que además, su jugo retiene por más tiempo las calidad de su sabor durante el almacenaje que otros jugos cítricos.

Debido a esto, la producción de la toronja se ha incrementado notablemente durante las últimas tres décadas, aumentando su consumo y por consiguiente su procesamiento industrial.

Durante el procesamiento de la toronja su jugo adquiere cantidades apreciables de componentes naturales amargos, entre los que se encuentran principalmente el limonoide denominado limonina y el flavonoide llamado naringina.

Estos componentes amargos son a menudo compuestos necesarios en jugos cítricos para su aceptación. Sin embargo, cuando la intensidad del amargor de los jugos es elevada se requiere de la reducción en estos constituyentes, para que los jugos cítricos sean aceptados por el consumidor.

Entre los métodos más utilizados para reducir los niveles de los componentes amargos se encuentran: el método de hidrólisis enzimática, la reducción por hidrólisis ácida, y la adsorción de la limonina y la naringina con resinas sintéticas.

Sin embargo, el método más reciente es la utilización de "agentes secuestrantes" como son las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son compuestos químicos con una estructura molecular cíclica. Esta estructura es relativamente rígida y presenta una "cavidad".

En presencia de las ciclodextrinas otras moléculas tienden a ser llevadas al interior de sus cavidades. Esto es, las moléculas que tengan el tamaño, la forma y la hidrofobicidad apropiadas, podrán interaccionar con las ciclodextrinas para formar complejos estables.

En tales casos, se obtienen jugos cítricos más aceptables, por la reducción de los niveles de los componentes amargos.

Bajo estas bases, el objetivo de nuestro trabajo, es la determinación de las condiciones adecuadas de: pH, concentración de ciclodextrina, temperatura y agitación para la encapsulación máxima con β -ciclodextrina de los componentes del amargor en el jugo de toronja.

CAPITULO I
GENERALIDADES

1.1 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son dextrinas cíclicas con una estructura circular, relativamente rígida, y que presentan una cavidad. Estas moléculas son producidas enzimáticamente a partir del almidón mediante la acción de una enzima llamada ciclodextrina glucano-transferasa (CGT-asa) [1].

Como una consecuencia del arreglo cíclico, estas moléculas no tienen un grupo final reducido, ni tampoco un grupo final reductor. Además, las ciclodextrinas son más resistentes a la hidrólisis ácida ó alcalina que el almidón y bastante estables en medio acuoso [2].

Existen tres tipos de ciclodextrinas: α , β y γ , que están constituidas de 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente, unidas por puentes glucosídicos. Su fórmula general es $(C_6H_{10}O_5)_n$ (donde n representa el número de unidades de glucosa) y su estructura química se ilustra en la Fig. 1 [3].

1.1.1 Formas y dimensiones.

La forma particular de cada molécula de ciclodextrina requiere un arreglo especial de los diferentes grupos hidróxilos. De tal forma que, los grupos hidróxilos secundarios (de los átomos de C-2 y C-3 de las unidades de glucosa) se localizan en el exterior del anillo mientras que

los hidróxilos primarios (sobre el átomo de C-6 de la unidad de glucosa) están en el interior del anillo. Como consecuencia, la superficie más externa del anillo resulta hidrofílica, en tanto que la naturaleza de la cavidad de las ciclodextrinas es básicamente hidrofóbica [4] (Fig. 2).

Las dimensiones moleculares de las ciclodextrinas α , β y γ se muestran en la siguiente tabla [5].

Dimensiones de la cavidad de las ciclodextrinas.

Dimensiones	α	β	γ
Profundidad (Å)	7.9 (± 0.1)	7.9 (± 0.1)	7.9 (± 0.1)
Diámetro interno (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diámetro externo (Å)	14.6 (± 0.4)	15.4 (± 0.4)	17.5 (± 0.4)
Volumen aproximado de la cavidad (Å ³)	174	262	472
Volumen total de las cavidades por mol de ciclodextrina (mL)	104	157	256
Volumen total de las cavidades por cada grano de ciclodextrina (mL)	0.1	0.14	0.20

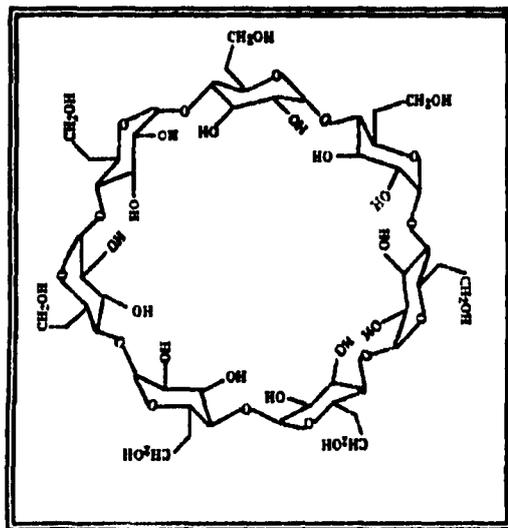


Fig. 1. Estructura química de una ciclodextrina.

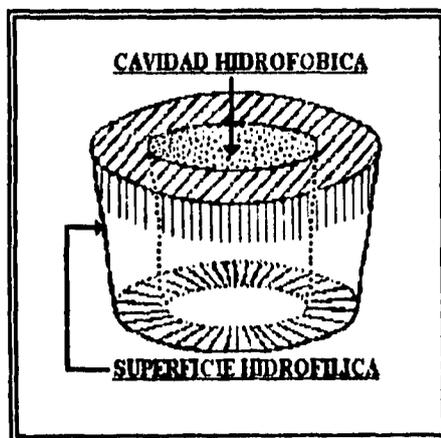


Fig. 2. Esquema de la estructura funcional de ciclodextrinas.

1.1.2 Propiedades de las Ciclodextrinas

En la siguiente tabla, se encuentran las propiedades fisicoquímicas más importantes de las ciclodextrinas.

Propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas.

PROPIEDAD	α	β	γ
Número de unidades de glucosa/molécula	6	7	8
Peso Molecular (gramo/gramo mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25°C (g/100 mL)	14.5	1.85	23.2
Forma de la molécula (en agua)	aguja	aguja	prisma
Hidrólisis con α -amilasa	ninguna	lenta	rápida
pK a 25°C (por potenciometría)	12,331	12,202	2,081
Volumen molar parcial en solución (ml/mol)	611.4	703.8	801.2
Temperatura de fusión (°C)	275	280	275
Tensión superficial (mN/m ²), en HCl 1N a 60°C	71	71	71

1.1.3 Características de Encapsulación de las ciclodextrinas

La propiedad más sobresaliente de las ciclodextrinas es su capacidad de formar complejos moleculares reversibles con sustancias de bajo peso molecular, tales como: ácidos grasos, vitaminas, o compuestos aromáticos. Las uniones que se dan

entre la "molécula huésped" (sustancia a encapsular) y la "molécula anfitrión" (ciclodextrina) se describen como hidrofóbicas con algunos enlaces polares [6].

La proporción de la "molécula huésped" incluida en la ciclodextrina es equimolar en la mayoría de los casos, y los complejos de inclusión que resultan de esta unión (sustancia encapsulada con ciclodextrina) actúan como si fuera una sola molécula; por ello, las propiedades fisicoquímicas de la "molécula huésped" se ven alteradas en relación con la ciclodextrina [7].

En general, las moléculas hidrofóbicas tienen una alta afinidad por la cavidad de las ciclodextrinas debido a que la ciclodextrina proporciona una matriz microheterogénea semejante a la estructura de un disolvente polar. En solución acuosa, la cavidad de la ciclodextrina es ocupada por las moléculas de agua en un estado de unión desfavorable (unión polar/no polar) y son por consiguiente rápidamente substituidas por "moléculas huésped" menos polares que el agua [8,9].

Si existe otro "componente huésped" en solución con mayor capacidad de inclusión que el compuesto deseado, la encapsulación se lleva a cabo con el primero debido a una mayor afinidad polar, y similitud en forma y tamaño [10].

Durante la encapsulación, el grado de formación del complejo de un componente se define por su afinidad con la ciclodextrina y por su concentración relativa. Aunque, este

proceso es sensible a la composición del solvente, al pH y a la temperatura [11].

La formación del complejo por encapsulación (inclusión) procede de acuerdo con las etapas siguientes (Fig. 3) [12]:

1. Aproximación relativa del componente a encapsular a la ciclodextrina.
2. Eliminación de las moléculas de agua de la cavidad de la ciclodextrina.
3. Interacciones ciclodextrina/componente a encapsular.
4. Formación de puentes de hidrógeno entre la ciclodextrina y el componente a encapsular.
5. Reconstitución de la estructura hidratada alrededor del complejo final.

La formación de estos complejos de inclusión son estabilizados por las diversas fuerzas intermoleculares en términos de interacciones hidrofóbicas (enlaces Van der Waals o enlaces London) y puentes de hidrógeno [13].

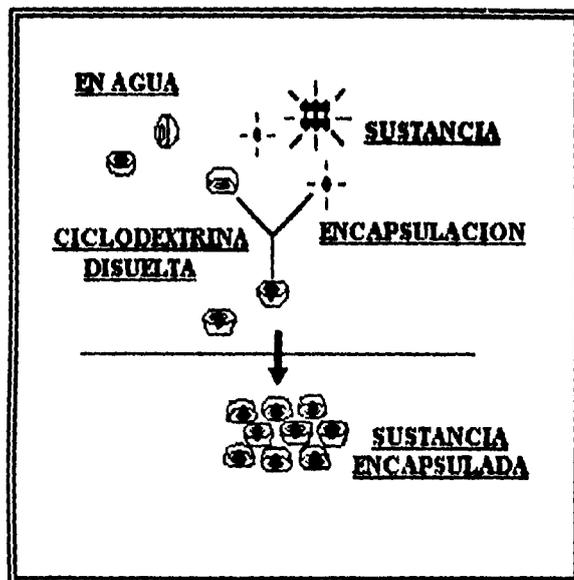


Fig. 3. Proceso de encapsulación de la "molécula huésped" por asociación reversible con una molécula de ciclodextrina.

1.1.4 Efectos Biológicos de la β -ciclodextrina.

La β -ciclodextrina ha sido probada en animales y humanos, durante la administración oral de medicamentos o como aditivo alimenticio. En ambos casos, ésta puede presentarse como ciclodextrina libre ó como el complejo de inclusión que contiene al medicamento, el sabor u otra sustancia huésped. Como la cantidad de la β -ciclodextrina es

pequeña, con la ayuda del jugo gástrico se presenta la rápida disociación del complejo formado; por lo que, la absorción de los componentes que lo forman se realiza por separado. La "molécula huésped" se absorbe rápidamente en el intestino, seguida de una cantidad insignificante de β -ciclodextrina, absorbida en forma intacta [14].

El destino de la β -ciclodextrina después de la administración oral puede ser resumido como sigue:

1. Disolución rápida y establecimiento del equilibrio al momento dinámico asociación/disociación del complejo.
2. Absorción rápida de la "molécula huésped" en el torrente sanguíneo.
3. Absorción de una cantidad insignificante de la β -ciclodextrina en forma intacta por el tracto intestinal.
4. La cantidad de β -ciclodextrina residual es metabolizada en el colon por la microflora.
5. Los metabolitos primarios resultantes de la metabolización en el colon (posiblemente maltodextrinas acíclicas, maltosa y glucosa), son metabolizados y absorbidos en forma similar al almidón para su completa asimilación.

La única toxicidad asociada a las ciclodextrinas parte de la base que algunas ciclodextrinas contienen trazas de los solventes orgánicos utilizados durante su elaboración. La α y γ ciclodextrinas por su alta solubilidad en agua son

separadas y purificadas utilizando solventes orgánicos, mientras que la β -ciclodextrina es muy poco soluble en agua y se utiliza un método físico para su separación y purificación. Por lo tanto, por su estructura química, las ciclodextrinas son totalmente inocuas [15].

La β -ciclodextrina es inocua cuando se administra oralmente, por lo que fue aprobada para su uso en alimentos por el Ministerio Japonés de Salud y Bienestar desde 1976. Esta ciclodextrina se clasifica como aditivo natural de los alimentos, por lo que, no necesita estar indicada en el etiquetado. Posteriormente, en 1983 fue aprobado su empleo en la industria farmacéutica japonesa.

En 1986, el Gobierno Holandés aprobó el uso de la β -ciclodextrina en todo producto alimenticio en el que los almidones modificados estén permitidos. Esta aprobación se basó en los datos metabólicos y toxicológicos provistos por China y Hungría. La aprobación Holandesa fue rápidamente seguida por la de otros países europeos (Tabla 1). En los Estados Unidos se está trabajando en la aprobación por parte de la FDA (Food Drug Administration).

Sin embargo, es importante hacer notar que la aprobación es sólo para la utilización de la β -ciclodextrina, en sus usos humano y animal [16].

Tabla 1. Aprobación del uso alimentario y farmacéutico de las ciclodextrinas en Japón y países comunitarios

PAIS	ALIMENTOS (β -ciclodextrina)	USO FAMACEUTICO
Japón	Permitido su uso como aditivo natural	Permitido
Hungría	Permitido	Permitido
Holanda	Permitido su uso como almidón modificado	No permitido
Bélgica	Permitido su uso como almidón modificado	No permitido
Luxemburgo	Permitido su uso como almidón modificado	No permitido
Francia	Permitido	Permitido
RFA	Permitido su uso como almidón modificado	No permitido
España	Permitido	No permitido
Italia	Permitido	No permitido

1.1.5 Aplicaciones de la β -ciclodextrina.

El uso de la β -ciclodextrina se ha acrecentado en el Japón durante los últimos años porque la encapsulación

molecular ha sido introducida en las industrias que manufacturan formas farmacéuticas, productos alimenticios, artículos de tocador, agroquímicos y otros [17,18].

Así mismo, estudios más extensos han mostrado que la aplicación de las ciclodextrinas en alimentos podrán incluir [19]:

- a) La presentación de un material líquido en forma de un producto sólido.
- b) El enmascarado de un sabor u olor desagradable de algún producto o compuesto.
- c) La estabilización de un compuesto que pudo de otra manera ser sensible a la temperatura, la hidrólisis, la auto-oxidación, la fotodegradación, etc.
- d) El incremento de la solubilidad en medio acuoso de un compuesto de baja solubilidad.
- e) La selección de reacciones específicas (como catálisis) por la encapsulación de grupos funcionales definidos.

1.2 Particularidades del jugo de toronja

La toronja (*Citrus paradisi*) es el más grande de los cítricos comerciales y se reconoce fácilmente por su color amarillo brillante y su sabor característico amargo-ácido. Generalmente, este fruto es más susceptible a la descomposición por efecto de bajas temperaturas en comparación con la naranja. Pero es considerablemente más resistente que las limas y los limones [20].

El jugo de toronja contiene una gran variedad de nutrientes, que dependen de la variedad de toronja, el lugar y la época en que se cultive. Sin embargo, éste ha tenido poca aceptación comercial por su sabor amargo, el cual se debe a la presencia del flavonoide naringina, así como de la limonina (compuesto limonoide).

Esto es aplicable a todos los productos procesados de la toronja: jugos, néctares y concentrados. Este sabor amargo se adquiere en el procesamiento del fruto, a nivel industrial, durante la extracción de su jugo.

1.2.1 Naringina

La naringina (Fig. 4) descubierta en 1857 por De Vry, es uno de los principales componentes amargos presentes en jugos de toronja y es insoluble en agua. Cuando está presente en altas concentraciones produce alteraciones al jugo durante su

procesamiento y/o almacenamiento. Cuando el jugo de toronja se calienta para ser pasteurizado la naringina se disuelve, al enfriarse cristaliza lo cual trae consigo problemas en el proceso [21].

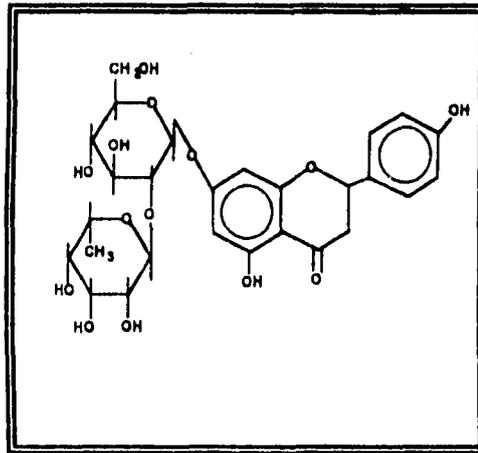


Fig. 4. Estructura química de la naringina.

La naringina se encuentra presente en todo el fruto: en el flavelo o piel exterior, en el albedo o piel interior y en el endocarpio o pulpa (Fig. 5), y, como se mencionó anteriormente, se acumula en el jugo durante el proceso de extracción. Además, se ha encontrado que el fruto verde, contiene una mayor concentración de naringina, y que disminuye cuando el fruto madura [22].

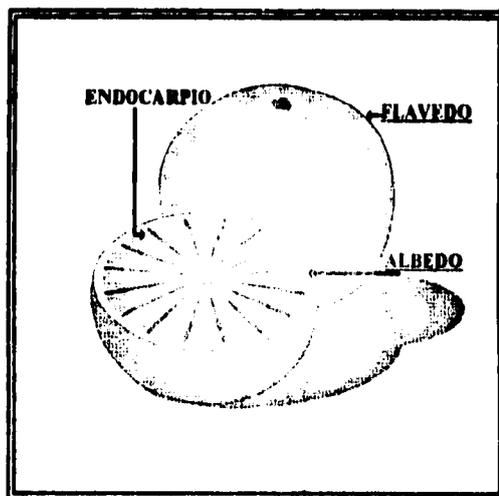


Fig. 5. Partes principales de la toronja.

1.2.2 Limonina

La limonina (Fig. 6) reduce la calidad y la aceptación de los jugos de frutos cítricos (naranjas y toronjas) por su intenso sabor amargo [23,24].

Las frutas intactas no la contienen como tal, pero sí el anillo A lactónico del ácido limonónico, un precursor no amargo, que se convierte gradualmente en limonina por la acción combinada de los ácidos del jugo y una enzima (anillo D lactosa hidrolasa) durante la maceración del fruto o extracción de su jugo. Por esta razón, el sabor amargo que imparte a los jugos se denomina comúnmente "amargor tardío" [25,26].

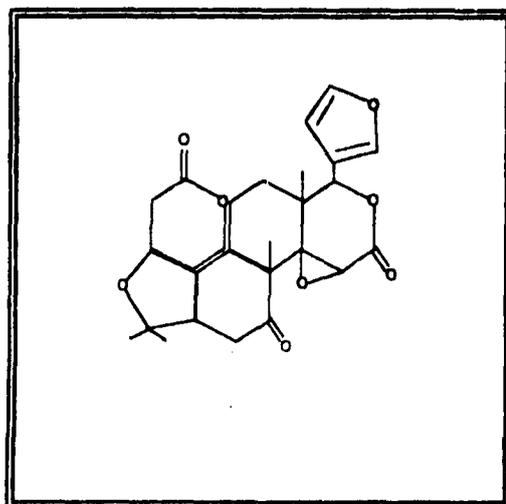


Fig. 6. Estructura química de la limonina.

1.2.3 Otros métodos para eliminar el sabor amargo en jugos de toronja.

Entre los métodos más utilizados para eliminar el amargor en el jugo de toronja, se tienen los siguientes:

- Hidrólisis ácida de la naringina en el jugo.
- Lavado de toronja con agua caliente previo a la extracción.
- Adsorción de la naringina con resinas sintéticas.
- Hidrólisis enzimática de la naringina.

De las técnicas mencionadas, la hidrólisis enzimática de la naringina es la más atractiva, ya que requiere equipo de uso común y un mínimo de operaciones, la especificidad de la enzima sobre la naringina permite obtener un jugo con propiedades organolépticas, funcionales y nutricionales aceptables [27].

Una de las técnicas más atractivas que se ha propuesto es la hidrólisis de la naringinasa y atrapamiento de la limonina simultáneamente. La técnica consiste en inmovilizar naringinasa en fibras de triacetato de celulosa lo cual permite hidrolizar el flavonoide, al mismo tiempo, la limonina queda adsorbida en las fibras del polímero. Con esta metodología se comprobó que la actividad de la enzima y la consistencia de las fibras de triacetato de celulosa fueron estables hasta por 20 días. Las propiedades organolépticas y funcionales del jugo obtenido no se alteraron, lo que hace el procedimiento bastante atractivo para aplicarse industrialmente si se toma en cuenta el ahorro en el costo de la producción y purificación de la naringinasa [28].

Otra de las técnicas probadas para la eliminación del sabor amargo en los jugos cítricos de toronja, es el uso de resinas sintéticas; se ha empleado intercambio iónico para retener la naringina y la hesperidina. Sin embargo, estas técnicas son poco atractivas debido a la alteración de las características organolépticas del jugo resultante [29].

Finalmente, la disminución del sabor amargo en jugo de toronja, encapsulando naringina y limonina con ciclodextrinas resulta un método rápido ya que simultáneamente se elimina la presencia "activa" de los 2 principales componentes que imparten el amargor. Bajo ciertas condiciones de reacción se logra una disminución de más del 50% de la concentración de naringina y limonina; además, las características organolépticas del jugo resultante son aceptables por el consumidor. Sin embargo, por la toxicidad de las α y γ ciclodextrinas se limita sólo a utilizar la β -ciclodextrina en el proceso de alimentos.

CAPITULO II
MATERIALES Y METODOS

2.1. Método Experimental.

El trabajo consistió en evaluar la influencia de: la concentración de β -ciclodextrina, la temperatura, el pH y la agitación, durante la encapsulación de la naringina y la limonina con β -ciclodextrina, en el jugo de toronja. Para ello, la metodología experimental se dividió en 3 etapas descritas a continuación (la primera únicamente se refiere a la naringina, la segunda a la limonina y la tercera etapa a la confirmación de los resultados mediante el análisis sensorial).

ETAPA 1. Determinación de los parámetros de encapsulación de naringina con β -ciclodextrina.

Se utilizó un jugo comercial de toronja (concentrado) "marca Florida 7", el cual fue reconstituido hasta 11 °Brix.

La concentración de la naringina en este jugo de toronja es de 4000-4200 μM (dato experimental).

Para la cuantificación de naringina se utilizó un método enzimático colorimétrico. Este método está basado en la reacción de acoplamiento de un radical catiónico ABTS con el producto de oxidación de la naringina mediante la enzima peroxidasa y el peróxido de hidrógeno, resultando un compuesto de color púrpura que es estable a un pH de 4.3, con un máximo de absorbancia a 560 nm. Esta reacción se llevó a

2.1. Método Experimental.

El trabajo consistió en evaluar la influencia de: la concentración de β -ciclodextrina, la temperatura, el pH y la agitación, durante la encapsulación de la naringina y la limonina con β -ciclodextrina, en el jugo de toronja. Para ello, la metodología experimental se dividió en 3 etapas descritas a continuación (la primera únicamente se refiere a la naringina, la segunda a la limonina y la tercera etapa a la confirmación de los resultados mediante el análisis sensorial).

ETAPA 1. Determinación de los parámetros de encapsulación de naringina con β -ciclodextrina.

Se utilizó un jugo comercial de toronja (concentrado) "marca Florida 7", el cual fue reconstituido hasta 11 °Brix.

La concentración de la naringina en este jugo de toronja es de 4000-4200 μ M (dato experimental).

Para la cuantificación de naringina se utilizó un método enzimático colorimétrico. Este método está basado en la reacción de acoplamiento de un radical catiónico ABTS con el producto de oxidación de la naringina mediante la enzima peroxidasa y el peróxido de hidrógeno, resultando un compuesto de color púrpura que es estable a un pH de 4.3, con un máximo de absorbancia a 560 nm. Esta reacción se llevó a

cabo a 25°C durante 30 minutos y, se detiene con la adición de azida de sodio [30].

Debido a que la cuantificación de la naringina recurre a una determinación espectrofotométrica, el jugo de toronja fue inicialmente clarificado mediante los siguientes pasos [31]:

- 1) Precipitación de las pectinas con etanol durante 2 horas en ausencia de luz, con una relación jugo-etanol de 1:10.
- 2) Centrifugación durante 10 minutos a 9000 r.p.m.
- 3) Filtración del sobrenadante.

Se construyó una curva estándar a partir del compuesto puro.

Para determinar la influencia de la temperatura sobre la encapsulación se usaron las siguientes temperaturas: 10, 15, 20, 30 y 50 °C y los siguientes tiempos: 3, 6, 18, 20 y 24 horas. En esta parte se utilizó una solución estándar de naringina a un pH de 3.5. En cada determinación se adicionó β -ciclodextrina y se agitó a 120 r.p.m. durante 24 horas. La concentración de naringina y de β -ciclodextrina en la solución analizada fue de 500 μ M y 44.5 μ M, respectivamente.

Para determinar la estabilidad de la naringina a diferentes pHs, se utilizó una solución estándar de naringina (4200 μ M), y se mantuvo a temperatura ambiente

(aproximadamente 25°C) durante una hora a los siguientes valores: 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5.

Para la determinación de la agitación óptima de encapsulación se preparó una solución estándar de naringina (4200 μM) a un pH de 3.5. A cada muestra se le adicionó β -ciclodextrina, la concentración de la ciclodextrina en la solución analizada era de 44.05 μM , y se dejó reaccionar a 25 °C por 24 horas y se agitó en un rango de 0 a 160 r.p.m.

La cantidad de β -ciclodextrina es un parámetro importante para encapsular naringina. Por lo que, se determinó la encapsulación a diferentes concentraciones de β -ciclodextrina. Para esto, a una solución estándar de naringina (4000 μM) con un pH de 3.5 se le adicionó la β -ciclodextrina y cada determinación se dejó reaccionar durante 24 horas, a 110 r.p.m. y 25 °C. Esta determinación también se llevó a cabo en el jugo de toronja, con las mismas condiciones de reacción que la solución estándar.

Sabiendo que la encapsulación mejora con la temperatura, se llevó a cabo la reacción con jugo reconstituido a las siguientes condiciones: 92 °C (temperatura de ebullición), 110 r.p.m. y 4.4 mM de β -ciclodextrina durante 10 minutos [32].

Esta determinación se llevó a cabo tanto en la solución estándar de naringina como en el jugo de toronja.

La concentración de la solución estándar de naringina fue de 4100 μM con un pH de 3.5.

ETAPA 2. Determinación de los parámetros de encapsulación de limonina con β -ciclodextrina.

Se utilizó un jugo de toronja (concentrado) marca "Florida 7" reconstituido hasta 11 °Brix. La cuantificación se llevó a cabo por el método de cromatografía de gases, por lo que fue necesario aislar y concentrar la limonina presente en el jugo. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos [33]:

- 1) Se pesaron 25 gramos de jugo reconstituido y se le adicionaron 3 gramos de sulfato de magnesio. Esta solución fue extraída 3 veces con 10 mL de cloroformo, en cada ocasión, y cada porción de cloroformo fue centrifugada por 5 minutos.
- 2) La fase de cloroformo fue transferida a un matraz kitasato, y el cloroformo fue evaporado en el vacío, a temperatura ambiente.
- 3) El cloroformo residual fue lavado en un embudo de separación una sola vez con 10 mL de hexano y de 2 veces con 10 mL de acetonitrilo.
- 4) La fase de acetonitrilo fue evaporada a sequedad entre 40-45°C. El matraz fue enfriado y se le adicionaron (cuantitativamente) 250 μ L de acetonitrilo.

Los resultados se compararon contra una curva patrón obtenida a partir de la limonina pura.

A una solución estándar de limonina con un pH de 3.5 se le adicionó β -ciclodextrina, la encapsulación se llevó a cabo durante 24 horas, a 110 r.p.m. y 25 °C.

Las concentraciones de la limonina y de la β -ciclodextrina en la solución analizada fueron de 5 ppm y 44.05 μ M, respectivamente.

Estas mismas concentraciones de limonina y de β -ciclodextrina fueron utilizadas para determinar la agitación óptima de encapsulación de limonina. El pH de la solución estándar de limonina era de 3.5, se le adicionó ciclodextrina y se dejó reaccionar durante 24 horas, a 25°C.

La encapsulación de la limonina con β -ciclodextrina, al igual que la encapsulación de naringina, se llevó a cabo a 92 °C (temperatura de ebullición), durante 10 minutos, 110 r.p.m. y 4.4 mM de β -ciclodextrina.

Esta determinación se realizó sólo en el jugo de toronja.

ETAPA 3. Análisis sensorial

Para la prueba de análisis sensorial, se utilizó el método de Comparación por Pares, el cual consiste en lo siguiente [34]:

- 1) Se determina si existe diferencia perceptible entre dos o más muestras. Esta diferencia se obtiene comparando dos muestras (un par) entre sí.
- 2) El procedimiento de comparación se efectúa dentro de cada par considerando un parámetro en especial. Las muestras se presentan en forma de 6 series de pares, cuidando que sólo se distinga entre sí por la variable en estudio, en este caso, la disminución del sabor amargo en el jugo de toronja.
- 3) Para que la prueba tenga validez estadística, se efectuaron tres repeticiones por juez. Los jueces seleccionados, fueron personas que conocen la prueba.

Condiciones experimentales del análisis sensorial.

Al jugo de toronja ya constituido se le adicionó 4.4 mM de β -ciclodextrina, y se mantuvo a 92 °C (temperatura de ebullición) durante 10 minutos con agitación constante de aproximadamente 110 r.p.m. Este jugo fue comparado con otro

jugo igualmente reconstituido, con el mismo tratamiento térmico y la misma agitación pero al cual no se le adicionó β -ciclodextrina.

2.2.2 Materiales

Reactivos

Etapa 1

- 1.- Estándar de naringina. (Aldrich.)
- 2.- Buffer de glicina- HCl 50 mM, pH 4.3.
- 3.- ABTS (ácido 2 azido-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), 3 mM.
- 4.- Peróxido de hidrógeno, 15 mM.
- 5.- Peroxidasa (enzima de rábano -E.C.1.11.1.7-), 0.02 mM.
- 6.- Azida de sodio 5 M.
- 7.- Alcohol etílico.

Etapa 2

- 1.- Estándar de limonina. (Sigma Chemical Co.)
- 2.- Sulfato de magnesio.
- 3.- Cloroformo.
- 4.- Hexano.
- 6.- Acetonitrilo.

Equipo

- 1.- Espectrofotómetro Beckman DU-65.
- 2.- Centrifuga Janetzki K24.
- 3.- Incubadora Innova 4330.
- 4.- Cromatógrafo de Gases. Modelo HP 5890, Serie II.
Detector de ionización de flama.
Columna Ultra 1 Crosslinked Methyl silicone Gum
(Hewlett-Packard).

Condiciones de trabajo en el cromatografo:

- Temperatura del inyector: 200°C.
- Temperatura del detector: 200°C.
- Temperatura del horno: 70°C.
- Flujo de nitrógeno: 1 mL/min.
- Split: 60 mL/min.

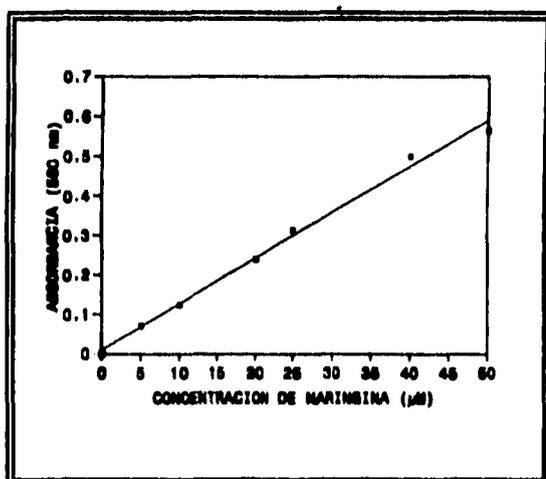
FALTA PAGINA

No 32a la.....

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSION

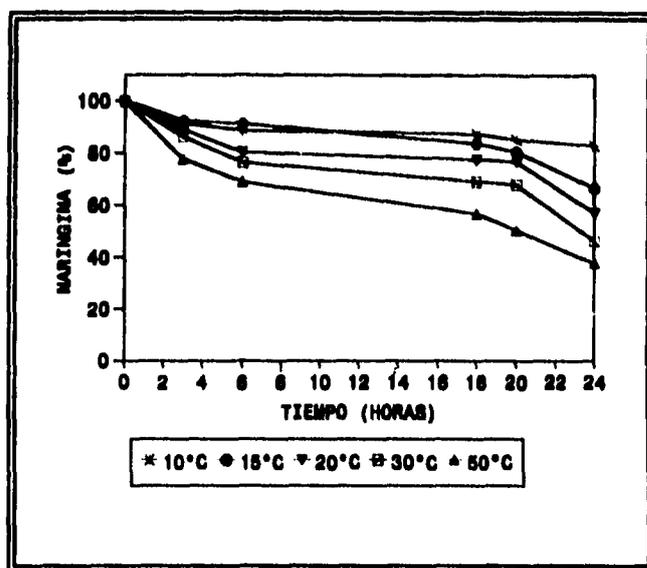
ETAPA 1. Determinación de los parámetros para la encapsulación de naringina con β -ciclodextrina.

La **gráfica 1** representa la curva patrón de naringina, la cual se determinó experimentalmente por el método espectrofotométrico, y es la referencia para la cuantificación de la naringina durante la experimentación de esta etapa.



Gráfica 1. Curva patrón de naringina, obtenida experimentalmente por espectrofotometría.

En la **gráfica 2** muestra la encapsulación de naringina con β -ciclodextrina a diferentes temperaturas, observándose que a mayor temperatura hay una reducción en la naringina residual. Se observa que la encapsulación es rápida durante las primeras tres horas seguido de un proceso más lento hasta aproximadamente 18 horas de reacción. Posteriormente se observa una disminución rápida de la concentración de naringina. Esto permite suponer que después de 20 horas y a una temperatura mayor de 10°C, la naringina se descompone. Para verificar esto se diseño el siguiente experimento: Una solución estándar de naringina, que no contenía β -ciclodextrina, se mantuvo a una temperatura de 25°C durante 24 horas y se observó que durante las 18 horas iniciales la naringina permaneció estable seguido de una disminución de aproximadamente un 12% de la concentración de naringina inicial. Esto corrobora la suposición de pérdida en naringina por descomposición.



Gráfica 2. Encapsulación de naringina (solución estándar 500 μM) con 45.05 μM de β -ciclodextrina a diferentes temperaturas.

Se determinó la funcionalidad de la temperatura en la reacción de encapsulación de la naringina con β -ciclodextrina.

Debido a que la concentración de naringina disminuye exponencialmente con el tiempo a una velocidad determinada como se observa en la gráfica 2, la velocidad de la encapsulación de naringina con β -ciclodextrina se representa mediante la siguiente ecuación:

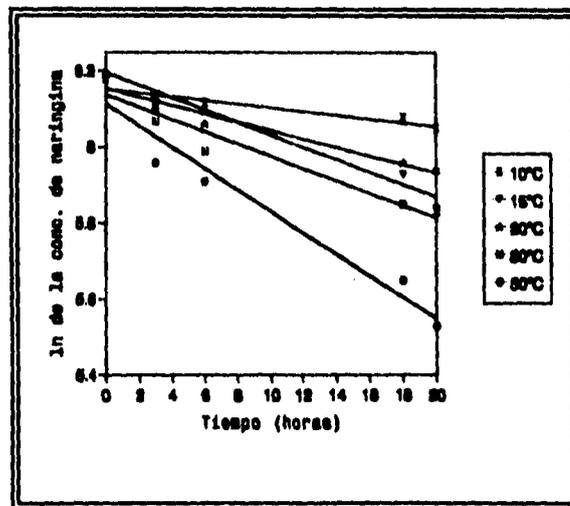
$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (1)$$

donde N representa la concentración de naringina en μM ,
 t el tiempo, y
 k la constante de velocidad de reacción.

La forma integrada de la ecuación representa una línea
 recta de pendiente $-k$ y ordenada al origen igual a $\ln(N_0)$:

$$\ln(N) = -kt + \ln(N_0) \quad (2)$$

Graficando para cada reacción de encapsulación a
 diferentes temperaturas, se obtiene la **gráfica 3**.



Gráfica 3. Representación gráfica del logaritmo natural de la concentración de naringina en función del tiempo.

A partir de esta gráfica se observa que la constante de velocidad, k , depende de la temperatura, definiendo k mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = Ae^{-\frac{E}{RT}} \quad (3)$$

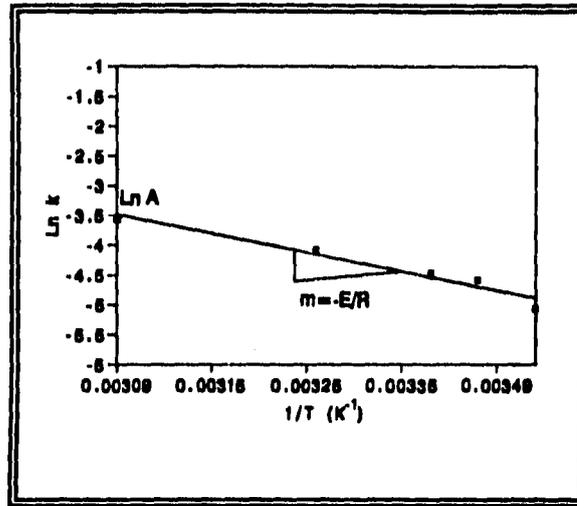
Aplicando el logaritmo natural a la ecuación (3) se obtiene una línea recta de pendiente $-E/R$ y ordenada al origen $\ln(A)$:

$$\ln(k) = -\frac{E}{RT} + \ln(A) \quad (4)$$

Graficando las constantes de velocidad (obtenidas de la gráfica 3) contra el inverso de cada una de las temperatura se obtiene la **gráfica 4**. A partir de esta última gráfica se obtiene el valor de las constantes A y $-E/R$ de la ecuación (3). Estos valores permiten predecir la velocidad de reacción para encapsular naringina con β -ciclodextrina a una determinada temperatura:

$$k = (60184)e^{-\frac{6353.10}{RT}} \quad (5)$$

donde el valor de la energía E está dado en calorías/g-mol



Gráfica 4. Representación gráfica del $\ln(k)$ en función del inverso multiplicativo de la temperatura.

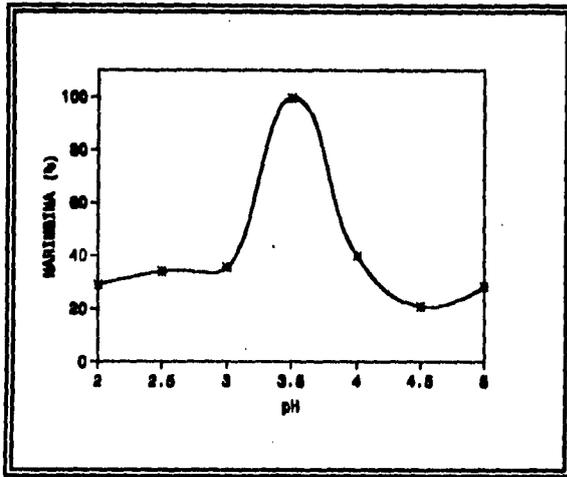
Comparando este valor de energía con el de otras reacciones llevadas a cabo en alimentos (Tabla 2) [35], resulta equiparable a aquellas reacciones en la que se utiliza un catalizador enzimático.

Tabla 2. Valor de energía (E) para algunas reacciones en alimentos.

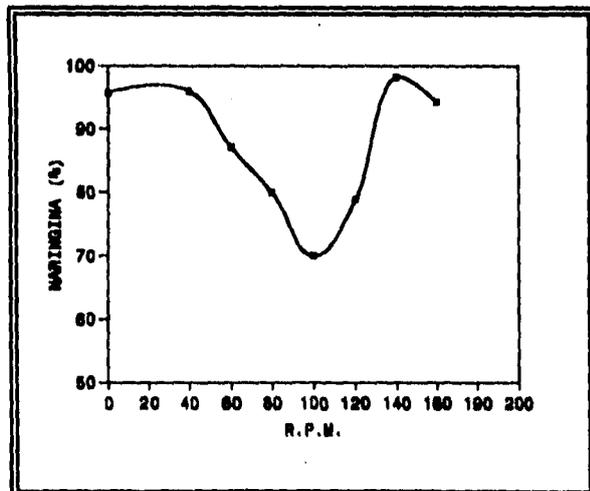
Reacción	Enzima	E (cal/g-mol) catalizador químico	E (cal/g-mol) Catalizador enzimático
Descomposición del peróxido	Catalasa	18,000	5,000
Hidrólisis de la sacarosa	Fructosidasa	26,000	11,000
Hidrólisis de la caseína	Tripsina	20,600	12,000
Hidrólisis de lípidos	Lipasa	13,200	4,200

En la determinación de la estabilidad de la naringina a diferentes pH's (gráfica 5), se observa que a pH's menores y mayores de 3.5 la naringina es poco estable. A pH de 3.5 prácticamente se conserva el 100% de naringina. Debemos señalar que, el pH natural del jugo de toronja es 3.5.

La gráfica 6 nos muestra la encapsulación de naringina con β -ciclodextrina a diferentes velocidades de agitación. En ésta se observa que abajo de 40 r.p.m. no se favorece la reacción de encapsulación. Conforme la agitación se incrementa la reacción de encapsulación mejora hasta aproximadamente 100 r.p.m. Cuando la agitación es mayor de 100 r.p.m. se observa que la encapsulación disminuye, y que a 140-160 r.p.m. es prácticamente despreciable.



Gráfica 5. Estabilidad de la naringina (solución estándar 4200 µM) a diferentes pH's, después de una hora de incubación a 25 °C



Gráfica 6. Encapsulación de naringina (solución estándar 4200 µM) con 44.05 µM de β-ciclodextina diferentes niveles de agitación durante 24 horas a una temperatura de 25 °C.

Se estableció que una agitación violenta (mayor de 100 r.p.m.) reduce la encapsulación de naringina debido a que se modifica o altera la estructura básica de la β -ciclodextrina, esto impide llevar a cabo la formación del complejo con la naringina. Para corroborar esta hipótesis se realizó el siguiente experimento:

Una solución de β -ciclodextrina se agitó a 170 r.p.m., durante 24 horas a 25°C. Esta β -ciclodextrina agitada fue mezclada con una solución conocida de naringina y se dejó reaccionar durante 24 horas, a 25 °C y 100 r.p.m. Como resultado de esto se observó que la β -ciclodextrina sólo encapsuló de un 2-4 % de naringina.

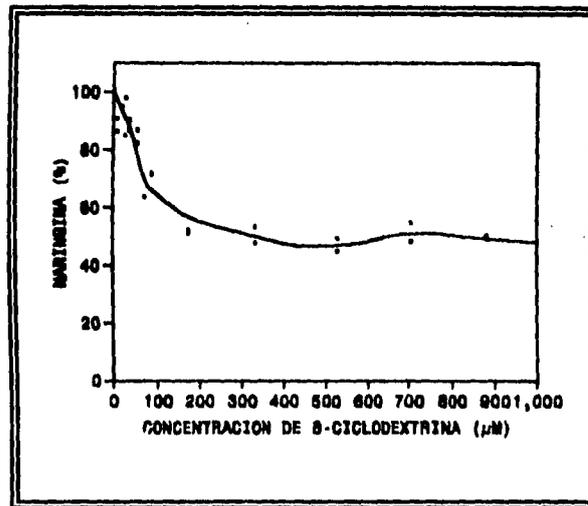
Con esto, podemos establecer que altas agitaciones superiores a 100 r.p.m. se reduce la capacidad de encapsulación de la β -ciclodextrina.

Se determinó la concentración óptima de β -ciclodextrina para una adecuada encapsulación (**gráfica 7**). Se puede observar que la encapsulación mejora al aumentar la concentración de β -ciclodextrina. Sin embargo, valores mayores de 200 μ M de β -ciclodextrina sólo causan una pequeña disminución de naringina.

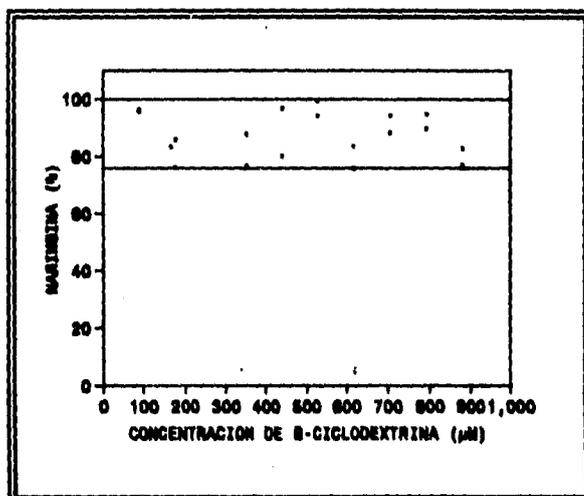
También en esta gráfica se observa que se necesita sólo una concentración de 200 μ M de β -ciclodextrina para poder encapsular aproximadamente 50% de naringina.

Al llevar a cabo este mismo experimento pero ahora en el jugo de toronja no se observó la encapsulación de naringina, **gráfica 8**. Esto sugiere que la presencia de los otros

componentes del jugo de toronja influyen en el proceso de encapsulación.

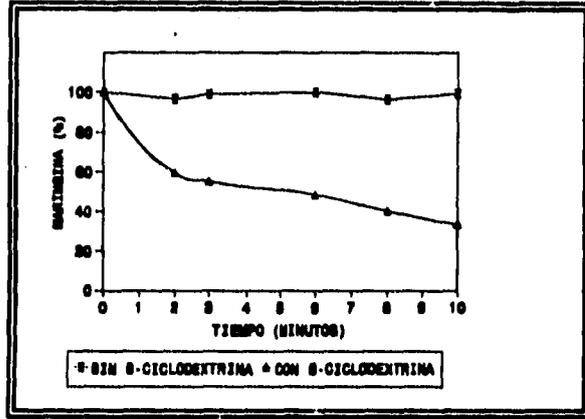


Gráfica 7. Determinación de la concentración óptima de β-ciclodextrina para encapsular naringina. Reacción llevada a cabo en la solución estándar (4000 μM) durante 24 horas, a 110 r.p.m. y 25 °C.

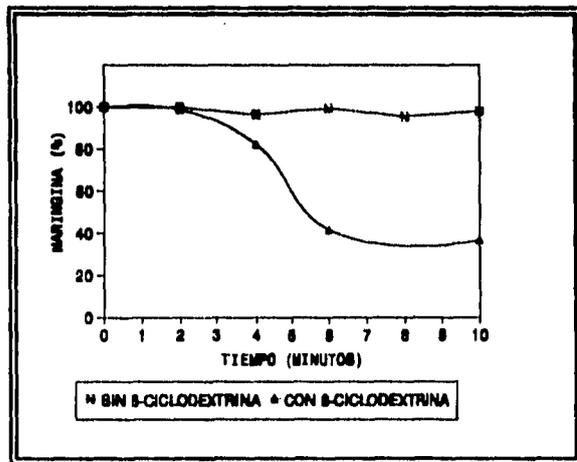


Gráfica 8. Determinación de la concentración óptima de β-ciclodextrina para encapsular naringina. Reacción llevada a cabo en jugo de toronja durante 24 horas, a 110 r.p.m. y 25°C.

Los resultados de la encapsulación de naringina con β-ciclodextrina a la mayor temperatura posible se muestran en las **gráficas 9 y 10**, observándose que tanto en la solución estándar de naringina como en el jugo de toronja se logra encapsular un 60% de naringina. Además se puede observar que, la reacción es más rápida en la solución estándar que en el jugo de toronja. En éste último, la reducción de naringina comienza después de 2 minutos de contacto; esto se supone, por presencia de los otros componentes del jugo.



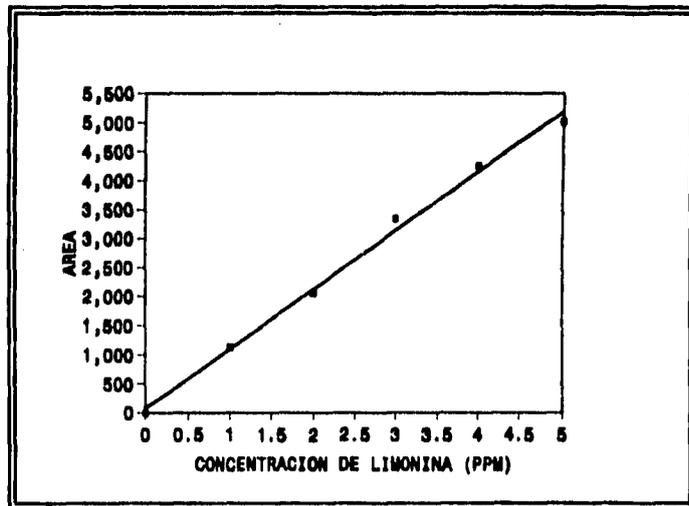
Gráfica 9. Encapsulación de naringina (solución estándar) con β -ciclodextrina. Condiciones de reacción: 92 °C, 110 r.p.m. y una concentración de 4.4 mM de β -ciclodextrina durante 10 minutos.



Gráfica 10. Encapsulación de naringina (en el jugo de toronja) con β -ciclodextrina. Condiciones de reacción: 92 °C, 110 r.p.m. y una concentración de 4.4 mM de β -ciclodextrina durante 10 minutos.

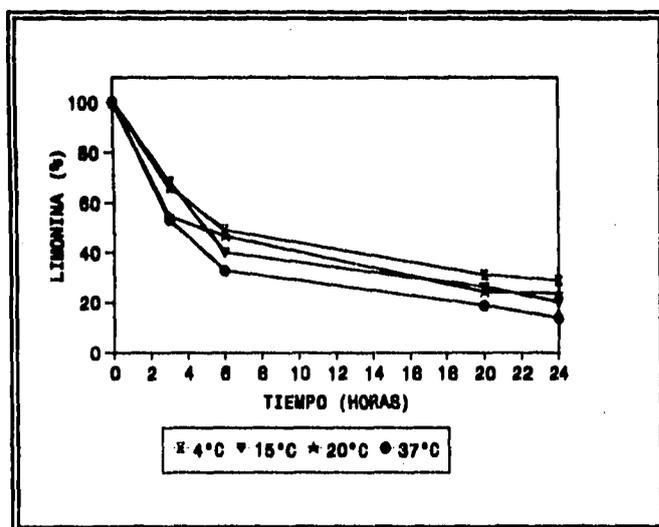
ETAPA 2. Determinación de los parámetros de la encapsulación de limonina con β -ciclodextrina.

La curva patrón de limonina, determinada en cromatografía de gases se presenta en la **gráfica 11**.



Gráfica 11. Curva patrón de limonina obtenida experimentalmente, mediante cromatografía de gases.

La encapsulación de limonina con β -ciclodextrina a diferentes temperaturas se representa en la **gráfica 12**. Se observa que a mayor temperatura mejora la encapsulación de la limonina. A diferencia de la naringina, la limonina no presenta ninguna descomposición con el tiempo (después de 18 horas). Además, se observa que el porcentaje de encapsulación de la limonina es mayor que el correspondiente a la naringina, aún con menores temperaturas.

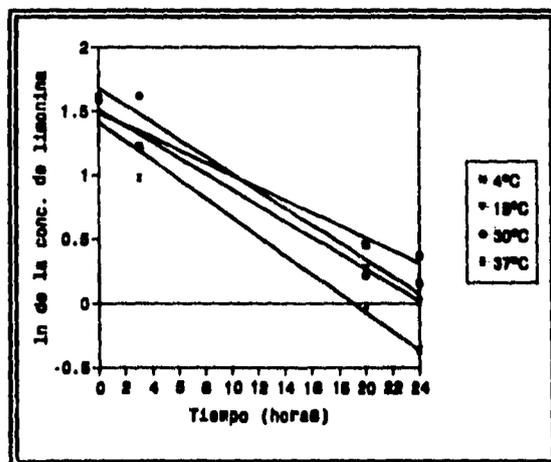


Gráfica 12. Encapsulación de limonina (solución estándar 5 ppm) con 44.05 μ M β -ciclodextrina a diferentes temperaturas las condiciones de reacción fueron 24 horas, 110 r.p.m. y 25°C.

Realizando el mismo análisis que para la naringina se obtiene las **gráficas 13 y 14**, con las cuales podemos predecir la constante de reacción para la encapsulación de limonina con β -ciclodextrina a una determinada temperatura. La ecuación resultante es la siguiente:

$$k = (1.89)e^{\frac{-2007.04}{RT}} \quad (6)$$

Observándose que, es menor el valor energía de activación de la encapsulación de la limonina con β -ciclodextrina que con naringina.



Gráfica 13. Representación gráfica del logaritmo natural de la concentración de limonina en función del tiempo.

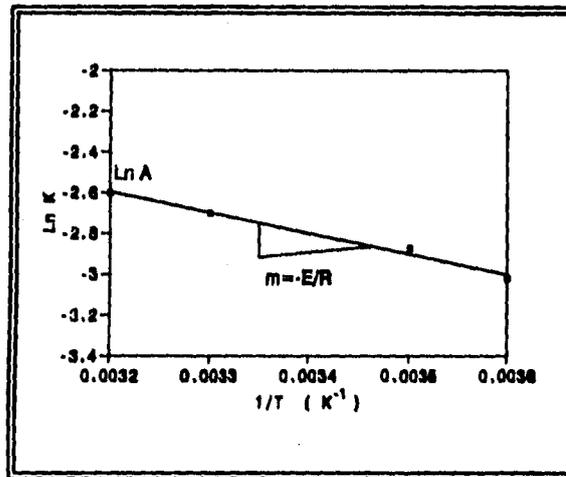
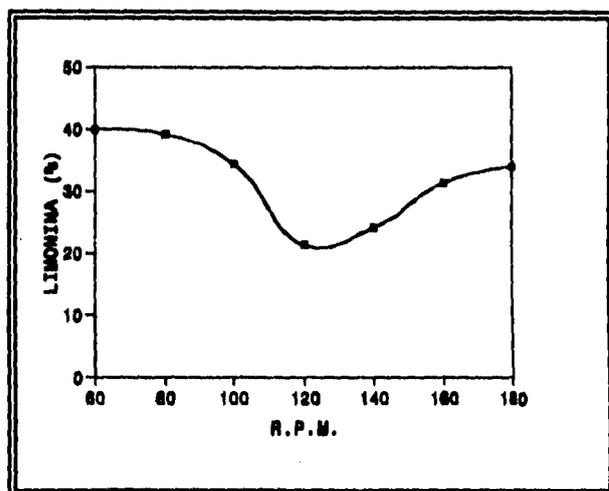


Figura 14. Representación gráfica de el ln(k) en función del inverso multiplicativo de la temperatura.

Como la naringina sólo es estable al pH del jugo, esto es a 3.5 de pH, se trabajó a la limonina a este mismo pH.

En la determinación de la agitación óptima para la encapsulación de limonina con β -ciclodextrina (gráfica 15), se obtiene la mejor reacción de encapsulación a 120 r.p.m. A esta condición la β -ciclodextrina encapsula aproximadamente el 80% de limonina. Con agitaciones mayores, al igual que con la naringina, no se favorece la formación del complejo.

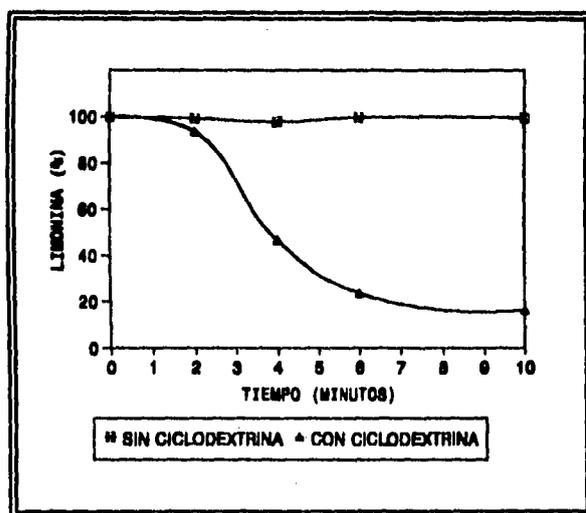


Gráfica 15. Encapsulación de limonina (solución estándar de 5 ppm) con 44.05 μ M de β -ciclodextrina a diferentes niveles de agitación. Las condiciones de reacción fueron: 24 horas a 25 °C.

Es importante hacer notar que la concentración de la naringina es de 1000 veces mayor que la concentración de la limonina en el jugo de toronja. Por ello, la concentración de β -ciclodextrina que se debe adicionar para una apropiada encapsulación de estos "componentes amargos", está determinada por el contenido de la naringina.

En la gráfica 16, podemos observar la encapsulación de limonina contenida en el jugo de toronja con β -ciclodextrina a las siguientes condiciones de reacción: 92°C, 110 r.p.m. y

una concentración de 4.4 mM de β -ciclodextrina durante 10 minutos. En esta gráfica se observa una disminución de un 80% del contenido inicial de limonina después de 6 minutos.



Gráfica 16. Encapsulación de limonina (en el jugo de toronja) con β -ciclodextrina. Condiciones de reacción: 92 °C, 110 r.p.m. y una concentración de 4.4 mM de β -ciclodextrina durante 10 minutos.

ETAPA 3. Análisis Sensorial.

El análisis sensorial se llevó a cabo con 15 jueces y cada uno probó 3 pares de muestras. Para que la prueba por juez se considere válida, el juez debió percibir o no el cambio en el amargor del jugo de toronja; esto es, cada juez debió contestar como mínimo 2 de 3 posibles respuestas con el mismo "valor" (disminuyó el amargor del jugo ó no disminuyó el amargor del jugo)

En la Tabla 3 podemos observar que de 15 jueces, 13 percibieron la disminución del sabor amargo del jugo de toronja, cuando contiene β -ciclodextrina. Esto equivale a un 80%; es decir, 8 de cada 10 personas lograron percibir la disminución del amargor en el jugo de toronja.

Además, prácticamente el 100% de los jueces, indicó que les agradaba el sabor del jugo de toronja con menos amargor y que la presencia de la β -ciclodextrina no alteraba la apariencia ni el sabor del jugo.

Tabla 3. Resultados de la prueba sensorial por el Método de Comparación por Pares.

Juez (número)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1	No	No	No
2	Si	Si	Si
3	Si	No	No
4	No	No	Si
5	Si	Si	No
6	Si	Si	No
7	Si	No	Si
8	Si	No	Si
9	Si	No	Si
10	Si	No	Si
11	Si	Si	Si
12	Si	Si	Si
13	Si	Si	Si
14	Si	Si	Si
15	Si	No	Si

Donde: Si significa que si percibió el cambio del amargor en el jugo, y

No significa que no percibió el cambio.

Método Estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos en la prueba sensorial, se utilizó el método estadístico de Ji-cuadrada (λ^2) [36].

Como para el análisis sensorial se utilizó el método de Comparación por Pares, en el que para el par de muestras se debía percibir o no un cambio en el amargor del jugo de toronja. La probabilidad de que uno u otra posibilidad sucediera era de un 50%.

Para que la prueba fuera válida se esperaba que el número de jueces que lograron percibir una disminución en el sabor amargo del jugo fuera mayor de un 50%. Para establecer que tan grande debe ser ese valor, se determina un valor crítico denominado c .

La hipótesis quedaría planteada de la siguiente manera:

$$\text{Hipótesis: } \lambda^2 \geq c$$

Aplicando el método estadístico de Ji-cuadrada:

1^{er} Paso. Representar los dos eventos posibles.

X= Si (disminuyó el amargor en el jugo), y

X= No (No disminuyó el amargor en el jugo)

Para $K=2$ intervalos, cada uno de los cuales contiene una de estas posibilidades, se determina el número b_j (donde b es el valor numérico obtenido de los dos posibles eventos y $j=1,2,3,\dots,K$).

Entonces para nuestra prueba $b_1=12$ jueces que Si percibieron la disminución del amargor y $b_2=3$ jueces que No percibieron la disminución del amargor en el jugo.

2° Paso. Se calcula la probabilidad p_j de que la variable aleatoria X que se considera tome cualquier valor en el intervalo. Se calcula

$$e_j = np_j$$

Para nuestro experimento la posibilidad de que ocurra cualquier evento es de 50% (0.5), obteniéndose

$$e_1 = 12(0.5) = 6 \quad \text{y} \quad e_2 = 3(0.5) = 1.5$$

3er Paso. Se calcula la desviación

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^K \frac{(b_j - e_j)^2}{e_j}$$

$$\chi^2 = \frac{(12-6)^2}{6} + \frac{(15-3)^2}{3} = 6.75$$

4° Paso. Escogemos el nivel de significancia $\alpha=5\%$

5° Paso. Se determina la solución de la ecuación

$$P(\chi^2 \geq c) = 1 - \alpha = 0.95$$

Para $K-1=1$ grado de libertad, $c=3.84$ (valor obtenido de las tablas de distribución de ji-cuadrada) [37]. Por lo tanto,

$$6.75 \geq 3.84$$

Por lo que, no se rechaza la hipótesis; es decir, sensorialmente se logró percibir una disminución del amargor en el jugo de toronja, con una confiabilidad de un 95%.

**CAPITULO IV
CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES**

CONCLUSIONES

1. La adición de β -ciclodextrina reduce la "presencia activa" de la naringina y de la limonina, obteniéndose menores concentraciones de estos componentes en el jugo de toronja.
2. Con un nivel de significancia del 5% se corroboró sensorialmente que existe la disminución del sabor amargo en el jugo de toronja.
3. La eficiencia de la encapsulación de la naringina y la limonina dependen, no sólo de la concentración de la β -ciclodextrina, sino de la presencia de los otros componentes del jugo de toronja.
4. Las constantes cinéticas de encapsulación según el modelo de Arrhenius contienen los siguientes parámetros:
 - > $k = (601.84)e^{\frac{-6353.10}{RT}}$ (para la naringina)
 - > $k = (1.89)e^{\frac{-2007.04}{RT}}$ (para la limonina)
5. Las energías de activación (E^*) obtenidas en las reacciones de encapsulación de naringina y limonina con β -ciclodextrina, son equivalentes a las energías de

activación de reacciones que son catalizadas con enzimas en alimentos.

6. Agitaciones elevadas (mayores de 120 r.p.m.) pueden afectar la estructura de la β -ciclodextrina y por lo tanto disminuir su capacidad de formar complejos moleculares.

7. Las condiciones óptimas para una apropiada reducción del sabor amargo en el jugo de toronja obtenidas en este trabajo corresponden a: la mayor temperatura posible durante el proceso de encapsulación, con una agitación de entre 100 y 120 r.p.m., un pH de 3.5, al menos una concentración de 4.4 mM. de β -ciclodextrina, y un tiempo de reacción de 10 minutos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

RECOMENDACIONES

- En estudios posteriores de la encapsulación de naringina y limonina mediante β -ciclodextrina en jugo de toronja natural se deben garantizar concentraciones similares a las del jugo de toronja comercial, con el objetivo de comparar nuestros resultados.
- Deberá tenerse mucho cuidado en la extracción del jugo a partir del fruto debido a que la maceración de su cáscara incorpora estos componentes amargos al jugo.
- Aún cuando los métodos de cuantificación de la naringina y la limonina utilizados en este trabajo permitieron obtener resultados aceptables, debemos enfatizar que resultados más precisos serán obtenidos mediante HPLC. Aunque, esta metodología de análisis instrumental tiene un alto costo.
- Durante nuestra experimentación se observó inestabilidad en la naringina, la limonina y la β -ciclodextrina; por lo que, sería importante revisar la estabilidad de estos componentes bajo diferentes condiciones de pH, temperatura, agitación, etc. Asimismo, la determinación de la estabilidad de los complejos formados entre la β -ciclodextrina y cada uno de los componentes amargos deberá ser de gran interés.

- Aún cuando los resultados del análisis sensorial muestran una diferencia significativa entre los jugos de toronja con y sin β -ciclodextrina, deberán de tomarse un mayor número de pruebas para reafirmar este resultado.

BIBLIOGRAFIA

1. Schmid G., *Cyclodextrin glycosyltransferasa production: yield enhancement by overexpression of cloned genes trends*. Biotechnol., 1989, 7:244.
2. French D., *The schardinger dextrans*. *Advances in carbohydrate.*, Chemistry, 1957, Vol. 12, 189-260.
3. Pitha J., Szente L., and Szejtli J., *Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners*, *Controlled drugs delivery*, CRC, FL, 1983, Vol. 1, 123-148.
4. Szejtli J., *Cyclodextrins in drug formulations: Part I.*, *Pharmaceutical technology*, 1991, 15(6), 36-44.
5. Bekers O., Uijtendaal E., Beijnen J., Bult A. and Underberg W., *Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners*, *Controlled drugs delivery*, CRC Fl, 1983, Vol. 1, 123-148.
6. Anguita A., *Intéres de las ciclodextrinas en el sector alimentario*, *Alimentaria*, *Revistas de tecnología e higiene de los alimentos*, 1990, 214(90), 43-49.
7. Duchene D., Vaution C. and Glumot F., *Cyclodextrins, their value in pharmaceutical technology*, *Drug development and industrial pharmacy*, 1986, 12 (11-13), 2193-2215.
8. Uekama K. and Otagiri M., *Cyclodextrins in drug carrier systems*, CRC, *Critical Reviews in therapeutic carrier systems*, 1987, Vol 3 Issue. I, 1-40.
9. Szejtli J., *Cyclodextrin technology*, Ed: Klumer, Academic Publishers, 1988, 1-78.

10. Nagamoto S., *Cyclodextrins Expanding the development of their functions and applications*, Chemical Economycal any Enginnering Review, 1985, 17 (718), 28-34.
11. Ibidem 6.
12. Ibidem 2.
13. Hall E. and Ache H., *Sudy of the forces responsible for binding of polar substrates in the cyclohexa-amylose cavity by position anihilation techniques*, The Journal of Physical Chemistry, 1979, 83 (14), 1805-1807.
14. Ibidem 4.
15. Szejtli J., *Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins*, Controlled Drug Bioavailability, 1985, Vol 3, 365-421.
16. korpela T., Mattsson P., Hellman J., Poavilainen S. and Mäkelä M., *Cyclodextrins: production, properties and applications in food*, Chemistry food biotechnol, 1988, 2(2):199.
17. Ibidem 6.
18. Ibidem 9.
19. Saenger W., *Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry*, Anguewandte, Chemie International Edition, 1980, 19, 344-362.
20. Tressler D. and Joslyn M., *Fruit and vegetable, Juice Processing Technology*, 2° edition, The AVI Publishing Company, USA, 1971, Pp. 92-124.
21. Neubeck C. *Flavonoid-hydrolyzing Enzymes in citrus technology (naringinase and hesperidinase), in fruits.*

- Fruit products and wines, *Enzymes in Food Processing*, Ed. Academic Press, New York, 1975, pp 431-434.
22. Behow N., Bennet R., Kanen K., Poling S. and Vandercook C., *molonic. Acid ester derivate of naringin in grapefruit*, *Phytochem.*, 1991, 30(12): 4198-4199.
23. McIntosh C., Mansell R. and Barcos S., *Relationship between limonin concentration in comercial single strength grapefruit juice*, *J. Food Sce.*, 1987, 52(6):1734-1735.
24. Hasegawa S., Bennett R., Herman Z. and Fong Ch., *Phytochemistry*, 1989, Vol 28(6). 1717-1720.
25. Nagy S., Shaw P. and Veldhuis M., *Citrus Sciece and Technology*, The AVI Publishing Company, Inc, 1977, Vol 1, Pp. 355-396.
26. Mansell R., McInntosh C. and Vest S., *An analysis of the limonin and naringin content of grapefruit juice samples collected from Florida State test houses*, *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31:156-62.
27. Reyo A. y Saval S., *Los flavonoides en la tecnología de los cítricos.*, *Tecnología de Alimentos, México*, 1990, 25(4):5-13.
28. Tsen H. and Yu G., *Limonin and naringin removal from grapefruit juice vith naringinase entraped in cellulose triacetate fibers*. *J. Food Sci.*, 1991, 56(1):31-34.
29. Braddock R. and Cadwallader K., *Citrus by manufacture products for food use*, *Food Technol.*, 1992, February:105-109.

30. Arnao M., Casas J., Del Río J., Acosta M. and García-Cánovas, An enzymatic colorimetric method for measuring naringin using 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in the presence of peroxidase, *Analytical Biochemistry*, 1990, 185, 335-338.
31. Petrus & Attaway, *Fruits and fruit products*, J., Assoc. off anal. chem., 1980, Vol. 63(6).
32. Konno A., Misaki M., Toda j., Wada T. and Yasumatsu K., Bitterness reduction of naringin and limonin by β -cyclodextrin, *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46(9), 2203-2208.
33. Kroger A. and Colter C., Gas chromatographic identification of limonin in citrus juice, *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 1972, 85:206.
34. Pedrero y Pangborn. *Evaluación sensorial de los alimentos, Métodos analíticos*, Ed. Alhambra, 1989, pp 72-75, 123-126.
35. Braverman, *Introducción a la Bioquímica de los alimentos*, Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México D.F., 1980, Pag. 48.
36. Kreyszig E., *Introducción a la estadística matemática. Principios y métodos*, Editorial Limusa, México, 1978, Pp. 275-277, 487.
37. Ibidem 36.