



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

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

Estudio de los parámetros fisicoquímicos de los complejos de timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas y evaluación del efecto de la complejación en su actividad antimicrobiana

**Autor:**

María Isabel Rodríguez López

**Directores:**

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Mercader Ros

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, Junio de 2017





**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

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

Estudio de los parámetros fisicoquímicos de los complejos de timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas y evaluación del efecto de la complejación en su actividad antimicrobiana

**Autor:**

María Isabel Rodríguez López

**Directores:**

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Mercader Ros

Dr. D. Jose Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, Junio de 2017





# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D<sup>a</sup> María Teresa Mercader Ros y el Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de los parámetros fisicoquímicos de los complejos de timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas y evaluación del efecto de la complejación en su actividad antimicrobiana” realizada por D<sup>a</sup>. María Isabel Rodríguez López en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 08 de mayo de 2017.

Dra. D<sup>a</sup> María Teresa Mercader Ros

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández



*A Héctor, porque siempre fuiste tu*

*A mis padres, por ser los mejores*

*A mis hermanos, Mar y Manuel*

*Os quiero*





## AGRADECIMIENTOS

Tras varios años de intensa investigación en el laboratorio, llega el momento de agradecer a todas aquellas personas que de un modo u otro me han ayudado a llevar a término esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral, la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Mercader Ros y el Dr. José Antonio Gabaldón Hernández, ya que para mí es un honor haber realizado este trabajo bajo su dirección y les estaré siempre muy agradecida por el valioso tiempo que le han dedicado. Con ellos he compartido estos años, en los que me han guiado, orientado e ilustrado en el arduo camino de la investigación.

En segundo lugar a la Dra. Estrella Núñez Delicado, gracias de todo corazón por confiar en mí, porque las dos sabemos que sin ti, no hubiera podido llevar a término este trabajo. Gracias por ayudarme.

Al Dr. Horacio Pérez Sánchez por tu inestimable ayuda para entender que era el Docking y el gran potencial que presenta esta herramienta.

Al Dr. Alfonso Pérez Garrido, por ayudarme a comprender el manejo del GCMS y por tu sabiduría química.

A José Antonio Pellicer, mi compañero de batallas. Gracias por nuestros largos cafés, intentando arreglar el mundo., y por tus buenos consejos. Si! ya esta aquí, por fin la terminé.

A Carmen, gracias por ayudarme en cualquier momento que lo he necesitado, y por resolverme todas las dudas que se me han ido planteando.

A Paco, por ayudarme en mis inicios con la microbiología, por contestarme a todas esas preguntas, una y otra vez.

A mis compañeros de despacho: Vicente, Silvia, Sara, Estefanía y Teresa. Que grandes momentos hemos pasado allí arriba, que pena que ya se terminen.

A Patricia, Ana, Eva y Lucia, gracias por vuestros consejos, por vuestras palabras de ánimo en los momentos que he necesitado.

A Gabi, gracias a los buenos ratos que hemos compartido y por tu ayuda en todo lo que he necesitado en el laboratorio.

A José M<sup>a</sup> Cayuela, y a todos mis compañeros del departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición que de una forma u otra me han apoyado para la realización de la tesis.

A Héctor, por lo feliz que me siento a tu lado y quererme tanto. Gracias por estar ahí en los buenos y malos momentos.

A mis padres y hermanos, porque sin vuestra ayuda y estímulo no hubiera llegado hasta donde estoy. Gracias por vuestro apoyo constante y animarme a conseguir mis objetivos.

A la Universidad Católica San Antonio de Murcia por haberme acogido y haberme ayudado a conseguir este sueño. Gracias.

*“Después de escalar una montaña muy alta,  
descubrimos que hay muchas otras montañas por  
escalar”*

*Nelson Mandela*



## COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **María Isabel Rodríguez López;** José Antonio Pellicer Balsalobre; María Teresa Mercader Ros; Patricia Navarro Martínez; Lucía Guardiola García; Eva Salazar Serna; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Capacidad antimicrobiana de timol*. VIII Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos " Dr Mario Yanes García", 2016, Tabasco, Méjico.
- **María Isabel Rodríguez López;** María Teresa Mercader Ros; Patricia Navarro Martínez; Carmen Lucas Abellán; Ana Serrano Martínez; Pilar Hernández Sánchez; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Microencapsulación de Timol*. VIII Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos " Dr Mario Yanes García", 2016, Tabasco, Méjico.
- **María Isabel Rodríguez López;** María Teresa Mercader Ros; Carmen Lucas Abellán; Ana Serrano Martínez; José Antonio Pellicer Balsalobre; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Estudio de la complejación de carvacrol en HP-beta-CDs a diferentes pHs*. II Jornadas de Investigación y Doctorado: Calidad y Acreditación, 2016, Murcia, España.
- **María Isabel Rodríguez López;** María Teresa Mercader Ros; Carmen Lucas Abellán; Ana Serrano Martínez; José Antonio Pellicer Balsalobre; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Encapsulación de Timol a diferentes pH*. I Jornadas de Investigación y Doctorado: Calidad y Acreditación, 2015, Murcia, España.
- José Antonio Pellicer Balsalobre; M<sup>a</sup> Isabel Fortea Gorbe; Juan Trabal Sau; **María Isabel Rodríguez López;** José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado. *Microencapsulación de aroma de fresa con diferentes agentes encapsulantes mediante spray drying*. I Jornadas de Investigación y Doctorado: Calidad y Acreditación, 2015, Murcia, España.

- **María Isabel Rodríguez López;** María Teresa Mercader Ros; Carmen Lucas Abellán; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Encapsulación de linalool en ciclodextrinas como vía para mejorar su estabilidad*. VIII Congreso CYTA/CESIA Conocimientos para impulsar una evolución inteligente del sector alimentario, 2015, Badajoz, España.
- **María Isabel Rodríguez López;** María Teresa Mercader Ros; Carmen Lucas Abellán; Ana Serrano Martínez; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Alternativas naturales a los fungicidas de síntesis química*. VII Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos " Dr Mario Yanes García", 2014, Tabasco, Méjico.
- María Teresa Mercader Ros; **María Isabel Rodríguez López;** Carmen Lucas Abellán; Estrella Núñez Delicado; José Antonio Gabaldón Hernández. *Encapsulación como vía para mejorar las prestaciones y minimizar los efectos adversos de los fungicidas de síntesis*. VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2013, Córdoba, España.

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





## ÍNDICE GENERAL

INDICE DE ABREVIATURAS .....	25
ÍNDICE DE FIGURAS .....	29
ÍNDICE DE TABLAS .....	37
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>1. Aceites Esenciales.....</b>	<b>49</b>
1.1. INTRODUCCIÓN .....	49
1.2 HISTORIA DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	50
1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	51
1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	52
1.4.1 Terpenos .....	53
1.4.2 Compuestos aromáticos .....	58
1.5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	58
1.5.1 Actividad antifúngica .....	59
1.5.2 Actividad antimutagénica.....	60
1.5.3 Actividad anticancerígena .....	61
1.5.4 Actividad antiviral .....	63
1.5.5 Actividad antioxidante .....	64
1.5.6 Actividad antidiabética .....	65
1.5.7 Actividad anti-inflamatoria .....	66
1.5.8 Actividad antiprotozoos.....	69
1.5.9 Toxicidad en tejidos .....	69
1.6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	71
1.7. APLICACIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	73
1.7.1 Industria farmacéutica.....	73
1.7.2 Industria cosmética.....	74
1.7.3 Industria agroquímica .....	75

1.7.4 Industria alimentaria .....	77
<b>2. Ciclodextrinas (CDs).....</b>	<b>79</b>
2.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN.....	79
2.2. PROPIEDADES .....	82
2.3. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS .....	85
2.3.1. $\alpha$ -CDs.....	86
2.3.2. $\beta$ -CDs.....	86
2.3.3. $\gamma$ -CDs.....	86
2.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN .....	87
2.4.1. Equilibrio de los complejos de inclusión.....	92
2.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS .....	93
2.5.1. Solución Dinámica.....	93
2.5.1.1. <i>Efecto de la temperatura</i> .....	93
2.5.1.2. <i>Empleo de disolventes</i> .....	94
2.5.1.3. <i>Efecto del agua</i> .....	94
2.5.1.4. <i>Analitos volátiles</i> .....	95
2.5.2. Co-precipitación.....	95
2.5.3. Complejación por método Slurry .....	96
2.5.4. Complejación por irradiación por microondas .....	97
2.5.5. Complejación por pasta .....	97
2.5.6. Mezcla húmeda y calefacción .....	97
2.5.7. Método de extrusión .....	98
2.5.8. Mezcla en seco.....	98
2.6. MÉTODO DE SECADO DE LOS COMPLEJOS FORMADOS .....	99
2.7. LIBERACIÓN.....	99
2.8. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CDs.....	99
2.8.1. Métodos de detección de complejos sólidos.....	100
2.8.1.1. <i>Difracción de rayos-X</i> .....	100
2.8.1.2. <i>Espectroscopía de resonancia magnética nuclear</i> .....	101

---

2.8.1.3. Espectroscopía de absorción infrarroja.....	101
2.8.1.4. Espectroscopía Raman .....	102
2.8.1.5. Métodos térmicos .....	103
2.8.1.6. Microscopia electrónica de Barrido .....	103
2.8.2. Métodos de detección de complejos en solución .....	104
2.8.2.1. Métodos de variación de la solubilidad .....	105
2.8.2.2. Métodos cinéticos .....	108
2.8.2.3. Métodos instrumentales.....	109
2.8.2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-VIS .....	109
2.8.2.3.2. Espectroscopía de fluorescencia.....	110
2.8.2.3.3. Dicroísmo circular .....	111
2.8.2.3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	111
2.8.2.3.5. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico .....	112
2.8.2.3.6. Modelado molecular .....	113
2.8.2.3.7. Métodos voltamétricos y polarográficos.....	113
2.8.2.3.8. Conductimetría.....	114
2.8.2.3.9. Cromatografía .....	115
2.9. APLICACIONES DE LA CDS .....	115
2.9.1. Industria farmacéutica .....	116
2.9.2. Cosmética y aseo personal.....	118
2.9.3. Industria alimentaria.....	120
2.9.2.1. CDs como agentes atrapadores de sabores.....	121
2.9.2.2. CDs como agentes protectores frente a la degradación, la luz y la temperatura.....	122
2.9.2.3. CDs para mejorar la vida útil de los alimentos .....	123
2.9.2.4. Aplicaciones de las CDs vacías .....	123
2.9.2.5. Aplicaciones especiales de las CDs en alimentos .....	125
2.9.4. Agricultura e industria química .....	126
2.9.5. Textil y cosmeotextil.....	127
2.9.6. Aplicaciones biomédicas .....	128

2.9.7. Nanotecnología .....	129
2.9.8. Ciclodextrinas y descontaminación .....	130
2.10. REGULACIÓN DE LAS CDS .....	131
2.11. BIODISPONIBILIDAD DE LAS CDS .....	133
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS .....</b>	<b>135</b>
<b>1. Objetivos.....</b>	<b>137</b>
<b>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>139</b>
<b>1. Materiales y métodos.....</b>	<b>141</b>
1.1. CÁLCULO DE $K_c$ .....	141
1.1.1. Reactivos .....	141
1.1.2. Estudio de solubilidad a diferentes pH.....	141
1.1.3. Cuantificación por GC-MS .....	142
1.2. PREPARACIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS.....	144
1.2.1. Método de irradiación por microondas.....	144
1.2.2. Método de solubilidad .....	145
1.2.3. Secado por atomización.....	145
1.3. CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS .....	147
1.3.1. Resonancia magnética nuclear.....	147
1.3.2. Modelado molecular .....	149
1.3.3. Calorimetría diferencial de barrido.....	150
1.3.4. Termogravimetría.....	152
1.3.5. Espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier .....	153
1.4. MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA .....	154
1.4.1. Reactivos .....	154
1.4.2. Cultivo Bacteriano .....	155
1.4.3. Método de Dilución de caldo.....	155

<b>CAPÍTULO IV. TIMOL .....</b>	<b>159</b>
<b>1. Timol.....</b>	<b>161</b>
1.1. INTRODUCCIÓN .....	161
1.1.1. Timol y salud.....	162
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	166
1.2.1. Cálculo de $K_c$ .....	166
1.2.1.1. <i>Estudio de formación de complejos de inclusión a diferentes pHs</i> .....	166
1.2.2. Estudio de formación de complejos de inclusión con HP- $\beta$ -CDs por diferentes método.....	173
1.2.2.1. <i>Spray Dryer</i> .....	177
1.2.2.2. RMN .....	183
1.2.2.3. <i>Acoplamiento molecular</i> .....	186
1.2.2.4. <i>Calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría</i> .....	187
1.2.2.5. <i>Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier</i> .....	189
<b>CAPÍTULO V. CARVACROL.....</b>	<b>193</b>
<b>1. Carvacrol .....</b>	<b>195</b>
1.1. INTRODUCCIÓN .....	195
1.1.1. Carvacrol y salud.....	196
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	204
1.2.1. Cálculo de $K_c$ .....	204
1.2.1.1. <i>Estudio de formación de complejos de inclusión a diferentes pHs</i> .....	204
1.2.2. Estudio de formación de complejos de inclusión con HP- $\beta$ -CDs por diferentes métodos.....	210
1.2.2.1. <i>Spray Dryer</i> .....	213
1.2.2.2. RMN .....	220
1.2.2.3. <i>Acoplamiento molecular</i> .....	223
1.2.2.4. <i>Calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría</i> .....	224



<b>CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>295</b>
<b>1. Conclusiones</b> .....	<b>297</b>
<b>CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>299</b>
<b>1. Bibliografía</b> .....	<b>301</b>





## LISTA DE ABREVIATURAS

- 9-AA: agente mutagénico.
- ABTS: Ácido 2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.
- ADN: Ácido desoxiribonucleico.
- AE: Aceites esenciales.
- ARN: Acido ribonucleico.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- ATPasa: Adenosin trifosfatasa.
- ATR: Attenuated Total Reflection.
- BMP: Bone Morphogenetic Proteins.
- CDs: Ciclodextrinas.
- CE: Eficacia de complejación.
- CECT: Colección española de cultivos tipos.
- CEE: Comunidad económica europea.
- CFU: Unidades formadoras de colonias.
- CGTasa: Ciclodextrina glucanotransferasa.
- CIF: Concentración mínima fraccionaria.
- CMA: Carga de materia activa.
- CNS: Sistema nervioso central.
- COX: Ciclooxygenasa.
- D-GalN: D-galactosamina.
- DAG: Dieta rica en grasa.
- DC: Dicroísmo circular.
- DMAPP: Dimetil-alil pirofosfato.
- DMSO: Dimetil sulfóxido.
- DnaK: Chaperona molecular de *Escherichia coli* 70 kDa.
- DPPH: 2, 2-difenil-picril-hidracil.
- DO: Densidad óptica.
- DSC: Calorimetría diferencial de barrido.
- DTA: Análisis térmico diferencial.
- EC: Electroforesis capilar.

ECM: Constituyente de la matriz celular.

EE: Eficacia de encapsulación.

E.E.U.U.: Estados Unidos.

EVA: Etilenvinilacetato.

FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas.

FCV: Norovirus calicivirus felino.

FDA: American Food and Drug Administration.

FPP: Farnesil difosfato.

FRAP: Reducción del hierro - poder antioxidante.

FTIR: Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier.

GA-3P: Gliceraldehido-3-fosfato.

GC: Cromatografía de gases.

GGPP: Geranil geranil difosfato.

GPP: Geranil difosfato.

GRAS: En general reconocido como seguros.

GroEL: Chaperona molecular de *Escherichia coli* 60 kDa.

GSH: Glutación.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno.

HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa.

HP-β-CDs: Hidroxipropil-β-ciclodextrinas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HR: Humedad relativa.

IDA: Ingesta diaria admisible.

iNOS: oxido nitroso sintasa inducible.

IL: Interleucina.

IPP: Isopentil pirofosfato.

IR: Espectroscopia de absorción infrarroja.

ITC: Calorimetría isotérmica de titulación.

JECFA: Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios.

Kc: Constante de complejación.

LPS: Lipopolisacáridos.

MBC: Concentración bactericida mínima.

MEP: Metileritritol fosfato.

MEV: Mevalonato.

- MIC: Concentración mínima inhibitoria.
- MNV-1: Norovirus murino.
- MS: Masas.
- MWI: Irradiación por microondas.
- NIRS: Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano
- NMDA: N-Metil-d-aspartato.
- NO: Oxido nitroso.
- NOE: Efecto Overhauser.
- OC2: Cáncer oral humano.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- OTGL: Termogravimetría diferencial.
- ox-LPS: Lipoproteínas de baja intensidad oxidadas.
- P: Producto.
- PA: Proceso de atomización.
- PDB: Base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas.
- PGE: Prostaglandina.
- pH: Potencial de hidrógeno.
- pKa: Logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil.
- P<sub>ow</sub>: Coeficiente de partición.
- PPAR: Receptores activados proliferadores de peroxisomas.
- rf*: Pulsos de radiofrecuencia.
- RMN: Resonancia magnética nuclear.
- RNS: Especie reactiva de nitrógeno.
- ROS: Especie reactiva de oxígeno.
- RP: Rendimiento del proceso.
- S: Sustrato.
- S<sub>0</sub>: Solubilidad del sustrato.
- SBE-β-CD: Sulfobutil-etil-β-ciclodextrina.
- SEM: Microscopía electrónica de barrido.
- T: Temperatura.
- TG: Termogravimetría.
- TLR: Receptores tipo Toll.
- TNF: Factor de necrosis tumoral.
- TPSs: Terpeno sintetas.

TSA: Medio de agar soja y triptona.

TSB: Caldo de soja y triptona.

UV: Ultravioleta.

VIS: Visible.

VTU: Unidad de temperatura variable.

W: Watio.

$\delta$ : Cambios químicos.

$\Delta C_p$ : Cambio en la capacidad calorífica.

$\lambda_{\max}$ : Longitud de onda.

$\mu$ : Velocidad de crecimiento.

$\tau$ : Intervalo de tiempo.

## ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

<b>Figura I.1.:</b> <i>Unidades de isopreno</i> .....	53
<b>Figura I.2.:</b> <i>Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno</i> .....	54
<b>Figura I.3.:</b> <i>Mecanismo de acción de los AE en células cancerosas.</i> .....	62
<b>Figura I.4.:</b> <i>Actividad antiinflamatoria.</i> .....	68
<b>Figura I.5.:</b> <i>Estructura de <math>\alpha</math>-CDs, <math>\beta</math>-CDs y <math>\gamma</math>-CDs</i> .....	79
<b>Figura I.6.:</b> <i>Estructura ciclodextrinas</i> .....	80
<b>Figura I.7.:</b> <i>Tipo de CDs</i> .....	83
<b>Figura I.8.:</b> <i>Rotaxanos y Catenano</i> .....	85
<b>Figura I.9.:</b> <i>Representación de un complejo de inclusión</i> .....	90
<b>Figura I.10.:</b> <i>Diámetro interno y externo de las CDs nativas</i> .....	92
<b>Figura I.11.:</b> <i>Micrografías obtenidas por SEM</i> .....	104
<b>Figura I.12.:</b> <i>Tipo de diagramas de fases con CDs</i> .....	105
<b>Figura I.13.:</b> <i>Formación de los diferentes tipos de complejos</i> .....	107
<b>Figura I.14.:</b> <i>Complejo de inclusión colesterol-CDs</i> .....	121
<b>Figura I.15.:</b> <i>Estructura de las nanoesponjas basadas en CDs</i> .....	130
<b>Figura I.16.:</b> <i>Estructura esquemática de nanomateriales que contienen CDs.</i> .....	131

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Figura III.1.:</b> <i>Recta de calibrado obtenida para timol por GC-MS</i> .....	142
<b>Figura III.2.:</b> <i>Recta de calibrado obtenida para carvacrol por GC-MS</i> .....	143
<b>Figura III.3.:</b> <i>Recta de calibrado obtenida para linalol por GC-MS</i> .....	143

<b>Figura III.4.:</b> Representación esquemática del proceso de secado por atomización.....	146
<b>Figura III.5.:</b> Secuencia de pulsos correspondiente a un ensayo RMN-2D. La dimensión $t_2$ es la habitual en ensayos mono-dimensionales. El ensayo se repite un determinado número de veces con distintos incrementos de $t_1$ , obteniendo así una señal (s) bidimensional ( $t_1$ , $t_2$ ).....	148
<b>Figura III.6.:</b> Perfil termoanalítico de un sistema huésped- $\beta$ -CD realizado por DSC.....	151
<b>Figura III.7.:</b> Termograma obtenido por DSC, donde se observa la transición vítrea.....	151
<b>Figura III.8.:</b> Equipo Hi-Res TGA 2950 utilizado en las determinaciones.....	152
<b>Figura III.9.:</b> Equipo Varian FT-IR 670 utilizado en las determinaciones.....	154
<b>Figura III.10.:</b> Curvas de crecimiento obtenidas a 35 °C para <i>E. coli</i> (izquierda) y <i>S. aureus</i> (derecha).....	155
<b>Figura III.11.:</b> Esquema de trabajo seguido en el ensayo en placa.....	156

#### CAPÍTULO IV. TIMOL

<b>Figura IV.1.:</b> Estructura química de timol.....	161
<b>Figura IV.2.:</b> Diagrama de fases de timol con $\alpha$ -CDs (A) y $\beta$ -CDs (B) a pH 3.5 (●), pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□) y pH 8.5 (◆) a 25 °C.....	167
<b>Figura IV.3.:</b> Diagrama de fases de timol con HP- $\beta$ -CDs a pH 3.5 (●), pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□) y pH 8.5 (◆) a 25 °C.....	168
<b>Figura IV.4.:</b> Equilibrio de disociación de timol.....	169
<b>Figura IV.5.:</b> Estructura de $\beta$ -CD y su modificada HP- $\beta$ -CD.....	171
<b>Figura IV.6.:</b> Aumento de la solubilidad de timol tras la formación de complejos de inclusión con $\alpha$ -CDs (50 mM), $\beta$ -CDs (13 mM) y Hp- $\beta$ -CDs (100 mM) a pH 3,5 (barras negras), pH 5,5 (barras azul claro), pH 6,5 (barras blancas), pH 7 (barras azul oscuro), pH 8,5 (barras grises)..	172
<b>Figura IV.7.:</b> Proceso de preparación de complejos de inclusión de timol-HP- $\beta$ -CDs..	174
<b>Figura IV.8.:</b> Resultados obtenidos por el método irradiación por microondas con HP- $\beta$ -CDs y timol a las 24 h (●), y a las 48 h (○).....	175

<b>Figura IV.9.:</b> <i>Diagrama de Fases de HP-β-CDs con timol.</i> .....	176
<b>Figura IV.10.:</b> <i>Micrografías de HP-β-CDs (A), MWI (B) y Método de solubilidad (C).</i> .....	178
<b>Figura IV.11.:</b> <i>Rendimiento de secado por spray-drying con HP-β-CDs y timol, método de irradiación por microondas (barras negras), método de solubilidad (barras grises).</i> .....	179
<b>Figura IV.12.:</b> <i>Eficacia de encapsulación de timol con HP-β-CDs, método de irradiación por microondas (barras negras), método de solubilidad (barras grises)</i> .....	180
<b>Figura IV.13.:</b> <i>Estabilidad de los complejos sólidos durante su almacenaje. A, MWI a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises), B método de solubilidad a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises).</i> .....	183
<b>Figura IV.14.:</b> <i>Espectro ROESY del complejo timol-HP-β-CDs en metanol-d4.</i> .....	185
<b>Figura IV.15.:</b> <i>Diferentes perspectivas tridimensionales de los complejos entre timol y HP-β-CDs obtenidos mediante Docking.</i> .....	187
<b>Figura IV.16.:</b> <i>Curvas de DSC de timol (a), MWI timol-HP-β-CDs (b), HP-β-CDs (c).</i> .....	188
<b>Figura IV.17.:</b> <i>Curvas de TG de a) HP-β-CDs en verde, b) MWI timol-HP-β-CDs en rosa, c) timol en azul.</i> .....	189
<b>Figura IV.18.:</b> <i>Espectro de FTIR de HP-β-CDs (línea verde), MWI timol- HP-β-CDs (línea roja), y timol (línea azul).</i> .....	190
<b>Figura IV.19.:</b> <i>Espectro de FTIR de HP-β-CDs (línea verde), MWI timol- HP-β-CDs (línea roja), y timol (línea azul). Las líneas verticales indican el máximo de la curva HP-β-CDs</i> .....	191

## CAPÍTULO V. CARVACROL

<b>Figura V.1.:</b> <i>Estructura química de carvacrol</i> .....	195
<b>Figura V.2.:</b> <i>Actividades biológicas atribuidas a carvacrol</i> .....	197
<b>Figura V.3.:</b> <i>Representación esquemática de la regulación de los genes BMP, FGF-1 y vías de señalización mediada por galanina (A) y de la vía de señalización mediada por TLR2 y 4 regulados por carvacrol (B).</i> .....	198
<b>Figura V.4.:</b> <i>Representación esquemática del mecanismo de control del dolor por carvacrol.</i> .....	200

<b>Figura V.5.:</b> Diagrama de fases de carvacrol con $\alpha$ -CDs a pH 3.5 (●), pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□), y pH 8.5 (◆) a 25 °C. ....	205
<b>Figura V.6.:</b> Diagrama de fases de carvacrol con $\beta$ -CDs a pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□) y pH 8.5 (◆) a 25 °C. Insertada pH 3.5 (●) a 25 °C. ....	205
<b>Figura V.7.:</b> Diagrama de fases de carvacrol con HP- $\beta$ -CDs a pH 3.5 (●), pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□), y pH 8.5 (◆), a 25 °C.....	206
<b>Figura V.8.:</b> Equilibrio de disociación de carvacrol. ....	207
<b>Figura V.9.:</b> Aumento de la solubilidad de carvacrol tras la formación de complejos de inclusión con $\alpha$ -CDs (50 mM), $\beta$ -CDs (13 mM) y Hp- $\beta$ -CDs (100 mM) a pH 3,5 (barras negras), pH 5,5 (barras azul claro), pH 6,5 (barras blancas), pH 7 (barras azul oscuro) y pH 8,5 (barras grises). ....	209
<b>Figura V.10.:</b> Método MWI con HP- $\beta$ -CDs y carvacrol a las 24 h (●), y a las 48 h (○).....	211
<b>Figura V.11.:</b> Diagrama de Fases de HP- $\beta$ -CDs con carvacrol. ....	212
<b>Figura V.12.:</b> Formación de complejos de HP- $\beta$ -CDs con carvacrol. ....	213
<b>Figura V.13.:</b> Micrografías de HP- $\beta$ -CDs (A), MWI (B) y Método de solubilidad (C). ....	214
<b>Figura V.14.:</b> Rendimiento de secado por spray-drying con HP- $\beta$ -CDs y carvacrol, método de irradiación por microondas (barras negras), método de solubilidad (barras grises). ....	215
<b>Figura V.15.:</b> Eficacia de encapsulación de carvacrol con HP- $\beta$ -CDs, método de irradiación por microondas (barras negras), método de solubilidad (barras grises) ....	217
<b>Figura V.16.:</b> Estabilidad de los complejos sólidos durante su almacenaje. A, MWI a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises), B método de solubilidad a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises) .....	219
<b>Figura V.17.:</b> Espectro ROESY del complejo carvacrol-HP- $\beta$ -CDs en metanol-d <sub>4</sub> . ....	222
<b>Figura V.18.:</b> Simulación para la formación del complejo de carvacrol con HP- $\beta$ -CDs.....	223
<b>Figura V.19.:</b> Curvas de DSC de carvacrol (a), MWI carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (b), HP- $\beta$ -CDs (c). ....	225
<b>Figura V.20.:</b> Termograma de a) HP- $\beta$ -CDs, b) MWI carvacrol-HP- $\beta$ -CDs, c) carvacrol. ....	225



**Figura V.21.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), MWI carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (línea roja), y carvacrol (línea azul). ..... 226

**Figura V.22.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), MWI carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (línea roja), y carvacrol (línea azul). Las líneas verticales indican el máximo de la curva HP- $\beta$ -CDs... 227

## CAPÍTULO VI. LINALOL

**Figura VI.1.:** Estructura química de linalol ..... 231

**Figura VI.2.:** Linalol y sus enantiómeros ..... 232

**Figura VI.3.:** Metabolismo de linalol en mamíferos ..... 233

**Figura VI.4.:** Diagrama de fases de linalol con  $\alpha$ -CDs a pH 3.5 (●), pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□), y pH 8.5 (◆) a 25 °C..... 237

**Figura VI.5.:** Diagrama de fases de linalol con  $\beta$ -CDs a pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□) y pH 8.5 (◆) a 25 °C. Insertada pH 3.5 (●) a 25 °C..... 237

**Figura VI.6.:** Diagrama de fases de linalol con HP- $\beta$ -CDs a pH 3.5 (●), pH 5.5 (○), pH 6.5 (■), pH 7 (□), y pH 8.5 (◆), a 25 °C..... 238

**Figura VI.7.:** Equilibrio de disociación de linalol.. ..... 239

**Figura VI.8.:** Aumento de la solubilidad de linalol tras la formación de complejos de inclusión con  $\alpha$ -CDs (50 mM),  $\beta$ -CDs (13 mM) y Hp- $\beta$ -CDs (100 mM) a pH 3,5 (barras negras), pH 5,5 (barras azul claro), pH 6,5 (barras blancas), pH 7 (barras azul oscuro) y pH 8,5 (barras grises). 241

**Figura VI.9.:** Método MWI con HP- $\beta$ -CDs y linalol a las 24 h (●), y a las 48 h (○).. ..... 243

**Figura VI.10.:** Diagrama de Fases de HP- $\beta$ -CDs con linalol. .... 244

**Figura VI.11.:** Micrografías de HP- $\beta$ -CDs (A), MWI (B), Método de solubilidad (C). ..... 246

**Figura VI.12.:** Rendimiento de secado por spray-drying con HP- $\beta$ -CDs y linalol, método MWI (barras negras) y método de solubilidad (barras grises). ..... 247

**Figura VI.13.:** Eficacia de encapsulación de linalol con HP- $\beta$ -CDs, método de MWI (barras negras) y método de solubilidad (barras grises). ..... 248

<b>Figura VI.14.:</b> Estabilidad de los complejos sólidos durante su almacenaje. (A) MWI a 25°C (barras negras) y 8°C (barras grises), (B) método de solubilidad a 25°C (barras negras) y 8°C (barras grises). .....	251
<b>Figura VI.15.:</b> Espectro ROESY del complejo linalol-HP-β-CDs en metanol-d4.....	253
<b>Figura VI.16.:</b> Perspectiva tridimensional de los complejos entre linalol y HP-β-CDs obtenido mediante Docking .....	254
<b>Figura VI.17.:</b> Curvas de DSC de linalol (a), MWI linalol-HP-β-CDs (b), HP-β-CDs (c). ....	255
<b>Figura VI.18.:</b> Termogramas de a) HP-β-CDs, b) complejo linalol-HP-β-CDs, c) linalol.....	256
<b>Figura VI.19.:</b> Espectro de FTIR de HP-β-CDs (línea verde), MWI linalol-HP-β-CDs (línea roja), y linalol (línea azul). .....	257
<b>Figura VI.20.:</b> Espectro de FTIR de HP-β-CDs (línea verde), MWI linalol-HP-β-CDs (línea roja), y linalol (línea azul). Las líneas verticales indican el máximo de la curva HP-β-CDs.....	258

## CAPÍTULO VII. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

<b>Figura VII.1.:</b> Modo de acción de timol, carvacrol y linalol en la célula .....	265
<b>Figura VII.2.:</b> Grupos hidroxilos de timol, carvacrol y linalol. ....	268
<b>Figura VII.3.:</b> Efecto de la concentración de timol complejado en HP-β-CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control E.coli, (○) 1,92 mM, (■) 3,84 mM, (□) 7,68 mM, (▲) 11,45 mM, (Δ) 25 mM y (◆) 37,75 mM de timol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control E.coli, (○) 0,99 mM, (■) 1,99 mM, (◆) 3,97, 6, 04, 12,52, y 20,86 mM de timol.....	271
<b>Figura VII.4.:</b> Efecto de la concentración de carvacrol complejado en HP-β-CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control E.coli, (○) 1,25 mM, (■) 2,49 mM, (□) 4,98 mM, (▲) 6,90 mM, (◆) 14,60, y 25,03 mM de carvacrol (B) por el método de solubilidad. (●) Control E.coli, (○) 0,95 mM, (■) 1,89 mM, (◆) 3,78, 5,87, 11,26 y 19,95 mM de carvacrol. ...	271
<b>Figura VII.5.:</b> Efecto de la concentración de linalol complejado en HP-β-CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control E.coli, (○) 0,20 mM, (■) 0,40 mM, (□) 0,78 mM, (▲) 1,15 mM, (Δ) 1,69 mM y (◆) 3,53 mM de linalol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control E.coli, (○) 0,84 mM, (■) 1,67 mM, (□) 3,34 mM, (▲) 5,95 mM, (Δ) 8,95 mM y (◆) 12,92 mM de linalol. ....	272

**Figura VII.6.:** Efecto de la concentración de timol complejoado en HP- $\beta$ -CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *S.aureus*, (○) 1,92 mM, (■) 3,84 mM, (□) 7,68 mM, (▲) 11,45 mM, (Δ) 25 mM y (◆) 37,75 mM de timol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *S.aureus*, (○) 0,99 mM, (■) 1,99 mM, (◆) 3,97, 6,04, 12,52 y 20,86 mM de timol

..... 284

**Figura VII.7.:** Efecto de la concentración de carvacrol complejoado en HP- $\beta$ -CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *S.aureus*, (○) 1,25 mM, (■) 2,49 mM, (□) 4,98 mM, (▲) 6,90 mM, (Δ) 14,60 mM y (◆) 25,03 mM de carvacrol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *S.aureus*, (○) 0,95 mM, (■) 1,89 mM, (◆) 3,78, 5, 87, 11,26 y 19,95 mM de carvacrol. .... 285

**Figura VII.8.:** Efecto de la concentración de linalol complejoado en HP- $\beta$ -CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *S.aureus*, (○) 0,20 mM, (■) 0,40 mM, (□) 0,78 mM, (▲) 1,15 mM, (Δ) 1,69 mM y (◆) 3,53 mM de linalol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *S.aureus*, (○) 0,84 mM, (■) 1,67 mM, (□) 3,34 mM, (▲) 5,95 mM, (Δ) 8,95 mM y (◆) 12,92 mM de linalol. .... 286



## ÍNDICE DE TABLAS

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

<b>Tabla I.1.:</b> <i>Monoterpenos más frecuentes de los AE</i> .....	56
<b>Tabla I.2.:</b> <i>Sesquiterpenos más frecuentes de los AE</i> .....	57
<b>Tabla I.3.:</b> <i>Algunos componentes aromáticos presentes en los AE</i> .....	58
<b>Tabla I.4.:</b> <i>Potencial anticancerígeno de los AE</i> .....	63
<b>Tabla I.5.:</b> <i>Toxicidad en tejidos de los AE</i> .....	71
<b>Tabla I.6.:</b> <i>Propiedades farmacológicas descritas para algunos AE</i> .....	74
<b>Tabla I.7.:</b> <i>Actividad insecticida de los AE</i> .....	77
<b>Tabla I.8.:</b> <i>Propiedades de las ciclodextrinas naturales</i> .....	82
<b>Tabla I.9.:</b> <i>Ciclodextrinas derivadas de <math>\beta</math>-CDs</i> .....	84
<b>Tabla I.10.:</b> <i>Productos farmacéuticos que contienen diversos tipos de CDs</i> .....	117
<b>Tabla I.11.:</b> <i>Algunas aplicaciones de las CDs en la industria farmacéutica</i> .....	118
<b>Tabla I.12.:</b> <i>Normativa legal de las CDs</i> .....	132
<b>Tabla I.13.:</b> <i>Representación esquemática del proceso de digestión de las CDs</i> .....	134

## CAPÍTULO IV. TIMOL

<b>Tabla IV.1.:</b> <i>Constantes de complejación (<math>K_c</math>) entre timol y distintos tipos de CDs a diferentes pH, calculados mediante el método de solubilidad</i> .....	168
<b>Tabla IV.2.:</b> <i>Eficacia de complejación (CE) entre timol y distintos tipos de CDs a diferentes pH</i> .....	173
<b>Tabla IV.3.:</b> <i>Eficacia de encapsulación y carga de materia activa (CMA)</i> .....	181
<b>Tabla IV.4.:</b> <i>Desplazamiento químico de timol y HP-<math>\beta</math>-CDs tanto en su forma libre como complejada en metanol-<math>d_4</math></i> .....	184

## CAPÍTULO V. CARVACROL

<b>Tabla V.1.:</b> Constantes de complejación ( $K_c$ ) entre carvacrol y distintos tipos de CDs a diferentes pH, calculados mediante el método de solubilidad. ....	206
<b>Tabla V.2.:</b> Eficacia de complejación (CE) entre carvacrol y distintos tipos de CDs a diferentes pH. ....	210
<b>Tabla V.3.:</b> Eficacia de encapsulación (EE) y carga de materia activa (CMA). ....	218
<b>Tabla V.4.:</b> Desplazamiento químico de carvacrol y HP- $\beta$ -CD tanto en su forma libre como complejada en metanol- $d_4$ . ....	221

## CAPÍTULO VI. LINALOOL

<b>Tabla VI.1.:</b> Constantes de complejación ( $K_c$ ) entre linalol y distintos tipos de CDs a diferentes pH, calculados mediante el método de solubilidad. ....	238
<b>Tabla VI.2.:</b> Eficacia de complejación (CE) entre linalol y distintos tipos de CDs a diferentes pH .....	242
<b>Tabla VI.3.:</b> Eficacia de encapsulación (EE) y carga de materia activa (CMA). ....	249
<b>Tabla VI.4.:</b> Desplazamiento químico de linalol y HP- $\beta$ -CD tanto en su forma libre como complejada en metanol- $d_4$ . ....	252

## CAPÍTULO VII. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

<b>Tabla VII.1.:</b> Aceites esenciales, procedencia y mecanismo de acción .....	262
<b>Tabla VII.2.:</b> Concentración mínima inhibitoria de los compuestos libres (en ausencia de CDs), frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	269
<b>Tabla VII.3.:</b> Velocidad de crecimiento y fase lag de timol con <i>E.coli</i> . ....	273
<b>Tabla VII.4.:</b> Velocidad de crecimiento y fase lag de carvacrol con <i>E.coli</i> . ....	274
<b>Tabla VII.5.:</b> Velocidad de crecimiento y fase lag de linalool con <i>E.coli</i> . ....	275

---

<b>Tabla VII.6.:</b> <i>Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida para E. coli de los complejos de monoterpenos obtenidos por ambos métodos.....</i>	277
<b>Tabla VII.7.:</b> <i>Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP-β-CD-(timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método MWI sobre E. coli. ....</i>	279
<b>Tabla VII.8.:</b> <i>Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP-β-CD-(timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método de solubilidad sobre E. coli.. ....</i>	281
<b>Tabla VII.9.:</b> <i>Velocidad de crecimiento y fase lag de timol con S. aureus. ....</i>	286
<b>Tabla VII.10.:</b> <i>Velocidad de crecimiento y fase lag de carvacrol con S. aureus. ....</i>	286
<b>Tabla VII.11.:</b> <i>Velocidad de crecimiento y fase lag de linalool con S.aureus.....</i>	287
<b>Tabla VII.12.:</b> <i>Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida para S. aureus. ....</i>	289
<b>Tabla VII.13.:</b> <i>Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP-β-CD-(timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método MWI sobre S. aureus.....</i>	291
<b>Tabla VII.14.:</b> <i>Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP-β-CD-(timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método de solubilidad sobre S. aureus.. ....</i>	292





TESIS DOCTORAL DE

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Isabel Rodríguez López

DIRECTORES

Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Teresa Mercader Ros

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

TÍTULO

“Estudio de los parámetros fisicoquímicos de los complejos de timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas y evaluación del efecto de la complejación en su actividad antimicrobiana”

RESUMEN

La demanda de compuestos naturales en la industria alimentaria para su empleo como conservantes ha aumentado significativamente en los últimos años, debido fundamentalmente a la percepción negativa que tienen los consumidores hacia los compuestos de síntesis química. Dentro de este grupo de posibles candidatos naturales, tanto los Aceites Esenciales (AE), como sus componentes ofrecen soluciones viables a corto plazo.

Respecto a la composición de los AE, destaca mayoritariamente la presencia de terpenos, entre ellos timol, carvacrol y linalol, que ejercen una marcada influencia sobre las propiedades biológicas que se les atribuyen. Si bien diferentes estudios han evidenciado la potencial actividad antifúngica, antimutagénica, anticancerígena, antiviral, antioxidante, antidiabética y anti-inflamatoria de estos monoterpenos, hasta la fecha su aplicación en la industria alimentaria está limitada, ya que son compuestos hidrofóbicos, sensibles a la acción de agentes externos como el oxígeno, la luz ultravioleta y la temperatura, sufriendo también modificaciones estructurales catalizadas por numerosas enzimas oxidativas. Además, su intenso aroma hace que al incorporarlos a los alimentos estos modifiquen sus propiedades organolépticas provocando el rechazo del consumidor; e incluso, pueden causar alergias por contacto o ingestión a las concentraciones empleadas usualmente en fragancias y perfumes, constituyendo

un inconveniente para su formulación y manipulación previa a su posible aplicación en diferentes sectores industriales (alimentación, cosmética, química o farmacéutica, entre otras).

Así, dados los beneficios atribuidos a los AE, sería interesante poder desarrollar estrategias que permitan solventar los inconvenientes intrínsecos a sus propiedades fisicoquímicas, que restringen hasta la fecha su amplio uso. Así, entre las posibles soluciones alternativas planteamos el empleo de CDs, unos azúcares cíclicos que tienen la capacidad de formar complejos de inclusión con un gran número de sustancias, aumentando su solubilidad y ejerciendo un efecto protector frente a factores ambientales externos.

En base a todo lo expuesto anteriormente, el principal objetivo de esta Tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la complejación de timol, carvacrol y linalol en diversos tipos de CDs nativas y modificadas, como etapa previa para evaluar posteriormente el efecto de la complejación sobre su actividad antimicrobiana.

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de timol, carvacrol y linalol a diferentes valores de pH, para optimizar el tipo de CD y medio de reacción que sustentan el mayor valor de constante de complejación. Una vez demostrada la capacidad de HP- $\beta$ -CDs para formar complejos de inclusión con los analitos objeto de estudio y dada su mayor eficacia a pH neutro con respecto a las nativas ensayadas, se seleccionó HP- $\beta$ -CDs para la formación de complejos de inclusión a pH neutro por dos métodos, el de solubilidad y el de irradiación por microondas, atomizando posteriormente las disoluciones en *Spray Dryer* para la obtención de partículas sólidas, ya que podrían ser de gran utilidad en la industria alimentaria al facilitar su manejo y almacenamiento posterior.

Así, se procedió a optimizar la preparación de los complejos sólidos por dos vías, con la finalidad de seleccionar aquel método que ofreciese mejores prestaciones, estableciendo como criterio los valores de eficacia de complejación, carga de materia activa, constante de complejación y estabilidad obtenidos.

Para aportar solidez científica a los resultados experimentales, los complejos obtenidos siguiendo el protocolo optimizado en una etapa anterior, se caracterizaron mediante el empleo de diferentes técnicas instrumentales con el fin de simular el resultado final y confirmar la inclusión de los monoterpenos objeto

de estudio en la cavidad de HP- $\beta$ -CD. Así, los complejos sólidos de timol, carvacrol y linalol se evaluaron mediante resonancia magnética nuclear, calorimetría diferencial de barrido, termogravimetría y espectrometría infrarroja por transformada de Fourier, simulando la estructura del complejo obtenido por modelado molecular.

Una vez caracterizados los complejos, se estudió el efecto de la inclusión de timol, carvacrol y linalol en HP- $\beta$ -CDs sobre su actividad antimicrobiana, con vistas a sustentar las evidencias necesarias para una posible aplicación como conservantes naturales en la industria alimentaria. Para ello, se seleccionó un microorganismo Gram (-) como *Escherichia. coli* y otro Gram (+) como *Staphylococcus. aureus*, como vía para comparar su espectro de acción, mostrando mayor actividad antimicrobiana los complejos de timol y carvacrol obtenidos por el método de solubilidad.

Por último, se llevo a cabo un estudio para comprobar si las combinaciones binarias de los complejos de timol, carvacrol y linalol, potenciaban o no el efecto antimicrobiano con respecto al descrito en los complejos aislados, revelando los resultados obtenidos que la acción combinada de timol y carvacrol favorece la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*.

Palabras Clave: Aceites esenciales, ciclodextrinas, timol, carvacrol, linalol, antimicrobiano, complejación.

#### ABSTRACT

The demand for natural compounds in the food industry to be used as preservatives has increased significantly in recent years, mainly due to the negative perception that consumers have towards chemical synthesis compounds. Within this group of potential natural candidates, both Essential Oils and their component offer viable short-term solutions.

The presence of terpenes, such as thymol, carvacrol and linalool, has a marked influence on the biological properties attributed to them. Although different studies have demonstrated the potential antifungal, antimutagenic, anticancer, antiviral, anti-oxidant, anti-diabetic and anti-inflammatory activity of

these monoterpenes, to date its application in the food industry is limited, since they are hydrophobic, action-sensitive compounds of external agents such as oxygen, ultraviolet light and temperature, also undergoing structural modifications catalyzed by numerous oxidative enzymes. In addition, there intense aromas make it so that when incorporating them into foods, they modify their organoleptic properties provoking the rejection of the consumer; and may even cause contact or ingestion allergies to the concentrations usually employed in fragrances and perfumes, constituting a drawback for their formulation and manipulation prior to their possible application in different industrial sectors (food, cosmetic, chemical or pharmaceutical, among others).

Thus, given the benefits attributed to Essential Oils, it would be interesting to be able to develop strategies to overcome the intrinsic drawbacks to their physicochemical properties, which have so far restricted their wide use. Thus, among the possible alternative solutions we propose the use of CDs, cyclic sugars that have the ability to form inclusion complexes with a large number of substances, increasing their solubility and exerting a protective effect against external environmental factors.

Based on all of the above, the main objective of this doctoral thesis was the study of the complexation of thymol, carvacrol and linalool in various types of native and modified CDs, as a preliminary step to later evaluate the effect of complexation on its antimicrobial activity.

Firstly, the study of thymol, carvacrol and linalool was carried out at different pH values, to optimize the type of CD and reaction medium that support the higher value of complexation constant. Once the ability of HP- $\beta$ -CDs to form inclusion complexes with the analytes under study was demonstrated and given their higher efficiency at neutral pH with respect to the natives tested, HP- $\beta$ -CDs were selected for the formation of inclusion at neutral pH by two methods, the solubility and the microwave irradiation, subsequently atomising the solutions in *Spray Dryer* to obtain solid particles, as they could be very useful in the food industry by facilitating their handling and subsequent storage .

Thus, we proceeded to optimize the preparation of the solid complexes in two ways, in order to select the method that offered the best performance,

establishing as criteria the values of complexing efficiency, active matter loading, complexation constant and stability obtained.

In order to provide scientific robustness to the experimental results, the complexes obtained following the protocol optimized in an earlier stage, were characterized by the use of different instrumental techniques in order to simulate the final result and confirm the inclusion of the monoterpenes object of study in the cavity of HP- $\beta$ -CD. Thus, the solid complexes of thymol, carvacrol and linalool were evaluated by nuclear magnetic resonance, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and infrared spectrometry by Fourier transform, simulating the structure of the complex obtained by molecular modeling

Once the complexes were characterized, the effect of the inclusion of thymol, carvacrol and linalool on HP- $\beta$ -CDs on their antimicrobial activity was studied, in order to support the evidence necessary for a possible application as natural preservatives in the food industry. For this purpose, a Gram (-) microorganism was selected as *Escherichia coli* and another Gram (+) as *Staphylococcus aureus* was selected as a way to compare its action spectrum, showing more antimicrobial activity thymol and carvacrol complexes obtained by the solubility.

Finally, a study was carried out to verify if the binary combinations of the thymol, carvacrol and linalool complexes enhanced or not the antimicrobial effect with respect to that described in the isolated complexes, revealing the obtained results that the combined action of thymol and carvacrol favors antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*.

Key words: Essential oils, cyclodextrins, thymol, carvacrol, linalool, antimicrobial, complexation.



## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**





## 1. ACEITES ESENCIALES

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) son líquidos aceitosos y aromáticos obtenidos a partir de diferentes partes de una planta (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, madera, frutos y raíces) (Burt, 2004). Están formados por una mezcla compleja de más de 100 moléculas de bajo peso molecular, habitualmente por debajo de 500 daltons, que pertenecen a diferentes familias de compuestos orgánicos: alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos. Los AE pueden obtenerse directamente (por ejemplo, exprimiendo frutos cítricos), o aplicando diferentes protocolos de extracción convencionales utilizando combinaciones de disolventes de naturaleza apolar y más avanzados mediante fluidos supercríticos y presurizados, seguidos habitualmente de una destilación por arrastre con vapor, para aumentar la pureza (Masango, 2005).

La mayoría de AE se extraen de plantas aromáticas localizadas en zonas templadas y cálidas de nuestro planeta, criterios que cumplen la cuenca mediterránea y áreas tropicales. Son líquidos volátiles, cristalinos, ocasionalmente coloreados, solubles en disolventes orgánicos y generalmente menos densos que el agua. Los AE son sintetizados, almacenados y liberados al ambiente por una gran variedad de estructuras epidérmicas especializadas de las plantas, cuya morfología es característica de cada grupo taxonómico. Sin embargo, la mayoría de las especies almacenan los compuestos volátiles sintetizados en una estructuras denominadas tricomas glandulares (Usano-Aleman y col., 2014).

Los AE se conocen desde la Edad Media debido a sus propiedades antisépticas, terapéuticas y por su intenso aroma, despertando un gran interés para la conservación de alimentos. La diferencia en sus perfiles organolépticos está condicionada por su composición química y riqueza, características que determinan sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Burt, 2004), que han despertado el interés de grandes compañías relacionadas con la alimentación humana y animal, farmacia y cosmética (Maguna y col., 2006; Rodríguez, 2011).

## 1.2. HISTORIA DE LOS AE

Las plantas aromáticas han sido cultivadas desde tiempo inmemorial, con el fin de mejorar el sabor de las comidas y perfumar al ser humano. De estas plantas aromáticas se obtienen sus AE, ampliamente conocidos debido a sus características balsámicas y antisépticas, aplicados inicialmente como sustancias odoríferas en ceremonias religiosas y perfumes (Woorwood, 2012).

La primera evidencia escrita sobre AE proviene de Egipto, China, India, Arabia, Persia y Grecia, que recogen los sofisticados conocimientos y tradiciones que imperaban en el cultivo y empleo de hierbas y especias (Loewenfeld y Back, 1980). En el Antiguo Testamento aparecen una gran cantidad de testimonios sobre el conocimiento y uso de los AE, de hecho en el libro del Éxodo 30: 23-25, se describe una fórmula para la creación de un bálsamo para la santa unción (Martínez, 2012).

Las primeras destilaciones de los AE se efectuaron en Egipto, Persia e India; sin embargo, y al igual que ocurre en otras áreas, estas primitivas destilaciones alcanzaron su máximo desarrollo en Occidente. Las conclusiones obtenidas sobre el uso de estas rudimentarias destilaciones son poco claras y escasas. De hecho, sólo aparecen reseñas sobre los AE en los manuscritos de los grandes historiadores como Herodoto, Plinio y su contemporáneo Dioscórides, siendo el aceite de trementina el primer AE mencionado por los historiadores griegos y romanos (Guenther, 2013).

En la Antigua Grecia, Roma y sobre todo a partir de la Edad Media, comienzan a elaborarse y distribuirse AE aplicando procedimientos bastante alejados de las técnicas usadas en la actualidad. Los “aceites olorosos” se podían obtener después de un tiempo de maceración de las flores, raíces u otras partes de las plantas, junto con aceite en envases cerrados. La primera descripción auténtica de la destilación de un AE fue llevada a cabo por Arnald de Villanova, quien especificó detalladamente el proceso de destilación del AE de trementina (Guenther, 2013).

En el s. XIII, los AE se producían en farmacias y sus aplicaciones ya eran descritas en farmacopeias (Bauer y col., 2001), pero hay fuertes evidencias de que su producción y su uso no se generalizó hasta mediados del s. XVI, época en la que comenzaron a comercializarse en Londres (Crosthwaite, 1998). Cabe

señalar que en la obra de Water Reiff (Frankfort, 1556), “New Gross Destillirbuch”, aparece la primera referencia sobre la industria francesa de AE y su comercialización. En consonancia con el físico francés Du Chesne, en su obra “Pharmacopoea Dogmaticorum Restituta” (1607), afirma que la preparación de los AE era conocida por todo el mundo, hasta para los aprendices y que además, las farmacias comercializaban de 15 a 20 tipos diferentes (Guenther, 2013). Junto a los avances alcanzados en la obtención de AE, se desarrollaron simultáneamente nuevas técnicas de fraccionamiento y caracterización.

A finales del s. XVIII con Lavoisier (1743-1794), comenzó una auténtica revolución de la química de los AE, ya que plantea un nuevo enfoque sobre la naturaleza de las sustancias que componen estas mezclas y la forma de separarlas para conseguir su identificación. Pero fue Houton años más tarde (1887), el primero en establecer la relación carbono/hidrógeno, la cual se confirmó en estudios posteriores para todos los hemiterpenos, terpenos, sesquiterpenos y politerpenos. Pero fue Wallach en 1918, quien sentó las bases de los terpenos y su clasificación (Guenther, 2013). Debido a los avances en la caracterización y propiedades de los AE, su aplicación en diferentes campos se ha ido ampliando a lo largo de los años. De la Croix en 1881, llevó a cabo los primeros ensayos sobre las propiedades bactericidas de los vapores de los AE (Boyle, 1955), no obstante, a lo largo de los siglos XIX y XX, el uso de los AE con fines médicos pasó a un segundo plano, dando mayor importancia a su uso como aromatizantes (Guenther, 2013).

### 1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS AE

Los AE se clasifican en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su **consistencia**, los AE se clasifican en fluidos, bálsamos y oleorresinas. Las Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los Bálsamos tienen consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, como por ejemplo el bálsamo de Perú o el bálsamo de Tolú. Según la definición de la Comunidad Económica Europea (CEE), las Oleorresinas son “extractos de especias de los que se ha evaporado el disolvente de extracción, dejando una mezcla del aceite volátil y el material

resinoso de la especia”, como por ejemplo la oleorresina del pimentón, pimienta negra o el clavo (Directiva 95/2/CE).

Según su **origen**, los AE se clasifican en naturales, artificiales y sintéticos. Los *naturales* se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, y debido al bajo rendimiento que se obtiene, son muy caros. Los *artificiales* se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Como su nombre indica, los *sintéticos* se obtienen combinando sus componentes aplicando protocolos químicos de síntesis. En consecuencia, son más económicos y, por tanto, mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes como por ejemplo las esencias de vainilla, limón, y fresa (Martínez, 2001).

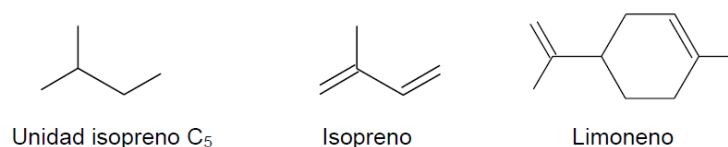
Según su **naturaleza química**, la mayoría son mezclas muy complejas de sustancias químicas. La proporción de estas sustancias cambia de un aceite a otro, variación que también se produce durante las estaciones, a lo largo del día, según las condiciones de cultivo y genética de la planta, por ello se pueden clasificar según sus componentes mayoritarios. Así, los AE ricos en monoterpenos se denominan monoterpenoides (albahaca, salvia, hierbabuena, etc.), los que ricos en sesquiterpenos, sesquiterpenoides (pino, copaiba, etc.) y los ricos en fenilpropanos se denominan fenilpropanoides (clavo, canela, anís, etc.) (Martínez, 2001).

#### 1.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS AE

Los AE son mezclas naturales muy complejas, que pueden contener de 20 a 60 componentes a diferentes concentraciones. En todos ellos identificamos concentraciones elevadas (20-70%) de dos o tres componentes mayoritarios, apareciendo niveles traza del resto de componentes. Habitualmente, aquellos componentes que aparecen en mayor proporción son los que determinan sus propiedades biológicas (Pavela, 2015) y entre estos grupos mayoritarios se encuentran por un lado los **terpenos y terpenoides**, y por otro, los **componentes aromáticos**, caracterizados todos ellos por su bajo peso molecular y elevada volatilidad (Bakkali y col., 2008).

### 1.4.1 Terpenos

Los terpenos son lípidos insaponificables, constituidos por dos o más moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (**Figura I.1**) formando estructuras lineales, cíclicas o bien pueden presentar ambas en la misma molécula. Dentro de este grupo también encontramos los terpenoides, que son terpenos que han sufrido modificación enzimática, que provoca la incorporación a la molécula átomos de oxígeno y el reagrupamiento o deleción de grupos metilo (Burt, 2004).

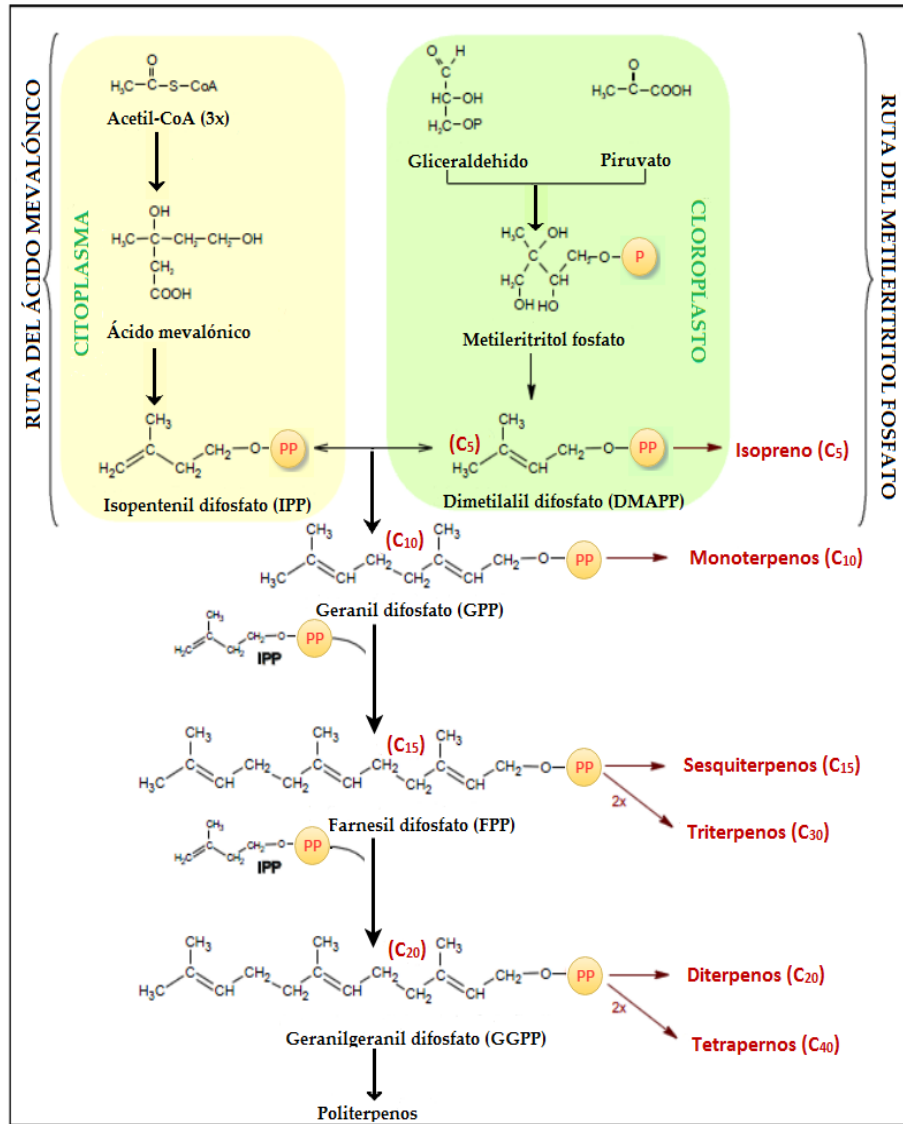


**Figura I.1:** Unidades de isopreno.

Los terpenos se consideran metabolitos secundarios y derivan de la ruta del mevalonato (MEV) o bien de la ruta del metileritritol fosfato (MEP). La primera ruta tiene lugar en el citosol y genera los isoprenoides (ubiquinona, esteroides, citoquininas y brasinosteroides) y la segunda que da lugar a la síntesis de los mono- (C<sub>10</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), carotenoides, la cadena lateral de las clorofilas, plastoquinona, tocoferoles, las hormonas giberelinas y el ácido abscísico, se produce en los plastos (Azcon y Talón, 2008). Estas rutas básicas de la biosíntesis de terpenos se representan en la **Figura I.2**.

La primera etapa de la biosíntesis de estos compuestos es la condensación de isopentil pirofosfato (IPP) (C<sub>5</sub>) y su isómero, el dimetil-alil pirofosfato (DMAPP). En la ruta del MEV, las unidades de isopreno se generan a partir del acetil-CoA, mientras que en la del MEP, se forman a partir de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (GA-3P). En consecuencia, el IPP y el DMAPP son utilizados por prenil transferasas para producir precursores de geranil difosfato (GPP) (precursor inmediato de los monoterpenos), farnesil difosfato (FPP) (precursor inmediato de los sesquiterpenos) y geranil geranil difosfato (GGPP) (precursor de los diterpenos y tetraterpenos). Sobre los diferentes precursores inmediatos actúan diferentes enzimas, denominadas genéricamente como terpeno

sintasas (TPSs), que producen los distintos tipos de terpenoides (Aharoni y col., 2005; Roberts, 2007; Kant y col., 2009; Granell y Rambla., 2013).



**Figura I.2.** Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contiene (Ávalos y Pérez, 2009).

Esta ruta biosintética da lugar tanto a metabolitos primarios como a secundarios, de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios encontramos hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides (xantofilas y carotenos), ubiquinonas y esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Actualmente se estima que de los 3.000 compuestos que forman el grupo de los terpenos, alrededor de unos 300 presentan un gran interés para la industria farmacéutica, alimenticia, sanitaria y cosmética (De la Rosa y col, 2010).

Los componentes fundamentales de los AE son los **monoterpenos** (C<sub>10</sub>), los cuales representan el 90% del total. Los monoterpenos son abundantes en familias de angiospermas dicotiledoneas como, *Myrtaceae*, *Asteraceae*, *Lauraceae*, *Apiaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae* (Azimova, 2012). En general, hacemos referencia a *i*) monoterpenos regulares, cuando se originan por la fusión “cabeza-cola” de dos unidades de isopreno, es decir, enlazando el carbono 1(C<sub>1</sub>) de la primera unidad de IPP y el carbono 4 (C<sub>4</sub>) de la segunda, y a *ii*) monoterpenos irregulares, cuando la fusión es de tipo “cabeza-mitad”, el carbono 1(C<sub>1</sub>) de la primera unidad de isopreno se une al carbono 2 ó 3 de la segunda. A partir de esta primera diferenciación, los monoterpenos se pueden subdividir atendiendo al número de ciclos que presentan en: acíclicos, monocíclicos y bicíclicos (Croteau y col, 2000) y los más representativos se recogen en la **Tabla I.1**.

Los **sesquiterpenos** (C<sub>15</sub>) son un amplio grupo de terpenoides formados por 3 moléculas de IPP que presenta más de 200 estructuras cíclicas diferentes; la ciclación del FPP ocurre por el mismo mecanismo que la ciclación del GPP y algunas sesquiterpeno sintetasas son capaces de dar lugar a más de 25 productos diferentes. Los cinco carbonos y el doble enlace adicional permiten un aumento de la flexibilidad de la cadena y la formación de un mayor número de estructuras; muchos de estos sesquiterpenos intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas y sus funciones son similares a las de los monoterpenos.

**Tabla I.1.:** *Monoterpenos más frecuentes de los AE (Yúfera, 2009).*

<b>Monoterpenos regulares</b>	<b>Carburos</b> Acíclicos: mirceno, Ocimeno. Monocíclicos: terpinenos, <i>p</i> -cimeno, felandreno Bicíclicos: pinenos, 3-careno, camfeno, sabineno
	<b>Alcoholes</b> Acíclicos: geraniol, linalol, citronelol, lavandulol, nerol Monocíclicos: $\alpha$ -terpineol, carveol Bicíclicos: borneol, fenchol, crisantenol, isopinocamfenol
	<b>Cetonas</b> Acíclicos: tegetona Monocíclicos: mentonas, carvona, pulegona, piperitona Bicíclico: alcanfor, fenchona, tujona, ombelulona, pinocamfona, pinocarvona
	<b>Esteres</b> Acíclicos: linalil acetato, propionato, acetato de citronelilo Monocíclicos: mentol, $\alpha$ -terpinil acetato Bicíclico: acetato de isobornilo
	<b>Éteres</b> Acíclicos: 1,8- cineol (eucaliptol), mentofurano
	<b>Fenoles</b> Timol y carvacrol
	<b>Monoterpenos irregulares</b>

Al poseer una unidad de isopreno más que los monoterpenos, los sesquiterpenos presentan una mayor plasticidad en su construcción, lo que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional (Palá, 2002). Las estructuras más importantes quedan detalladas en la **Tabla I.2.**



**Tabla I.2.:** *Sesquiterpenos más frecuentes de los AE (Yúfera, 2009).*

<b>Carburos</b>
Monocíclicos: bisaboleno, $\beta$ -elemeno
Bicíclicos: $\beta$ -selineno, azuleno, $\beta$ -cariofileno
<b>Alcoholes</b>
Acíclicos: farnesol y nerolidol
<b>Cetonas</b>
Monocíclicos: germacrona, turmerona
Bicíclico: nootkatona, $\beta$ -vetivona
<b>Esteres</b>
Bicíclico: acetato de cedrilo

Las principales fuentes de estos compuestos son las siguientes: angélica, bergamota, apio, menta, naranja, romero y salvia (Sánchez y Restrepo 2009; Pavela y Vrchotová, 2013; Russo y col., 2013; Tawfeeqa y col., 2016; Cvetkovikja y col, 2016).

Los **diterpenos** ( $C_{20}$ ) son otra gran familia de terpenoides que encontramos en los AE junto a monoterpenos ( $C_{10}$ ) y sesquiterpenos ( $C_{15}$ ). Se trata de compuestos con 20 átomos de carbono (cuatro unidades de IPP), por lo que su peso molecular es superior al de monoterpenos y sesquiterpenos, y muestran menor volatilidad (Yúfera, 2009).

Estos productos naturales exhiben una amplia gama de actividades biológicas beneficiosas para la salud humana, tales como anti-VIH, anti-tumorales, antidiabéticas, y antibacteriana (Devappa y col, 2011, Bonito y col, 2011), además poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. En ocasiones, también se han descrito efectos adversos, efecto hipercolesterolémico atribuido al cafestol (Bonita y col, 2007), no atribuible a la dosis empleada.

Los **tetraterpenos** ( $C_{40}$ ) se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal, ya que esta familia está formada por los carotenoides, que deben su nombre al hidrocarburo altamente insaturado caroteno, los cuales se forman mediante la unión "cola-cola" de dos moléculas de GGPP. Estos compuestos solo son capaces de sintetizarlos las plantas, algas, bacterias y ciertos hongos (Pizarro y Stange, 2009).

### 1.4.2. Compuestos aromáticos

Otra categoría de los AE son los compuestos de naturaleza química aromática como los fenilpropanoides, los cuales están formados por un esqueleto de fenilpropano. Son menos frecuentes que los terpenos y sus funciones son similares a las de los monoterpenos y sesquiterpenos (Gómez-Torrente, 2015). Entre ellos destacan los compuestos aromáticos que se muestran en la **Tabla I.3**.

**Tabla I.3.** Algunos componentes aromáticos presentes en los AE.

<b>Aldehidos</b> Cinamaldehido
<b>Alcoholes</b> Alcohol cinámico
<b>Fenoles</b> Chavicol, eugenol
<b>Derivados metoxi</b> Anetol, estragol y metileugenol
<b>Compuestos metilendioxi</b> Apiol, miristicina, safrol

Las principales fuentes de estos compuestos son las plantas pertenecientes a las siguientes familias: *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae* y *Rutaceae* (Chami y col., 2004), encontrando altas concentraciones en anís, canela, clavo e hinojo (Grayson, 2000).

### 1.5. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS AE

Los efectos biológicos de los AE están directamente relacionados con la presencia de terpenos y compuestos aromáticos (Mahmoud y Croteau, 2002; Bakkali y col., 2008), pero esta composición puede variar considerablemente según la influencia de factores ambientales como la humedad, tipo de suelo, temperatura y período de recolección, condicionando en el momento de obtención del aceite la riqueza de unos compuestos u otros, modificando así sus

propiedades biológicas (Sarrazin y col., 2015; Evergetis y col., 2016; Kiazolu y col., 2016; Almeida y col., 2016).

### 1.5.1. Actividad antifúngica

Ciertos compuestos presentes en los AE, interfieren el metabolismo celular de la mayoría de especies de hongos, inhibiendo en consecuencia el crecimiento del micelio y la germinación posterior de las esporas (Serrano y col., 2005; Tzortzakis, 2007a, 2007b; Regnier y col., 2010).

Se ha evidenciado que la hidrofobicidad de los AE y de sus componentes, provocan el fraccionamiento de la capa lipídica de las membranas celulares de los hongos, y en consecuencia, la integridad celular, ya que interrumpen las estructuras de membrana. Estos cambios en la hidrofobicidad de la membrana, permiten una mayor permeabilidad en el intercambio catiónico de iones  $H^+$  y  $K^+$ . Este hecho origina cambios en el flujo de protones y el pH celular, altera los gradientes iónicos; además modifica la composición química de las células fúngicas y los procesos metabólicos en el hongo, conduciendo esta cascada de procesos a la muerte celular (Beckman, 2000).

Recientemente se ha postulado que la deformación y disfunción de la membrana podría dar lugar a interferencias en la generación de ATP dentro de la célula fúngica, debido principalmente a la inhibición de enzimas y sustratos implicados en la producción de ATP (Coutinho y col., 2011; El-Mogy y Alsanius, 2012).

Por otra parte, los AE también inhiben la germinación de las esporas, la elongación del tubo germinal y el crecimiento del micelio de los hongos. Estos procesos se originan por la vacuolización del citoplasma, la aparición de numerosos lisosomas y el desprendimiento de la membrana plasmática de la pared celular debido a la delgadez de las capas fibrilares, provocando así la pérdida de integridad celular (da Cruz y col., 2013).

Numerosos trabajos han descrito la actividad antifúngica de los AE, como el de *Lavandula sp.*, frente a *Cryptococcus neoformans* (Khosravi y col., 2011; Zuzarte y col., 2011, 2012), el de *Mentha piperita* frente *Mucor ramannianus* (Agarwal y col., 2008, Mkaddem y col., 2009) o el de camomila extraído de *Matricaria chamomilla*

frente a *Aspergillus niger* (Tolouee y col., 2010). Otros autores han identificado a los componentes responsables de esta actividad.

Así, Zore y col. (2011) evidenciaron que los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de eucalipto, árbol de té y geranio, citral, citronelol, geraniol y acetato de geranil respectivamente, son los responsables del bloqueo del ciclo celular de *Candida albicans* en la fase S. En un trabajo similar, Rao y col. (2010), atribuyeron a eugenol, timol y carvacrol (componentes mayoritarios del aceite esencial de clavo, tomillo y orégano respectivamente), la inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que afectan a la homeostasis al reducir la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$ .

Otros autores han demostrado que los AE merman la fluidez de la membrana, ocasionando la pérdida del contenido y, por tanto de su viabilidad. Así, se ha descrito que el aceite de árbol de té altera la permeabilidad de la membrana y la cadena respiratoria de *C. albicans*, provocando su muerte (Hammer y col., 2004; Carson y col., 2006).

### 1.5.2. Actividad antimutagénica

Según Zaveri y col. (2011), cualquier agente capaz de provocar daño en el ADN o en la proliferación celular, puede aumentar la tasa de mutación, alterando así la regulación del ciclo celular, promoviendo a una división celular incontrolada, que es la génesis del cáncer. Sin embargo, las sustancias con efecto antimutagénico, entre ellas ciertos metabolitos secundarios presentes en los AE, pueden ayudar a fortalecer las defensas celulares frente a mutágenos ambientales y el estrés oxidativo (Kaur y col., 2010). Así, se ha evidenciado que los AE de *Melaleuca alternifolia* y *Lavandula angustifolia*, presentan efecto antimutagénico *in vivo*, ya que inhiben las mutaciones inducidas en un modelo de *Escherichia coli* (Evandri y col., 2005).

Se postula que el efecto antimutagénico de los AE se debe a su capacidad para inhibir la penetración de mutágenos al interior de las células, la eliminación de radicales libres y la activación de ciertas enzimas (Sharma y col., 2001; Ipek y col., 2005). Además, se ha demostrado que un componente mayoritario del té verde, [-]-epigallocatecina-3-galato, es un potente inhibidor de enzimas de fase I, como el citocromo P450 (Gomes-Carneiro y col., 2005).

Diversos autores han comprobado que el aceite esencial de jengibre y el de cúrcuma tienen potencial antimutagénico, ya que son capaces de inhibir la acción directa de ciertos mutágenos de síntesis química, como la azida sódica, 4-nitro-*o*-fenilendiamina, extracto de tabaco, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, y 2-acetamido fluoreno (Jeena y col., 2014; Liju y col., 2014).

Gulluce y col. (2012) han demostrado que los derivados de luteolina (7-O-glucósido de luteolina y 7-O-xilósido de luteolina), componentes del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) tienen la capacidad de inhibir la unión del agente mutagénico (9-AA) al ADN.

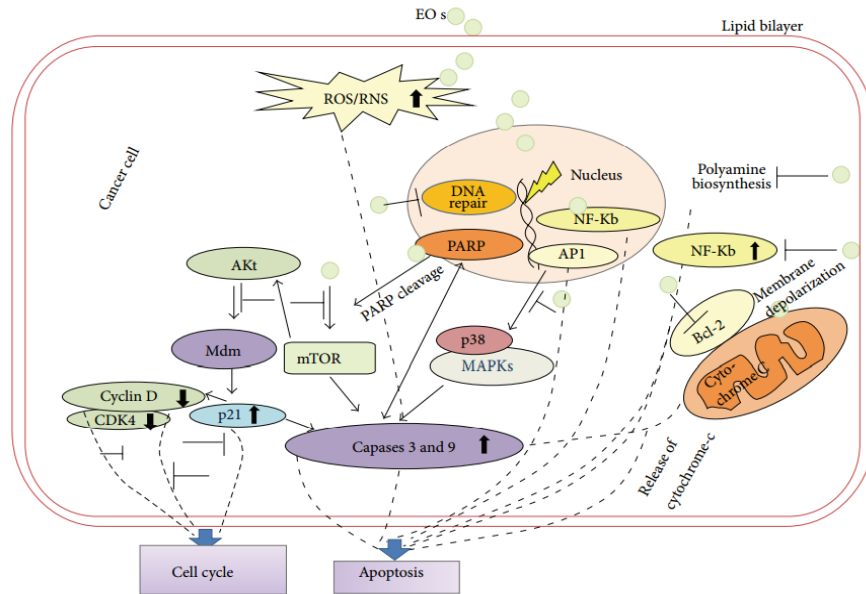
Además, se ha descrito que los AE promueven la reparación del ADN y son capaces de inducir apoptosis (Guatam y col., 2014).

### 1.5.3. Actividad anticancerígena

En la bibliografía encontramos numerosas evidencias del efecto protector que ejercen determinados componentes de los AE sobre diferentes tipos de cáncer. Así, se identifica a  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y 1,8 cineol, componentes principales del aceite esencial de romero, como responsables del efecto citotóxico sobre la línea celular SKOV3 del cáncer de ovario (Wang y col., 2012); también se ha descrito que el ácido boswético obtenido del aceite esencial de incienso, es capaz de suprimir la viabilidad de las células del cáncer de páncreas, mediante la activación de la cascada de las caspasas (**Figura I.3**) y la supresión de los niveles de expresión de la ciclina D1 (Ni y col., 2012).

Se ha descrito que los componentes principales del aceite esencial de *Thymus citrodorus*, borneol, timol, 3,7-dimetil - 1, 6 - octadieno - 3 - ol, 1 -metil- 4-[hidroxi -  $\alpha$  -isopropil] ciclohexeno, y terpenos, como el alcanfor, son los responsables de la activación de la apoptosis en la línea celular HepG2 del cáncer de hígado, mediante la inhibición de la activación de la vía NF- $\kappa$ B (Wu y col., 2013).

La eficacia de este aceite ha sido evidenciada por Ferruelo y col. (2014), verificando que la actividad de la vía de señalización NF- $\kappa$ B, está implicada en diferentes tipos de tumores.



**Figura I.3:** Mecanismo de acción de los AE en células cancerosas (Gautam y col., 2014).

En la **Tabla I.4** se describe el efecto anticancerígeno y la actividad antitumoral de diferentes AE.

Estos hallazgos ponen de manifiesto el interés científico y farmacéutico mostrado desde hace aproximadamente una década, hacia los AE (compuestos naturales), debido al aumento de la resistencia a los agentes quimioterapéuticos y a la recurrencia de los tumores (Liu, 2009), ya que se ha comprobado que pueden llegar a tener el mismo efecto que los medicamentos; por ejemplo, el aceite esencial de *Stevia rebaudiana*, rico en monoterpenos y sesquiterpenos, muestra una actividad citotóxica (a 400 mg/mL), comparable a la del fármaco vinblastina (Mann y col., 2014).

**Tabla I.4:** *Potencial anticancerígeno de los AE (Raut y Karuppaiyil, 2014).*

Actividad antitumoral	Aceites esenciales	Referencias
Inhibición de la proliferación de la leucemia murina y de las líneas de celulares del carcinoma epidérmico de la boca	<i>Alpinia officinarum</i> ; <i>Citrus hystrix</i> ; <i>C. paradise</i> (pomelo); <i>Curcuma longa</i> (Cúrcuma); <i>Cymbopogon nardus</i> (Citronella grass); <i>Cymbopogon martini</i> ; <i>Lavandula angustifolia</i> ; <i>Mentha spicata</i>	Hata y col., 2003; Carneseccchi y col. 2004; Koo y col., 2004; Manosroi y col., 2006
Inducción de la apoptosis en las células de hepatocarcinoma.	<i>Artemisia annua</i>	Li y col., 2004
Inhibición del cáncer primario de hígado.	<i>Curcuma aromatica</i> (Curcuma)	Manosroi y col., 2006; Wen Ma y col., 2016
Quimiopreención de varios tipos de cáncer	<i>Allium sativum</i> ; <i>Elaeis guineensis</i> (Aceite de Palma)	Milner, 2001; Luk y col., 2011
Inhibición del cáncer de colon e inducción de la apoptosis en neuroblastoma	<i>Myristica fragrans</i>	Piras y col., 2012; Lee y col., 2005
Inhibición del crecimiento de diferentes líneas celulares de cáncer de mama.	<i>Foeniculum vulgare</i> ; <i>Boswellia sacra</i>	Ozbek y col., 2003; Suhail y col., 2011

#### 1.5.4. Actividad antiviral

Además de la actividad antimicrobiana, las plantas poseen una marcada actividad antiviral, ya que se ha comprobado que la inhibición de la replicación viral se debe a la presencia en los AE, de monoterpenos y sesquiterpenos (Astani y col., 2011).

Se ha demostrado que el aceite esencial de tomillo (*Thymus sp*) es capaz de inhibir la replicación del virus Epstein-Bar (Hamid y col., 2011), o que los aceites

de eucalipto, tomillo o menta son capaces de inhibir la actividad del virus herpes (Schnitzler y col., 2007; Reichling y col., 2005; Civitelli y col., 2014). Además, estudios recientes llevados a cabo por Elizaquivel y col. (2013), han evidenciado que los AE de clavo, orégano y zataria, reducen la infectividad de los norovirus calicivirus felino (FCV) y murino (MNV-1).

Por otro lado, el componente fundamental de *Lippia citriodora*, que es el geranial, y el de *Pimenta racemosa* (eugenol), son los AE más efectivos frente al virus del Dengue y el de la fiebre amarilla (Meneses y col., 2009). El eugenol, componente mayoritario de los AE de clavo, canela y albahaca, presenta efectos antivirales debido a la inhibición de *i*) la peroxidación lipídica y *ii*) la replicación de ARN y ADN vírico (Benencia y Courregs, 1999; De Logu y col., 2000; Minami y col., 2003).

#### 1.5.5. Actividad antioxidante

Se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno (ROS) provocan daño en las macromoléculas celulares (McCord, 2000). Este daño oxidativo se ha relacionado con numerosos problemas de salud, tales como el envejecimiento, la arteriosclerosis, el cáncer, alzheimer, parkinson, la diabetes y el asma (Edris, 2007).

El equilibrio celular de los radicales libres se mantiene gracias a la actividad de ciertos compuestos antioxidantes, que ralentizan la oxidación deslocalizando (secuestrando) radicales libres gracias a sus estructuras aromáticas, actuando a nivel intracelular o bien en las membranas de las células, para proteger a los diferentes órganos y sistemas (Raut y Karuppayil, 2014).

Los flavonoides, terpenoides y componentes fenólicos de los AE presentan importantes efectos antioxidantes (Tomaino y col., 2005; Ferguson y Philpott, 2008; Miguel, 2010; Cavar y col., 2012; Sánchez-Vioque y col., 2013); entre ellos, los obtenidos de *Origanum majorana*, *Filifolia tagetes*, *Bacopa monnieri* y *C. longa* muestran una elevada actividad antioxidante (Maestri y col., 2006; Maheshwari y col., 2006; Tripathi y col., 2007), así como los *Salvia cryptantha* y *S. multicaulis*, *Achillea millefolium*, *Melissa officinalis*, *Malelula alternifolia*, *Zedoaria Curcuma*; *Ocimum sp.* y *Mentha sp.* (Gulluce y col., 2007; Hussain y col., 2008; Kimetal, 2004; Politeo y col., 2007; Tepe y col., 2004).



Esta capacidad antioxidante va a depender de los componentes que conforman los diversos AE; por ejemplo los AE de eucalipto deben su actividad antioxidante a la presencia de 1,8- cineol (*Eucalyptus globulus*) y limoneno (*Eucalyptus radiata*); el primero de ellos muestra varias vías de reducción de la oxidación, ya que además de secuestrar radicales libres, tiene poder quelante, protegiendo así la molécula de ADN frente a la oxidación (Horvathova y col., 2014); el limoneno por su parte, muestra también una elevada capacidad antioxidante (Amiri, 2012).

El AE de cilantro, cuyo componente mayoritario es el linalol, tiene una actividad antioxidante tan elevada que puede sustituir a los antioxidantes sintéticos utilizados habitualmente en la industria alimentaria (Laribi y col., 2015; Samojlik y col., 2010; Silva y Domingues, 2015).

La actividad antioxidante de los AE se determina aplicando diferentes métodos como el ORAC, ABTS, DPPH o FRAP (Bentayeb y col., 2014; Dawidowicz y Olszowy, 2014, Huang y col., 2005; Rubio y col., 2013).

En general, los AE con mejor captación de radicales libres muestran mayor actividad antioxidante: clavo> canela> nuez moscada> albahaca> orégano> tomillo (Tomaino y col., 2005).

#### **1.5.6. Actividad antidiabética**

Desde el punto de vista clínico de la diabetes tipo 1, se detecta una deficiencia de insulina de origen autoinmunitario debido a una destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas, mientras que en la diabetes mellitus de tipo 2 se produce una resistencia progresiva a la acción periférica de la insulina, con o sin déficit asociado en la secreción.

Se prescriben habitualmente diferentes fármacos para el control de la hipoglucemia, no exentos de efectos secundarios no deseados. En este sentido, se va haciendo cada vez más patente la búsqueda de estrategias y remedios naturales para prevenir el desarrollo y progresión de ciertas patologías.

Habitualmente, la mayoría de personas que buscan una cura natural para la diabetes son aquellas que están cansadas de la ingesta de dosis crecientes de fármacos, sin una mejora apreciable de la enfermedad (Marles y Farnsworth, 1995; Dahanukaretal, 2000).

Movidos por la situación desesperada de los diabéticos, diferentes compañías oportunistas han encontrado un filón, de hecho existen actualmente en el mercado una gran cantidad de remedios alternativos y suplementos naturales que prometen y aseguran una cura para la diabetes.

Lo que debemos preguntarnos es si realmente lo que ofrecen sus productos es tan efectivo como sus anuncios sugieren, si sus efectos han sido contrastados científicamente, si han sido adulterados con sustancias no permitidas y si tienen autorización para su venta, ya que al margen de parafarmacias, mercados tradicionales y herbolarios, diferentes páginas web ofrecen productos anónimos (fármacos falsificados o suplementos dietéticos) y más baratos para la diabetes, que no hacen referencia a la composición de ingredientes.

Al respecto, se ha evidenciado que el trans-anetol, componente mayoritario del AE de hinojo, inhibe la vía de activación del factor de transcripción kappa B, el cual está directamente relacionado con enfermedades inflamatorias, incluyendo la diabetes (Aggarwal y col., 2004). Además, posee propiedades hipoglucemiantes ya que puede revertir, de manera significativa, las actividades alteradas de enzimas implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono (Sheikh y col., 2015).

Por otro lado, Dongare y col. (2012) han demostrado que el AE de *Foeniculum vulgare* (familia Apiaceae), puede controlar la glucosa en ayunas, los parámetros lipídicos y la hemoglobina glucosilada en ratas diabéticas inducidas con fármaco.

En un estudio realizado en conejos diabéticos (inducidos con aloxano), a los que se les administraba una dosis diaria de 200 mg/kg de AE de romero (*Rosmarinus officinalis*), se observó una reducción significativa del nivel de glucosa en sangre, así como un aumento de la concentración de insulina. También se comprobó que inhibe la peroxidación lipídica y activa enzimas antioxidantes, por lo que se cree que el efecto antidiabético de *R. officinalis* se debe a su marcado potencial antioxidante (Bakirel y col., 2008).

#### **1.5.7. Actividad anti-inflamatoria**

La inflamación es una respuesta protectora normal inducida por la lesión de tejidos o la infección. Para eliminar las células muertas o dañadas, se produce una

respuesta inflamatoria que provoca un aumento de la permeabilidad de las células endoteliales de cubierta, y el incremento de leucocitos en sangre, dando lugar al denominado “estallido oxidativo”, que conduce a la liberación de citoquinas (Gomes, 2008).

Se ha evidenciado que los AE de eucalipto, romero, lavanda, pino, clavo y mirra, tienen la capacidad de prevenir la respuesta inflamatoria (Darshan y Doreswamy, 2004; Barbieri Xavier y col., 2013). Se postula que los AE intervienen durante la explosión oxidativa de la reacción inflamatoria, donde se forman ROS, ya que son capaces de secuestrar los radicales libres. La actividad antiinflamatoria de los AE se puede atribuir no sólo a su actividad antioxidante, sino también a sus interacciones con la cascada de señalización que implica a las citoquinas, a la regulación de los factores de transcripción y a la expresión de genes pro-inflamatorios (**Figura I.4**) (Miguel, 2010).

Por otro lado, Arranz y col. (2015) han comprobado que la actividad antiinflamatoria de los AE de mejorana y albahaca dulce, es debida a sus componentes mayoritarios hidrato de sabineno y terpineol para mejorana y, linalol y eugenol para albahaca dulce. Estos aceites, a una concentración de 10 mg/mL, son capaces de ralentizar la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la expresión génica de LPS (lipopolisacáridos) y de ox-LPS (lipoproteínas de baja intensidad oxidadas) de las células THP-1.

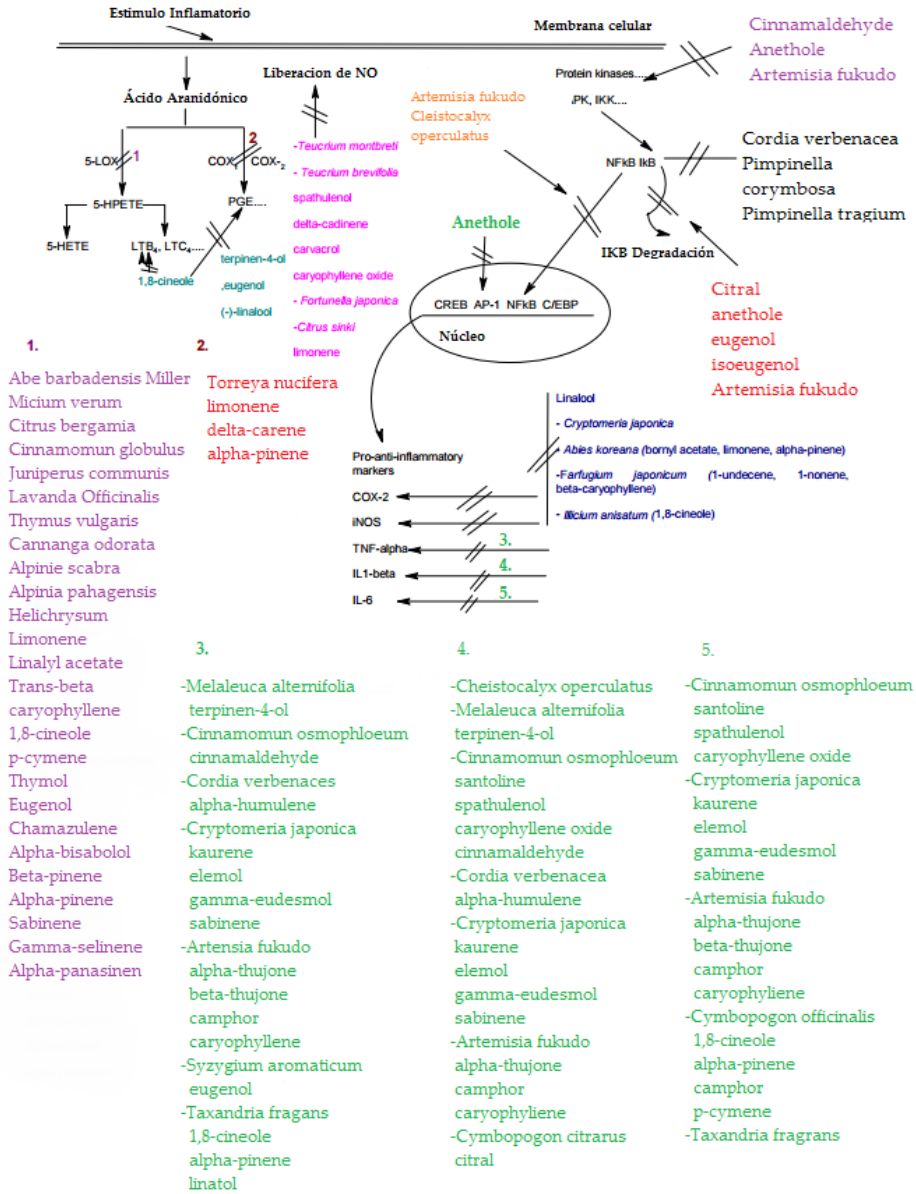


Figura I.4. Actividad antiinflamatoria de AE (Miguel, 2010).

### 1.5.8. Actividad antiprotozoos

Los protozoos son considerados seres unicelulares simples que pueden aparecer de manera individual o formando colonias y constituyen la manifestación más elemental de vida animal. Algunos de ellos son causantes de enfermedades en los seres humanos como la de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), amibiasis (*Entamoeba histolytica*), leishmaniosis (*Leishmania sp*), giardiasis (*Giardia lamblia*), tricomoniasis (*Trichomonas vaginalis*) y malaria (*Plasmodium sp.*). El nivel de gravedad de las enfermedades causadas por protozoos van desde leves a mortales, considerándose por tanto un importante problema de salud pública.

El uso de fármacos contra los protozoos está limitado debido a sus efectos secundarios, entre ellos el aumento de la resistencia y la necesidad de un uso prolongado (Sauter y col., 2012). De ahí que se estén buscando alternativas naturales al tratamiento de estas enfermedades, entre las que destacan los AE.

Así, el orégano (*Origanum Vulgare*), y los AE de *Nepeta cataria* y *Lippia alba* son capaces de inhibir el crecimiento del tripanosoma, debido a que estimulan su lisis celular. Se ha evidenciado que *Thymus vulgaris* y su principal componente (timol), poseen efecto sobre tripanosomas mediante la desestabilización de la membrana plasmática (Santoro y col., 2007; Saeidnia y Gohari, 2012). Además, los AE de *T. vulgaris* y *Allium sativum* inhiben a ciertas amebas (*Entamoeba histolítica*), atribuyendo su potencial antiamebiano a su riqueza en terpenoides timol, carvacrol y linalol (Vunda y col., 2012).

También se ha descrito que el crecimiento y adhesión de *Giardia lamblia* es impedido por los AE de *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis subsp. Sylvestris*, *O. basilicum* y *Lippia graveolens*. El tratamiento con estos aceites provoca cambios ultra-estructurales en las células, que conducen a la pérdida de su viabilidad (Almeida y col., 2007; Machado y col., 2010).

### 1.5.9. Toxicidad en tejidos

Al estar compuestos por diferentes moléculas activas y concentración de las mismas, los AE afectar de diferente forma a las células (Carson y Hammer, 2011). Habitualmente, su diana es la membrana citoplasmática (Bakkali y col., 2008), provocando su interrupción y permeabilidad, mermando así sus funciones

celulares, tales como la homeostasis y la actividad de la cadena de transporte electrónico.

En consecuencia, los AE pueden ejercer efectos citotóxicos sobre las células eucariotas, debido a la permeabilización de las membranas mitocondriales -tanto externa como interna-, provocando la muerte celular por necrosis y apoptosis (Armstrong, 2006). Los responsables de esta actividad citotóxica son los compuestos oxigenados, alcoholes, aldehídos y compuestos fenólicos, que los constituyen (Bruni y col., 2004). Esta actividad les confiere propiedades anticancerígenas, ya que pueden actuar como quimioterapéuticos frente a virus, bacterias, y hongos (Burt, 2004; Rota y col., 2004; Hammer y Carson, 2011).

Sin embargo, los efectos tóxicos que provocan los AE en las células eucariotas pueden dañar también al huésped. Así, pueden provocar irritación, sensibilización, absorción percutánea, toxicidad aguda en órganos y sistemas, fototoxicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad, limitando por ello su empleo en medicina (Raut y Karuppayil, 2014). Por ello, para el uso terapéutico se requiere disponer de una materia prima homogénea, la caracterización completa que permita identificar todos los compuestos presentes en el extracto, así como los correspondientes ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo*, que determinen el efecto individual y sinérgico de cada compuesto (Vigan, 2010).

Se ha comprobado que si bien los AE pueden ser seguros a bajas concentraciones; sin embargo, a elevadas concentraciones pueden provocar toxicidad en los seres humanos (Sinha y col., 2014), al entrar en contacto con la piel, por ingestión accidental, tras exposición a productos industriales en ensayos clínicos de toxicidad cutánea (Raut y Karuppayil, 2014).

Se ha descrito que algunos AE como el de *Mentha pulegium*, pueden causar la muerte a mascotas (mamíferos), ya que desencadena hemorragias internas y daño pulmonar en perros (Südekum y col., 1992). Además, ciertos terpenoides cetónicos como el estragol, presente en el AE de estragón, anís estrellado, anís verde, albahaca e hinojo, puede tener efectos cancerígenos al ser administrado por vía intraperitoneal, causando daños en el ADN de ratones; resultados similares se han obtenido con metil-isoeugenol (Raut y Karuppayil, 2014).

La **Tabla I.5** muestra la toxicidad en los tejidos descrita en la bibliografía para algunos AE.

En un estudio reciente se evidenció que elevadas concentraciones de los AE de palmarosa y citronela, inducen citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos, siendo el efecto similar al descrito para los terpenoides citral y geraniol. Sin embargo, concentraciones bajas de estos mismos aceites son seguros para el consumo humano (Sinha y col., 2014), no evidenciando citotoxicidad.

**Tabla I.5.:** Toxicidad en tejidos de los AE (Raut y Karuppayil, 2014).

Toxicidad	Aceites esenciales	Referencias
Efecto hepatotóxico en ratones	<i>Mentha pulegium</i> (pulegona y mentofurano)	Gordon y col., 1982; Vigan, 2010
Necrosis y vacuolización en humanos	AE cuyo componente principal sea citral	Hayes y Markovic, 2003
Diarrea y proteinuria transitoria en humanos sanos	AE cuyo componente principal sea el limoneno	Vigan, 2010; Raut y Karuppayil, 2014
Toxicidad en humanos	AE de ajeno (Artemisia absinthium), <i>M. pulegium</i> , AE cálamo ( <i>A. calamus</i> ) y AE de mostaza ( <i>Brassica nigra</i> )	Dweck, 2009; Raut y Karuppayil, 2014
Carcinogénico en humanos y ratones	AE de Cálamo ( <i>Acorus calamus</i> ) croton ( <i>Croton tiglium</i> ), albahaca ( <i>Ocimum sp.</i> ), nuez moscada ( <i>M. fragrans</i> ) rosa ( <i>Rosa sp.</i> )	Bakkali y col., 2008; SCF, 2001; SCF, 2002

#### 1.6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

En los últimos años, los efectos de los AE han sido estudiados en una amplia variedad de microorganismos, pero su efecto y modo de acción no ha podido ser elucidado detalladamente, ya que están compuestos por un elevado

número de sustancias (Hyldgaard y col., 2012). Además hay que tener en cuenta que su actividad antimicrobiana no puede ser confirmada basándose solo en la acción de uno solo de ellos (Bajpai, Baek, y Kang, 2012), ya que a su vez pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos. Diferentes autores han propuesto que la acción antimicrobiana de los AE puede ser atribuida a su habilidad para penetrar a través de las membranas bacterianas hacia el interior de la célula, provocando la inhibición de sus propiedades lipofílicas y funcionales (Bajpai y col., 2012; Fisher y Phillips, 2009; Guinoiseau y col., 2010).

Se postula que es su estructura fenólica la que provoca una respuesta antimicrobiana frente a bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (Bajpai y col., 2012; Shapira y Mimran, 2007). Estos componentes fenólicos son los responsables de la disrupción de la membrana celular, inhibiendo las propiedades funcionales de la célula, y provocando la salida de su contenido interno (Bajpai y col., 2012).

Los mecanismos de acción podrían atribuirse a la capacidad de los compuestos fenólicos para alterar la permeabilidad de la célula microbiana, dañar las membranas citoplasmáticas, interferir en el sistema de generación de energía (ATP), e interrumpir la fuerza motriz de protones (Bajpai y col., 2012; Friedly y col., 2009; Li y col., 2011). Se ha descrito que esta disrupción de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, puede provocar la muerte celular (Li y col., 2011).

Gill y col (2006) utilizaron eugenol, carvacrol y cinamaldehído, para evidenciar tanto el efecto inhibitorio sobre la enzima de membrana ATPasa, presente en *E.coli* y *Listeria monocytogenes*, como la disrupción y el consiguiente aumento de la permeabilidad de la membrana, siendo este efecto menos acusado con cinamaldehído.

Del mismo modo, isocianato de alilo es capaz de inhibir ciertas enzimas como tiorredoxina reductasa y acetato quinasa, provocando así la alteración de las reacciones metabólicas de *E. coli O157:H7* (Luciano y Holley, 2009).

Otra característica importante de los AE es su carácter hidrofóbico, pudiendo separar lípidos de la membrana celular y mitocondrial de las bacterias, provocando que éstas sean más permeables (Burt, 2004; Friedly y col., 2009).

Esta interacción de los AE con las membranas microbianas provoca la inhibición del crecimiento de algunas bacterias tanto gram positivas como gram



negativas (Calsamiglia, Busquet, Cardozo, Castillejos, y Ferret, 2007). Se ha demostrado que las bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, son más susceptibles a los AE que las gram negativas, entre ellas *E.coli*, y *Salmonella enteritidis* (Chorianopoulos y col., 2004).

Algunos autores han postulado que el mecanismo de acción en las bacterias gram positivas debería de ser más efectivo, al presentar solo una capa de peptidoglicano (Shelef, 1983; Smith-Palmer y col., 1998; Chao y Young, 2000; Cimanga y col., 2002; Sokovic, Glamoclija, Marin, Brkic, y van Griensven, 2010).

Basándonos en esta premisa, las bacterias gram negativas deberían de ser en consecuencia más resistentes a los AE (Kim y col., 2011), ya que poseen una pared celular hidrofílica (tienen una membrana externa que cubre la pared celular compuesta por lipopolisacáridos), y esta capa externa ayuda a prevenir la penetración de compuestos hidrofóbicos (Calsamiglia y col., 2007; Ravichandran, Hettiarachchy, Ganesh, Ricke, y Singh, 2011).

Este postulado se ha podido evidenciar con el AE de canela, ya que mostró mayor efecto inhibitorio en bacterias gram positivas (*S. aureus*), que sobre las gram negativas (*Escherichia coli*), debido a las diferencias estructurales entre ambas (Hsouna y col., 2011).

## 1.7. APLICACIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES

Aproximadamente el 90% del consumo mundial de AE se centra en tan solo 13 países, liderados por EEUU y China, que juntos acaparan el 44% (FAO, 2011). De ahí que su empleo este muy diversificado, como va a quedar reflejado en los apartados siguientes.

### 1.7.1. Industria farmacéutica

Desde el punto de vista farmacológico, los AE muestran poder antiséptico de amplio espectro, ya que son efectivos frente a diversas cepas bacterianas patógenas, ciertos hongos. Entre ellos, el citral, componente mayoritario de los AE de limón, naranja y bergamota, inhibe el crecimiento de *E. coli* (Somolinos y col., 2010). También presentan acción analgésica, descrita en el AE de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), cuyo componente mayoritario es la citronela (Gbenou y col., 2013).

Además, los aceites de menta e hinojo se emplean con frecuencia en cremas dentales (Chawla y Thakur, 2013), otros como el de eucalipto se utilizan como inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (**Tabla I.6**).

El anetol, componente mayoritario de los AE del anís (*Pimpinella anisum*), hinojo (*Foeniculum vulgare*) y anís estrellado (*Illicium verum*), determina que estos aceites esenciales se utilicen como antiespasmódicos, antisépticos y expectorantes (DerMarderosian y Beutler, 2002). Algunos AE tienen efecto neurosedante, como los de lavanda, melisa y valeriana (Dobetsberger y Buchbauer, 2011).

**Tabla I.6.:** *Propiedades farmacológicas descritas para algunos AE.*

Acción	Aceite esencial	Referencias
Expectorante	Anís, Hinojo, Eucalipto, Hoja de pino.	Gradinaru y col., 2014; Choi and Hwang 2004; Silva y col., 2003
Antiespasmódico	Anís, hinojo, lavanda, comino, hierbabuena.	Dinesha y col., 2014; El-Awadi y Hassan, 2010; Russo y col., 2013, Ali, Behnaz y Aliakbar, 2014; Akbari y col., 2015
Antiinflamatorio	Salvia, Manzanilla.	Baricevic y col., 2001; Bhaskaran y col., 2010
Sedante	Lavanda, melisa, valeriana	Kim y col., 2011; Murphy y col., 2010; Emamghoreishi y Talebianpour, 2015

### 1.7.2. Industria cosmética

Tanto en perfumería como en cosmética se han utilizado una amplia variedad de AE. Su uso es muy significativo en perfumería debido, indiscutiblemente, a las cualidades olfativas de los AE. Esto implica que sean incorporados en un gran número de formulaciones, desde perfumes para aguas de colonia hasta fragancias para detergentes de ropa, como ocurre con el AE de *Lavandula angustifolia* Mill., el cual es utilizado en jabones, perfumes y lociones para la piel (Da oporto, 2009).

El AE del geranio rosa (*Pelargonium sp.*) es muy apreciado debido a que tiene una fragancia suave a rosas, por ello se utiliza en una amplia gama de perfumes, cremas, jabones y artículos de aseo (Ravindra y Kulkarni, 2015). El AE de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) contiene apigenol, y se emplea en cosmética para dar reflejos dorados al cabello (Ortiz y Lombardo, 2009).

La importancia de los AE en cosmética deriva de algunas esencias y de su efecto sobre la piel, además del uso como aromatizante en diferentes formulaciones cosméticas (Da oporto, 2009).

Así, los AE de rosa mosqueta, contribuyen de forma efectiva a atenuar cicatrices y arrugas; o el AE de pepita de frambuesa que contiene una elevada proporción de retinol, que ayuda a la piel a protegerse del sol; o el AE de aguacate, que aporta elasticidad a la piel debido a su alto contenido en vitamina E, empleándose también en la elaboración de bálsamos labiales, o como acondicionador y reparador de la fibra capilar (Vuong, 2014; Liu, Spindler, y Vakili-Tahami, 2013; Kulkarni y col., 2014).

### 1.7.3 Industria agroquímica

Los productos fitosanitarios (plaguicidas) son sustancias de origen natural o sintético utilizadas como biocidas para combatir los parásitos de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos, y del hombre y su ambiente. Sin embargo, los plaguicidas son sustancias tóxicas y peligrosas, que pueden provocar efectos adversos en el hombre y su entorno al entrar en contacto con ellos.

Esta peligrosidad presenta varios aspectos: peligrosidad en su fabricación y formulación, peligrosidad para el aplicador, peligrosidad ecológica, es decir, su acción sobre el medioambiente con efectos secundarios indeseables (desequilibrios biológicos, aparición de nuevas plagas, resistencias, fitotoxicidades, acción sobre la fauna silvestre terrestre y acuícola, toxicidad para abejas, etc.) y por último, peligrosidad para el consumidor de productos tratados a causa de los residuos tóxicos que estos alimentos pudieran contener. Aunque todos los aspectos comentados son importantes, éste último es el que más preocupa a la opinión pública.

Solamente en Europa están autorizados unos trescientos principios activos que actúan como plaguicidas, aunque existen alrededor de setecientas sustancias

de diferente naturaleza química utilizadas como tales. A ello hay que añadir, que los productos técnicos se presentan en el mercado bajo diferentes formulaciones y que se aplican de forma variada e indiscriminada, tanto en dosis como en tiempo.

En general, el empleo de plaguicidas está ampliamente extendido y la evolución del consumo muestra una pauta ascendente. Esta circunstancia ha desencadenado una conciencia social que está derivando hacia una disminución de las dosis de aplicación, y al estudio y desarrollo de nuevos plaguicidas cada vez menos tóxicos, más biodegradables -reducción de sus efectos colaterales-, y en definitiva, menos peligrosos para el medioambiente, en consonancia con los principios de la Producción Integrada y la Agricultura Ecológica.

De entre las diferentes estrategias de lucha alternativas, los AE presentan un gran potencial y su interés como alternativa a los plaguicidas de síntesis química en el campo agroalimentario y medioambiental ha aumentado extraordinariamente en los últimos años.

En la bibliografía podemos encontrar numerosos trabajos que describen el efecto biocida de numerosos AE sobre bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas (Bakkali y col., 2008). Así, se ha evidenciado el efecto antibacteriano del AE de salvia frente a *S. Aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa* (Adrar y col., 2015).

Además, el AE de *Chenopodium ambrosoides* es muy utilizado en veterinaria (Chekem y col., 2010 y Vieira y col., 2011), ya que sus componentes mayoritarios: ascaridole, carvacrol, p-cimeno,  $\alpha$ -terpineno y limoneno inhiben el crecimiento del protozoo *Leishmania donovani* (Monzonte y col., 2007).

También se ha evidenciado la actividad insecticida de los AE frente a ciertas plagas (Rattan, 2010), algunos de ellos se incluyen en la **Tabla I.7**.

**Tabla I.7.:** Actividad insecticida de los AE.

Plaga	Aceite esencial	Referencias
Hormigas	<i>Mentha spicata</i> , tanacetum, poleo, clavo.	Robu, Covaci, y Popescu, 2015; Kim y col., 2013; Chibuzor, 2011.
Áfidos	<i>Allium</i> , coriandro, anís.	Bhalerao, 2015
Pulgas	Lavanda, menta, citronela.	Bhalerao, 2015; Worwood, 2012
Moscas	Ruda, citronela, menta.	Hanan, 2013;
Piojos	<i>Mentha spicata</i> , albahaca, <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Ortuño, 2006; Khater, Ramadan, El-Madawy, 2009
Polillas	Menta, hisopo, romero, eneldo, clavo	Ortuño, 2006: Dampc y Luczkiewicz, 2013
Coleópteros	Tanacetum, comino, ajenjo, tomillo, hinojo marino, albahaca.	Polatoğlu, 2016; Kim y Lee, 2014; Szczepanik, y col., 2012; Kłys, 2007
Cucarachas	Menta, ajenjo, eucalipto, laurel.	Kumar y col., 2011; Yeom y col., 2013; Matsubara y col., 2010
Nemátodos	Clavo, menta, salvia, caléndula, cedro, citronela.	Gupta, Sharma, y Naik, 2011; Betancourth-García y col., 2011; Baličević y col., 2014

#### 1.7.4. Industria alimentaria

La Comisión Europea ha aceptado una amplia variedad de componentes de los AE para su uso como aromatizantes en productos alimenticios. Así, se autoriza el empleo de linalol, timol, eugenol, carvona, cinamaldehído, vainillina, carvacrol, citral y limoneno, por no presentar riesgo alguno para la salud del consumidor. La agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA), también reconoce ciertas especies vegetales como seguras (GRAS), entre las que se incluyen el clavo, orégano, tomillo, nuez moscada, albahaca, mostaza y canela. Aun así, existen limitaciones relacionadas con la ingesta diaria de AE y sus componentes, por lo que antes de que puedan ser utilizados en productos alimentarios, debe realizarse una reevaluación por parte de la FDA (Hyldgaard, Mygind y Meyer, 2012).

A pesar de que se ha demostrado el potencial antimicrobiano de los AE y de sus constituyentes, su utilización como conservantes de alimentos está limitada, ya que se necesitan elevadas concentraciones para conseguir una acción antimicrobiana adecuada. En muchos productos alimenticios, los componentes hidrofóbicos de los AE son menos efectivos, ya que interactúan con los componentes de la matriz, como ocurre por ejemplo con la grasa (Cava-Roda y col., 2010; Rattanachaiksompon y Phumkhachorn, 2010), almidón (Gutiérrez y col., 2008) y proteínas (Kyung, 2011). Además, el intenso aroma de los AE, incluso cuando se aplican a concentraciones bajas, puede causar efectos organolépticos adversos, que superan el umbral aceptable para los consumidores (Lv y col., 2011). Al tener que aumentar su concentración para poder compensar las interacciones con los componentes de la matriz alimentaria, su aplicación en alimentos picantes es complicada, ya que el umbral sensorial es muy alto.

Para poder solventar este inconveniente se pueden utilizar diferentes estrategias. Entre ellas, se podrían incorporar los AE en envases (activos), formando parte del envase, en lugar de incluirlo como un ingrediente más del producto. Otra opción puede ser la inclusión del AE en polímeros comestibles, cubiertas biodegradables, bolsitas que permiten su liberación lenta sobre la superficie del alimento, o bien en el espacio de cabeza de los envases de fruta, carne y pescado (Pelissari y col., 2009; Sánchez-González y col., 2011).

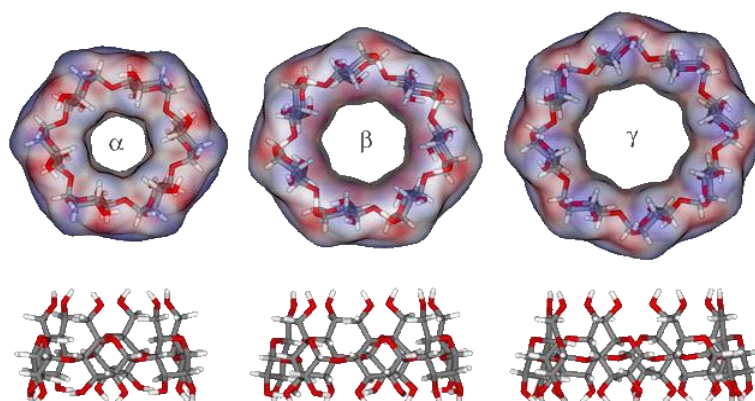
Al incorporar componentes volátiles de los AE a los films o cubiertas biodegradables, se reduce la velocidad de difusión hacia el producto alimenticio, manteniendo estos compuestos activos en el espacio de cabeza o en la superficie del producto durante largos periodos de tiempo (Phillips y Laird, 2011; Sánchez-González y col., 2011).

Se pueden emplear también nanoemulsiones, para minimizar los efectos organolépticos adversos de los AE en la matriz de los alimentos. Esta estrategia permite aumentar la estabilidad de los componentes volátiles, protegiéndolos de la interacción de la matriz del alimento, aumentando así la actividad antimicrobiana del AE debido al incremento de la absorción celular pasiva (Donsi y col., 2011).

## 2. CICLODEXTRINAS (CDs)

### 2.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos naturales de seis ( $\alpha$ -CDs), siete ( $\beta$ -CDs) u ocho ( $\gamma$ -CDs) unidades de glucosa, unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4) (**Figura I.5**). Reciben otras denominaciones como cicloamilosas, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger (Villiers, 1891; Eastburn y Tao, 1994). Se sintetizan mediante una reacción de transglucosilación intramolecular en la degradación del almidón, llevada a cabo por la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) de *Bacillus macerans* (Szetjili, 1998).



**Figura I.5:** Estructura de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs (Zhang y col., 2013).

Villiers las descubrió en 1891, ya que fue capaz de obtener una pequeña cantidad de dextrinas tras la digestión del almidón mediada por *Bacillus amylobacter*.

Tras permanecer unas semanas en alcohol, se observó la aparición de cristales que respondían a la fórmula de las CDs  $[(C_6H_{10}O_5)_n + 3 H_2O]$ , dando a este nuevo compuesto el nombre de "Celulosina". De acuerdo con otros autores,

Villiers comprobó que las CDs se formaron por la contaminación del cultivo de *Bacillus amylobacter* con *Bacillus macerans* (Villiers, 1891).

Años mas tarde (1903), Schardinger logró aislar la bacteria responsable de la degradación del almidón y de la formación de cristales, y la llamó Strain II (Schardinger, 1903). Aplicando un test colorimétrico, consiguió aislar dos productos cristalinos, dextrina A y dextrina B; esta última se asemejaba a la "Celulosina" obtenida por Villiers.

En 1904, Schardinger aisló un nuevo microorganismo al que denominó rottebazillus I, conocido posteriormente como *Bacillus macerans*, que era capaz de producir las mismas dextrinas cristalinas. Entre 1905-1911, se determinó que dicho microorganismo producía grandes cantidades de dextrinas cristalinas a partir del almidón (25-30%), estudió su comportamiento químico en presencia de alcoholes, cloroformo, éter y disolución de yodo. Demostró que las dextrinas no eran capaces de reducir el cobre ni eran fermentadas por levaduras. A estos productos cristalinos Schardinger los nombró como dextrina cristalina  $\alpha$  y dextrina cristalina  $\beta$ , pero no fue hasta 1935 cuando se pudo aislar la dextrina cristalina  $\gamma$ .

En 1942, con el desarrollo de las técnicas de análisis, se observó la estructura cristalina de  $\alpha$ - y  $\beta$ -CDs por cristalografía de rayos X, ratificándose así las estructuras propuestas con anterioridad.

En 1948, se elucidó la estructura de  $\gamma$ -CDs por rayos X y se reconoció que las CDs pueden formar complejos de inclusión. Se observó que cada unidad de glucosa quiral conforma una estructura rígida en forma de silla, lo que establece que todos los tipos de CDs tuvieran una estructura de cono truncado. (Figura I.6).

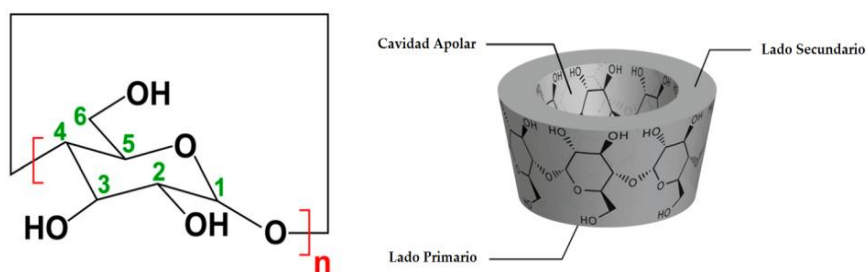


Figura I.6.: Estructura ciclodextrina (Crini, 2014).



Así, orientados hacia la zona más ancha de la estructura de cono truncado se sitúan los -OH secundarios de los carbonos C-2 y C-3 de cada unidad de glucosa; y hacia la boca estrecha de la estructura, encontramos los -OH primarios de los C-6, quedando orientados los grupos -CH<sub>2</sub>OH hacia la superficie externa del cono.

Los hidrógenos de los carbonos más apolares de los azúcares (C-3 y C-5) y el oxígeno de los enlaces glucosídicos entre las unidades de glucosa, quedan orientados hacia el interior de la estructura troncocónica. La orientación específica de todos estos grupos, da lugar a una estructura de cono truncado que permite albergar moléculas insolubles en su interior debido a su cavidad hidrofóbica, y cuya superficie externa es hidrofílica, por lo que es soluble en agua, lo constituye una verdadera complejación molecular (Pinho y col., 2014).

En la década de los 50, aparecen dos grupos de investigación liderados cada uno por French (1957) y Cramer (1954), los cuales comenzaron a trabajar en la síntesis enzimática de CDs, fraccionando los compuestos puros y caracterizando sus propiedades químicas y físicas.

Así, French sintetizó dos nuevas cycloamilosas llamadas  $\delta$ - y  $\epsilon$ -dextrina que contenían 9 y 10 unidades de glucosa respectivamente y en 1961, Thomas y Stewart demostraron la existencia de  $\zeta$ - y  $\eta$ - dextrinas, las cuales contenían 11 y 12 unidades de glucosa, sin embargo Cramer se centró en el estudio de las propiedades de los complejos de inclusión formados por las CDs.

En 1953 Freudenberg, Cramer y Plieninger protegieron bajo patente, la utilidad de las CDs en la formulación de fármacos, ya que aumentaban la solubilidad de principios activos apolares y ejercían un efecto protector frente a la oxidación.

Pero fue French en 1957 quien realizó la primera revisión de CDs (seguida por la de Caesar en 1968), y en ella se aludía por primera vez a la toxicidad de las CDs.

Durante los 25 años siguientes, se llevaron a cabo numerosos estudios sobre la toxicidad de las CDs para poder habilitar su uso en humanos. El primer congreso internacional de CDs se celebró en 1981, estableciendo su organización cada dos años.

## 2.2. PROPIEDADES

Las CDs producidas por la conversión enzimática del almidón se denominan CDs naturales o parenterales:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs, siendo la  $\beta$ -CDs las más utilizadas debido a su bajo coste. En la **Tabla I.8** se describen las principales características de las CDs naturales.

**Tabla I.8.** *Propiedades de las ciclodextrinas naturales (Brewster y Loftsson, 2007; Loftsson y Brewster, 2011; Kurkov y Loftsson, 2013).*

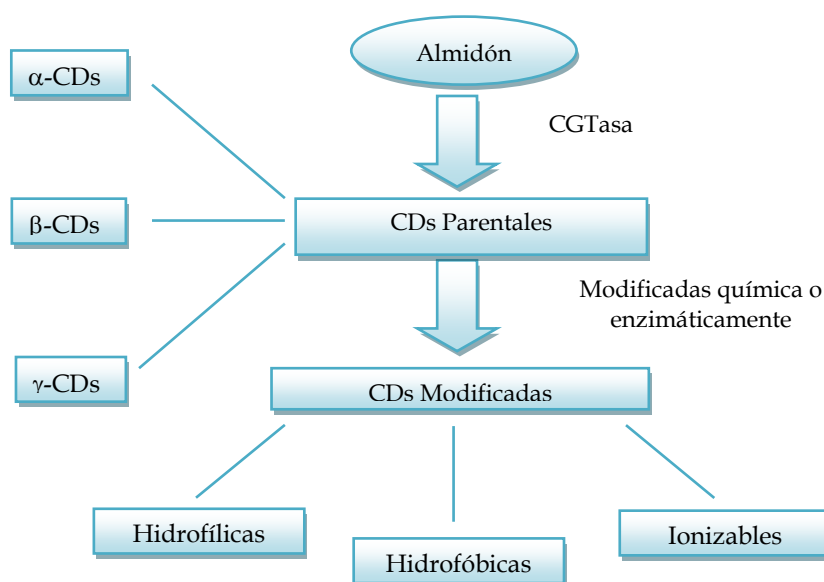
Propiedades	$\alpha$ CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Fórmula	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>
Peso molecular ( <i>uma</i> )	972	1135	1297
Solubilidad en agua 25°C (%, w/v)	14,5	1,85	23,2
Diámetro exterior (Å)	14,6	15,4	17,5
Diámetro interno (Å)	4,7-5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Volumen de la cavidad (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Moléculas de agua internas	6-8	11-12	13-17
Punto de fusión (°C)	275	280	275
Poder de rotación a 25°C	+150,5	+162,5	+177,4
Protones donadores	18	21	24
Protones aceptores	30	35	40
Hidrólisis por amilasa intestinal	insignificante	lenta	rápida

Las CDs derivadas o modificadas, se obtienen a partir de las CDs naturales mediante síntesis química, utilizando reacciones de acilación o esterificación de los OH de los carbonos primarios y secundarios de las CDs naturales (Szejtli, 2013). Dependiendo del compuesto diana, se selecciona el sustituyente a incluir en la correspondiente CD parental (nativa), mejorando así la capacidad de

inclusión y las propiedades físico-químicas de las CDs naturales (Szente, Szemán y Sohajda, 2016) (**Figura I.7**).

La mayor parte de las CDs derivadas presentan modificaciones de volumen en su cavidad hidrofóbica, y estos cambios pueden mejorar su solubilidad acuosa, su estabilidad frente a la luz y el oxígeno, y mejorar la actividad de la molécula huésped (Villers, 1981; Martin del Valle, 2004; Veiga, y col., 2006).

Hasta la fecha, las  $\beta$ -CDs han sido transformadas con más de 20 sustituyentes distintos, pudiendo clasificarlas en base a su interacción con las moléculas de agua en hidrofílicas, hidrofóbicas e ionizables (Pinho y col., 2014).



**Figura I.7.:** Tipos de CDs

Las hidrofílicas tienen buena solubilidad en agua y son adecuadas para la formación de complejos de inclusión con moléculas poco solubles, en este grupo se incluyen las HP- $\beta$ -CD (**Tabla I.9**). Las hidrofóbicas son capaces de modular la velocidad de liberación de moléculas de agua. Las CDs ionizables pueden mejorar la velocidad de disolución y la formación de complejos de inclusión (Pinho y col., 2014).

En 2004, Szejtli estimó que se habían sintetizado más de 15.000 CDs, sin embargo postuló que la mayoría de estas derivadas nunca encontrarían

aplicaciones debido a sus elevados costes de producción y a la dificultad de síntesis. Dentro de ellas, tanto la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) como la sulfobutileterciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD) han abierto el camino a nuevas aplicaciones, particularmente en la formulación de medicamentos, ya que en la actualidad se emplean como solubilizantes de numerosos principios activos que son la base de fármacos (Geodon, Vjend y Nexterone) (Crini, 2014).

**Tabla I.9.:** *Ciclodextrinas derivadas de  $\beta$ -CDs (Arias, 2014).*

CDs	Nombre	Propiedades
Hidrofílicas	Metil- $\beta$ -CDs, heptakis (2,6-di-O-metil)- $\beta$ -CDs (DM- $\beta$ -CDs)	Solubles en agua fría y disolventes inorgánicos
	Trimetil- $\beta$ -CDs 2,6-di-O-metil -3-O-acetil- $\beta$ -CDs (DMA- $\beta$ -CDs)	Superficie activa, hemolítica
	glucosil - $\beta$ -CDs (G1- $\beta$ -CDs)	Elevada solubilidad en agua, baja toxicidad
	maltosil- $\beta$ -CDs (G2- $\beta$ -CDs)	
	Hydroxyalkylated- $\beta$ -CD (HE- $\beta$ -CDs)	Elevada solubilidad en agua, baja toxicidad
	2-, 3- Hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CDs)	
	Hidrofóbicas	Dietil- $\beta$ -CDs (DE- $\beta$ -CDs) Trietil- $\beta$ -CDs (TE- $\beta$ -CDs)
Triacetil- $\beta$ -CDs (TA- $\beta$ -CDs) Tributiril- $\beta$ -CDs (TB- $\beta$ -CDs) Trivaleril $\beta$ -CDs (TV- $\beta$ -CDs)		Insoluble en agua, soluble en disolventes orgánicos
Carboximetil-O-etil- $\beta$ -CDs (CME- $\beta$ -CDs) Sulfobutil-etil- $\beta$ -CDs (SBE- $\beta$ -CDs)		Soluble a pH > 4 Soluble en agua

Estos azúcares cíclicos pueden formar estructuras supramoleculares debido a su capacidad para unirse de forma específica mediante enlace covalente o no covalente a otras CDs. Esto unido a su capacidad para la formación de complejos de inclusión con moléculas huésped de carácter orgánico, esto proporciona la posibilidad de elaborar hilos supramoleculares. De esta forma, se pueden crear arquitecturas moleculares como: catenanos, rotaxanos, polirrotaxanos y tubos (Figura I.8). Estas estructuras, que no se pueden obtener por otros métodos, se emplean para la separación de mezclas complejas de moléculas y enantiómeros (Szetjli, 1998).

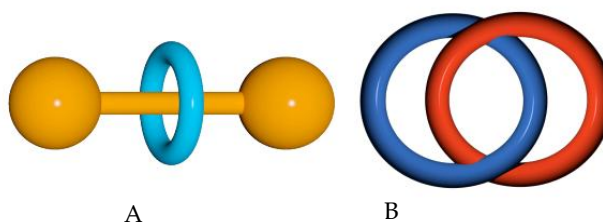


Figura I.8: (A) Rotaxanos, (B) Catenano (Danon, 2016).

### 2.3. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS

Diversos autores han revisado los perfiles de seguridad y toxicología de las CDs (Stella and He, 2008; Arima y col., 2011; Kurkov y Loftsson, 2013) en humanos, ya que se emplean habitualmente en productos farmacéuticos como Piroxicam o Itraconazol.

Diversos autores han demostrado que las CDs parentales administradas por vía oral no son tóxicas, ya que se comportan de forma similar al almidón, de hecho su absorción en el intestino es menor conforme disminuye su tamaño ( $\gamma$ -CD >  $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD) (Irie y Uekama, 1997; Arima y col., 2011; Duchêne y Bochot, 2016). De forma similar ocurre en determinadas CDs derivadas de  $\beta$ -CD, tales como 2-hidroxipropil- $\beta$ -CDs (HP- $\beta$ -CDs) y sulfobutiléter- $\beta$ -CDs (SBE- $\beta$ -CDs) (Loftsson, y Brewster, 2010).

Además, diversos estudios de toxicidad han demostrado que  $\alpha$ -  $\gamma$ -, HP- $\beta$ -, SBE- $\beta$ -, sulfatada- $\beta$ - y maltosil- $\beta$ -CDs son seguras, incluso administradas de forma parenteral. Sin embargo, otras evaluaciones de seguridad revelan que la

parental  $\beta$ -CDs, y sus modificadas metil- $\beta$ -CDs y random-metil- $\beta$ -CDs (RM- $\beta$ -CDs) no deben de ser administradas por vía parenteral, debido a su baja solubilidad en agua y a que pueden ser tóxicas a nivel renal (Loftsson, y Brewster, 2010; Kurkov y Loftsson, 2013). De hecho, RM- $\beta$ -CDs, actualmente, solo puede ser usada en formulaciones nasales y a nivel tópico, pero en ambos casos a muy baja concentración.

A continuación, se describen resultados recientes, que aparecen en la bibliografía científica, sobre ensayos de toxicidad llevados a cabo con CDs nativas.

### 2.3.1. $\alpha$ -CDs

Las  $\alpha$ -CDs si se aplican por vía intramuscular pueden ser bastante irritantes; se unen a algunos lípidos produciendo irritación ocular y tras su administración por vía oral en ratas, se absorben entre el 2 y 3%. Sólo una pequeña fracción de  $\alpha$ -CD se absorbe intacta en el tracto gastrointestinal y se excreta, principalmente inalterada, en la orina tras la administración por vía intravenosa (Jambhekar y Breen, 2016).

### 2.3.2. $\beta$ -CDs

Las  $\beta$ -CDs administradas intramuscularmente, se consideran menos irritantes que las  $\alpha$ -CDs. Se ha descrito que al ser ingeridas por vía oral se unen al colesterol, absorbiéndose en el tracto gastrointestinal superior en cantidades muy pequeñas (1- 2%). Como en el caso de las  $\alpha$ -CDs, no son metabolizadas en el tracto intestinal superior, pero sí son degradadas por las bacterias del ciego y colon (Voncina, 2011). Actualmente, son las CDs más comunes en formulaciones farmacéuticas y por lo tanto, más estudiadas en humanos. A pesar de ello, no se recomienda su ingesta en dosis elevadas, ya que por su baja solubilidad en agua se puede producir su recristalización en los riñones, dando lugar a un efecto nefrotóxico (Duchêne y Bochot, 2016).

### 2.3.3. $\gamma$ -CDs

Comparando las tres CDs naturales, para las  $\gamma$ -CDs se han descrito pocos efectos adversos (Martin del Valle, 2004), por lo que los principales fabricantes

impulsan su empleo como aditivo alimentario. De hecho, fueron incluidas en la directiva 2012/288/UE, como ingrediente alimentario. Además, al tener una cavidad más grande, poseen una mayor solubilidad en agua y mejor biodisponibilidad que las  $\alpha$ - y  $\beta$ -ciclodextrinas, y por tanto, pueden tener más aplicaciones en diferentes sectores, especialmente en la industria alimentaria y farmacéutica (Li y col., 2007).

Al administrarlas por vía intramuscular inducen una mínima irritación, y son degradadas a glucosa por las enzimas intestinales del tracto intestinal superior, incluso a altas dosis (10-20 g/kg/día).

Al administrarse por vía oral no son absorbidas y se excretan principalmente, sin alterar su estructura, a través de la orina (Jambhekar y Breen, 2016).

#### 2.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

El creciente interés por las CDs se justifica por su naturaleza anfífila, pudiendo actuar como moléculas anfitrión y encapsular huéspedes hidrofóbicos en su cavidad apolar interna, mediante la formación de complejos de inclusión CDs-huésped (Bilensoy y Hincal, 2009; Laza-Knoerr y col., 2010; Pinho y col., 2014; Valente y Soderman, 2014). Hay que tener en cuenta que la formación de los complejos de inclusión no es rígida, sino que poseen una relativa flexibilidad, la cual les permite asociarse con una gran variedad de moléculas.

Las CDs tienen también la habilidad para identificar y complejarse con huéspedes específicos de forma selectiva, por lo que se dice que poseen la propiedad para reconocer moléculas (Davis y Higson, 2011). Si bien la formación del complejo se ve favorecida por la polaridad de la molécula huésped, numerosos autores especulan que los factores decisivos en la formación del complejo son más bien geométricos que químicos (Muñoz-Botella y col., 1995).

Por lo tanto, puede afirmarse que el proceso de inclusión, entre la molécula huésped y la CD, transcurre porque es energéticamente favorable, el analito es relativamente apolar, y la cavidad hidrofóbica de la CD está imperfectamente solvatada.

Para la formación de los complejos de inclusión, se tiene que generar una interacción entre la molécula huésped, generalmente hidrofóbica, y la CD. Esta

interacción provoca un cambio favorable en el valor de la entalpía y, habitualmente desfavorable en la entropía.

Cramer fue el primero en describir la secuencia mecánica que conduce a la formación de complejos de inclusión, dividiéndola en 5 etapas (Kfoury y col., 2016):

- I. En primer lugar, la molécula huésped se acerca a la CD provocando la salida de moléculas de agua de la cavidad, alcanzando un nivel de energía de estado gaseoso, ya que adquieren libertad de traslación y rotación y por tanto, una disminución de las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno.
- II. El huésped alcanza también un nivel de energía de estado gaseoso, al liberarse las moléculas de agua.
- III. La parte apolar de la molécula huésped entra en la cavidad, donde se producen interacciones de Van der Waals y/o enlaces de hidrógeno, etapa que conduce a la estabilización del complejo de inclusión.
- IV. Las moléculas de agua liberadas por el huésped y la cavidad de las CDs se reorganizan, formando puentes de hidrógeno.
- V. La zona de la molécula huésped que queda fuera de la cavidad de las CDs, se hidrata al interactuar con las moléculas de agua, quedando inmersa en la capa de hidratación de las CDs (Crini, 2014).

Los estudios sobre la naturaleza de estos enlaces, con moléculas huésped seleccionadas, han puesto de manifiesto la importancia de cada una de las fuerzas implicadas en el proceso de inclusión (Schneiderman y Stalcup, 2000).

Si se compara la magnitud de las fuerzas implicadas se demuestra que para un huésped apolar, las interacciones I, II, y III son las más relevantes. De cualquier forma, la relevancia de las fuerzas implicadas va a depender de las características de la molécula huésped, así como de la CD empleada.

De hecho, Szejtli apoya la idea de que aunque las interacciones de Van der Waals y los puentes de hidrógeno pueden jugar un papel importante en la formación de los complejos de inclusión, la fuerza que más contribuye a la formación del complejo es la reducción de la estabilidad de la energía de todo el



sistema, como consecuencia de la sustitución de las moléculas de agua del interior de la cavidad de las CDs, que poseen una elevada entalpia, por moléculas hidrofóbicas, lo que conlleva a la formación de uniones apolar-apolar (Crini, 2014).

El papel de las interacciones hidrofóbicas en la formación de los complejos crea cierta controversia, ya que si las comparamos con las interacciones de tipo Van der Waals y dipolo-dipolo son interacciones relativamente débiles. Así, si se compara la energía necesaria para la formación de un enlace covalente (400 kJ/mol) con la necesaria para establecer un enlace por puente de hidrógeno (40 kJ/mol), y la requerida para las interacciones por fuerzas de Van der Waals (4 kJ/mol) (Astray y col.,2009), se deduce que estas interacciones son las más débiles y, en muchos casos, no conducen a la formación de un complejo estable, por ello se piensa que también intervienen interacciones de tipo estérico (Crini, 2014).

No obstante, la disposición espacial específica que adopte la molécula apolar, cuyo radio de Van der Waals sea compatible con el tamaño de la cavidad de la CD, pueden establecer interacciones hidrofóbicas y como consecuencia las moléculas se incorporan en la CD, dando lugar a un complejo cuya estabilidad puede ser, en muchos casos, semejante a la que resultaría de una unión covalente (Martin del Valle, 2004).

Las moléculas hidrofóbicas forman complejos más estables, ya que éstas no son capaces de formar enlaces por puente de hidrógeno, como en el caso del benceno.

La estabilidad del complejo es proporcional al carácter hidrofóbico de los sustituyentes sobre la CD base. Así, los sustituyentes metilo o etilo aumentan la estabilidad de los complejos, mientras que los hidroxilos la disminuyen, al igual que ocurre con los grupos ionizables (Martin del Valle, 2004).

Cuando convergen en una misma molécula las siguientes características: geométricas, químicas, estéricas y energéticas favorables para la inclusión, comenzará el proceso de formación del complejo.

Por todo lo expuesto anteriormente, se deduce que la habilidad de las CDs para formar complejos de inclusión se debe a dos factores.

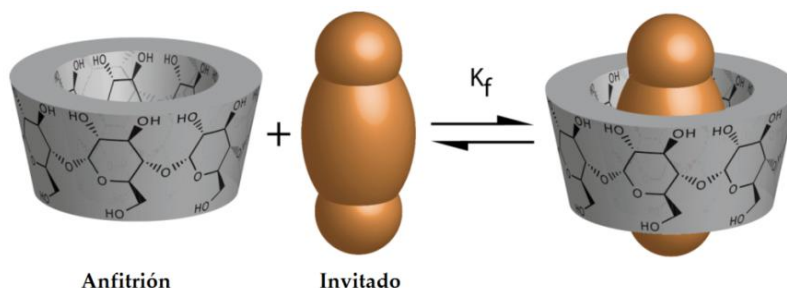
El primero, el impedimento estérico, que depende del tamaño de la CD y de la molécula huésped, o a ciertos grupos funcionales que puede poseer la molécula

huésped. Así, si el tamaño del huésped no es el adecuado, no podrá ajustarse correctamente en la cavidad de la CD.

El segundo factor es la multitud de las interacciones que se producen entre los tres componentes del sistema (CD-huésped-disolvente), que deben conducir a un estado termodinámicamente estable (Crini, 2014), ya que para la formación de los complejos debe existir a una fuerza impulsora (energía neta), que empuje la molécula huésped hacia el interior de la CD (Martin del Valle, 2004).

La unión resultante entre la CD y la molécula huésped no es fija o permanente, sino que es un equilibrio dinámico gobernado por una constante, cuya fuerza depende del tamaño relativo de la molécula huésped y de las interacciones establecidas entre las CDs y la molécula complejada (**Figura I.9**).

La formación de los complejos de inclusión puede ser en estado cristalino o en disolución, siendo el agua el disolvente más utilizado en este caso. La formación de complejos de inclusión se puede llevar a cabo en un sistema de co-solventes y en presencia de cualquier disolvente no acuoso.



**Figura I.9:** Representación de un complejo de inclusión (Crini, 2014).

La complejación con CDs se utiliza habitualmente para aumentar la solubilidad acuosa, la velocidad de disolución de fármacos poco solubles y para mejorar su biodisponibilidad y estabilidad.

Además, se han utilizado como secuestrantes de sabores desagradables, para reducir la evaporación, estabilizar sustancias volátiles, proteger moléculas sensibles a la luz o al oxígeno, ayudar a convertir sustancias líquidas y aceites en

polvo, reducir la irritación gástrica, cutánea y ocular, y para prevenir incompatibilidades e interacciones con otras sustancias.

En este sentido, las CDs han sido aplicadas con éxito en diferentes sectores: alimentación (Fujishima y col., 2001; Astray y col., 2009; Nedovic y col., 2011; Li y col., 2014), farmacia (Bhardwaj y col., 2000; Loftsson y Brewter, 2011; Lakkakula y Krause, 2014), cosmética (Holland y col., 1999; Tarimci, 2011), tecnología enzimática (Villalonga, Cao y Fragoso, 2007), protección del medio ambiente (Bhardwaj y col., 2000; Kozlowski y Sliwa, 2010), bioconversión (Dufosse y col., 1999; Ng y col., 2013; Kang y col., 2015), envasado (Lavoine y col., 2014; Fenyvesi y col., 2016), e industria textil (Hedges, 1998; Bhaskara-Amrit y col., 2011; Voncina y Vivod, 2013; Radu, Parteni, y Ochiuz, 2016).

Hay una gran cantidad de moléculas de distinta naturaleza dispuestas a ser incluidas en las CDs, tales como: hidrocarburos alifáticos de cadena lineal o ramificada, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos, compuestos aromáticos, gases y compuestos polares, derivados halogenados, oxiácidos y aminas (Schmid, 1989).

En función del tipo de huésped a encapsular, debemos hacer una selección previa de la CD adecuada, ya que si bien la altura de la cavidad hidrofóbica es igual para los tres tipos de CDs parentales, el número de unidades de glucosas de cada una de ellas determina el diámetro interior de la cavidad y su volumen (**Figura I.10**).

Conforme a estas dimensiones, las moléculas de bajo peso molecular o compuestos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos pueden ser complejadas por las  $\alpha$ -CDs; las  $\beta$ -CDs son adecuadas para incluir moléculas aromáticas y heterociclos; y las moléculas más grandes, tales como macrociclos y esteroides, pueden ser acomodadas por  $\gamma$ -CDs (Martín del Valle, 2004).

Durante la formación de los complejos, al inicio, se produce un equilibrio muy rápido (normalmente en cuestión de minutos), no obstante, para alcanzar el equilibrio final se necesita de más tiempo. Por otro lado, cuando se produce un incremento en el número de moléculas de agua en el ambiente circundante, se genera rápidamente la disociación del complejo de inclusión. En disoluciones poco concentradas resulta difícil que la molécula huésped encuentre a la CD, quedando libre en el medio acuoso (Martín del Valle, 2004).

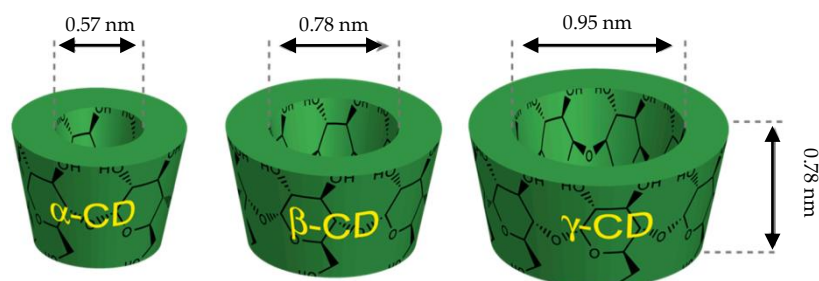
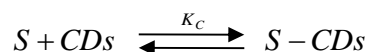


Figura I.10 Diámetro interno y externo de las CDs nativas (Crini, 2014).

#### 2.4.1. Equilibrio de los complejos de inclusión

Para poder determinar la estabilidad de los complejos de inclusión es necesario llevar a cabo el cálculo de la constante que gobierna el equilibrio (constante de complejación,  $K_c$ ). El conjunto de las técnicas utilizadas para determinar el valor de  $K_c$  se basan en los cambios producidos en las propiedades físico-químicas de la molécula complejada: solubilidad en agua (Higuchi y Connors, 1965); absorptividad molar, UV-VIS (Hussain y col., 1993; Sigurdardottir y Loftsson, 1995; Cannavà y col., 2010); oxidación enzimática (Núñez-Delicado y col., 1999, Mercader-Ros y col., 2010); reactividad química (Loftsson, 1995; Másson y col., 1998); fluorescencia (Muñoz de la Peña y col., 2007; Lucas-abellán y col., 2014), resonancia magnética nuclear (Harabagiu y col., 2004; Alfonsí y col., 2013); pKa de grupos funcionales; cambios calorimétricos (Uekama, 1979; Yao y col., 2014); descenso del punto de congelación (Suzuki y col., 1993) y cambios en los tiempos de retención cromatográfica (Tong y col., 2014).

El equilibrio dinámico de formación de complejos de inclusión obedece a la siguiente reacción:



La constante de equilibrio, o constante de complejación ( $K_c$ ), que determina la estabilidad de los complejos formados puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$K_c = \frac{S - CDs}{[S]_L [CDs]_L}$$

donde S-CDs refleja la concentración de analito complejado con CDs, mientras que  $[CDs]_L$  y  $[S]_L$  determinan la concentración de CDs y sustrato libre en el equilibrio, respectivamente.

Por lo que a mayor valor de  $K_c$ , el complejo formado será más estable. Este valor puede verse influenciado por diferentes factores, como el pH la fuerza iónica del medio, la temperatura y el tipo de disolvente.

## 2.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS

### 2.5.1. Solución dinámica

Si se compara la formación de complejos en su forma cristalina con la disolución, en este último se dispone de más moléculas de CDs que en forma cristalina, ya que las moléculas solo están en la superficie de los cristales de las CDs. Además, en disolución se puede acelerar el proceso mediante el empleo de ultrasonidos.

En general, el proceso de disolución de un sólido se acelera cuando éste se agita, ya que los ultrasonidos son vibraciones que ocurren por encima del intervalo normal auditivo humano. Dichas vibraciones agitan la disolución porque generan burbujas microscópicas que se expanden y contraen, aumentando hasta alcanzar el tamaño crítico, momento en el cual se colapsan y producen una alta temperatura local transitoria. Además de agitar la disolución, las burbujas rompen la superficie del sólido. La disolución asistida con ultrasonidos se caracteriza por proporcionar un pequeño desplazamiento, una pequeña velocidad de agitación y aceleraciones increíblemente altas.

En resumen, si se aumenta la temperatura del disolvente, se consigue incrementar la solubilidad de las CDs y la del analito, intensificando así la probabilidad de formar complejos. Por esta razón, la complejación se produce más rápidamente cuando las CDs y el analito están en disolución o formando una dispersión de finas partículas.

#### 2.5.1.1. Efecto de la temperatura

Se puede incrementar la solubilidad del complejo, si se calienta la disolución, aunque en ocasiones éste se puede desestabilizar. La estabilidad

térmica del complejo varía dependiendo del analito, pero la mayoría de los complejos empiezan a desnaturalizarse en el intervalo 50-60 °C. Ciertos complejos al ser insolubles o tener el analito unido fuertemente pueden ser estables a temperaturas más altas.

#### *2.5.1.2. Efecto del disolvente*

El disolvente más utilizado para llevar a cabo la formación de complejos de inclusión, es el agua. De hecho, a mayor grado de solubilidad de las CDs en el disolvente, habrá más moléculas disponibles para la formación de los complejos. Además, el disolvente que ocupa la cavidad hidrofóbica de la CD debe ser fácilmente desplazable por el analito utilizado, por ello es más empleado es el agua.

Muchos de los analitos no son solubles en agua, y ello provoca que la formación de complejos pueda ser muy lenta. Por consiguiente, para poder llevar a cabo la complejación, se puede solubilizar previamente la molécula a complejar, mediante el empleo de disolventes orgánicos. Estos deben tener una temperatura de ebullición baja, para eliminarlo fácilmente por evaporación, como ocurre por ejemplo con etanol o éter dietílico.

#### *2.5.1.3. Efecto del agua*

Al aumentar la cantidad de agua, también lo hace la solubilidad de las CDs y el analito, de forma que la complejación se produce con mayor facilidad. No obstante, si la cantidad de agua es demasiado alta, tanto las CDs como el analito pueden estar tan diluidos que no se asocian con la misma facilidad que lo harían en una disolución más concentrada.

Por ello, para conseguir que la formación de los complejos se lleve a cabo a un buen ritmo, es conveniente mantener una baja cantidad de agua.

Ciertos compuestos de elevado peso molecular como los aceites, demuestran tener tendencia a asociarse entre ellos para formar micelas, antes que interactuar con las CDs. En este caso, se recomienda emplear más agua y una buena agitación para poder dispersarlos, de esta forma se podrán separar y aislar las moléculas de aceite.

#### 2.5.1.4. Analitos volátiles

Durante la formación de complejos, se puede sufrir pérdidas por parte de los analitos volátiles, sobre todo si se utiliza calor. Dicho inconveniente es posible solucionarlo mediante la utilización de un reactor sellado, o bien, aprovechando el reflujo de las moléculas volátiles al volver al recipiente de mezcla.

### 2.5.2. Co-precipitación

Las CDs se disuelven en agua caliente y el analito es añadido mientras se agita la disolución de CDs. Se puede aumentar hasta un 20% la concentración de las CDs (habitualmente  $\beta$ ) en la disolución, si el analito puede soportar elevadas temperaturas. Conforme avance la reacción y disminuya la temperatura, la solubilidad de los complejos será menos, en el caso que la concentración de CDs sea muy elevada. En muchos casos, para que se produzca la precipitación de los complejos es necesario mantener la solución de CDs y el analito enfriando al tiempo que se agita.

Para separar el precipitado obtenido, se puede realizar por decantación, centrifugación o filtración, recomendando el lavado con una cantidad pequeña de agua o algún otro solvente miscible, como alcohol etílico, metanol o acetona. Hay que tener en cuenta, que el uso de disolventes orgánicos en el lavado con puede influir negativamente en algunos complejos, por lo que se debe evaluar previamente.

En este método, la principal desventaja radica en la expansión masiva causada por la baja solubilidad de las CDs, requiriendo así el empleo de grandes volúmenes de agua (que posteriormente debemos eliminar). La capacidad de precipitación, la energía requerida para calentar y refrigerar el proceso, y el tiempo, pueden transformarse en factores limitantes, provocando que el coste total del proceso se encarezca sobremanera (Pitha y col., 1992 ; Loftsson y col., 1993).

Los complejos formados con CDs y analitos ionizados son más estables que con los no ionizados. Así, la complejación de los analitos básicos se puede mejorar adicionando amoníaco a la solución acuosa, favoreciendo la complejación (Chaudhary y Patel, 2013), como se ha descrito en la bibliografía, donde la adición de hidróxido de amonio incrementó la constante de complejación del

anticancerígeno hidrófobo pancratistatina con HP- $\beta$ -CDs, mejorando su solubilidad acuosa (Torres-Labandeira y col., 1990).

### 2.5.3. Complejación por el método *Slurry*

A diferencia con el método de co-precipitación, por el método *slurry* las CDs no necesitan ser disueltas completamente para formar los complejos. En este método, para conseguir una disolución saturada de CDs, se necesita obtener una concentración de sólidos solubles cercanas al 50-60% en agitación continua. Cuando la formación de los complejos entre la CDs y la molécula huésped satura la fase acuosa, se produce la cristalización o precipitación de los mismos pudiendo ser recogidos como se describe en el método de co-precipitación (Chaudhary y Patel, 2013).

El tiempo requerido para que se formen los complejos es variable y depende del analito, por lo que debe optimizarse el tiempo requerido para obtener los complejos. En general, este tipo de complejación se realiza a temperatura ambiente. La principal ventaja de este método es la reducción del tamaño del reactor y la cantidad de agua necesaria.

### 2.5.4. Complejación por irradiación por microondas

Este método de preparación de complejos de inclusión, se puede trasladar a escala industrial, ya que la preparación requiere poco tiempo y se alcanzan buenos rendimientos (Nasir, Harikumar y Kaur, 2012). Básicamente, la molécula huésped y la CD se disuelven en agua o en un disolvente orgánico, introduciendo la mezcla en un horno microondas a la máxima potencia (150 W), dejando reaccionar durante un corto período de tiempo (1,5 min aproximadamente), a una temperatura de 60 °C. Tras ello, la parte no complejada se elimina adicionando un disolvente, obteniendo así un precipitado que se secará posteriormente a 400 °C (Mulay, 2011). Estos parámetros pueden modificarse en función de las propiedades y estabilidad de la molécula huésped (Kfoury y col., 2016).

### 2.5.5. Complejación en pasta

En este método se añade una pequeña cantidad de agua a la mezcla del huésped y CD, suficiente para formar una pasta. A continuación, la mezcla se



introduce en un mortero y se agita con movimientos circulares hasta obtener una pasta, pudiendo realizar el proceso en una amasadora, cuando se requieren grandes cantidades de producto. El tiempo requerido para obtener los complejos dependerá del analito a complejar (Chaudhary y Patel, 2013).

El complejo resultante se puede secar directamente o bien lavarse con una pequeña cantidad de agua, recuperando los complejos formados por filtración o centrifugación. A veces, en el proceso de secado obtenemos una masa dura en lugar de un polvo fino; ello depende del analito y de la cantidad de agua utilizada inicialmente.

En general, la masa dura se puede secar completamente, aplicando posteriormente un proceso de molturación para obtener los complejos en forma de polvo.

#### **2.5.6. Mezcla húmeda y calefacción**

Para hidratar el analito y las CDs, en este procedimiento se requiere poca cantidad (entre un 20-25%) o ausencia de agua.

Las CDs y el analito se mezclan bien y se colocan en un recipiente herméticamente cerrado, que se calienta a unos 100 °C, secando posteriormente los complejos. La cantidad de agua añadida, el grado de mezcla y el tiempo de calentamiento deben ser optimizados previamente para cada analito (Martin del Valle, 2004).

#### **2.5.7. Método de extrusión**

La extrusión combina el mezclado y el calentamiento. Las CDs, el analito y el agua pueden mezclarse antes de ser introducidos en la extrusora. El grado de mezcla, la temperatura de calentamiento y el tiempo, se controlan de forma automatizada. Dependiendo de la cantidad de agua, los complejos de extrusión se pueden secar a medida que se enfrían o bien en un horno.

Este método posee dos grandes ventajas ya que es un proceso continuo y que necesita poca cantidad de agua.

Sin embargo, una de las desventajas que presenta este método se debe al calor generado, ya que si bien en unos casos puede ser favorable, en otros puede afectar la estabilidad del analito a complejar (Chaudhary y Patel, 2013).

#### 2.5.8. Mezcla en seco

Determinados analitos se pueden complejar directamente al combinarlos con las CDs, esto suele ocurrir con aceites o analitos líquidos (Martin del Valle, 2004; Chaudhary y Patel, 2013).

La cantidad de mezcla y el tiempo requerido depende del analito a complejar.

Habitualmente, este método se lleva a cabo a temperatura ambiente. La gran ventaja que presenta este método es que no necesita que se añada agua, salvo que se requiera una etapa de lavado.

No obstante, muestra diversas desventajas entre las que destaca la posible formación de aglomerados al trabajar a gran escala, lo que da lugar a que la mezcla entre el analito y las CDs no sea homogénea, provocando que la formación de los complejos no sea completa.

#### 2.6. MÉTODOS DE SECADO DE LOS COMPLEJOS FORMADOS

Para obtener complejos en estado sólido, debemos retirar el disolvente (habitualmente agua). Así, los complejos pueden secarse en un horno, en un secador de lecho fluido u otros equipos (atomizadores, liofilizadores). La elección de uno u otro dispositivo requiere tener en cuenta ciertas consideraciones. En primer lugar, se tendrá un cuidado especial con los complejos durante el proceso de secado para que el analito no se vea afectado por la temperatura. Así, los complejos formados con analitos cuya temperatura de ebullición es menor a 100 °C, se deben secar a temperaturas bajas para evitar pérdidas de analito.

Por ello, cuando trabajamos con analitos volátiles algunas de las condiciones del secado por atomización deben modificarse con el fin de minimizar las posibles pérdidas, y en consecuencia el rendimiento. En resumen, para los compuestos altamente volátiles o sensibles al calor no es viable el secado por atomización (Ain, Kumar y Pathak, 2015).

Como alternativa, es posible utilizar un liofilizador para secar estos complejos, ya que, al trabajar a temperatura, se reduce la pérdida de analitos volátiles. Además, el secado por congelación es muy útil para analitos sensibles al calor y para complejos solubles como los hidroxipropilados.

Los complejos también pueden secarse por aspersión, controlando la formación de precipitados para evitar que se formen partículas demasiado grandes, que pueden bloquear el dispositivo de vaporización o la boquilla.

### 2.7. LIBERACIÓN

Una vez que los complejos están formados y secos, son muy estables, alargando la vida del analito a temperatura ambiente y en condiciones de baja humedad.

Al estar los complejos disueltos en agua se produce la liberación controlada del analito. Este proceso se desarrolla en dos fases: primero se disuelve el complejo e inmediatamente, se libera el analito hasta llegar a su límite de solubilidad en agua, intercambiando su posición de la cavidad interna de la CDs por la de las moléculas de agua circundantes, estableciéndose un equilibrio entre el analito libre y el complejo (Martín del Valle, 2004).

Al formarse complejos con distintos analitos, estos no pueden liberarse al medio en la misma proporción, ya que cada uno de ellos tiene diferente solubilidad en agua, y siempre ha de cumplirse el equilibrio individual, marcado por sus respectivas constantes ( $K_c$ ).

### 2.8. MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CDS

La evaluación de la formación de un complejo de inclusión huésped-CD y su caracterización completa no es una tarea sencilla y a menudo requiere el empleo de diferentes métodos de análisis, cuyos resultados deben examinarse y combinarse, ya que cada método explora una característica particular del complejo de inclusión.

Estas modificaciones pueden ser físicas (solubilidad, tensión superficial); químicas (reactividad, variaciones en el valor de las constantes de ionización ácido-base); o espectroscópicas, aportando datos cualitativos (posición de los máximos), o cuantitativos (variaciones en el coeficiente de absorción molar o en la intensidad de fluorescencia) de los parámetros espectrales (Singh y col., 2010; Mura, 2014).

Los métodos espectroscópicos son los más adecuados para la detección de estos complejos en disolución, teniendo en cuenta que la naturaleza de las fuerzas implicadas en su formación son débiles (Martín y col., 1985).

### **2.8.1. Métodos de detección de complejos sólidos**

#### *2.8.1.1. Difracción de rayos-x*

Se considera la técnica más común para la caracterización e identificación de la estructura cristalina del complejo (Mura, 2015).

Dentro del estudio de la difracción de rayos x, se pueden distinguir dos técnicas analíticas diferentes, la difracción de rayos x monocristal y la difracción de rayos x en polvo. En el primer caso, se la considera una técnica no destructiva, que proporciona la estructura tridimensional de toda la molécula (dimensión, posición de los átomos dentro de la red cristalina, y las longitudes y ángulos de los enlaces) y además se obtiene la información sobre su identidad molecular, conformación y empaquetamiento, sin embargo su aplicación en el estudio de los complejos de inclusión es bastante limitada, debido a que esta técnica requiere de la disponibilidad de cristales únicos estables a una determinada dimensión que varía entre 80 y 250  $\mu\text{m}$ , y hay muy pocos complejos que cumplan estos requisitos.

Por otro lado, la difracción de rayos X en polvo es usada ampliamente para la caracterización de las CDs y de los complejos de inclusión, ya que permite analizar muestras finamente trituradas y homogeneizadas.

No obstante, los diagramas de difracción son una prueba indiscutible de la formación de los complejos de inclusión, ya que si se compara los diagramas de la molécula huésped, de la CDs sola y del complejo, se evidencian cambios en el estado sólido como consecuencia de las interacciones entre los componentes.

Esta técnica tiene la ventaja de no requerir ningún tratamiento previo de la muestra, y a diferencia de los métodos térmicos, la muestra no sufre ningún cambio físico-químico durante la obtención del espectro; además puede ser reutilizada para un análisis posterior (Mura, 2015).

#### 2.8.1.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN aporta una evidencia directa de la inclusión de la molécula huésped dentro de la cavidad de la CD, mediante la observación de los desplazamientos químicos del protón ( $^1\text{H}$  RMN), o del carbono ( $^{13}\text{C}$  RMN), entre la molécula huésped libre, la molécula anfitrión y el complejo formado.

Además, los desplazamientos químicos no sólo evidencian la formación del complejo de inclusión, sino que también dan información sobre la estequiometría, estabilidad, mecanismo y geometría de los complejos formados.

Como consecuencia de la inclusión de la molécula huésped en la CD, el espectro del complejo exhibe un desplazamiento de los protones H3 y H5, confirmando la formación del complejo de inclusión (Schneider y col., 1998, Fielding, 2000; Mura, 2014).

Así, se ha descrito que desplazamientos de delta:  $\Delta\delta \text{ H3} > \Delta\delta \text{ H5}$  ó  $\Delta\delta \text{ H3} < \Delta\delta \text{ H5}$ , son indicativos de la inclusión parcial o total de la molécula huésped, respectivamente (Greatbanks and Pickford, 1987, Rekharsky y col., 1995).

Las técnicas de RMN NOESY (Efecto nuclear *Overhauser*) y ROESY (Efecto rotacional *Overhauser*), han sido ampliamente utilizadas para determinar la estructura de numerosos complejos de inclusión, como se ha descrito recientemente para el estudio de naringenina con  $\beta$ -CDs (Yang y col., 2013).

#### 2.8.1.3. Espectroscopía de absorción infrarroja

La espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) se ha convertido en una técnica de análisis rutinario en el estudio de los complejos sólidos. Permite identificar los modos de vibración de la molécula huésped y la CD, que se perturban durante el proceso de inclusión. Los cambios en las bandas características de las moléculas huésped, desaparición, ampliación o las variaciones en la intensidad del pico y/o desplazamientos en su longitud de onda, son indicativos de la formación de complejos de inclusión (Mura, 2015).

Las principales ventajas de esta técnica son su amplia difusión, limitado coste, elevada sensibilidad y selectividad, y la rapidez y facilidad de adquisición de los espectros. Sin embargo, una posible desventaja estriba en la dificultad en la preparación de la muestra para su análisis (Mura, 2015). Esta desventaja, puede solventarse utilizando la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), donde la muestra sólida (finamente pulverizada), se irradia directamente con una o más bandas de radiación de longitud de onda comprendida entre 1 y 2.5  $\mu\text{m}$ , o 10.000 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , que penetra a través de la superficie de la capa de partículas, excita los modos de vibración de las moléculas del analito, y se dispersa en todas direcciones. De este modo, se produce un efecto de reflectancia que depende de la composición de la muestra.

Si la fracción de molécula huésped encapsulada es inferior al 25 %, las bandas de las CDs cambian ligeramente y las bandas que podrían ser asignadas a las moléculas huésped, pueden enmascarse fácilmente por las bandas del espectro de las CDs.

Estudios espectrales del FTIR dan información sobre la participación del hidrógeno en diversos grupos funcionales, que se puede comprobar evaluando los desplazamientos de las bandas de absorción a frecuencias más bajas. El aumento de la intensidad de pico y el ensanche de la banda, se debe a la vibración del grupo involucrado en la formación de los enlaces de hidrógeno (Bencini y col., 2008).

#### 2.8.1.4. Espectroscopía Raman

La espectroscopia Raman ha avanzado mucho en los últimos años y su aplicación en la industria farmacéutica ha aumentado enormemente (Krishna Mohan y col., 2012). Es una herramienta útil para la investigación de los estados vibracionales de las moléculas y monitorizar los cambios en la estructura de los enlaces moleculares. En comparación con la espectroscopia FTIR, la Raman apenas necesita preparación de la muestra, no interfieren las bandas de absorción del agua, y la información que aporta es similar (Mura, 2015).

El espectro Raman de las CDs presenta regiones libres de bandas, que pueden ser utilizadas como marcador de la presencia de la molécula huésped, tales como la vibración de los enlaces dobles (C=O) y (C=C) y los enlaces C-H de

los anillos aromáticos (Ribeiro-Claro y col., 2006). La presencia de picos en la región 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de insaturaciones en una molécula (Frank, 1999), utilizando las variaciones de las bandas Raman en la región 1500-1800  $\text{cm}^{-1}$ , para justificar la formación de complejos de inclusión de curcumina (Mohan y col., 2012).

Se aconseja el empleo de la espectroscopia Raman en el caso de complejos en medios líquidos, donde la presencia de soluciones acuosas no supone un obstáculo, como ocurre en el caso de la espectroscopia IR (Rao y col., 2006).

#### 2.8.1.5. Métodos térmicos

Las diferentes técnicas analíticas que se engloban bajo el paraguas de los métodos térmicos, son adecuadas para la determinación de complejos de inclusión en estado sólido, o bien en el caso de complejos en medios líquidos, pero aislados y cristalizados para facilitar su evaluación.

Las técnicas térmicas más empleados son la calorimetría diferencial de barrido (DSC), el análisis térmico diferencial (DTA), la termogravimetría (TG), termogravimetría diferencial (OTGL) y calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

Debemos tener en cuenta que cuando se realiza la incorporación de la molécula huésped a la CD, se produce un desplazamiento del punto de fusión o ebullición de la molécula a temperaturas más elevadas, llegando a desaparecer o quedar enmascarado en torno a la temperatura de descomposición de las CDs (300 °C). Esta modificación conlleva una mejoría en la estabilidad de una gran cantidad de principios activos, principalmente en el caso de aceites y líquidos volátiles (Uekama, 1979).

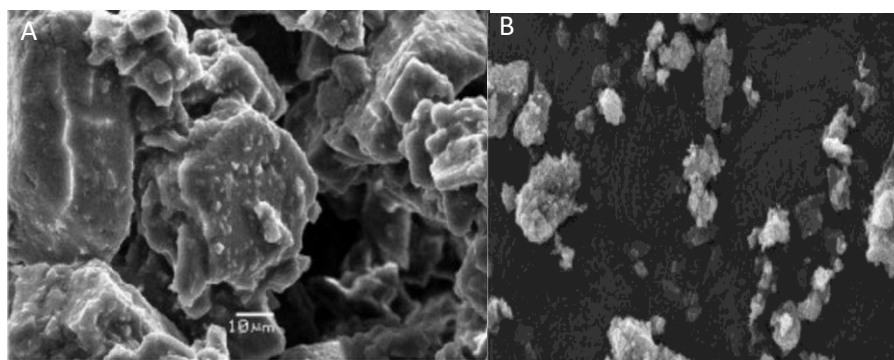
De todos los métodos térmicos enumerados, la calorimetría de titulación isotérmica es el más interesante para la caracterización de los mecanismos de interacción entre fármacos y las CDs (Bouvhemal y col., 2012), ya que es una técnica rápida y se necesita poca cantidad de muestra, al contrario que ocurre con los métodos tradicionales (Mura, 2015).

#### 2.8.1.6. Microscopia electrónica de Barrido

La microscopia electrónica de barrido (SEM) es utilizada para el estudio de los aspectos microscópicos de las ciclodextrinas, de la molécula huésped y del

complejo sólido formado. La diferencia en el estado de cristalización de la molécula huésped, puede indicar la formación de complejos de inclusión (Marzouqi y col., 2006; Jadhav y Vavia, 2008).

Las imágenes aportadas por el SEM muestran al detalle la apariencia física y el tamaño de los complejos formados. Como ocurre por ejemplo en el complejo formado entre geraniol y  $\beta$ -CD utilizando el método *slurry* y el de pasta. Como se observa en la **Figura I.11** (A), los complejos aparecen como aglomerados, sin embargo, en el caso de los complejos formados por mezcla física (**Figura I.11** B), presentan la misma apariencia que las  $\beta$ -CD. Estas diferencias descritas, se deben a la formación de complejos de inclusión (Menezes y col., 2012).



**Figura I.11.:** Micrografías obtenidas por SEM. (A) Método pasta (B) Mezcla física

### 2.8.2. Métodos de detección de complejos en solución

Llevar a cabo la evaluación y caracterización completa de la formación de los complejos de inclusión no se considera una tarea sencilla, ya que a menudo se requiere del uso de diferentes métodos analíticos.

Hay que tener en cuenta que cada método explora una característica particular de los complejos, por ello su uso combinado permite una comprensión más profunda de las interacciones huésped-anfitrión, ayudando así a la selección de la CDs más adecuada para cada analito.

Generalmente, los diferentes métodos de análisis se basan en la detección de una variación en cualquier propiedad física o química de la molécula huésped como consecuencia de la formación del complejo de inclusión. Obviamente, es



esencial que la variación sea lo suficientemente grande como para ser detectada o estimada con suficiente precisión. Además, cualquier método de medición sufre de sus propios inconvenientes, que deben ser bien conocidos y tenidos debidamente en cuenta, para evaluar cuánto pueden afectar a la fiabilidad de los resultados.

### 2.8.2.1. Método de variación de la solubilidad

El método más sencillo para la formación de complejos de inclusión son los diagramas de fases descritos por Higuchi y Connors (1965). Para su elaboración se fija una cantidad de analito, y se añade a soluciones de concentraciones crecientes de CDs, a un volumen determinado. Con el fin de conseguir que el proceso sea termodinámicamente favorable, la concentración que se añade de analito siempre es en exceso.

Estas disoluciones se mantienen a temperatura constante hasta alcanzar el equilibrio, y posteriormente son filtradas para eliminar el analito no disuelto.

Para cuantificar la concentración de analito presente en la solución, hay que tener en cuenta su solubilidad intrínseca (disuelto en su forma libre) más su solubilidad aparente (cantidad de analito disuelto gracias al complejo de inclusión) A partir de esto se deduce que hay dos tipos principales de complejos de inclusión, A y B, donde en ambos se representa la solubilidad del analito frente a la concentración de CDs empleadas en cada caso (Higuchi y Connors, 1965) (Figura I.12).

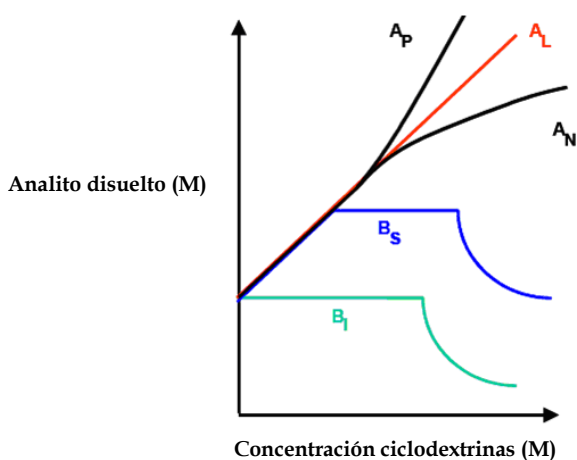


Figura I.12.: Tipo de diagramas de fases con CDs (Chaudhary y Patel, 2013).

En el caso de los diagramas tipo A se corresponden con complejos solubles y no precipitan, de hecho, la solubilidad aparente del analito aumenta linealmente con la concentración de las CDs mientras que los de tipo B, describen la formación de complejos con una solubilidad en agua limitada ya que precipitan en las condiciones del ensayo.

Los diagramas tipo B se dividen en dos subgrupos: tipo BS, que indica la formación de complejos con una solubilidad limitada; la cual corresponde a la solubilidad intrínseca y a la solubilidad aparente del analito y tipo BI, son similares a los BS pero en este caso los complejos formados son tan insolubles que ni siquiera se llega a aumentar la solubilidad del analito (**Figura I.12**).

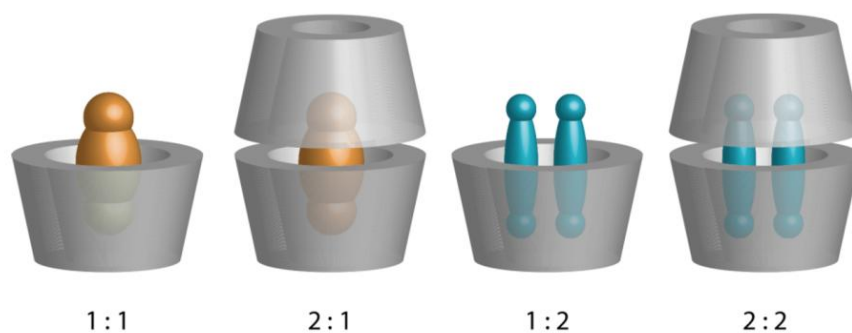
Los diagramas tipo A se subdividen en tres perfiles: tipo A<sub>L</sub>, donde la solubilidad del complejo aumenta de forma lineal conforme lo hace la concentración de CDs; tipo A<sub>P</sub> o isoterma de desviación positiva; y tipo A<sub>N</sub> o isoterma de desviación negativa (**Figura I.12**).

Los diagramas de tipo A<sub>L</sub> son de primer orden con respecto a la concentración de CDs (L) y también pueden ser de primer orden o superior con respecto a la concentración de analito (S); por ejemplo: SL, S2L, S3L, ..., SmL. Si la pendiente del sistema tipo A<sub>L</sub> es mayor que uno, indica que los complejos son de orden superior a uno para el analito. Una pendiente menor de uno, no excluye necesariamente los complejos de orden superior, sino que se supone que los complejos son 1:1, en ausencia de información adicional.

El tipo A<sub>P</sub> sugiere la formación de complejos de orden superior a uno respecto a las CDs, es decir, SL<sub>2</sub>, SL<sub>3</sub>, ..., SL<sub>n</sub>. La estequiometría del tipo A<sub>P</sub> se puede calcular tras el ajuste de las curvas. En cambio, los diagramas de tipo A<sub>N</sub> son sistemas difíciles de interpretar.

Tradicionalmente, los diagramas de fase tipo B se suelen presentar en las β-CDs, ya que tienen una solubilidad limitada en agua, mientras que los tipo A son más habituales en las CDs modificadas, como las HP-β-CDs, ya que dan lugar a complejos altamente solubles.

Dentro de la clasificación anterior, se puede determinar la existencia de otros subtipos (**Figura I.13**).



**Figura I.13.:** Formación de los diferentes tipos de complejos (Crini, 2014).

La formación de los complejos 1:1 ( $A_L$ ), ocurre cuando el complejo está formado por una molécula de CDs y otra de sustrato. En este tipo de complejos se observa un aumento lineal en la solubilidad del sustrato.

La formación de complejos 1:2 ( $A_F$ ), se produce cuando el complejo está formado por dos moléculas de sustrato y una CD.

La formación de complejos 2:1, ocurre cuando una molécula huésped es atrapada por 2 CDs.

Y por último, la formación de complejos 2:2 se debe a que 2 CDs pueden encapsular al mismo tiempo, dos moléculas huésped (Landy y col., 2007).

Estos sistemas de diagrama de fases no solo permiten la evaluación cualitativa de los complejos de inclusión, sino que también se utilizan para calcular la  $K_c$ .

Para complejos con estequiometría 1:1, la solubilidad se calcula mediante la siguiente expresión:

$$S_T = S_0 + [S - CD]$$

donde  $S_0$  es la solubilidad acuosa del analito en el medio de complejación. En este caso, la  $K_c$  se puede calcular a partir de la pendiente de la isoterma, tal y como muestra la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Pendiente}}{S_o(1 - \text{Pendiente})}$$

donde la pendiente de la recta siempre será menor que la unidad.

Para complejos tipo  $[S_mL_n]$ , la solubilidad responde a las expresiones siguientes:

$$\begin{aligned} [S]_t &= S_o + m[S_m - L_n] \\ [L]_t &= [L] + n[Su_m - L_n] \end{aligned}$$

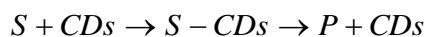
Los valores de  $[S_mL_n]$ ,  $[Su]$  y  $[L]$  pueden ser obtenidos con las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} [S] &= S_o \\ [S_mL_n] &= \frac{[S]_t - S_o}{m} \\ [L] &= [L]_t - n[S_mL_n] \end{aligned}$$

donde  $S_o$  es el producto de solubilidad de  $Su$  (en ausencia de CDs),  $[S]_t$  es la concentración total de  $Su$  (complejado y no complejado) y  $[L]_t$  es la concentración total de CDs.

#### 2.8.2.2. Métodos cinéticos

A partir de la formación de complejos de inclusión se ha podido comprobar que las CDs son capaces de acelerar determinadas reacciones gracias a que ejercen un efecto catalítico (Breslow y col., 1980; Sojo y col., 1999), aunque a veces pueden ralentizarlas, al proteger los sustratos de especies reactivas externas como el oxígeno (Uekama y col., 1983; Núñez-Delicado y col., 1999; Lucas-Abellán y col., 2008a) y la luz ambiental (Uekama y col., 1978b). En definitiva, podemos decir que modifican la constante de velocidad de reacción. Así, se representa el proceso de inclusión y de reacción de acuerdo con el siguiente esquema:



el incremento o descenso de la velocidad de reacción será indicativo de la formación del complejo de inclusión.

El cálculo de la constante de formación del complejo  $K_c$ , se llevaría a cabo aplicando una metodología análoga a la cinética de Michaelis-Menten. Otra metodología para poder calcular este valor sería mediante las representaciones gráficas de Lineweaver-Burk.

Los métodos cinéticos permiten el cálculo de las constantes de formación del complejo en el caso de moléculas químicamente lábiles, a las que no se les pueden aplicar otras metodologías (Uekama y col., 1978a).

#### 2.8.2.3. Métodos instrumentales

En los últimos años, el desarrollo que han experimentado las técnicas instrumentales, ha contribuido a que se apliquen habitualmente en la detección de complejos de inclusión y para el cálculo de las constantes de asociación de los mismos, abarcando desde las más versátiles y utilizadas, como la espectroscopia de absorción UV-VIS, hasta las más sofisticadas, como el modelado molecular.

##### 2.8.2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-VIS

Es una técnica simple, económica, rápida y muy útil para el estudio de la formación de complejos de inclusión en disolución, cuando esta da lugar a una modificación significativa del espectro de absorción de la molécula a estudio (Mura, 2014). Constituye, junto con el dicroísmo circular (DC), una de las técnicas instrumentales más utilizadas en la detección de complejos de inclusión con CDs.

La formación de complejos de inclusión se ha evidenciado por la observación de desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos del máximo de absorción del espectro de la molécula huésped de eritromicina (Song y col., 2011), los desplazamientos cortos de la longitud de onda ( $\lambda_{\max}$ ) del máximo de absorción de hidrocortisona (Chun y col., 1993), y el aumento o disminución de la intensidad del máximo de absorción de danazol, con o sin cambios en  $\lambda_{\max}$ .

Además, debemos tener en cuenta que un gran número de moléculas orgánicas son muy poco solubles en agua, no dando lugar a soluciones homogéneas, por lo que son difícilmente analizables por esta técnica. No obstante, se considera que la solubilización es debida a la inclusión, pudiendo obtener el espectro de absorción en solución acuosa, observando variaciones en su espectro comparables a las que se observarían al disolver la molécula en solventes de baja polaridad, con respecto a otros solventes más polares (Basan, 2001).

La estequiometría y la estabilidad de la constante de complejación puede calcularse evaluando los cambios del espectro de absorción, mediante la relación molar, el método Job's plot (Connors, 1987), o aplicando el método de desplazamiento espectral (Benesi-Hildebrand o la ecuación de Scott) (Ungaro y col., 2011).

La desventaja que presenta este método es su baja especificidad, ya que puede sufrir interferencias por la presencia de otras sustancias, no teniendo una evidencia real de la formación del complejo de inclusión (Mura, 2015).

#### 2.8.2.3.2. Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica de fácil manejo, rápida y extremadamente sensible para el estudio de la formación de complejos de inclusión en disolución con moléculas fluorescentes. Tras la inclusión de un analito fluorescente en la cavidad de las CDs, se observa un aumento de la fluorescencia, esto es debido a la protección que ofrece las CDs frente a procesos de extinción y de desintegración no radiactiva (Madrid y col., 1999).

La detección del complejo puede establecerse en función de los cambios espectrales observados, tanto en el espectro de excitación, como en el de emisión, también en la mejora o incremento de la intensidad de la luminiscencia, en el rendimiento cuántico, en las variaciones en los tiempos de vida de los estados excitados, en la mejora (o inhibición) de los procesos de formación de excímeros, así como en las modificaciones cuantitativas acaecidas en los procesos de amortiguación de fluorescencia y transferencia de energía.

La gran ventaja que presenta este método es su elevada sensibilidad, pero muestra diversas limitaciones como son el campo de aplicación, ya que solo se puede utilizar con moléculas fluorescente, la preparación de las muestras es

tediosa y requiere de mucho tiempo, ya que se requiere un cuidado muy estricto para evitar interferencias (Meo y col., 2006).

Al igual que para las técnicas UV y DC, la estequiometría y las constantes de estabilidad de los complejos de inclusión, se calculan a partir de los cambios del espectro de fluorescencia de la molécula huésped en presencia de concentraciones crecientes de CDs (Mura, 2014).

#### 2.8.2.3.3. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica que permite demostrar la formación de complejos de inclusión con CDs en solución acuosa. La formación de los complejos de inclusión se puede detectar debido al aumento de la actividad óptica.

Los espectros de DC se caracterizan por su signo, magnitud y el máximo de longitud de onda.

De acuerdo a la simetría, el signo del efecto Cotton inducido depende de la relación espacial entre el centro de simetría y el cromóforo perturbado; mientras que la magnitud del efecto depende de la rigidez del complejo formado (Uekama, 1978).

En particular, el efecto Cotton positivo se observa si el momento dipolar de transición del huésped es paralelo al eje de simetría de las CDs, mientras que será negativo cuando es perpendicular (Fromming y Szejtil, 1994). Por lo tanto, el signo y la intensidad del efecto Cotton inducido de una molécula huésped cuando se compleja con una CD, puede dar una idea sobre el grado de penetración y orientación del huésped en la cavidad de la CD (Mura, 2014).

#### 2.8.2.3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Para poder distinguir entre las moléculas huésped incluidas o no en el interior de las CDs, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), es una herramienta que juega un papel muy importante, ya que permite elucidar la estructura de los complejos de inclusión. Aunque se pueden realizar distintos tipos de RMN, los más extendidos son de  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . De hecho, los experimentos llevados a cabo con  $^1\text{H}$ -RMN y con  $^{13}\text{C}$ -RMN proporcionan una amplia información sobre los complejos de inclusión, ya que ambos se basan en la

observación de los desplazamientos químicos del protón o del carbono respectivamente, y en la tasa de relajación entre la molécula libre y la complejada.

Los análisis de los desplazamientos químicos del núcleo de la molécula complejada varían conforme aumenta la concentración de las CDs, esto permite el cálculo de la constante de complejación, determinar el mecanismo de complejación, el grado de penetración de la molécula en el interior de la cavidad de la CD y la geometría de los complejos en disolución (Harabagiu y col., 2004).

Así, la <sup>1</sup>H-RMN es la más aplicada ya que permite obtener espectros en solución acuosa deuterada, y la mayoría de los complejos con CDs se estudian en agua.

El principal inconveniente de esta técnica, es la escasa solubilidad que presentan los complejos con CDs en D<sub>2</sub>O, esto hace que se requiera el uso de otros disolventes, lo que podría modular las interacciones CDs analito respecto al medio acuoso. Por el contrario, la <sup>13</sup>C-RMN permite la obtención de los espectros en agua donde la solubilidad es mayor, pero al ser menos sensible, requiere el empleo de concentraciones más elevadas de CDs y complejo.

El empleo de otros disolventes orgánicos deuterados puede alterar y descomponer el complejo. Así, el dimetil sulfóxido (DMSO) o el dioxano, parecen ser los más apropiados debido a su elevada polaridad, a la vez que contribuyen a mantener la estabilidad del complejo.

Así mismo, en la espectroscopía de RMN se ha observado un fenómeno muy común denominado NOE, consistente en la transferencia de la polarización de un espín nuclear de una población a otra, entre aquellos átomos próximos entre sí. Por lo que las distancias interatómicas derivadas de los NOE son particularmente útiles para aclarar la estructura tridimensional de una molécula o de un complejo. Además, basado en este efecto se pueden llevar a cabo experimentos en dos dimensiones (2D), que permiten evidenciar de una forma clara y rápida la proximidad espacial de los átomos en el espectro, lo que facilita la interpretación de los datos.

#### 2.8.2.3.5. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico.

Es una técnica espectroscópica de gran utilidad para la caracterización de especies químicas que contienen electrones desapareados, incluyendo radicales



libres. Por lo tanto, a pesar de que su aplicación es más limitada que la RMN, puede ser un método útil y muy específico para evaluar los complejos de inclusión de especies radicales con CDs en soluciones acuosas.

Dado que la constante de acoplamiento de los radicales es muy sensible a los cambios de polaridad, su modificación debido al movimiento hacia un ambiente menos polar que el agua, como es la cavidad de las CDs, confirma la formación de complejos de inclusión (Mura, 2014).

Los experimentos de resonancia de espín electrónico, junto con los métodos de  $^1\text{H}$ -RMN, modelos electroanalíticos y moleculares, se usan para caracterizar completamente la interacción huésped-anfitrión, como por ejemplo entre una nueva nitrooxoisoa porfina y CDs nativas y sus derivadas (Pérez-Cruz y col., 2013).

#### 2.8.2.3.6. Modelado molecular

El modelado molecular permite obtener la estructura geométrica de los complejos de inclusión mediante el cálculo de las energías de acoplamiento. Por ello, se considera una potente herramienta para predecir y explicar los mecanismos de formación de los complejos de inclusión y su estructura (Capello, y col., 2006; Miro y col., 2009). Se basa en la búsqueda de la correlación entre la determinación experimental de las constantes de equilibrio de los complejos y los parámetros teóricos que describen el proceso de inclusión, tales como la energía de acoplamiento, las interacciones hidrofóbicas y intermoleculares.

Hay que destacar que este método solo proporciona valores predictivos, lo cual podría ser útil en estudios previos para seleccionar la CD a emplear (Bilensoy, 2011).

#### 2.8.2.3.6. Métodos voltamétricos y polarográficos

La polarografía y voltametría son técnicas adecuadas para el estudio de la formación de complejos de inclusión de CDs con moléculas huésped electroactivas, y pueden utilizarse para la determinación de la naturaleza de los complejos de inclusión (Matsue y col., 1984, Jones y Parr, 1986). Además, son métodos altamente sensibles, con un bajo consumo de reactivos y adecuados para

evaluar las constantes de asociación de los complejos de inclusión con concentraciones bajas de moléculas huésped (Radi y Eissa, 2010).

En polarografía, la complejación con CDs da lugar a una disminución de la corriente; esta disminución se debe a que el complejo de inclusión presenta un coeficiente de difusión menor que la molécula libre. Por otra parte, los cambios observados en el potencial de onda media de la molécula huésped, se deben a la redistribución de electrones a consecuencia de la presencia de CDs, y la intensidad de tales cambios refleja la tendencia de las moléculas huéspedes a formar complejos de inclusión.

Análogamente, en voltametría la formación de complejos de inclusión provoca el desplazamiento del pico del potencial catódico en sentido negativo, y al mismo tiempo, se produce una disminución de la intensidad de la corriente.

El pulso diferencial catódico y la voltametría cíclica se han aplicado para determinar las constantes de estabilidad y la energía de Gibbs de los complejos de inclusión de lumazin con  $\alpha$ -CD o  $\beta$ -CD (Ibrahim y col., 2002).

#### 2.8.2.3.7. Conductimetría

La conductividad eléctrica se ha empleado para determinar las constantes de equilibrio de los complejos entre CDs y una gran variedad de tensioactivos iónicos y moléculas anfífilas. Las constantes de equilibrio de los complejos formados por  $\beta$ -CD con bromuro de dodeciltrimetilamonio en solución acuosa fueron evaluadas mediante conductividad eléctrica, pero hay que tener en cuenta la posible asociación del contraión con el complejo de inclusión y la relación entre la conductividad molar con la concentración de dicho compuesto (Junquera y col., 1995).

La medida de la conductividad se ha empleado para investigar el comportamiento de tres fármacos antidepresivos (imipramina, desipramina, amitriptilina), en solución acuosa, tanto en ausencia como en presencia de CDs. Se observó que todos los fármacos exhiben fenómenos de agregación, y el efecto de las CDs sobre dicha agregación se ha evaluado mediante la determinación de la "concentración crítica de la agregación", y el grado de disociación del sistema ternario  $\beta$ -CD/fármaco/H<sub>2</sub>O (Junquera y col., 2001).

Además, se han llevado a cabo ensayos conductimétricos para confirmar el efecto de la longitud de la cadena del agente tensioactivo sobre la formación de los complejos de inclusión, determinando la estequiometría y la constante de asociación de los complejos entre  $\beta$ -CD y una serie de bromuros de *n*-alquiltrimetilamonio a una concentración micelar crítica (Rafati y col., 2005).

#### 2.8.2.3.8. Cromatografía

Las CDs son capaces de formar complejos de inclusión altamente selectivos con una variedad de moléculas huésped y en particular, están dotados de un poder de discriminación hacia sustancias enantioméricas, en virtud de la quiralidad inherente de su estructura.

Estas propiedades se han explotado en el desarrollo de fases estacionarias, como modificadores de fase móvil en cromatografía, en particular en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Juvancz y Szejtli, 2002), y en electroforesis capilar (EC) (Kwaterczak y col., 2009), para la separación de enantiómeros o de compuesto estrechamente relacionados, incluyendo isómeros geométricos.

Además, HPLC y EC se han utilizado para la determinación de formación de complejos huésped-CD, aportando una vía para la determinación de constantes de asociación de los complejos de inclusión, precisa y reproducible. Sin embargo, ambos métodos tienen la desventaja de no aportar información estructural sobre el complejo de inclusión formado (Mura, 2014).

### 2.9. APLICACIONES DE LAS CDS

El resultado de la complejación de un analito con una CD, desde el punto de vista microscópico, es una microencapsulación. Esto puede originar cambios en las propiedades químicas y físicas de la molécula huésped, deseables para numerosas aplicaciones industriales, como pueden ser:

- Estabilización de moléculas sensibles a la oxidación en presencia de oxígeno y luz.
- Modificación de la reactividad química.
- Fijación de moléculas altamente volátiles.
- Aumento de la solubilidad.

- Aumento de la biodisponibilidad.
- Transformación de sustancias líquidas en polvo.
- Reduce la evaporación y estabiliza los aromas.
- Reduce la hemolisis.
- Evita incompatibilidades en las mezclas.
- Protección frente a la degradación por microorganismos.
- Enmascaramiento de malos olores y sabores.
- Enmascaramiento de pigmentos o colores.

Estas características de las CDs, unidas a la ausencia de efectos tóxicos y a su bajo precio (por ejemplo, el kg de  $\beta$ -CDs oscila entre 4,5 y 5,40 €), las hacen adecuadas para su aplicación en diferentes sectores: química analítica, agricultura, farmacia, medicina, industria alimentaria, cosmética o textil, entre otras (Kfoury y col., 2016).

### **2.9.1. Industria farmacéutica**

Una de las aplicaciones clásicas de las CDs es en la industria farmacéutica. Al ser una industria en continua evolución, necesita crear nuevas formulaciones, tanto para aumentar las propiedades de los principios activos como para reformular especialidades farmacológicas ya existentes y las CDs ofrecen importantes ventajas respecto a las formulaciones tradicionales.

La complejación de fármacos en CDs ha demostrado que puede mejorar su absorción a través de la membrana biológica, aumentar su solubilidad, y además actuar como transportadores moleculares y potenciadores de la penetración, al aumentar la biodisponibilidad del fármaco en la superficie de la membrana (Loftsson y Brewster, 2011), y por tanto, disminuir sus efectos adversos.

La baja solubilidad de la gran mayoría de los fármacos y su formulación clásica, la cual incluye una combinación de disolventes orgánicos, surfactantes y condiciones extremas de pH, suelen provocar irritación u otro tipo de reacciones adversas.

En cambio, las CDs no son irritantes y ofrecen ventajas adicionales, tales como: la estabilización de los compuestos activos, la reducción de su volatilidad y la capacidad de enmascarar sabores amargos o irritantes y malos olores de los

fármacos (Zhao y col., 1995; Szetjli, 1998; Hedges, 1998; Irie y Uekama, 1999; Dardeer, 2011).

Se han descrito y comercializado numerosas aplicaciones de CDs en el sector farmacéutico. Por ejemplo, la incorporación de  $\beta$ -CDs o de sus derivadas puede aumentar la solubilidad en agua de los diversos principios activos. En algunos casos, esto permite un aumento del efecto farmacológico ya que se puede reducir la dosis a administrar lo que se traduce en una mejora de la biodisponibilidad del fármaco. En la **Tabla I.10** se muestra diversos productos farmacéuticos que contienen diferentes tipos de CDs.

**Tabla I.10.:** *Productos farmacéuticos que contienen diversos tipos de CDs (Agrawal y Gupta, 2012).*

Nombre comercial	Forma de aplicación	CDs	Principio activo
<b>Caverject</b>	Solución intravenosa	$\alpha$ -CDs	Alprostadil
<b>Meiact</b>	Tableta	$\beta$ -CDs	Cefalosporina
<b>Propulsid</b>	Supositorio	HP- $\beta$ -CDs	Cisaprida
<b>Aerodiol</b>	Spray Nasal	M- $\beta$ -CDs	17 $\beta$ -Estradiol
<b>Geodon</b>	Solución Intramuscular	SBE- $\beta$ -CDs	Ziprasidona mesilato

Se han utilizado con éxito como excipientes en formulaciones acuosas cutáneas (Uekama y col., 1992; Yang y col., 2008), en soluciones acuosas de enjuague bucal (Kristmundsdóttir y col 1996; Figueiras y col., 2009; Mannila y col., 2010), en sistemas de administración nasal de fármacos (Kublik y col., 1996; Dale y col., 2006; EMA/CHMP/333892/2013), y en soluciones oculares (Lofsson y Stefánsson, 1997; van Dorne, 1993; Jarho y col., 1996; Sigurdsson y col., 2007; Ito y col., 2010; EMA/CHMP/333892/2013).

Algunas de las aplicaciones de las CDs en el sector farmacéutico (mayoritariamente  $\beta$ -CDs), se incluyen en la **Tabla I.11**, incorporándose a

comprimidos orales (cetirizina) y en supositorios de cisaprida; las  $\gamma$ -CDs también han sido utilizadas en soluciones de minoxidil (EMA/CHMP/333892/2013).

**Tabla I.11.:** Algunas aplicaciones de las CDs en la industria farmacéutica (EMA/CHMP/2013).

	Oral	Nasal	Rectal	Dérmica	Ocular	Parenteral
$\alpha$ -CDs						X
$\beta$ -CDs	X		X	X	X	
$\gamma$ -CDs	X			X		
HP- $\beta$ -CDs	X		X	X	X	X
SBE- $\beta$ -CDs	X					X
RM- $\beta$ -CDs		X			X	

### 2.9.2. Cosmética y aseo personal

En este sector, el empleo de las CDs está ampliamente extendido, ya que son capaces de estabilizar los compuestos de interés, debido a que permiten el control de olores desagradables y proporcionan protección a los aromas en la fabricación de ambientadores y detergentes.

Estas aplicaciones se están llevando a cabo en pasta de dientes, cremas sólidas y líquidas para la piel, suavizantes para la ropa, toallitas de papel, tejidos y desodorantes, protección de aromas y sabores en barras de labios, aumento de la solubilidad de sustancias en agua y una mayor estabilidad térmica de los aceites.

Las CDs interactúan con los compuestos volátiles creando una barrera energética para minimizar la volatilización, y conseguir fragancias de larga duración (Prasad y col., 1999). En la preparación de productos de baño las CDs regulan la salida de la fragancia al formar complejos de inclusión con éstas y con fosfato de calcio (Tatsuya, 1999). En 1999 Holland y col., prepararon composiciones (en cosmética) que contenían CDs para prolongar la duración de la fragancia, pero las CDs también se utilizan para atrapar y así reducir los olores corporales (Trinh y col., 1999).

Además, las CDs se utilizan como agentes complejantes en la elaboración de polvos de talco para estabilizar las fragancias, reduciendo las mermas por evaporación u oxidación, mejorando también la eficacia antimicrobiana (Hedges, 1998).

El polvo seco de CDs, con un tamaño de partícula inferior a 12  $\mu\text{m}$ , se utiliza para el control de olores en pañales, dispositivos menstruales, toallitas de papel y preparaciones para el cuidado del cabello, con el fin de atrapar los mercaheptanos volátiles. Las HP- $\beta$ -CDs son el tipo de CDs que proporcionan una mayor protección antimicrobiana (Woo y col., 1999).

Además, las CDs se han empleado en pasta de dientes a base de sílice, con la finalidad de aumentar casi tres veces la disponibilidad de triclosán (agente antimicrobiano) (Loftsson y col., 1999). También se han utilizado en detergentes de lavavajillas y ropa, para enmascarar los olores en el punto de lavado (Foley y col., 2000; Angell y France, 2001).

Del mismo modo, las CDs se han usado en la preparación de lociones de protección solar, en una proporción 1:1 (pantalla solar/HP- $\beta$ -CDs) y en formulaciones de cremas antiarrugas. Recientemente se han realizado formulaciones de retinol con  $\gamma$ -CDs para incrementar su solubilidad acuosa y prevenir la oxidación, ya que si este componente se oxida, se forman intermedios tóxicos peroxídicos, encontrándolo en el mercado bajo diferentes marcas comerciales como Eucerin Vital Retinol R (Beiersdorf), Nutrientes y Antiedad (Efal) (Darakshan, y Khan, 2013).

Otra propiedad importante de las CDs, a explotar en el sector de fragancias y perfumes, radica en el empleo de concentraciones más bajas de ciertos aromas, que pueden provocar efectos adversos en el hombre. De hecho, el uso de productos perfumados se ha asociado con un incremento en la frecuencia de dermatitis alérgica de contacto. En este sentido se han identificado 26 fragancias sospechosas de causar esa afectación, que deben indicarse en la etiqueta del producto, si su contenido supera cierto umbral (0.01% para cosméticos de aclarado y 0.001% en cosméticos de permanencia), entre las que se encuentran derivados de síntesis química y aceites esenciales (Directiva 2003/15/CE de la Unión Europea (EC, 2003)).

Estas consideraciones revelan que la industria cosmética es en la actualidad, el mayor mercado potencial para las CDs ya que continuamente aparecen nuevas aplicaciones en mercados consolidados y emergentes, como la aromaterapia y el cosmetotextil (Crini, 2014).

### **2.9.2. Industria alimentaria**

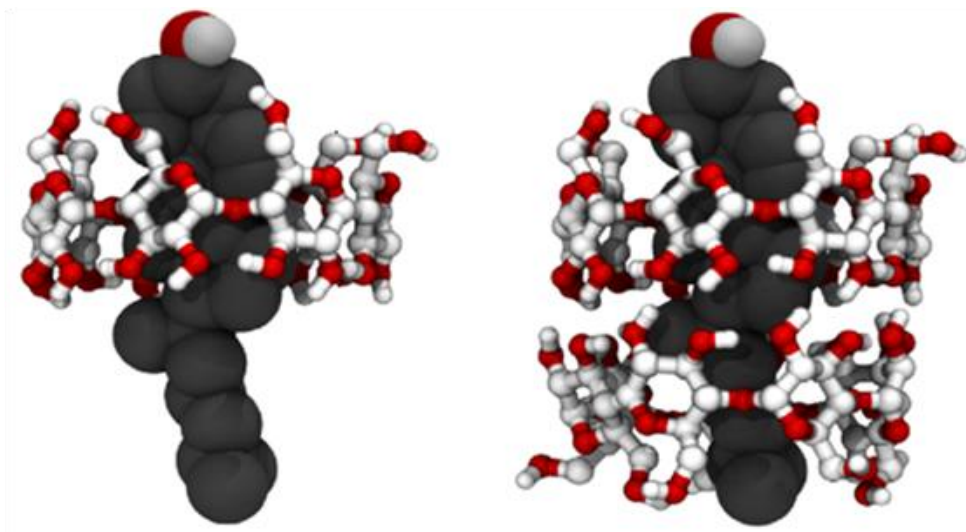
Actualmente en la industria alimentaria, se ha recomendado el empleo de las CDs para la elaboración de diferentes aditivos alimentarios para poder alcanzar una gran variedad de objetivos: proteger a los componentes lipófilos de los alimentos que son sensibles a la degradación por medio del oxígeno, la luz o el calor, conseguir solubilizar colorantes y vitaminas de los alimentos, estabilizar fragancias, sabores, vitaminas y aceites esenciales contra los cambios no deseados, suprimir los olores o sabores desagradables y lograr una liberación controlada de ciertos constituyentes alimenticios.

También se han empleado con éxito en la protección del flavor en los alimentos, durante el procesado y almacenamiento, ya que éstas forman complejos de inclusión con grasas, sabores y aditivos alimentarios, protegiéndolos de su degradación u oxidación. No hay que olvidar que los sabores pueden ser volátiles, aceites o líquidos y su complejación con CDs constituye una alternativa a la tecnología convencional de encapsulación usada para la protección de sabores (Reineccius y Risch, 1986; Reineccius y col., 2002, 2003, 2005; Kfoury y col., 2015).

En los últimos años, la industria de alimentos funcionales ha adquirido cierta relevancia y mercado, destinando las empresas esfuerzos en investigación y recursos para satisfacer las demandas del consumidor y obtener a la vez productos diferenciados. Este mercado se incrementa anualmente y abarca en la actualidad el 33% en las demandas de consumo. Los nuevos alimentos funcionales se pueden enriquecer con compuestos de naturaleza lipofílica (por ejemplo antioxidantes), pero a pesar de las numerosas ventajas que presentan estas moléculas, tienen limitado su uso en las formulaciones funcionales debido a su elevada volatilidad, limitaciones que pueden solventarse utilizando CDs (Crini, 2014).



Las CDs también se han utilizado para retener compuestos en determinados procesos industriales, por ejemplo para eliminar colesterol en leches, queso, yogurt mantequilla o huevos (**Figura I.14**) (Kwak y col., 2004; Jung y col., 2008), o incluir fitoesteros en mayonesa o en mantequilla (Astray y col., 2009).



**Figura I.14.:** Complejo de inclusión colesterol-CDs (López, de Vrie y Marrink, (2011).

Las CDs pueden provocar un endurecimiento de las grasas y aceites sin necesidad de hidrogenación, obteniendo así una emulsión con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados derivados de aceites vegetales y pescados. Además, la emulsión producida por las CDs presenta mejores características sensoriales y un aumento en la estabilidad durante el almacenamiento (Choi y col., 2009).

#### 2.9.2.1. CDs como agentes atrapadores de sabores

La complejación con CDs se presenta como una alternativa a las técnicas convencionales de encapsulación para la protección del aroma. Esto es debido a la propiedad fundamental de la encapsulación, que consiste en proporcionar una protección, básicamente a cualquier tipo de componente de sabor e inhibir o

excluir interacciones entre los diferentes componentes de la matriz alimentaria, evitando la producción de mal sabor, así como mermas en su intensidad.

#### 2.9.2.2. *CDs como agentes protectores frente a la degradación, luz y temperatura*

Diversos componentes de los alimentos los cuales son sensibles al oxígeno, a la degradación por la luz y a la temperatura, pueden ser formar complejos de inclusión con las CDs.

Los componentes aromáticos como el citral (componente responsable del olor a cítricos frescos), son sensibles a la luz. Este compuesto es susceptible a la presencia de ácidos y a la degradación oxidativa (Djordjevic y col., 2008), lo que provoca que se descomponga rápidamente durante su almacenamiento debido a una serie de reacciones de ciclación y oxidación que generan compuestos no deseados, reduciendo además su intensidad de sabor. Cuando el citral es complejado con  $\beta$ -CDs, se consigue mantener el sabor a limón, presenta un elevado grado de fotoestabilidad y se minimiza su alteración durante el almacenamiento (Strassburger y col., 2010).

Se obtuvieron resultados similares, estabilidad frente a la oxidación y luz UV, al complejar resveratrol con  $\beta$ -CDs (Lucas-Abellán, 2008; Allan, Lenehan y Ellis, 2009).

Por otro lado, hay sabores o ingredientes alimentarios sensibles al oxígeno (ácidos grasos no saturados o colorantes, entre otros), que al ser complejados con CDs mejoran su estabilidad química. Este efecto fue descrito en 1987 por Szente y Szejtli, que midieron en ingredientes libres y complejados el consumo de O<sub>2</sub>, para evaluar el grado de oxidación. Los resultados de estos experimentos, y otros posteriores, revelaron que la complejación con CDs impide “casi completamente” las alteraciones químicas del sabor debido a la presencia de oxígeno, incluso cuando se almacena el alimento en atmósferas de oxígeno puro (Szente y Szejtli 1987, 2004).

Cuando se encuentran en estado sólido, los complejos formados con sabores volátiles o AE pueden aumentar su resistencia al calor, de hecho al compararlos con las formulaciones tradicionales, el empleo de las CDs mejora la retención de dicho sabor en el alimento. Diversos estudios confirman que la formación de complejos entre las CDs y los AE, no solo ejercen un efecto protector frente a la

evaporación, sino que también los estabilizan frente a temperaturas elevadas evitando mermas durante el procesado del alimento (Szente y Szejtli 1987, 2004; Marques, 2010, Yang y col., 2013).

#### 2.9.2.3. *CDs para mejorar la vida útil de los alimentos*

Según lo expuesto anteriormente, cabe esperar que durante el almacenamiento bajo condiciones no extremas de temperatura y humedad relativa (25 °C y 60%), se alargue en los alimentos la vida media de los sabores complejados con CDs (Szente y Szejtli 1987, 2004; Marques, 2010; Kfoury y col., 2016).

Se ha podido demostrar en un estudio con 12 sabores distintos (naturales y sintéticos) complejados con  $\beta$ -CDs que durante su almacenamiento a lo largo de 14 años, en condiciones no extremas de temperatura y humedad relativa, se mantiene la estabilidad a lo largo del tiempo de dichos sabores, gracias a la encapsulación molecular (Szente y Szejtli 1987, 2004).

El poder de conservación de las  $\beta$ -CDs depende de la estructura, polaridad y geometría del sabor encapsulado, mostrando una protección más eficaz con terpenoides y propanoides que con sabores de estructura fenólica.

#### 2.9.2.4. *Aplicaciones de las CDs vacías*

El sabor amargo de los alimentos puede ser enmascarado mediante la formación de complejos de inclusión mediante el empleo de las CDs. Pero es necesario tener en cuenta que la cantidad de compuesto complejado que se libera al medio acuoso en una disolución, depende de diferentes factores, como la temperatura, la constante de complejación y las concentraciones relativas de ambos componentes.

El equilibrio dinámico establecido debido a la formación de complejos de inclusión se desplazará hacia la complejación, en disoluciones concentradas y a baja temperatura, sin embargo se dirigirá hacia la liberación del compuesto encapsulado en disoluciones más diluidas y a mayor temperatura. Por esta razón, al entrar en contacto los complejos flavor-CDs con las papilas gustativas en el interior de la boca, se comportan como una disolución diluida a 37 °C, liberando fácilmente su sabor y aroma.

Linde y col. (2009, 2010), consiguieron reducir el sabor amargo de la proteína de soja hidrolizada hasta un 90% mediante la adición de  $\alpha$ -, y  $\beta$ -CDs, lo que representa una posible solución para enmascarar el sabor amargo de los alimentos con soja y de los péptidos bioactivos, que se pueden utilizar para prevenir enfermedades. Sin embargo el estudio realizado por Gaudette y Pickering (2012b) muestra que las CDs solo pueden enmascarar el sabor amargo del té, ya que  $\beta$ -CDs solo suprime el sabor amargo de las catequinas en presencia de sacarosa y un bloqueante del sabor amargo, pero no lo elimina. Otro estudio muestra que la incorporación, en este caso, de  $\beta$ -,  $\gamma$ -CDs redujo hasta un 50% la intensidad de amargura del ginseng en un modelo de bebida energética (Tamamoto y col., 2010).

Se ha descrito que las CDs pueden reducir el sabor amargo de los zumos con sabor cítrico, como el de naranja y el de pomelo, ya que al adicionar las CDs, pueden formar complejos de inclusión con la limonina y la naringina.

Estos componentes a baja concentración poseen un sabor apreciado, pero cuando están presentes en proporción elevada, causan un fuerte sabor amargo. Así, considerando los grandes volúmenes de zumo que requiere la industria, sería menos costoso eliminar la limonina y naringina utilizando columnas rellenas de  $\alpha$ - o  $\beta$ -CD, ya que incluso pueden reutilizarse por tratamiento con álcali diluido o etanol (Astray y col., 2009).

En otro estudio se han comparado los efectos de la adición de  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -CDs a un zumo de pera, mostrando que una concentración 15 mM de  $\alpha$ -CDs puede prevenir la oxidación de los compuestos volátiles presentes, conservando así su aroma y sabor (Andreu-Sevilla y col., 2011b).

La incorporación de las CDs antes de la clarificación de la enzima se postula como una solución alternativa al agotamiento del contenido de caroteno en el zumo de zanahoria y naranja. De hecho la adición de un 3% de HP- $\beta$ -CDs al zumo homogeneizado, no solo aumenta el contenido en carotenos sino que mejora sensiblemente sus parámetros nutricionales y físico-químicos (Karangwa y col., 2012).

Otra aplicación interesante es la adición de CDs a los aceites de fritura, ya que pueden eliminar los ácidos grasos libres, reducir la formación de espuma y eliminar los residuos de la superficie del aceite (Astray y col., 2009).

Una de las aplicaciones de las CDs en la industria alimentaria es la formación de complejos de inclusión para secuestrar determinados componentes de los alimentos. Así,  $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD, se utilizaron para la extracción de compuestos fenólicos de granada, pudiendo utilizarlos directamente como materia prima para el desarrollo de alimentos funcionales (Diamantia y col., 2016).

Por otro lado, las  $\beta$ -CDs se han empleado en la elaboración de productos de origen animal, para poder eliminar de forma eficaz el contenido en colesterol, y de esta forma mejorar sus propiedades nutricionales. Entre los productos estudiados destacan la manteca de cerdo y la mantequilla donde se ha conseguido eliminar aproximadamente el 90 % de su contenido con solo un 5 % de  $\beta$ -CDs (Jung y col., 2005; Kim y col., 2006; Kim y col., 2007) o la crema de queso, donde se ha podido eliminar el contenido en colesterol, sin modificar su sabor, textura y propiedades sensoriales (Mei y col., 2012).

#### *2.9.2.5. Aplicaciones especiales de las CDs en alimentos*

Una de las aplicaciones más interesantes y desafiantes de las CDs estriba en su incorporación en envases activos, generando sistemas de liberación controlada de ciertos compuestos, para alargar la vida útil de los alimentos envasados.

Las CDs vacías o los complejos CDs-agente antimicrobiano y antioxidante incorporados en las películas de plásticos para el envasado de alimentos, reduce eficazmente la pérdidas de sustancias aromáticas y alargan la vida útil del producto. Así, se ha descrito que los complejos de inclusión de CDs con ciertos AE (eucalipto, romero y orégano), reducen su volatilidad y pérdidas durante el procesado y almacenamiento de los alimentos. Además, mejora su capacidad de captación de radicales libres (Kfoury y col., 2015).

En los envases activos de frutas o verduras frescas que se almacenan durante un largo periodo de tiempo, se produce la liberación de los componentes activos de las CDs debido al aumento de la humedad provocada por la liberación de moléculas de agua de los propios alimentos (respiración), lo que hace que el equilibrio se desplace hacia la liberación del huésped. (Ayala-Zavala y col., 2008). Sin embargo, si el objetivo es la inclusión de componentes no deseados en los alimentos, la CD los atraparán mejor cuando menor sea la humedad.

La adición de CDs a películas de embalaje proporciona mejoras en las propiedades sensoriales del producto, manteniendo de esta forma su calidad y seguridad. Se ha descrito la incorporación de CDs en películas comestibles obtenidas a partir de fuentes de carbono renovables como alcoholes y carbohidratos (Linde, Laverde y Colauto, 2011).

Se ha comprobado que los polímeros formados con etileno-alcohol-vinílico y  $\beta$ -CDs, muestran excelentes propiedades para el envasado activo de alimentos, ya que es capaz de retener componentes no deseables de los alimentos. En un estudio realizado con leche pasteurizada, se comprobó que este tipo de envase, reducía en un 23% el contenido de colesterol de la leche (López-Dicastillo y col., 2011). A pesar de las ventajas descritas, esta tecnología de envasado está infrautilizada (Linde, Laverde y Colauto, 2011).

#### **2.9.4. Agricultura e industria química**

Las CDs forman complejos con una amplia variedad de productos químicos agrícolas, incluidos herbicidas, insecticidas, fungicidas, repelentes, feromonas y reguladores del crecimiento (Lucas-Abellán y col., 2008b). De hecho, su encapsulación molecular puede mejorar su eficacia y facilitar la formulación de estos agroquímicos en una amplia variedad de formas, por ejemplo, aumentando su fluidez, humectabilidad, velocidad de disolución, estabilidad química y térmica y reduciendo su volatilidad. Además, las CD tienen la capacidad de aumentar la solubilidad aparente de varios plaguicidas hidrofóbicos y, por tanto, su biodisponibilidad para la biodegradación (Villaverde y col., 2004; Villaverde y col., 2005; Villaverde, 2007). Además, los CD presentan varias ventajas sobre los disolventes y tensioactivos no iónicos, incluyendo su menor toxicidad y mayor biodegradabilidad (Ribeiro y col., 2011).

Las CDs han sido ampliamente utilizadas en la industria química, para la separación de isómeros y enantiómeros, para catalizar reacciones y ayudar en los procesos de descontaminación de materiales de desecho. En la separación de enantiómeros por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC), se han utilizado columnas cuya fase estacionaria contiene CDs nativas o modificadas inmovilizadas.

Las CDs, además de modificarse para las reacciones de catálisis, también se modifican para reacciones de hidrólisis selectiva y en la hidroximetilación de fenoles. Estas modificaciones químicas de las CDs les confiere una gran actividad catalítica, ya que aumentan la velocidad de reacción en la conversión del ácido fenilpirúvico a fenilalanina (Atwood, 1990). Las CDs también desempeñan un papel importante en los procesos biocatalíticos, debido al aumento de la enantioselectividad.

Así, se ha podido emplear una amplia gama de CDs, las nativas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CDs) y sus modificadas (hidroxipropil, metil, alquil-carboxilada, sulfatada y alquil-sulfatada), para realizar una resolución quiral de fármacos antimalaria racémicos. (Németh y col., 2011).

En 1991 Kamal y col. demostraron que la hidrólisis de ésteres de arilpropiónico racémico por la enzima transportadora de albúmina de suero bovino, tenía una enantioselectividad baja (50-81%), mientras que con  $\beta$ -CDs no solo mejoraba la enantioselectividad (80-99%), sino que también aumentó la tasa de hidrólisis.

Las CDs se pueden utilizar en la protección del medio ambiente, solubilizando contaminantes orgánicos y metales pesados, para su eliminación de suelos, agua y atmósfera (Gao y Wang, 1998). Las aguas residuales que contienen compuestos aromáticos ecológicamente inaceptables como fenol, *p*-clorofenol y benceno; tras ser tratadas con  $\beta$ -CDs, reducen considerablemente los niveles de estos hidrocarburos aromáticos respecto de sus niveles iniciales.

Las  $\beta$ -CDs aceleran la degradación de todos los tipos de hidrocarburos que influyen en la cinética de crecimiento, produciendo un aumento de la biomasa y una mejor utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. El bajo coste de las  $\beta$ -CDs, hace posible su utilización para estos fines (Bardi y col., 2000).

#### **2.9.5. Textil y cosmeotextil**

Diversas investigaciones indican que las CDs también pueden aplicarse en el sector textil (Andreaus y col., 2010; Bhaskara, 2011; Vocina y Vivod, 2013).

El uso de la química es determinante para crear textiles con nuevas funcionalidades y así hacerlos apropiados para aplicaciones especiales, tales como resistencia a los antimicrobianos.

Las CDs son consideradas como un agente prometedor en el acabado textil. Existe una nueva línea, la cosmetotextil, en pleno desarrollo y con una creciente demanda en el mercado. La cosmetotextil no es el empleo de cosméticos ni de un nuevo tejido, sino el uso de ingredientes microencapsulados acoplados a tejidos que permiten reducir peso, la hidratación o perfumar la piel.

Tanto la cosmética como la industria textil están a la vanguardia de la investigación sobre este tema. Hay muchas posibilidades y un ingente mercado, para el desarrollo de nuevos productos textiles-cosméticos con nuevas propiedades, basadas en el uso de CDs.

#### **2.9.6. Aplicaciones biomédicas**

Actualmente, el sector médico está mostrando un enorme interés en el uso y aplicaciones de las CDs. El ejemplo más conocido del empleo de CDs es el compuesto activo sugammadex, una  $\gamma$ -CD modificada que actúa como un agente selectivo de unión a bloqueantes. Este compuesto forma un complejo con los bloqueantes neuromusculares (rocuronio o vecuronio) en plasma, reduciendo la cantidad de bloqueante neuromuscular disponible para acoplarse a los receptores nicotínicos en la unión neuromuscular. Esto produce una reversión del bloqueo neuromuscular inducido por el rocuronio o el vecuronio (Crini, 2014).

Otro ejemplo interesante es la preparación de vacunas DAPTACEL (Sanofi Group, Pasteur), para la protección contra la difteria, el tétanos y la tosferina (complejo de inclusión realizado con dimetil- $\beta$ -CD). Su capacidad para alcanzar y bloquear los canales de sodio y actuar como anestésicos, depende de su estado de protonación. Brandariz e Iglesias (2013) demostraron que el grado de complejación de las CDs varía según el estado de protonación de las moléculas huésped, hecho a tener en cuenta en la administración de los anestésicos locales.

Las CDs son la gran esperanza para el desarrollo de aplicaciones en biomedicina y nanomedicina, tales como nanopartículas, biosensores para el diagnóstico molecular, la terapia génica o la ingeniería de tejidos (Crini, 2014).



También han sido empleadas en dispositivos médicos (catéteres, prótesis, injertos vasculares, implantes óseos), e incluso, en injertos de superficie o termofijación de CDs, campo que ha despertado un gran interés, aunque solo unos pocos nanosistemas terapéuticos se han evaluado en profundidad, no alcanzando ninguno hasta la fecha la fase clínica, debido a su elevado coste (Crini, 2014).

Otro problema a resolver radica en la escasa información sobre la biocompatibilidad y toxicidad de estos nanomateriales. Así Zhang y Ma (2013) auguran una vía clínica de investigación a futuro, que debe focalizarse en el desarrollo de sistemas supramoleculares con CDs.

Los nanomateriales basados en CDs han encontrado aplicaciones en el sector biomédico, farmacéutico, en farmacoterapia, biología y biotecnología y en la industria textil, desarrollando prendas capaces de administrar fármacos por vía transdérmica, aplicación sugerida hace más de una década por Szejtli (2004).

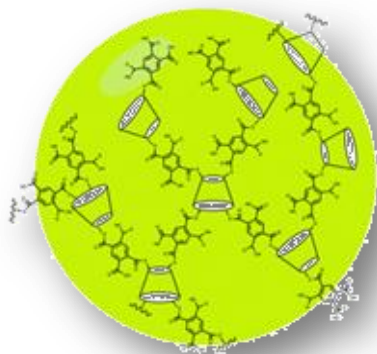
### 2.9.7. Nanotecnología

Las CDs y sus derivados se han empleado para desarrollar nanomateriales (Davis y Higson, 2011, Tejashri y col., 2013, Chilajwar y col., 2014), debido a que son capaces de formar nuevos materiales con estructuras supramoleculares versátiles (nanopartículas, nanoesponjas, nanomicellas, nanovesículas, etc.), con aplicación en la formulación farmacéutica, y en particular, en la administración de fármacos (Goyal y col., 2011, Bilensoy y Hincal, 2009).

En la actualidad, la nanotecnología está recibiendo un gran reconocimiento, por su potencial para combinar características que son difíciles de alcanzar con el uso de un solo fármaco.

Recientes avances en el sistema de administración de fármacos reside en el empleo de nanoesponjas basadas en CDs (**Figura I.15**).

Chilajwar y col., realizaron un análisis estadístico que demostró que el 40% de los medicamentos comercializados y el 90% de los fármacos en fase de desarrollo, son solubles gracias a las nanoesponjas basadas en CDs (Chilajwar y col., 2014).



**Figura.I.15.:** Estructura de las nanoesponjas basadas en CDs (Crupi, 2013).

Estas nuevas estructuras son capaces de mejorar la biodisponibilidad de un fármaco mediante la modificación de sus parámetros farmacocinéticos. Las Nanoesponjas ofrecen la capacidad de contener en su interior una gran cantidad de fármaco, en comparación con otros nanovehículos. Además, pueden resolver cuestiones relacionadas con la solubilidad, la estabilidad y la liberación (Tejashri y col., 2013).

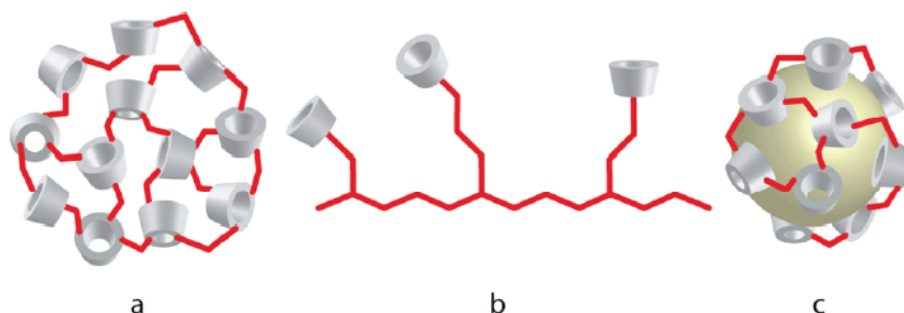
Las formulaciones habituales de las nanoesponjas permiten administrar el fármaco por vía oral, parenteral, tópica o inhalación; sin embargo, es necesario una exhaustiva caracterización previa para optimizar su rendimiento terapéutico y evidenciar el papel que juega la nanocavidad en la complejación (Crini, 2014).

### 2.9.8. Ciclodextrinas y descontaminación

Recientemente, Crini y colaboradores describieron el uso de polímeros basados en CDs reticuladas formando matrices poliméricas (**Figura I.16**), para la eliminación de contaminantes mediante procesos de adsorción (Morin-Crini y Crini, 2013).

No corresponde a un desarrollo aislado, ya que numerosos investigadores han llevado a cabo estudios sobre la formación de polímeros basados en las CDs para su empleo en la descontaminación ambiental. El estudio de estos materiales, especialmente por RMN, ha aportado nuevas evidencias sobre su estructura, que justifican su comportamiento (Crini, 2002, Bilensoy, 2011; Morin-Crini y Crini,

2013). Sin embargo, con la excepción de su aplicación en la descontaminación de suelos y el tratamiento de gases y olores, no se han introducido con éxito, en la descontaminación de aguas residuales (Morin-Crini y Crini, 2013, Dodziuk, 2006).



**Figura I.16:** Estructura esquemática de nanomateriales que contienen CDs: (a) reticulación, (b) polimerización y (c) revestimiento (Crini, 2014).

Las nanoesponjas no sólo se han empleado para aplicaciones farmacéuticas, ya que recientemente, aparecen en la bibliografía desarrollos para el tratamiento y purificación de aguas residuales (Bilensoy, 2011; Landy y col., 2012; Tong y Chen, 2013), aportando ventajas en cuanto a coste y reutilización, frente a los materiales adsorbentes utilizados habitualmente, como el carbón activo.

## 2.10. REGULACIÓN DE LAS CDS

En la actualidad, no existe armonización legal con respecto al empleo de CDs en los alimentos. La regulación de las CDs (**Tabla I.12**) difiere entre países con Japón a la cabeza como pionera en su producción y consumo (Mosinger y col., 2001).

El uso de  $\alpha$ - y  $\beta$ -CDs para su empleo en alimentos fue autorizado inicialmente por Japón, posteriormente en Hungría y Alemania en 1976, 1983 y 2000, respectivamente.

**Tabla I.12. :** Normativa legal de las CDs (Kloury y col., 2016).

CDs	Europa	EEUU	Australia y Nueva Zelanda	Japón
$\alpha$ -CDs	Alimento nuevo (2004)	GRAS (2004)	Alimento nuevo (2004)	Producto Natural
$\beta$ -CDs	Portados de aditivos alimentarios (< 1 g/kg)	GRAS (2001)	---	Producto Natural
$\gamma$ -CDs	Alimento nuevo (2001)	GRAS (2000)	Alimento nuevo (2003)	Producto Natural

Tanto en Francia como en Holanda y Bélgica, el uso de las CDs en alimentación como agente encapsulante de sabor se aprobó en 1986. En España, se autorizó el uso de las  $\beta$ -CDs en alimentos en 1987. El Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Organización de las Naciones Unidas de Alimentación y Agricultura (UN/FAO/WHO), aceptaron el uso de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CDs en 1995, 2000 y 2002, respectivamente.

Debido al perfil toxicológico de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -CDs, no han sido aceptadas para el consumo diario. Sin embargo, en  $\beta$ -CDs está fijado en 5 mg/kg por peso del producto alimenticio. Se argumenta que el exceso de ingesta de  $\beta$ -CDs podría provocar diarrea (Kloury y col., 2016).

Se han asignado números E (códigos asignados a los aditivos) para  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs, los cuales son E457, E459 y E458, respectivamente (JECFA, 2013; Directiva 2003/95/EC, 2003). Además,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs fueron incluidas en la lista GRAS de FDA como aditivos alimentarios en 2000, 2001 y 2004, respectivamente.

En Australia y Nueva Zelanda,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -CDs son consideradas como nuevos alimentos desde 2004 y 2003, respectivamente (Cravotto y col., 2006).

Con respecto a los posibles efectos adversos postulados sin evidencia contrastada, cabe señalar que los seres humanos han sido consumidores habituales de las CDs. Así, se ha descrito que el proceso enzimático que sufre el almidón de los alimentos, hace que aparezcan pequeñas cantidades de CDs naturales y derivadas (Szente y col., 2006).

Solo unos pocos estudios han evaluado con propiedad la toxicidad de las CDs derivadas (Boulmedarat y col., 2005; Gould y Scott, 2005; Kiss y col., 2007; Ulloh y col., 2007), a pesar de no revelar efectos adversos, hasta la fecha carecemos de regulación para poderlas incluirlas en los alimentos (Kloury y col., 2016).









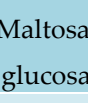






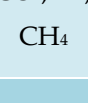


#### 2.11. BIODISPONIBILIDAD DE LAS CDS

Las CDs son en general, resistentes a la acción de las amilasas (Kukov y Loftsson, 2013). A diferencia de las dextrinas lineales y del almidón, éstas no poseen ningún extremo de la molécula que sea sensible a la acción de las  $\beta$ -amilasas y son muy poco hidrolizables por las  $\alpha$ -amilasas; sin embargo la selectividad depende del tipo de amilasa y de la CD. Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -CDs son estables frente a la  $\alpha$ -amilasa salival, pero las  $\gamma$ -CDs son susceptibles a la acción de las  $\alpha$ -amilasas salivares y pancreáticas (Munro y col., 2004). Así, mientras que las  $\alpha$ - y las  $\beta$ -CDs fermentan al entrar en contacto con la microflora del colon, la degradación de las  $\gamma$ -CDs comienza en la boca debido a las  $\alpha$ -amilasas (Harangi y col., 2012), continuando en el tracto gastrointestinal por acción de las  $\alpha$ -amilasas y las bacterias intestinales (De Bie y col., 1998; Irie y Uekama, 1997; Stella y He, 2008).

La tasa de digestión de las CDs aumenta conforme lo hace el tamaño de la cavidad interna, y disminuye cuando la cavidad interna de las CDs está ocupada por un huésped (Buedenbender y Schuls, 2009). En la **Tabla I.13** se esquematiza el curso de las CDs tras ser ingeridas por vía oral (Kurkov y Loftsson, 2013).

Además, se ha demostrado que las CDs inducen cambios favorables en la microflora intestinal, ya que favorecen el crecimiento y actividad de las bifidobacterias y lactobacillus y disminuyen el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium perfringens* (Spears y col., 2005; Pranckute y col., 2014), ejerciendo un efecto preventivo frente al cáncer de colon

**Tabla I.13.:** Representación esquemática del proceso de digestión de las CDs  
(Kurkov y Loftsson, 2013).

	$\alpha$ -CDs	$\beta$ -CDs	$\gamma$ -CDs	
<b>Boca</b>				$\alpha$ -amilasa
<b>Esófago</b>				
<b>Estomago</b>				
<b>Colon</b>			 Maltosa, glucosa	$\alpha$ -amilasa, digestión bacteriana
<b>Ciego</b>				digestión bacteriana
<b>Recto</b>				digestión bacteriana
	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub>	Flatulencias y heces blandas
<b>CD no metabolizadas</b>	0.3%	> 4%	0%	

## **CAPÍTULO II. OBJETIVOS**





## 1. OBJETIVOS

Como se describe en la sección anterior (**Capítulo I**), los AE, entre ellos los monoterpenos, poseen excelentes propiedades beneficiosas para la salud. Sin embargo, son compuestos bastante insolubles en agua y sensibles a la acción de agentes externos como aire, luz y enzimas oxidativas, además de ser causantes de alergias por contacto o ingestión a las concentraciones usualmente empleadas en fragancias y perfumes, constituyendo un inconveniente para su formulación y manipulación previa a su posible aplicación en diferentes sectores industriales (alimentación, cosmética, química o farmacéutica, entre otras).

Así, el objetivo principal de esta Tesis se centra en el estudio de la complejación de los monoterpenos timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas (CDs), como una solución viable a los inconvenientes descritos.

Para la consecución de este objetivo, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Estudio de la solubilidad acuosa de timol, carvacrol y linalol en presencia de diferentes tipos de CDs.
2. Cálculo de las constantes de complejación ( $K_c$ ) entre timol, carvacrol y linalol y diferentes tipos de CDs, mediante el análisis de los cambios producidos en sus propiedades fisicoquímicas tras ser complejados.
3. Optimización de un método de preparación de complejos sólidos de timol, carvacrol y linalol.
4. Caracterización de los complejos sólidos de timol, carvacrol y linalol.
5. Estudio del efecto de la inclusión de timol, carvacrol y linalol en CDs, sobre su actividad antimicrobiana.



## **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. CÁLCULO DE $K_c$

#### 1.1.1. Reactivos

Timol, carvacrol y linalol fueron proporcionados por Sigma (Madrid, España). Las ciclodextrinas (CDs) nativas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - CDs) y la modificada (HP- $\beta$ -CD), fueron suministradas por AraChem (Eindhoven, Holanda). El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

#### 1.1.2. Estudio de solubilidad a diferentes pH

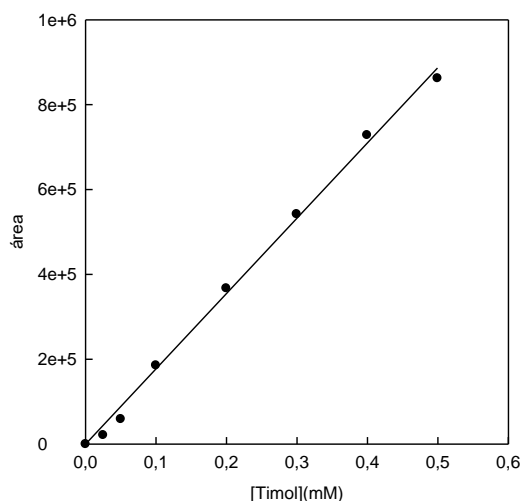
Los estudios de solubilidad de los tres monoterpenos, en presencia de CDs, se realizaron de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors, en 1965.

Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, y HP- $\beta$ -CDs, hasta alcanzar una concentración de 100 mM, mientras que en el caso de  $\beta$ -CDs, se llegó hasta 15 mM, que es su límite de solubilidad en agua, en un volumen total de 5 mL. Para la evaluación del efecto del pH en el proceso de formación de complejos, estas disoluciones se llevaron a cabo en diferentes disoluciones reguladoras: tampón acetato sódico 100 mM, a pH 3,5, 5,5; tampón fosfato sódico 100 mM, a pH 6,5 y 7,0; y tampón borato sódico 100 mM, a pH 8,5.

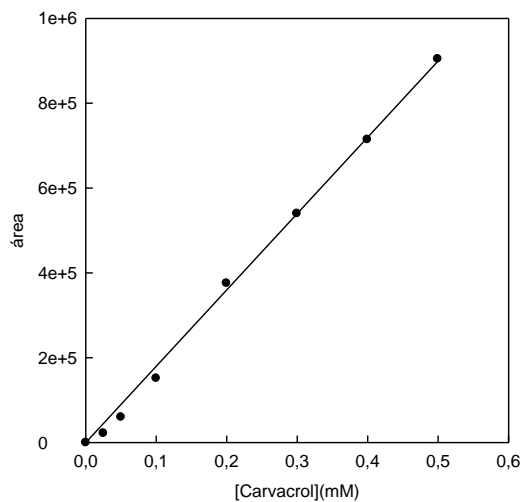
A cada una de las disoluciones se le adicionó una cantidad saturante del monoterpeno objeto de estudio, y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos en oscuridad, a 25 °C, hasta alcanzar el equilibrio. Una vez transcurrido este tiempo, las disoluciones se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu$ m, para eliminar el exceso de monoterpeno (monoterpeno no disuelto).

### 1.1.3. Cuantificación por GC-MS

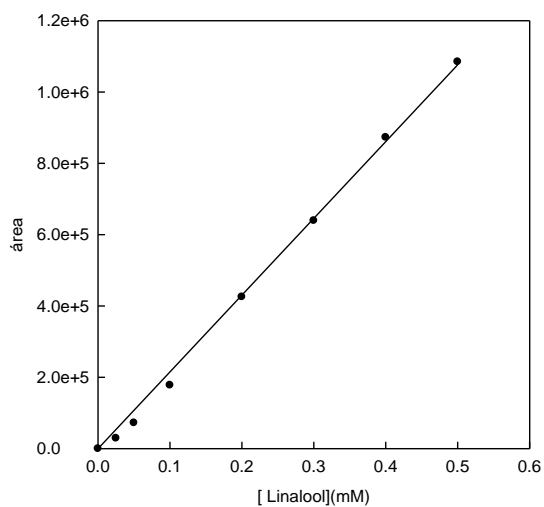
Para cuantificar la cantidad de monoterpeno en cada filtrado, se rompieron los complejos monoterpeno-CDs adicionando etanol al 80%. Posteriormente, cada una de las disoluciones se introdujo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, (Shimadzu QP 2010), equipado con una columna capilar Slb-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). Las condiciones de trabajo fueron: temperatura inicial 70 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta alcanzar los 160 °C, y a partir de aquí 30 °C/min hasta 280 °C, la cual se mantiene durante 6 min; temperatura del inyector 250 °C, tipo de inyección en modo Split 1:20, y se utilizó helio como gas portador. Para la cuantificación de los monoterpenos objeto de estudio se utilizaron las áreas obtenidas tras la inyección de las muestras correspondientes, que fueron interpoladas en las respectivas rectas de calibrado obtenidas para cada monoterpeno, a partir de un patrón 10 mM. Como se muestra en las **Figuras III.1-III.3**, en cada recta patrón se utilizaron siete concentraciones (0,25, 0,5, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mM), representando cada punto la media de tres determinaciones. La identificación de los componentes se basó en los tiempos de elución relativa y la comparación del espectro de masas de cada pico con la base de datos que incorpora el sistema.



**Figura III.1.:** Recta de calibrado obtenida para timol por GC-MS.



**Figura III.2.:** Recta de calibrado obtenida para carvacrol por GC-MS.



**Figura III.3.:** Recta de calibrado obtenida para linalol por GC-MS.

Una vez calculadas las concentraciones de monoterpeno presente en cada muestra, se representaron los valores obtenidos frente a la concentración de CDs. Para el cálculo de la constante de complejación de los complejos de inclusión ( $K_c$ ),

se determinó la pendiente y ordenada en el origen de los diagramas de fases correspondientes a los estudios de solubilidad, de acuerdo a la siguiente ecuación (Higuchi y Connors, 1965):

$$K_c = \frac{\text{Pendiente}}{S_0(1 - \text{pendiente})} \quad \text{[III.1.]}$$

donde  $S_0$  es la solubilidad acuosa del monoterpeno en ausencia de CDs y "pendiente", es la pendiente de la recta obtenida en el diagrama de fases correspondiente.

Para determinar la eficacia en la complejación (CE) de cada monoterpeno, se utilizó la siguiente ecuación (Lucas-Abellán y col., 2008a):

$$CE = \frac{[\text{monoterpeno} - CD]}{[CD]} = S_0 \times K_c \quad \text{[III.2.]}$$

## 1.2. PREPARACIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS

### 1.2.1. Método de irradiación por microondas (*slurry*)

El cálculo de  $K_c$  entre timol, carvacrol ó linalol y HP- $\beta$ -CDs, se llevó a cabo mediante la adición de diferentes concentraciones de HP- $\beta$ -CDs a 100 mL de agua, manteniendo una relación molar 1:1.

Las soluciones acuosas de HP- $\beta$ -CDs (0-100 mM) fueron irradiadas con microondas durante 30 s, a intervalos de 10 s, hasta alcanzar la disolución una temperatura de 70 °C. Seguidamente, se añadió el monoterpeno a estudiar a cada una de las muestras, irradiando de nuevo durante 30 s a los mismos intervalos (10 s), hasta alcanzar 70 °C. Posteriormente, las muestras se agitaron y se mantuvieron durante 12 h en viales de centelleo, sellados con parafilm y protegidos de la luz.



Transcurrido ese tiempo, siguiendo de nuevo el procedimiento descrito anteriormente, las muestras fueron sometidas a una nueva etapa de irradiación, hasta alcanzar los 70 °C. Tras ello, las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 0,45 µm para eliminar el exceso de monoterpeno (monoterpeno no disuelto). Por último, se determinó la concentración de cada monoterpeno mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 1.1.3.

### 1.2.2. Método de Solubilidad

Para ello, en viales de centelleo se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de HP-β-CDs, hasta una concentración de 100 mM en un volumen total de 100 mL.

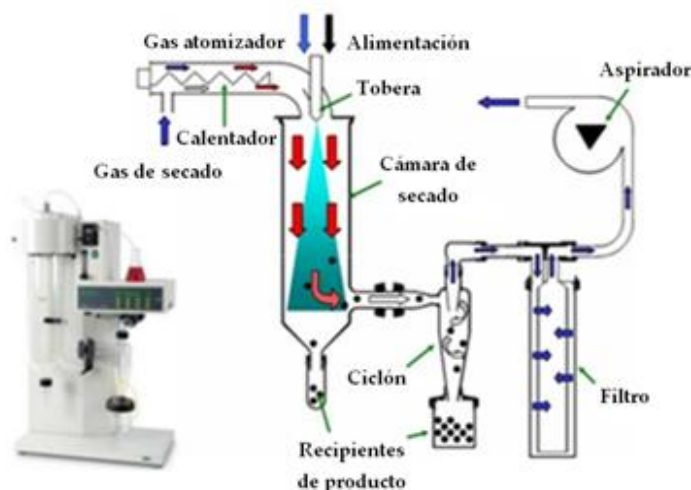
A cada una de las disoluciones se le adicionó una cantidad saturante de monoterpeno, y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos en oscuridad, a 25 °C, hasta alcanzar el equilibrio. Tras ello, las disoluciones se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45 µm para eliminar el exceso de monoterpeno (monoterpeno no disuelto). Posteriormente, se midió la concentración de cada monoterpeno mediante cromatografía, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 1.1.3.

### 1.2.3. Secado por atomización

Las disoluciones acuosas obtenidas para cada complejo monoterpeno-HP-β-CDs, mediante ambos procedimientos (irradiación por microondas y solubilidad), fueron sometidas a un proceso de atomización, para obtener los complejos en estado sólido.

Para ello, se utilizó un atomizador Mini Spray Dryer Büchi B290 (Flawil, Suiza), en el que se fijaron como óptimos los siguientes parámetros del proceso de secado (**Figura III.4**): temperatura de entrada del aire  $170 \pm 2$  °C, temperatura de salida del aire  $68 \pm 2$  °C, caudal de flujo 5 mL/min, presión del aire 3,2 bar, velocidad de rotación 30000 rpm y diámetro de boquilla de 1,5 mm (Lee y col., 1999).

Los complejos sólidos resultantes, se almacenaron en viales de vidrio (sellados herméticamente), a temperatura ambiente (25 °C) y en refrigeración (8 °C), hasta su empleo.



**Figura III.4.:** Representación esquemática del proceso de secado por atomización.

Para establecer el rendimiento del proceso de atomización (PA) para cada complejo monoterpeno-HP- $\beta$ -CDs se utilizó una técnica gravimétrica, determinando con la ayuda de una balanza analítica la relación entre el peso en gramos de complejo sólido obtenido tras el secado por atomización, y el peso en gramos del correspondiente complejo en disolución, según Di Battista y col., 2015:

$$RP = \frac{[gr \text{ obtenidos de polvo}]}{[gr \text{ sólidos en disolución}]} * 100 \quad \text{[III.3.]}$$

Si bien el rendimiento (RP) nos da idea de la cantidad de sólidos presentes (CDs y monoterpeno) tanto disolución como en estado sólido; la eficacia de encapsulación (EE) hace referencia a la proporción de monoterpeno presente en el sólido con respecto al contenido en la disolución (al margen de las CDs), utilizando para su cálculo la ecuación descrita por Frascareli y col., 2012:

$$EE = \frac{[M_{dato}]}{[M_{aato}]} * 100 \quad \text{[III.4.]}$$

donde  $M_{dato}$  es la concentración de monoterpeno después de atomizar y  $Maato$  hace referencia a la concentración de monoterpeno presente en la disolución antes de someterla al proceso de secado por atomización.

Además, se determinó la carga de materia activa (CMA) mediante la siguiente ecuación:

$$CMA = \frac{\text{Materia activa encapsulada}}{\text{Aumento de la cantidad de polvo}} * 100 \quad \text{[III.5.]}$$

Que nos da idea de la cantidad de monoterpeno presente en el sólido obtenido tras el proceso de atomización.

Una vez estudiados los complejos, se llevó a cabo la evaluación de la estabilidad de los complejos sólidos, para ello se prepararon 100 muestras (50 por el método MWI y otras 50 por el método de solubilidad), con una concentración de 50 mM de HP- $\beta$ -CDs. Las muestras sólidas se almacenaron durante 17 meses en recipientes de plástico cerrados, y 50 de ellas se conservaron a temperatura ambiente (25 °C) y el resto, refrigeradas a 8 °C. Las medidas se realizaron cada mes.

Para poder estudiar la morfología de los complejos sólidos obtenidos mediante el *Spray Dryer* se realizaron microfotografías a través de la microscopía electrónica de barrido (Merlin VP Compact, Zeiss, Alemania). Las muestras de polvo se fijaron en los botones de montaje y se observaron al microscopio sin necesidad de recubrimiento con una capa de oro.

### 1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS SÓLIDOS

#### 1.3.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

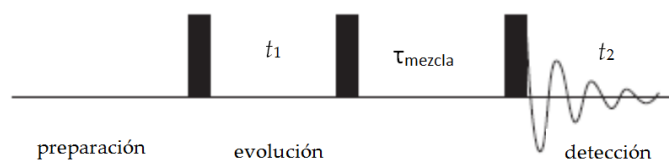
Todos los experimentos se realizaron en un espectrómetro de alta resolución Bruker Avance II, a 600.13 MHz; equipado con una sonda inversa de banda ancha (TXI) y una unidad de temperatura variable (VTU). Las determinaciones se realizaron a 298 °K, introduciendo las muestras en viales de 5 mm.

Debido a la baja solubilidad de los monoterpenos en agua, todas las muestras analizadas (monoterpenos libres, CDs y los complejos obtenidos), se disolvieron en 60 mL de metanol deuterado (metanol-d<sub>4</sub>, CD<sub>3</sub>OD). Los datos de RMN se procesaron con el software MestReNova (versión 6.0.2-5475).

Los cambios químicos ( $\delta$ ) observados se expresaron en ppm, y la señal del disolvente residual, se utilizó como referencia interna. Los cambios inducidos en los desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H-RMN ( $\Delta\delta$ ) para el correspondiente monoterpeno y HP- $\beta$ -CD que se producen debido a la complejación, se calcularon mediante la ecuación:  $\Delta\delta = \delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{libre}}$ .

Además, se evaluó la formación de los complejos por espectroscopía bidimensional (RMN-2D), aplicando el método ROESY (Bax y Davis, 1985), utilizando una secuencia de pulsos wg-ROESY (watergate-ROESY).

Un ensayo de RMN-2D consta de varias etapas, separadas convenientemente por pulsos de radiofrecuencia (*rf*): *i*) preparación, *ii*) evolución tras haber excitado los núcleos durante un tiempo variable  $t_1$ , *iii*) mezcla en un intervalo de tiempo ( $\tau$ ), y *iv*) detección en un tiempo  $t_2$  (**Figura III.5**).



**Figura III.5.:** Secuencia de pulsos correspondiente a un ensayo RMN-2D. La dimensión  $t_2$  es la habitual en ensayos mono-dimensionales. El ensayo se repite un determinado número de veces con distintos incrementos de  $t_1$ , obteniendo así una señal (*s*) bidimensional ( $t_1, t_2$ ).

La dimensión adicional se origina en el intervalo de tiempo  $t_1$ , durante el cual el núcleo está sujeto a determinadas condiciones. La amplitud de la señal en  $t_2$  es función de lo que sucedió a los núcleos durante el período de evolución,  $t_1$ .

El experimento se repite para un determinado número de valores de  $t_1$ , con lo que se obtiene un conjunto de espectros donde las amplitudes de las resonancias vienen moduladas con las frecuencias que existían en el período de

evolución. Posteriormente, una transformación de Fourier con respecto a  $t_1$ , define las frecuencias de modulación y da como resultado el espectro bidimensional (2D).

Para el ensayo ROESY se utilizaron las siguientes condiciones experimentales: 32 escaneos, un tiempo de adquisición de 0,150 s y un retardo de pulso de 2,3 s.

### 1.3.2. Modelado molecular (*Docking*)

Se realizó un estudio de modelado molecular para dar una justificación plausible a los resultados obtenidos por RMN, ilustrando las representaciones tridimensionales de las conformaciones más probables para los complejos de inclusión.

Las estructuras moleculares de los monoterpenos objeto de estudio, se construyeron manualmente utilizando la herramienta informática AutoDock (Morris y col., 2009), y la información estructural derivada de los datos experimentales obtenidos mediante RMN. La estructura de la  $\beta$ -CD se obtuvo de la base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas (PDB), código 3CGT. La estructura de HP- $\beta$ -CDs, se desarrolló mediante la adición de grupos hidroxipropilo a la estructura de  $\beta$ -CD.

Los cálculos de acoplamiento molecular se llevaron a cabo utilizando los parámetros predeterminados (la configuración por defecto), en el software AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010), ya que aporta, atendiendo a los resultados experimentales, una explicación eficaz sobre la posible formación de complejos entre compuestos bioactivos y CDs.

Durante las simulaciones de acoplamiento, si bien las CDs se mantienen rígidas; tanto los grupos hidroxipropil de HP- $\beta$ -CDs como los respectivos monoterpenos, fueron considerados explícitamente como flexibles, teniendo en cuenta la capacidad del algoritmo principal de AutoDock Vina ([http://bio-hpc.eu/software/vina\\_vision](http://bio-hpc.eu/software/vina_vision)), para la detección de enlaces giratorios basados en reglas químicas conocidas. Las representaciones gráficas de los resultados de acoplamiento se prepararon usando el programa PyMOL (Molecular Graphics System, versión 1.3, Schrödinger, LLC).

### 1.3.3. Calorimetría diferencial de barrido

Las transiciones térmicas (termogramas), de todos los sistemas estudiados (monoterpenos, HP- $\beta$ -CDs y complejos monoterpeno-HP- $\beta$ -CDs), se registraron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), utilizando un analizador Mettler DSC Q100 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza).

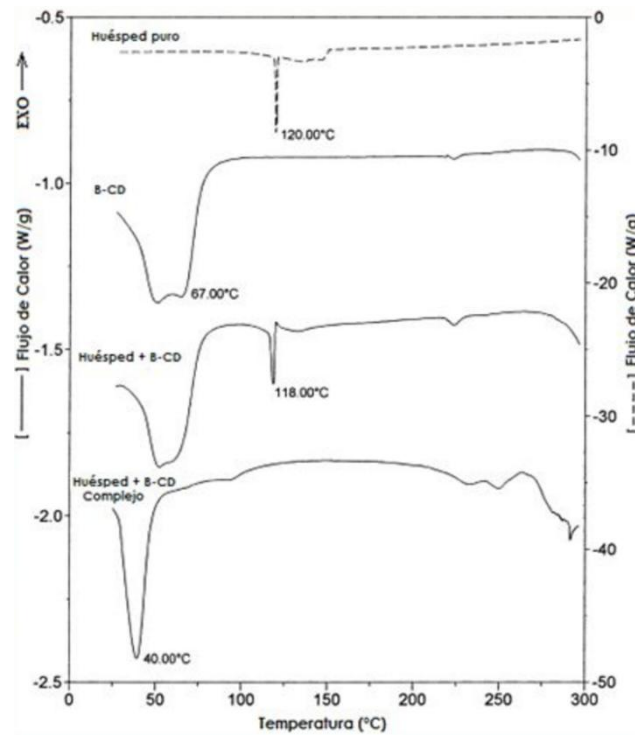
En el ensayo, la muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, utilizando una cápsula vacía como referencia (blanco). El equipo registra las diferencias en el flujo de calor suministrado por el equipo a la muestra y al blanco (calefactores individuales), en función de la temperatura aplicada y del tiempo.

Si se detecta cualquier diferencia, los calefactores individuales la corregirán, de manera que la temperatura se mantendrá igual en ambas cápsulas. Es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el equipo compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas cápsulas (muestra y blanco).

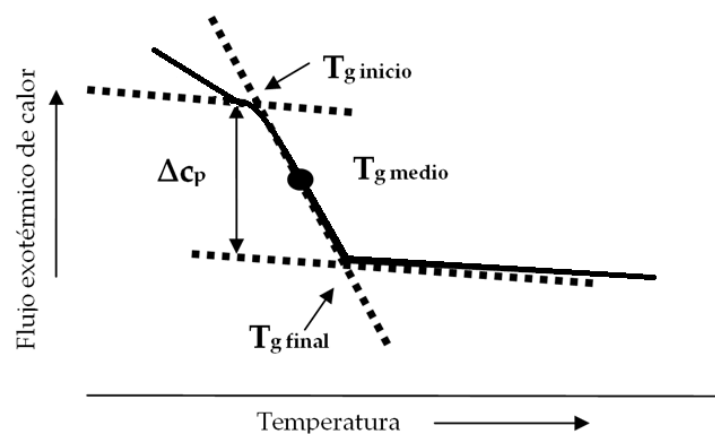
El valor del flujo de calor se expresa en unidades de potencia por cantidad de masa (Mw/g), y se representa mediante curvas conocidas como termogramas. Las curvas pueden ir: *i*) hacia abajo, que reflejan procesos endotérmicos, ya que este tipo de transiciones expresan una diferencia de temperatura o, *ii*) hacia arriba, que corresponden a procesos exotérmicos que implican que la sustancia está sufriendo procesos de fusión-desnaturalización o cristalización-adsorción, respectivamente.

En los termogramas, las cristalizaciones aparecen como picos exotérmicos y las fusiones, como picos endotérmicos. En la **Figura III.6**, se muestra un termograma correspondiente al perfil termoanalítico de un sistema huésped  $\beta$ -CD.

Así, la calorimetría diferencial de barrido detecta la transición vítrea en base al cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ). En la **Figura III.7**, se muestra un termograma típico donde se puede observar el comienzo, el punto medio y el punto final de la transición vítrea. El  $\Delta C_p$  en la transición vítrea, se evidencia como un cambio en la línea base del termograma.



**Figura III.6.:** Perfil termoanalítico de un sistema huésped-  $\beta$ -CD realizado por DSC. (Adaptado de Giordano y col., 2001).



**Figura III.7.:** Termograma obtenido por DSC, donde se observa la transición vítrea.

El equipo se calibró para las diferentes variables: temperatura, flujo de calor y entalpías de fusión, con agua tri-destilada (PF= 0,0 °C,  $\Delta H= 6.013 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), Indio (PF= 156,6 °C,  $\Delta H= 3,28 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), plomo (PF = 327,5 °C,  $\Delta H= 4.799 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) y zinc (PF= 419,6 °C,  $\Delta H= 7,32 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) (Roos y Karel, 1991).

Para el ensayo, se pesaron entre 2 y 4 mg de muestra en cápsulas de aluminio de 40  $\mu\text{L}$ , que se cerraron herméticamente (una cápsula vacía y perforada se utilizó como referencia) y se introdujeron en el analizador DSC. Todas las determinaciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, hasta llegar a 300 °C. Esta velocidad de calentamiento se utiliza habitualmente para observar de forma clara, transiciones térmicas en biopolímeros (Sopade y col., 2004; Tananuwong y Reid, 2004).

#### 1.3.4. Termogravimetría

Para la realización del ensayo se pesaron entre 4-5 mg de muestra en cápsulas de aluminio, que se llevaron a un equipo de análisis termogravimétrico Hi-Res TGA 2950 (**Figura III.8**).



**Figura III.8.:** *Equipo Hi-Res TGA 2950 utilizado en las determinaciones.*

Las muestras se sometieron a una rampa de calefacción desde temperatura ambiente a 300 °C a una velocidad de 10 °C/min, bajo atmósfera de nitrógeno. El análisis termogravimétrico (TG) es una técnica que analiza la variación de peso de una muestra en función del tiempo o la temperatura.



Para realizar el análisis, la muestra se colocada en una balanza y se calienta en un pequeño horno. Al calentarse, los materiales orgánicos se descomponen, y la temperatura de descomposición es característica de cada material.

La técnica determina la cantidad y rapidez en la variación de peso de una muestra en función de la temperatura y/o el tiempo, realizando el ensayo bajo una atmósfera controlada; determinando así la composición de los materiales, pudiendo predecir su estabilidad a temperaturas de hasta 1500 °C. Esta técnica permite por tanto, caracterizar materiales que presentan pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación.

### **1.3.5. Espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR)**

La técnica de FTIR se emplea en la elucidación estructural del complejo huésped-CD formado, y ayuda a demostrar qué parte de la molécula del principio activo se encuentra dentro o fuera de la cavidad de la ciclodextrina (Manolikar y Sawant, 2003). En los espectros de infrarrojo aparecen absorciones a frecuencias características, que pueden atribuirse a grupos químicos específicos (Stuart, 2004).

La espectroscopia de infrarrojos (IR), es la rama de la espectroscopia que estudia las interacciones de la materia con la región infrarroja del espectro electromagnético. La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 100  $\mu\text{m}$ .

El principio de la técnica radica en la excitación de los modos de vibración y rotación de los enlaces entre los átomos, al ser irradiados con un haz de luz infrarroja. Cada molécula, según las características de sus enlaces, absorberá radiación a una o varias longitudes de onda específicas, por lo que podrá ser identificada.

Los espectros de absorción, emisión y reflexión de especies moleculares en el infrarrojo, se pueden explicar asumiendo que todos ellos son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros (Gómez y Murillo, 2012).

Los espectros de IR por transformadas de Fourier de las sustancias de partida y de los complejos, se llevaron a cabo en un espectrofotómetro VARIAN FT-IR 670 (**Figura III.9**) con una resolución de  $0,10\text{ cm}^{-1}$ , en modo *Attenuated Total Reflection* (ATR). Con la técnica ATR el haz incide por detrás de la muestra, y al tratarse de una interfaz donde el medio externo tiene una densidad óptica menor que la del medio donde incide, la radiación sufre una reflexión total.



**Figura III.9.:** Equipo Varian FT-IR 670 utilizado en las determinaciones.

La presencia en la superficie de moléculas que absorben radiación produce una atenuación de la radiación reflejada. Este hecho tiene lugar porque el medio absorbente cambia el índice de refracción local, lo que hace que parte de la radiación penetre en el medio menos denso y sea por lo tanto, atenuada; de ahí el origen de la denominación de esta técnica.

El intervalo de número de ondas empleado fue desde  $250$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , con 32 barridos por espectro y una resolución de espectro de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 1.4. MEDIDA DE CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

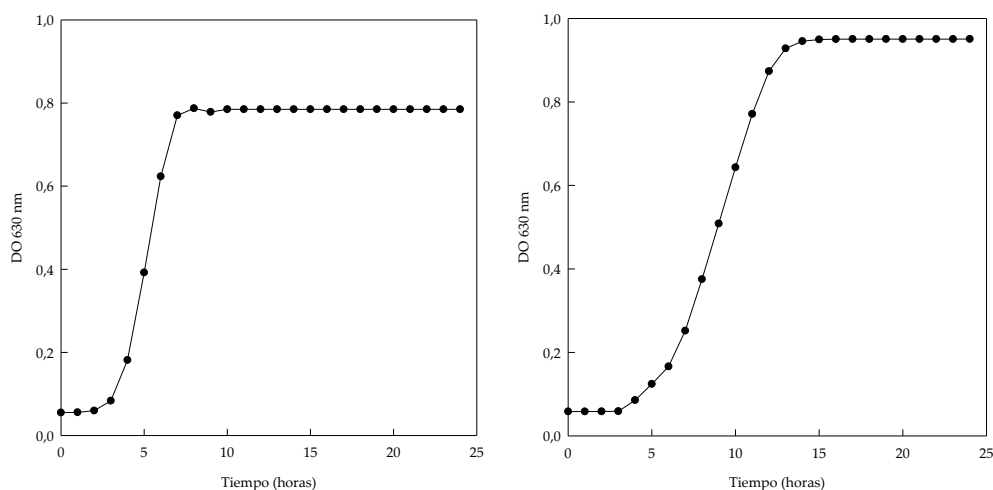
##### 1.4.1. Reactivos

Timol, carvacrol y linalol fueron proporcionados por Sigma (Madrid, España). Las HP- $\beta$ -CDs fueron suministradas por AraChem (Eindhoven, Holanda). Los medios de cultivo TSB (Soja Triptona) y TSA (Soja Triptona Agar), y el agua de peptona tamponada fueron adquiridos a Scharlau (Barcelona, España). Las cepas *E. coli* (CECT 943) y *S. aureus* (CECT 239) fueron

proporcionadas por la colección española de cultivos tipo (CECT) (Paterna, España). El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

### 1.4.2. Cultivo bacteriano

Las cepas de *E.coli* (CECT 943) y de *S.aureus* (CECT 239) se activaron en TSB y posteriormente, se incubaron en condiciones aerobias a 35 °C durante 24 h. A continuación, las células bacterianas fueron lavadas con 0,1 g/100 mL de agua de peptona tres veces consecutivas. Posteriormente, se realizó una curva de crecimiento tanto de *E. coli* como de *S. aureus* (**Figura III.10**) a 35 °C para poder correlacionar el recuento en placa con los valores de densidad óptica a 630 nm. Los cultivos fueron conservados en TSA no más de 3 meses a 4 °C.



**Figura III.10.:** Curvas de crecimiento obtenidas a 35 °C para *E. coli* (izquierda) y *S. aureus* (derecha).

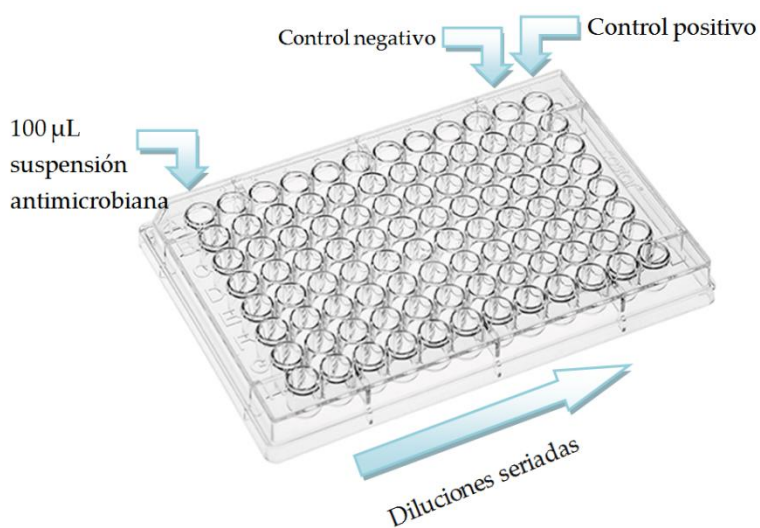
### 1.4.3. Método de dilución de caldo

Con este ensayo se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de timol, carvacrol y linalol en su forma libre y complejada. Para ello se utilizó el método descrito por Brandt y col., 2010. El análisis MIC se llevó a cabo en placas

de microtitulación estériles de 96 pocillos, de fondo plano y 300  $\mu$ L de capacidad (MicroWell, Nunc, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA).

En primer lugar se preparó una suspensión para cada microorganismo (*E. coli* y *S. aureus*) en TSB (2X), realizando diluciones seriadas hasta conseguir una concentración aproximada de inóculo de 5.0 Log<sub>10</sub> unidades formadoras de colonias/mL (CFU/mL). De esta suspensión bacteriana se adicionaron alícuotas de 100  $\mu$ L por pocillo a la placa (columnas 1-10) (**Figura III.11**), utilizando una pipeta multicanal (12 canales, Eppendorf AG), siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

A la primera fila (columna 1), se añadieron 100  $\mu$ L de la suspensión antimicrobiana objeto de estudio (monoterpenos complejados o no), y se mezclaron con los 100  $\mu$ L de suspensión bacteriana. Posteriormente, 100  $\mu$ L de cada pocillo de la columna 1 se transfirieron a la siguiente columna, y así sucesivamente hasta llegar a la columna 10 de la placa (**Figura III.11**).



**Figura III.11.:** Esquema de trabajo seguido en el ensayo en placa.

Las últimas filas se utilizaron como controles de crecimiento bacteriano.

Los controles positivos se prepararon con inóculo, agua destilada estéril, Tween 20 y HP- $\beta$ -CD, a las concentraciones de ensayo, para descartar cualquier

interferencia de los disolventes y/o aditivos en los valores de densidad óptica a 630 nm (DO630) o bien en la actividad antimicrobiana. Los controles negativos se prepararon con disoluciones de antimicrobiano, agua estéril y TSB (2x).

Tanto los complejos de inclusión de timol, carvacrol y linalol como los monoterpenos en su forma libre (AE), se añadieron a las placas de 96 pocillos como suspensiones acuosas, utilizando 0,01 g/100 g de Tween 20 como emulsionante.

Las concentraciones de los complejos de inclusión y de los aceites de timol, carvacrol y linalol utilizadas, variaron entre 0,20 y 37,75 mM.

Una vez preparadas las placas con las soluciones antimicrobianas y las suspensiones bacterianas, se determinó la absorbancia a 630 nm (DO630) en un lector de placas SPECTRAMax PLUS (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EUA) a (tiempo 0 h). Posteriormente, las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h, realizando una nueva lectura (DO630). Como criterio para la asignación de actividad antimicrobiana se utilizó la siguiente: aquellos pocillos donde se observó una disminución de absorbancia  $\leq 0,05$  tras 24 h de incubación se consideró "inhibición positiva", y las concentraciones más bajas de los correspondientes agentes antimicrobianos se consideraron como sus valores MIC (Hill y col., 2013).

Para corroborar los resultados obtenidos, a todos los pocillos donde se observó inhibición en el ensayo anterior se les determinó la capacidad bactericida en placas de Petri con TSA. Para ello, se adicionaron 0,1 mL de cada pocillo a las placas y se incubaron durante 24 horas a 35 °C. En las placas donde no se observaron colonias en la superficie tras el período de incubación, a la concentración de antimicrobiano presente en el pocillo se la etiquetó como bactericida. Para un mismo compuesto, de todas las concentraciones que mostraron actividad antimicrobiana, la concentración bactericida mínima (MBC) se asignó la menor de ellas (Hill y col., 2013).

Una vez calculadas MIC y MBC para los microorganismos ensayados (*E. coli* y *S.aureus*), se llevó a cabo un estudio para comprobar el efecto antimicrobiano de combinaciones de timol, carvacrol y linalol. Para llevar a cabo este estudio se prepararon combinaciones de los distintos AE en diferentes proporciones (93-7%, 15-85%, 60-40%, 78-22%, 50-50%), evaluando su eficacia

mediante el método de dilución de caldo descrito por Brandt y col 2010. Para evaluar el efecto antimicrobiano de las combinaciones ensayadas se utilizó el índice de concentración mínima fraccionaria (CIF), que se calcula como se describe a continuación: para el monoterpeno A, se divide la concentración mínima inhibitoria (MIC) obtenida cuando se combina con otro monoterpeno (por ejemplo B), entre la MIC de este monoterpeno A solo, frente al microorganismo ensayado. De igual modo, se calcula el CIF para el monoterpeno B. Sumando ambos valores, obtendremos el CIF conjunto (Magalhães y Nitschke, 2013), aplicando la siguiente ecuación:

$$CIF = \frac{[MIC_A \text{ combinación}]}{[MIC_A \text{ solo}]} + \frac{[MIC_B \text{ combinación}]}{[MIC_B \text{ solo}]} \quad \text{[III.6.]}$$

En función del valor obtenido para CIF, diremos que la combinación ensayada tendrá o no efecto antimicrobiano.

Así, si este parámetro revela un valor  $\leq 1$  habría sinergia; si es igual a 1 habría efecto aditivo; para valores entre 1-2, no hay efecto (indiferencia), y para valores de CIF  $> 2$ , el efecto sería antagónico (Pei y col., 2009).

Se considera que una interacción es aditiva, cuando el efecto de la combinación de ambos monoterpenos es igual a la suma de sus efectos individuales. Por otro lado, el antagonismo aparece cuando el efecto de uno o ambos componentes, es menor al aplicarse juntos que al hacerlo por separado. Sin embargo, el efecto sinérgico se produce cuando el efecto antimicrobiano de la combinación de ambas sustancias es superior a la suma de sus respectivos efectos individuales (Burt, 2004); finalmente, la ausencia de interacción se expresa como indiferencia (Bassolé, y Juliani, 2012).

## **CAPÍTULO IV. TIMOL**





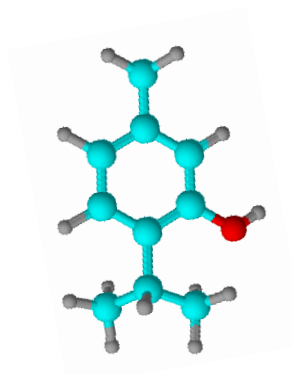
## 1. TIMOL

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Timol (2-isopropil-5-metilfenol), es el monoterpeno más abundante en los aceites esenciales de las plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, entre las que se encuentran: *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Monarda* (Licata y col., 2015; Mancini y col., 2015; Sarwar y Latif, 2015). También está presente en otras especies como *Lippia gracilis Schauer*, (Verbenaceae), *Euphrasia officinalis Hayne* (Scrophulariaceae), *Nigella sativa L.* (Ranunculaceae), y *Trachyspermum Ammi L., Sprague* (Apiaceae); (Moein y col., 2015; Novy y col., 2015; Raj y col., 2015).

Los estudios de Poulouse y Croteau (1978) demostraron que su síntesis se lleva a cabo mediante la aromatización de  $\gamma$ -terpineno, seguido de la hidroxilación de *p*-cimeno.

El timol (Figura IV.1) es un sólido cristalino de color blanco, ligeramente soluble en agua (0,98 g/L a 25 °C) y muy soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos ( $P_{ow}$ : logP 3,30) (Nieddu y col., 2014). Sus disoluciones acuosas son estables en medios neutros y débilmente ácidos. Presenta una presión de vapor de 2,5 hPa (50 °C).



**Figura IV.1.:** Estructura química de timol.

Se ha descrito una toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>) por vía oral de 980 mg kg<sup>-1</sup> y por absorción cutánea >2000 mg/kg en ratas. En humanos, puede provocar irritaciones en la piel tras absorción cutánea, o en los ojos por contacto ocular.

Por ingestión, puede provocar irritaciones en mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto intestinal. A dosis elevadas, puede provocar efectos sistémicos en el sistema nervioso central, problemas hepáticos o renales y trastornos cardiovasculares.

El timol ha sido registrado por la Comisión Europea para su uso como aromatizante en los productos alimenticios debido a que no supone un riesgo para la salud del consumidor. Además, la administración de alimentos y medicamentos (FDA) de EEUU, lo ha clasificado como GRAS o como aditivo alimentario autorizado (Marchese y col., 2016).

### 1.1.1. Timol y salud

Se ha demostrado que este fenol tiene un marcado poder antioxidante y antiinflamatorio, y en ocasiones se prescribe como anestésico local, antinociceptivo, cicatrizante y antiséptico. Además, posee actividad antibacteriana y antifúngica, así como efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular (Marchese y col., 2016).

Un estudio realizado en ratones por Mendes y col. (2010), evidenció la actividad antiinflamatoria y cicatrizante de timol. Así, tras inducir un edema a los ratones mediante la administración de carragenina, demostraron que concentraciones de 10 y 30 mg/kg del aceite esencial de *Lippia gracilis*, cuyo componente mayoritario es timol (32,7 %), inhiben más de una señalización intracelular, entre ellas la migración de leucocitos, implicadas en los efectos de varios mediadores de inflamación.

El mismo grupo llevo a cabo ensayos *in vitro*, utilizando células humanas y diferentes concentraciones del monoterpeno, para comprobar que timol podía ejercer cierto efecto anestésico local y antinociceptivo, ya que tiene la capacidad de bloquear los canales de sodio regulados por voltaje. Los resultados demostraron que la concentración inhibitoria media para musculo esquelético fue de 104 μmol y de 149 μmol para los canales de sodio neuronales (Mendes y col., 2010).

Con respecto al sistema cardiovascular, este monoterpeno fenólico ejerce diversos efectos beneficiosos, ya que es capaz de inducir la hipotensión (Aydin y col., 2007), y la relajación vascular (Peixoto-Neves y col., 2010).

En 2002, Magyar y col. demostraron que el timol puede inducir arritmias cardiacas en cardiomiocitos ventriculares caninos, a través de la inhibición de los canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ . A una concentración de 10  $\mu M$  el timol elimina la señal del potencial de acción, mientras que a concentraciones de 100  $\mu M$  o superiores, provoca un acortamiento de la duración del potencial de acción acompañado por una depresión progresiva de la meseta y una reducción de la  $V_{max}$ . Estos resultados fueron similares a los obtenidos con timol en ensayos *in vitro*, utilizando miocitos ventriculares aislados de corazones humanos sanos (Magyar y col., 2002).

Años más tarde (2004), los mismos autores evaluaron los efectos de timol en preparaciones cardiacas de mamíferos (cerdos de Guinea y perros), constatando que timol provoca una acción inotrópica negativa (reducción de la contracción y frecuencia cardiaca) en ambas preparaciones (actuando como  $\beta$ -bloqueante), de forma dosis-dependiente, ya que a bajas concentraciones se observó una reducción del tránsito intracelular de calcio, sin disminución aparente de la contractilidad. Sin embargo, a concentraciones más altas de timol, se suprimieron los tránsitos de calcio y las contracciones cardiacas (Magyar y col., 2004).

Por otra parte, el timol también induce la liberación rápida de calcio en las vesículas reticulares sarcoplásmicas caninas y reduce la actividad de la bomba de calcio (Szentandrassy y col., 2004). En este estudio los autores concluyeron que la acción inotrópica negativa de timol se debe a una reducción en el contenido de calcio del retículo sarcoplásmico, inducido por la liberación de calcio y la inhibición de la bomba de calcio.

Además, timol ejerce efectos vasodilatadores en aorta de rata, de hecho, investigaciones llevadas a cabo por Peixoto-Neves y col. (2010), demostraron que provoca una relajación dosis-dependiente en el anillo aórtico, el cual se había pre-contraido tras la administración de KCl. En este estudio se evaluaron concentraciones de timol entre 300 y 1.000  $\mu M$ , las cuales reducen significativamente la contracción provocada por el dibutirato de forbol (1  $\mu M$ ), un activador de la proteína C quinasa. La magnitud de este efecto inhibitor llevado a

cabo por timol es mayor en presencia del inhibidor de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ).

Así pues, se concluyó que timol era capaz de inducir una relajación endotelio-independiente en aorta de rata, a través de diversos mecanismos de acción que implican la inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico, la reducción de la sensibilidad de los elementos contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$  y el bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana (Peixoto-Neves y col., 2010).

Por otra parte, su actividad anticancerígena está siendo evaluada en la actualidad por diferentes grupos de investigación. Se han descrito diferentes mecanismos de acción por los que timol ejerce efectos protectores frente al cáncer, ya que es capaz de inhibir el crecimiento celular (Jaafari y col., 2012), inducir la apoptosis independiente y dependiente de las caspasas (Deb y col., 2011; Yin y col., 2012; Llana-Ruiz-Cabello y col., 2014) y la despolarización del potencial de membrana mitocondrial (Lai y col., 2009).

Recientemente, Kang y col., (2016) demostraron en ensayos *in vitro* en células gástricas, que concentraciones de timol (100 mM, 200 mM y 400 mM), inducen la inhibición del crecimiento celular gástrico, debido a que actúa sobre el ciclo celular mediante la prolongación de la fase sub-G1 de las células gástricas. Además, otros ensayos adicionales (Anexina V-FITC y tinción PI), evidenciaron que timol induce la muerte celular por apoptosis, concluyendo los autores que timol podría actuar como una agente eficaz contra el cáncer (Kang y col., 2016).

Habitualmente, el efecto anticancerígeno de timol se asocia a su capacidad para secuestrar radicales libres (Braga y col., 2006; Jaafari y col., 2007). Estas propiedades antioxidantes de timol están condicionadas por su estructura aromática, y se deben a su capacidad para donar átomos de H del grupo hidroxilo a los radicales peroxilo, dando lugar a radicales fenoxilo estables, ya que pueden deslocalizar el electrón mediante estructuras resonantes, ralentizando la reacción de peroxidación lipídica (Mastelic y col., 2008; Viuda-Martos y col., 2010).

En un estudio llevado a cabo por Meeran, Fizur y Stanley (2012) con ratas albinas Wistar, se evaluó el efecto protector de timol, induciendo infarto de miocardio en ratas mediante el uso de isoproterenol, provocando el incremento de los niveles de creatina-quinasa en suero, hidroperóxidos de lípidos y una

disminución de los niveles de GSH, vitamina C y E. Sin embargo, tras el tratamiento de las ratas con 7,5 mg/kg de timol, se obtuvo una actividad normalizada de la creatina-quinasa, se determinaron niveles normales de los productos de la oxidación de lípidos, GSH y vitaminas C y E. Estos resultados fueron corroborados en ensayos *in vitro*, donde se evidenció la marcada actividad antioxidante de timol (Meeran y col., 2012).

Diferentes estudios han revelado que timol puede ser absorbido o degradado rápidamente en el estómago e intestino delgado (Anderson y col, 2012.; Michiels y col, 2008). En un estudio *in vivo* realizado por Nieddu y col. (2014), se demostró al administrar por vía oral una dosis de timol 0,5 g/kg, éste se absorbe rápidamente, eliminándose lentamente en 24 h. El tiempo para alcanzar la concentración máxima ( $T_{\text{máx}}$ ) en los organismos fue de unos 30 min, mientras que la vida media de la fase de absorción ( $t_{1/2}$ ) fue muy baja, aproximadamente 0,3 h.

En algunos órganos como el hígado, pulmones, riñones y los músculos, se detectaron concentraciones de timol bastante bajas. Sin embargo, se determinó una mayor cantidad de timol en los intestinos, tanto en la mucosa como en el contenido, lo que indica que no se absorbe totalmente. En este mismo estudio, se formaron complejos de timol con  $\beta$ -CDs, evidenciando un incremento en la absorción y en la vida media de timol (Nieddu, y col., 2014).

Recapitulando, dados los beneficios descritos para timol en diferentes sectores como la medicina, farmacia, alimentación o agricultura, sería interesante poder desarrollar estrategias que permitan solventar los inconvenientes intrínsecos a sus propiedades fisicoquímicas, que restringen hasta la fecha su amplio uso, como su escasa solubilidad en agua, inestabilidad frente a diferentes factores ambientales como calor, luz y oxígeno.

Así, entre las posibles soluciones alternativas planteamos el empleo de CDs, unos azúcares cíclicos que tienen la capacidad de formar complejos de inclusión con un gran número de sustancias, aumentando su solubilidad y ejerciendo un efecto protector frente a factores ambientales externos.

## 1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.2.1. Cálculo de $K_c$

La CD presenta una cavidad en la que se incluirán moléculas de timol, de forma parcial o completa. Los complejos de inclusión se disocian bajo ciertas condiciones, recuperando así la molécula huésped sus propiedades físico-químicas originales. Esta propiedad única de CDs permite aplicaciones muy interesantes en la industria farmacéutica, alimentaria o en química analítica.

En primer lugar, se calcularon las constantes de complejación ( $K_c$ ) entre timol y diferentes tipos de CDs nativas y modificadas a diferentes valores de pH utilizando el método de solubilidad, con el fin de comparar los valores obtenidos y determinar qué CD alberga en su interior mayor concentración de timol, y cómo evoluciona el equilibrio en función del pH del medio de reacción; variable a tener en cuenta para el posible empleo de los complejos en formulaciones aplicables en diferentes sectores.

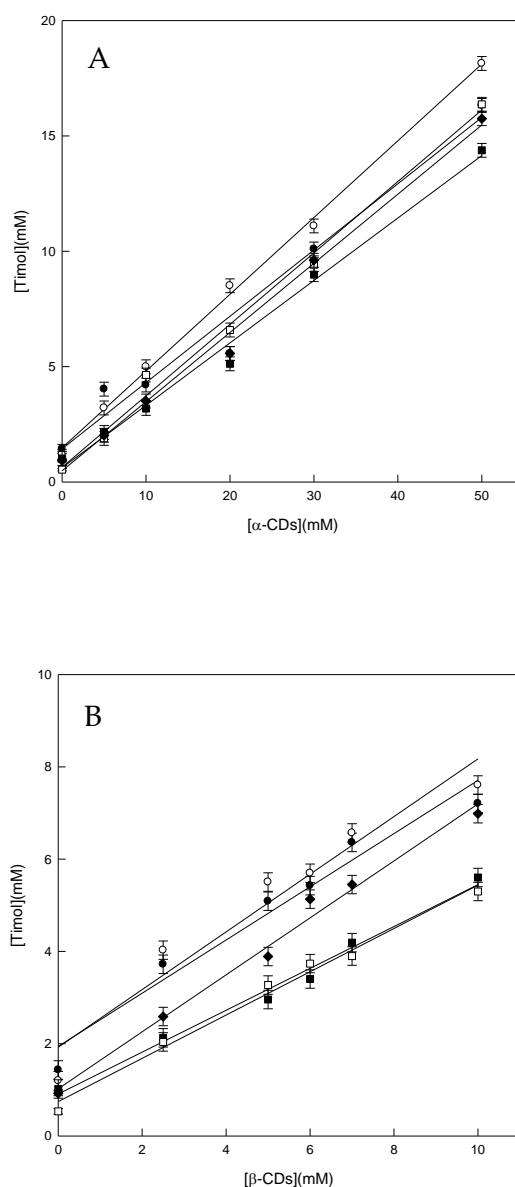
Puesto que la finalidad última se dirige a una posible aplicación industrial, se tomará como criterio de selección el valor de  $K_c$ , seleccionando como óptima aquella CD que sea capaz de complejar mayor concentración de timol.

#### 1.2.1.1. Estudio de formación de complejos de inclusión a diferentes pHs

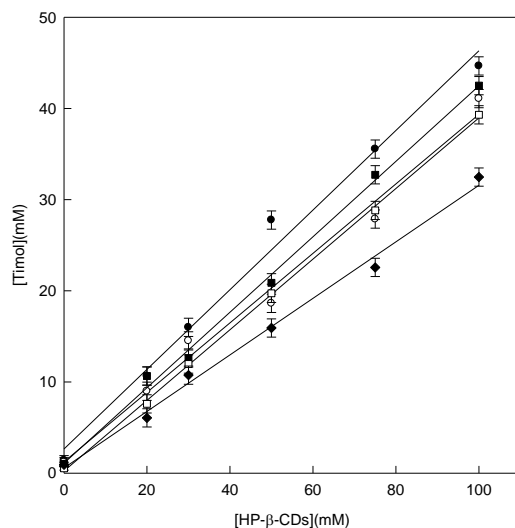
Se recurrió al método de solubilidad para calcular el valor de  $K_c$  entre timol y los distintos tipos de CDs, utilizando el método descrito por Higuchi y Connors, en 1965. El diagrama de fases de timol se realizó a diferentes valores de pH (3,5; 5,5; 6,5; 7,0 y 8,5) con  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y HP- $\beta$ -CDs, con el fin de comparar los valores de  $K_c$ . Para ello, se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y HP- $\beta$ -CDs y se llevaron a saturación con un patrón de timol.

Estas disoluciones se mantuvieron en un baño de ultrasonidos a temperatura constante (25 °C), hasta que se alcanzó el equilibrio. Tras ello, se cuantificó la concentración de timol soluble, en cada caso, siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**).

El diagrama de fases de timol presentó una tendencia lineal para los 3 tipos de CDs (Figuras IV. 2–3), entre el aumento de la concentración de timol y el aumento de la concentración de CDs (Tipo A<sub>L</sub>), indicando que en todos los casos la estequiometría de los complejos de inclusión formados fue 1:1.



**Figura IV.2.:** Diagrama de fases de timol con  $\alpha$ -CDs (A) y  $\beta$ -CDs (B) a pH 3,5 (●), pH 5,5 (○), pH 6,5(■), pH 7,0 (□) y pH 8,5 (◆) a 25 °C.



**Figura IV.3.:** Diagrama de fases de timol con HP- $\beta$ -CDs a pH 3,5(●), pH 5,5 (○), pH 6,5(■), pH 7,0 (□) y pH 8,5 (◆) a 25 °C.

Para calcular el valor de  $K_c$  en cada caso se utilizó la ecuación descrita por Higuchi y Connors, en 1965 (**Ecuación III.1**) y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.1**.

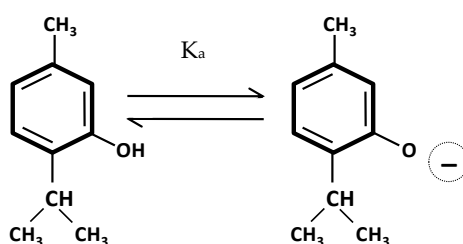
**Tabla IV.1.:** Constantes de complejación ( $K_c$ ) entre timol y distintos tipos de CDs a diferentes pH, calculados mediante el método de solubilidad.

pH	$\alpha$ -CDs $K_c(M^{-1})$	$\beta$ -CDs $K_c(M^{-1})$	HP- $\beta$ -CDs $K_c(M^{-1})$
pH 3,5	281 $\pm$ 26	701 $\pm$ 39	291 $\pm$ 19
pH 5,5	336 $\pm$ 22	866 $\pm$ 19	493 $\pm$ 37
pH 6,5	600 $\pm$ 54	913 $\pm$ 80	638 $\pm$ 73
pH 7,0	701 $\pm$ 90	1184 $\pm$ 115	2583 $\pm$ 176
pH 8,5	592 $\pm$ 67	580 $\pm$ 45	778 $\pm$ 64



Los valores de  $K_c$  obtenidos mediante el método de solubilidad (**Tabla IV.1**), aumentan conforme el pH se acerca a la neutralidad (7,0). Este hecho se debe a que la solubilidad ( $S_0$ ) de timol varía con el pH del medio (ver **Tabla IV.2**), disolviéndose mejor a pH ácido, solubilidad que va decreciendo hasta el 62% ( $S_0 = 0,54$ ) a un valor de pH 7,0. Sin embargo, observamos que  $S_0$  vuelve a subir hasta 0,92 a pH básico (8,5), alcanzando una solubilidad similar a la observada a pH 6,5 ( $S_0 = 1,02$ ).

Hay que tener en cuenta que la estructura aromática de timol (derivada de fenol) determina su reactividad, comportándose como un ácido débil ( $pK_a = 10,62$ ), condicionando el pH del medio su grado de disociación y, en consecuencia, su solubilidad (**Figura IV.4**).



**Figura IV.4.:** Equilibrio de disociación de timol.

Al ser más ácido que el agua y entrar en contacto con hidróxidos alcalinos en disolución acuosa a pH básico, reacciona con ellos formando sales o iones fenóxido, más estables que el propio timol (a pH neutro), debido al efecto neto de la resonancia del anillo aromático (deslocalización de la carga negativa).

La formación del complejo de inclusión de timol con ciclodextrina, determina un descenso de la entalpía y un incremento de la entropía del sistema por reducción de la energía libre de éste, lo que ocasiona un aumento de la estabilidad del complejo.

Los principales factores que limitan la formación del complejo son la relación entre los tamaños de las ciclodextrinas y la sustancia complejada, y la polaridad de la molécula huésped.

Así, la protonación de timol y en definitiva su solubilidad, es determinante en la estabilidad de los complejos.

Si tenemos en cuenta que la cavidad de las ciclodextrinas es bastante hidrófoba, la inclusión de especies apolares y sin carga está favorecida sobre las especies hidratadas polares o con carga neta, ya que la superficie interna del cono que albergará a la molécula huésped es apolar. De hecho, para los tres tipos de CDs ensayadas (ver **Tabla IV.1**), observamos un incremento espectacular en la estabilidad (valores de  $K_c$ ) de los complejos obtenidos a pH 7, que difiere significativamente de la estabilidad de los complejos de inclusión obtenidos con un ácido no disociado o su anión conjugado (fenóxido), ya que el ión fenóxido está más hidratado (más soluble) que su forma no disociada, por lo que su inclusión en la cavidad de la CD está menos favorecida.

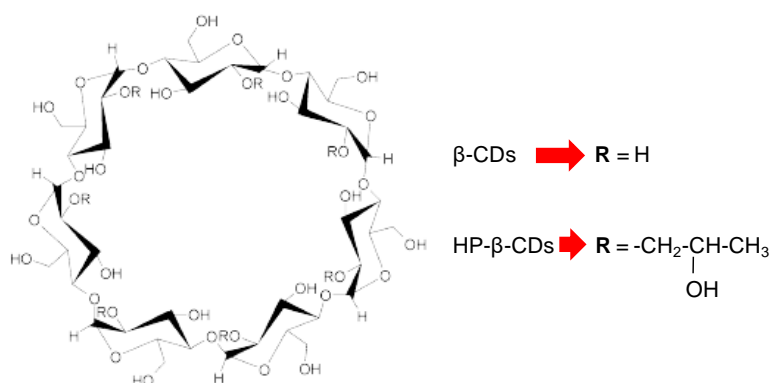
Con respecto al tamaño de la cavidad, si nos fijamos en el valor de  $K_c$  obtenido para las nativas evaluadas (ver **Tabla IV.1**), se alcanzaron mayores valores con las  $\beta$ -CDs, con independencia de pH ensayado.

Este hecho se debe a que la cavidad de  $\alpha$ -CDs (0,49 nm) es demasiado pequeña, interactuando bien con cadenas carbonadas alifáticas; en cambio el tamaño de  $\beta$ -CDs (0,62 nm), es apropiado para los anillos aromáticos como el de timol, alcanzando a pH neutro un valor de  $K_c$  1,7 veces superior al determinado con  $\alpha$ -CDs ( $701 \pm 90$ ).

Si bien el tamaño de la cavidad tan acusado explica las diferencias en los valores de  $K_c$  obtenidos para  $\alpha$ -CDs y  $\beta$ -CDs, cuando comparamos los valores de  $K_c$  obtenidos para  $\beta$ -CDs y su modificada HP- $\beta$ -CDs, que fueron  $1184 \pm 115$  y  $2583 \pm 176$ , respectivamente, cómo justificamos esas diferencias. Podríamos pensar erróneamente que deben estar implicados otros factores, puesto que tanto nativa y modificada deberían tener el mismo diámetro ya que difieren sólo en el cambio de átomos de H por grupos hidroxipropilo (**Figura IV.4**).

Así, siguiendo esta hipótesis, una posible explicación al hecho de que HP- $\beta$ -CD de lugar a un complejo más estable con timol (valor de  $K_c$  2,18 veces superior al obtenido con  $\beta$ -CD), que el obtenido con la nativa correspondiente, puede justificarse por la intensidad de las fuerzas hidrófobas e interacciones de Van der Waals implicadas, la liberación de la tensión del anillo, las modificaciones en la superficie del disolvente y, en mayor medida, la presencia de

grupos hidroxipropil presentes en la modificada rompe los puentes de H cerca de la cavidad de la CD, haciendo más accesible la entrada a las moléculas de timol al cono apolar, provocando un aumento en la solubilidad de timol.

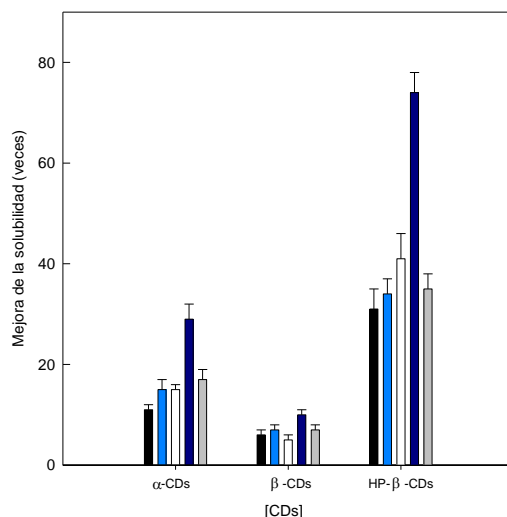


**Figura IV.5.:** Estructura de  $\beta$ -CD y su modificada HP- $\beta$ -CD.

Si bien los factores descritos son ciertos y favorecen en mayor o menor extensión la entrada de timol en el cono apolar, para que la argumentación fuese realmente sólida habría que incluir que los grupos hidroxipropilo provocan la apertura de la cavidad de la ciclodextrina, modificando significativamente el tamaño con respecto a la nativa, favoreciendo así que la molécula de timol entre completamente en la cavidad interna de la HP- $\beta$ -CDs, mientras que en  $\beta$ -CDs, sólo entra una parte de la molécula.

En resumen, la formación de complejos de inclusión de timol con CDs, varía en función del pH del medio, siendo mayor en el caso de HP- $\beta$ -CDs >  $\beta$ -CDs >  $\alpha$ -CDs a pH neutro (**Figura IV.6**), factor a tener en cuenta a la hora de formar complejos de inclusión y determinar valores de  $K_c$ .

Sin embargo, es importante señalar que el valor de  $K_c$  no depende solo del aumento de la solubilidad de timol al ser complejado con CDs, sino que también depende de la solubilidad ( $S_0$ ) de timol en dicho medio. Por ello se determinó la eficacia de la complejación (CE) para cada tipo de CDs.



**Figura IV.6.:** Aumento de la solubilidad de timol tras la formación de complejos de inclusión con  $\alpha$ -CDs (50 mM),  $\beta$ -CDs (13 mM) e HP- $\beta$ -CDs (100 mM) a pH 3,5 (barras negras), pH 5,5 (barras azul claro), pH 6,5 (barras blancas), pH 7 (barras azul oscuro) y pH 8,5 (barras grises).

Para los complejos con estequiometría 1:1, la CE puede determinarse a partir de la pendiente del diagrama de fases (**Ecuación III.12.**), ya que tiene en cuenta tanto la solubilidad de timol como la  $K_c$ .

El valor de CE obtenido para timol con los diferentes tipos de CDs, a distintos pH, se presenta en la **Tabla IV.2.**

Como se observa en la **Tabla IV.2.**, el producto de solubilidad varía según el pH del medio, ya que como se ha descrito anteriormente, timol al ser más ácido que el agua puede protonarse al variar el pH del medio formando sales o iones fenóxido, más estables que el propio timol (a pH neutro), debido al efecto de la resonancia del anillo aromático, mejorando su solubilidad acuosa.

**Tabla IV.2.:** Eficacia de complejación (CE) entre timol y distintos tipos de CDs a diferentes pH.

pH	S <sub>0</sub> (mM)	CE α-CDs	CE β-CDs	CE HP-β-CDs
pH 3,5	1,42 ± 0,20	399 ±50	790 ±110	413 ±60
pH 5,5	1,19 ± 0,15	400 ±40	719 ±130	586 ±70
pH 6,5	1,02 ± 0,12	612 ±101	677 ±120	650 ±50
pH 7,0	0,54 ± 0,11	378 ±52	639 ±106	1395 ±123
pH 8,5	0,92 ± 0,10	545 ± 0,12	533 ±91	716 ±80

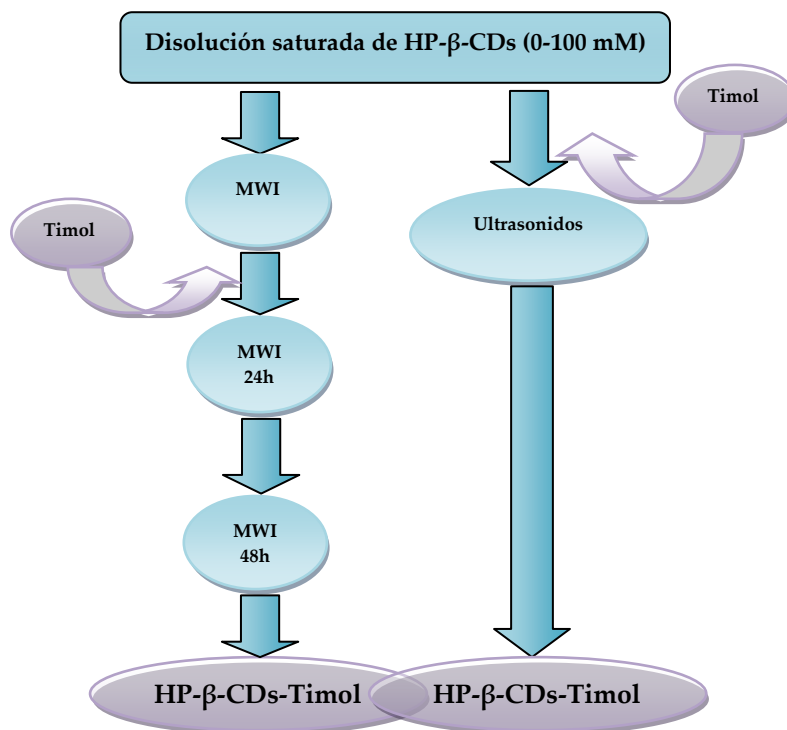
### 1.2.2. Estudio de formación de complejos de inclusión con HP-β-CDs por diferentes métodos

Una vez demostrada la capacidad de HP-β-CDs para formar complejos de inclusión con timol y dada su mayor eficacia a pH neutro con respecto a las nativas ensayadas, se seleccionó HP-β-CDs para la formación de complejos de inclusión a pH neutro y posterior atomización de las disoluciones en *Spray Dryer*, para la obtención de partículas sólidas, ya que podrían ser de gran utilidad en la industria alimentaria al facilitar su manejo y almacenamiento posterior.

Los complejos se prepararon por dos procedimientos: *i*) irradiación por microondas (MWI) y, *ii*) método de solubilidad (**Figura IV.7**), siguiendo los protocolos descritos en el apartado de materiales y métodos (**Capítulo III**).

Así, se procedió a optimizar la preparación de los complejos sólidos por dos vías, con la finalidad de seleccionar aquel que ofreciese mejores prestaciones, trabajando en ambos casos a concentraciones cercanas al límite de solubilidad de HP-β-CDs.

Para obtener los complejos de inclusión de HP-β-CDs con timol por el método de irradiación por microondas, se siguió el protocolo descrito previamente por Hernández-Sánchez y col. (2016) con ligeras modificaciones.

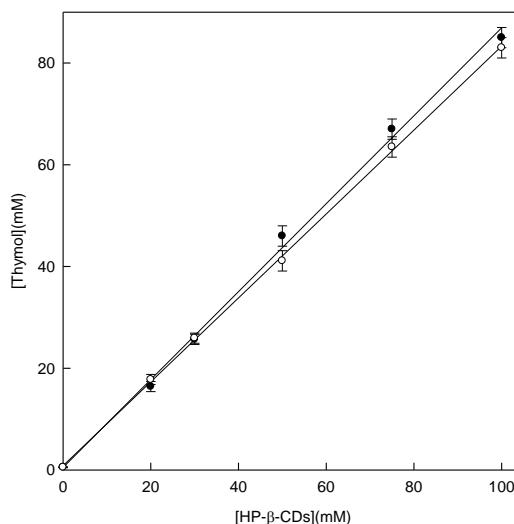


**Figura IV.7.:** Proceso de preparación de complejos de inclusión de timol-HP-β-CDs.

Como se observa en la **Figura IV.8**, la estequiometría de los complejos obtenidos fue 1:1, ya que conforme aumenta la concentración de HP-β-CDs, lo hace también la de timol.

A continuación, se determinó si el valor de  $K_c$  variaba con el tiempo de contacto, alargando el proceso de 24 h a 48 h. Los resultados obtenidos ( $4835 \pm 94$  y  $4696 \pm 87$ , respectivamente), demostraron que un tiempo de contacto de 24 h es adecuado para alcanzar el valor máximo de  $K_c$ , comprobando además que el aumento de la solubilidad de timol es de 108 a las 24 h y 107 veces y a las 48 h, valores muy similares entre sí.

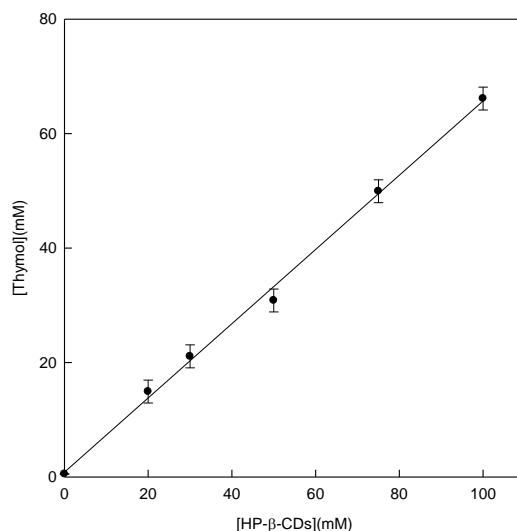
Por lo tanto, se seleccionó como óptimo el producto obtenido a las 24 h, ya que de esta forma se ahorraría tiempo y costes en la preparación de los complejos de inclusión y sería más fácil poder transferir esta metodología a la industria.



**Figura IV.8.:** Resultados obtenidos por el método irradiación por microondas con HP-β-CDs y timol a las 24 h (●), y a las 48 h (○).

Para poder comparar los resultados obtenidos por el método de irradiación por microondas con el de solubilidad, se realizaron diagramas de fases con timol. Para ello se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de HP-β-CDs hasta una concentración de 100 mM, en un volumen total de 100 mL, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.9**, pudiendo observar que el valor de  $K_c$  es ligeramente inferior al descrito a pH neutro en el estudio de formación de complejos de inclusión a diferentes valores de pH ( $2148 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Esta disminución en el valor de la  $K_c$  puede justificarse por el hecho de que al aumentar la cantidad de agua (dilución), la ciclodextrina y el timol no se ponen en contacto con la misma facilidad que en una disolución más concentrada (Martin del Valle, 2004), y obviamente habrá más moléculas de agua en el interior de la cavidad.



**Figura IV.9.:** *Diagrama de Fases de HP-β-CDs con timol.*

Si bien utilizando esta metodología la solubilidad de timol aumenta 89 veces, con el método de irradiación por microondas se incrementa 107 veces, mejorando en consecuencia la solubilidad de timol. Esto puede ser debido a que la irradiación por microondas tiene la capacidad de penetrar en cualquier sustancia, provocando la rotación de las moléculas que presentan un dipolo eléctrico, como el agua; es decir, estimula los choques de unas moléculas con otras, favoreciendo así la salida de las moléculas de agua del interior de la cavidad de la CDs, circunstancia que aprovechan las moléculas de timol para introducirse en la cavidad apolar vacía (Kappe, 2004).

Hay que tener en cuenta que la radiación por microondas no afecta a la energía de activación necesaria para iniciar la reacción, pero aporta casi de forma instantánea, la suficiente energía para superar esta barrera y completar la reacción más rápidamente y con mayor rendimiento que utilizando métodos convencionales de calentamiento. Además, la energía transmitida por microondas afecta a los parámetros de temperatura descritos en la ecuación de Arrhenius, de forma que este calentamiento instantáneo provoca un movimiento molecular más



rápido (aumento de la energía cinética), generando mayor número de colisiones, favoreciendo así la disolución de los reactivos.

#### 1.2.2.1. *Spray Dryer*

Los complejos solubles preparados con diferentes concentraciones de HP- $\beta$ -CDs se sometieron a un proceso de atomización para obtener los complejos en estado sólido (método descrito en el **Capítulo III**). Se aplicó este método de secado por estar muy extendido en la industria (Reineccius, 2009) y además, existen diferentes estudios que corroboran su utilidad en la obtención de complejos sólidos con CDs (Reineccius y col., 2002; Jafari y col., 2008; Wu y col., 2014).

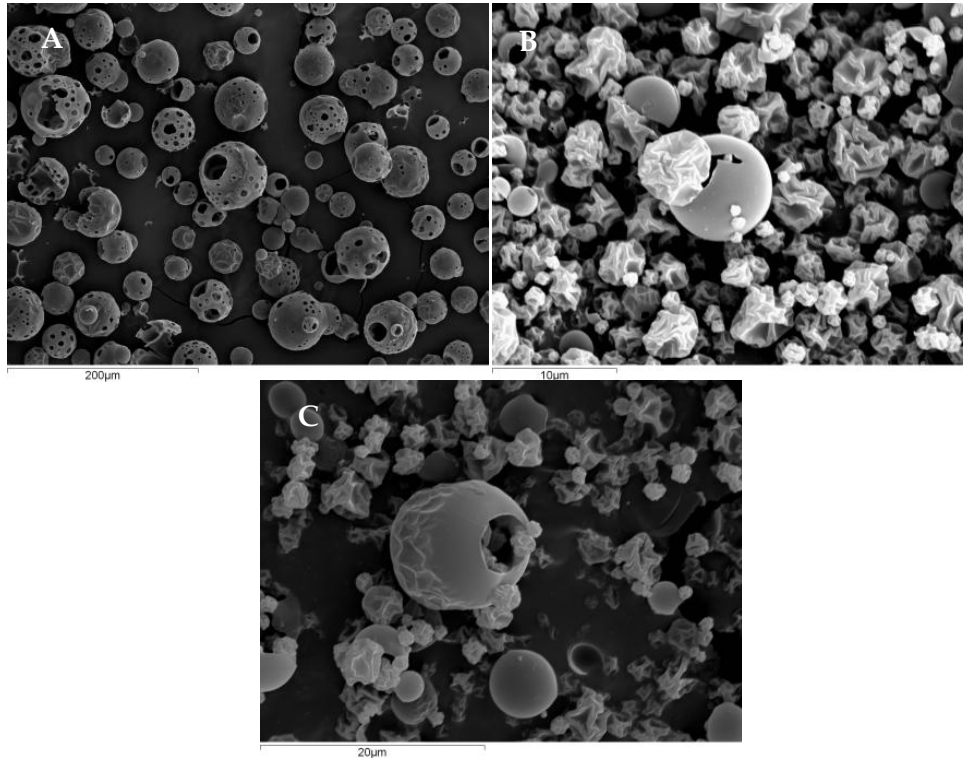
Para llevar a cabo este estudio se comparó el rendimiento de complejación de timol utilizando los dos métodos de preparación de complejos descritos anteriormente (**Figura IV.7**).

Las propiedades físicas de los complejos sólidos obtenidos pueden ejercer una influencia importante en parámetros como la densidad y la solubilidad, por ello es importante analizar la estructura y el tamaño de los diferentes tipos de encapsulación, y su forma de secado. De hecho, como se ha descrito en la bibliografía (de Barros Fernandes y col, 2014), cuando las partículas son vistas a través del microscopio electrónico de barrido (SEM), presentan una geometría esférica y un tamaño variable, que es típico de los materiales obtenidos mediante secado por atomización.

Los resultados del SEM (**Figura IV.10**) mostraron que el polvo obtenido tras el secado por atomización de los complejos derivados de ambos procedimientos, contienen partículas irregulares con forma esférica, revelando numerosos pliegues y abolladuras en la superficie.

Según Loksuan (2007), los pliegues en la superficie de las partículas atomizadas y la expansión de su tamaño, se generan habitualmente a consecuencia de la presencia de materiales de soporte (ciclodextrinas), ya que ralentizan la velocidad de evaporación del agua del sistema debido a su capacidad para retener moléculas de agua.

Como se puede observar en la **Figura IV.10** (micrografías B y C), las superficies externas de ciertos complejos muestran paredes continuas, sin grietas, que influyen de manera significativa en la pérdida de compuestos volátiles.

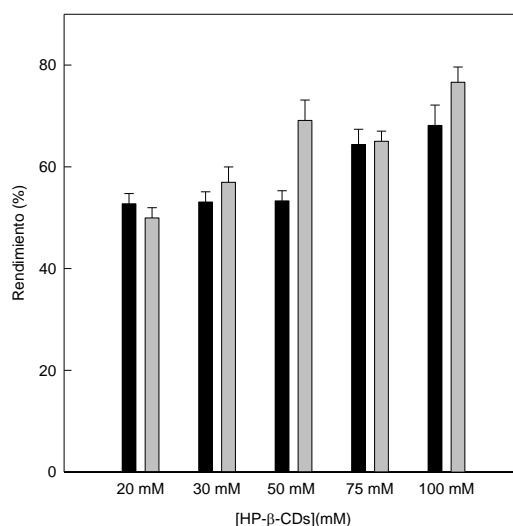


**Figura IV.10.:** *Micrografías de HP-β-CDs (A), Complejos por MWI (B) y complejos por el método de solubilidad (C).*

En la bibliografía se describen morfologías, en la microencapsulación de aceite de café (Frascareli y col., 2012), aceite esencial de orégano (Alvarenga y col., 2012) y en infusiones de laurel (Medina-Torres, 2016), donde también aparecen micropartículas con morfología globular externa similares a las descritas en la **Figura IV.10**.

A continuación, se determinó el rendimiento en el proceso de secado (RP), utilizando la **Ecuación III.3** (materiales y métodos), para el método de irradiación por microondas y para el método de solubilidad, sin tener en cuenta el polvo que queda en el interior del equipo, por considerarse una cantidad despreciable.

Los resultados obtenidos para ambos métodos (**Figura IV.11**) revelan que el rendimiento es superior al 50%.



**Figura IV.11.:** Rendimiento de secado por *spray-drying* con HP-β-CDs y timol, método de irradiación por microondas (barras negras), método de solubilidad (barras grises).

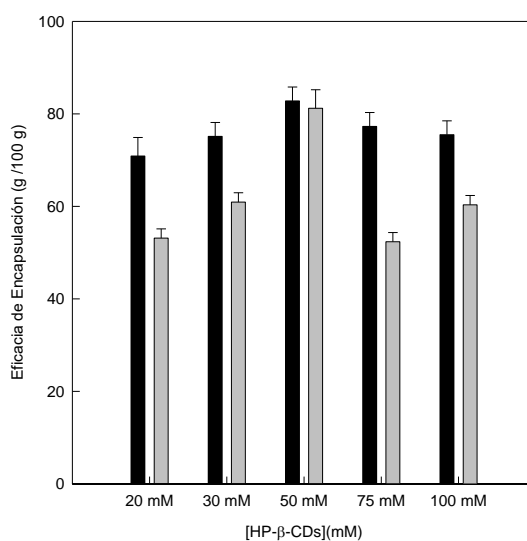
Cabe destacar en ambos casos, que a medida que aumenta la concentración de HP-β-CDs se consigue un rendimiento mayor (dosis dependiente), alcanzando el máximo rendimiento a 100 mM por el método de solubilidad (76,62%).

La diferencia entre ambos métodos puede justificarse considerando que a igual proporción de CDs, existe mayor cantidad de timol en disolución cuando se forman complejos mediante irradiación por microondas, dando lugar a que haya una mayor cantidad de sólidos en la mezcla incrementando la viscosidad de la disolución (de Barros Fernández, 2014). Este hecho condiciona un contacto mayor con la pared de la cámara del atomizador, pudiéndose pegar a ella y disminuir el rendimiento del proceso global (Tonon y col., 2008).

Además, hay que tener en cuenta que las cantidades que se introducen en el equipo son pequeñas (volumen total de 100 mL) y aunque se pueden producir pérdidas significativas, trabajando a escala de laboratorio es difícil alcanzar

rendimientos superiores al 80 % (Arpagaus y Schafroth, 2009). Sin embargo, al aumentar el volumen de secado trabajando a escala industrial, aumenta el rendimiento del proceso ( $\geq 93\%$ ), como ha descrito Eguinoa (2014) al atomizar complejos de inclusión de eugenol con  $\beta$ -CDs.

Para evaluar las pérdidas de timol cuando los complejos se sometieron a un proceso de atomización, se analizaron veinte muestras de los complejos formados, diez alícuotas antes y otras diez tras pasar por el *Spray Dryer*, determinando la concentración de timol mediante GCMS, aplicando el procedimiento descrito en materiales y métodos (**Capítulo III**). La concentración de timol encontrada en los complejos sólidos tras la atomización (**Figura IV.12**), se utilizó para determinar la eficacia de la encapsulación (EE), **Ecuación III.4**, con respecto a la cantidad teórica de timol presente en la disolución antes de atomizar, en cada caso.



**Figura IV.12.:** Eficacia de encapsulación de timol con HP- $\beta$ -CDs, método de irradiación por microondas (barras negras), método de solubilidad (barras grises).

Al comparar la eficacia de encapsulación obtenida por ambos métodos, observamos que en todos los casos es ligeramente superior para el método de irradiación por microondas, oscilando en el intervalo 70,9 a 82,8 g/100 g, mientras que para el método de solubilidad los valores oscilaron entre 53,14 y 81,21 g/100 g. Este resultado puede explicarse considerando que en el MWI las CDs alcanzan

un estado instantáneo de resonancia, favoreciendo de esta forma la salida de las moléculas de agua de su interior y simultáneamente, la entrada de timol (Bergese y col., 2003).

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de eficacia (EE), se procedió a determinar la carga de materia activa (CMA) aplicando la **Ecuación III.5**, que relaciona la cantidad de timol encapsulado con los gramos de polvo obtenidos tras atomizado (*Spray Dryer*).

Como se puede observar en la **Tabla IV.3**, al igual que ocurre con la eficacia de encapsulación, los valores obtenidos mediante irradiación por microondas (entre 6,70 y 7,17 g/100 g) mejoran los alcanzados aplicando el método de solubilidad, que oscilaron entre 3,35 ya 4,32 g/100 g, resultados que concuerdan con los descritos por Tao y col., 2014, para atomizados de timol complejoado en  $\beta$ -CDs.

**Tabla IV.3.:** Eficacia de encapsulación (EE) y carga de materia activa (CMA).

HP- $\beta$ -CDs	MWI		Solubilidad	
	EE (g/100 g)	CMA (g/100 g)	EE (g/100 g)	CMA (g/100 g)
<b>20 mM</b>	70,90 $\pm$ 4	6,82 $\pm$ 0,05	53,14 $\pm$ 2	3,43 $\pm$ 0,03
<b>30 mM</b>	75,14 $\pm$ 3	6,77 $\pm$ 0,07	60,94 $\pm$ 2	3,47 $\pm$ 0,04
<b>50 mM</b>	82,80 $\pm$ 3	7,17 $\pm$ 0,06	81,21 $\pm$ 4	4,32 $\pm$ 0,08
<b>75 mM</b>	77,30 $\pm$ 3	6,87 $\pm$ 0,08	52,35 $\pm$ 2	3,35 $\pm$ 0,07
<b>100 mM</b>	75,50 $\pm$ 3	6,70 $\pm$ 0,04	60,35 $\pm$ 2	3,55 $\pm$ 0,06

Llegados a este punto, conviene resaltar que el hecho de alcanzar un mayor rendimiento no implica tener una mayor cantidad de complejos de inclusión, ya que en la cantidad de polvo recuperado puede haber tanto complejos de inclusión "cargados con timol" como CDs vacías.

Así, con el fin de establecer la validez del proceso de atomización y justificar los resultados previos, se determinó de nuevo la Kc disolviendo el polvo

atomizado en agua destilada, utilizando una proporción 1:1 (p:v), para asegurar la disolución de los complejos.

Los valores de  $K_c$  obtenidos,  $3645 \pm 134$  para el atomizado procedente de MWI y  $946 \pm 84$  para el método de solubilidad, corroboran los resultados previos (mayor valor de  $K_c$  y EE), aconsejando el empleo del método de irradiación por microondas para la formación de complejos de inclusión de timol.

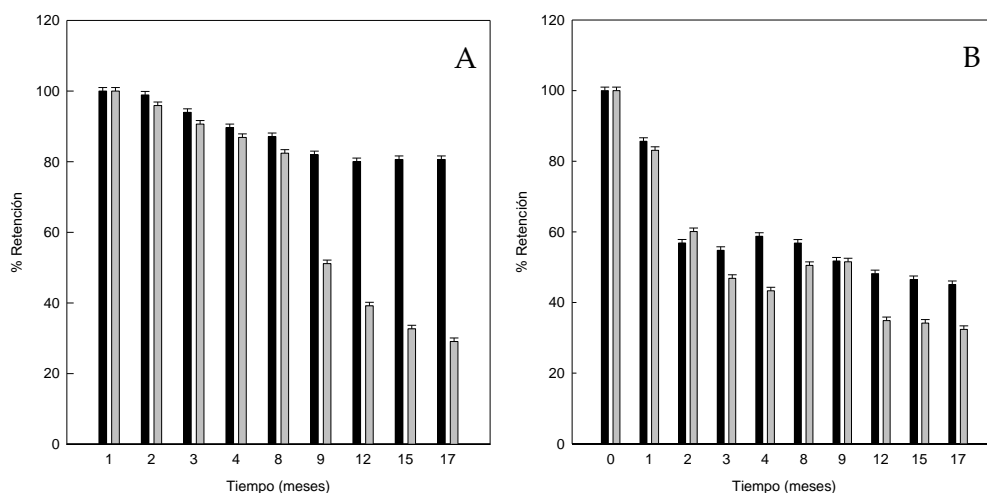
Seleccionado el método óptimo para la formación de complejos de inclusión de timol, se llevó a cabo un ensayo de estabilidad de los atomizados obtenidos por MWI, utilizando como control los derivados del ensayo de solubilidad, ya que en general, los sabores encapsulados se almacenan durante largos períodos de tiempo antes de ser utilizados. Así, es importante conocer no solo la cantidad inicial de componente activo en la cavidad de las CDs, sino también la variación del mismo en función del tiempo.

Dado que la humedad (actividad de agua) influye negativamente en la estabilidad del polvo obtenido por *Spray Dryer* (Alvarenga y col., 2012), para conseguir un polvo con el menor contenido de humedad posible, se ajustaron las variables del atomizador, fijando una temperatura de entrada de 180 °C y una velocidad de bomba de 0,8 L min<sup>-1</sup>, minimizando así las variaciones en las características físicas y químicas de los atomizados.

Fijadas las variables, para evaluar la estabilidad de los complejos sólidos se prepararon 100 muestras (50 por el método MWI y otras 50 por el método de solubilidad), con una concentración de 50 mM HP- $\beta$ -CDs. Las muestras se almacenaron durante 17 meses en recipientes de plástico cerrados, y 50 de ellas se conservaron a temperatura ambiente (25 °C) y el resto, refrigeradas a 8 °C.

Como se observa en la **Figura IV.13.A**, tras 17 meses de almacenamiento, el porcentaje de retención de timol encapsulado en los atomizados obtenidos por MWI es mayor a 25 °C, ya que se mueve en un rango de 100 a 80,62 %, perdiendo sólo un 19,4%, bastante menos que los atomizados obtenidos por diagrama de fases, que perdieron el 50% de timol; mientras que al someterlos a una temperatura de 8 °C, se pierde al final del ensayo el 71% de timol (100–29,10%), un 36% menos que por diagrama de fases (**Figura IV.13.B**). Este resultado adverso puede justificarse considerando que, al almacenar las muestras a menor temperatura, aumenta considerablemente el contenido en humedad en el ambiente circundante, favoreciendo la competición desigual con las moléculas de

timol (en cantidad limitante) por las CDs (moléculas higroscópicas), y por consiguiente, condicionando la liberación del compuesto complejoado.



**Figura IV.13.** Estabilidad de los complejos sólidos durante su almacenaje. A, MWI a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises), B método de solubilidad a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises).

En resumen, los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad, apoyan el empleo del método MWI en la preparación de complejos sólidos de timol-HP- $\beta$ -CDs, con un tiempo de contacto de 24 h, ya que además de alcanzar mayor eficacia en el proceso, conlleva otras ventajas tecnológicas y económicas de gran interés para la industria alimentaria como el escalado del proceso a nivel industrial, reducción de costes (ahorro energético y mano de obra), además, permite un calentamiento rápido de la reacción sin sobrecalentar la superficie de contacto, agilizando la cinética del proceso. Estos resultados coinciden con los descritos previamente por Mohitm y col. (2010), tras complejar cefdinir con  $\beta$ -CDs mediante MWI y posterior atomización, concluyendo que la utilización de MWI mejora sobremanera la disolución de los complejos formados.

## 1.2.2.2. RMN

Para corroborar que la formación de los complejos de inclusión entre timol y HP- $\beta$ -CDs fue efectiva, se evaluó la interacción de ambas moléculas a través del RMN, ya que ofrece una evidencia “inequívoca” de la inclusión de la molécula huésped en el interior de la CDs (Marques, 2010). Esta técnica se ha empleado con frecuencia para examinar el modo de interacción de la  $\beta$ -CDs con diferentes moléculas aromáticas. Así, si una molécula se introduce en el cono apolar de las CDs, si bien los átomos de -H situados en el interior de la cavidad, experimentarán un desplazamiento para poder acomodar a la molécula huésped, sin embargo, los átomos de -H situados en la superficie externa no se verán afectados (Szejtli, 1985; Chadha y col., 2010).

Así, los resultados obtenidos tras someter los complejos a <sup>1</sup>H-RMN corroboraron que la estequiometría es 1:1. En la **Tabla IV.4** se muestran los valores de desplazamiento químico de timol y HP- $\beta$ -CD tanto en su estado libre, como complejo en solución de metanol- $d_4$ , así como las diferencias entre las señales de las moléculas libres y complejadas.

**Tabla IV.4.:** Desplazamiento químico de timol y HP- $\beta$ -CDs tanto en su forma libre como complejada en metanol- $d_4$ .

	H-Atom	$\delta$ /ppm (Libre)	$\delta$ /ppm (Complejo)	$\Delta\delta$ (Complejo - Libre)/ppm
Timol	H-C (3)	6,967	6,968	-0,001
	H-C (4)	6,573	6,575	-0,002
	H-C (6)	6,560	6,551	0,009
	H-C (2')	3,265	3,274	-0,009
	H-C (5')	2,197	2,202	-0,005
	H-C (2'')	1,169	1,172	-0,003
HP- $\beta$ -CD	H-C (1)	5,074	5,070	0,004
	H-C (2)	3,723	3,726	-0,003
	H-C (3)	3,947	3,945	0,002
	H-C (4)	3,418	3,416	0,002
	H-C (5)	3,534	3,532	0,002
	H-C (6)	3,821	3,817	0,004
	H-C (9)	1,126	1,125	0,001

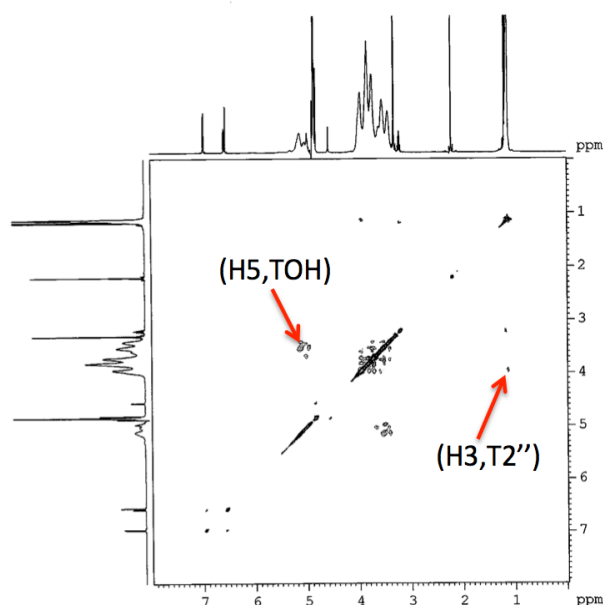


Esta modificación de los desplazamientos químicos de la molécula libre con respecto a la complejada, verifican la formación del complejo de inclusión. Además de determinar los desplazamientos químicos, se llevó a cabo un estudio mediante espectroscopía de RMN bidimensional (2D), ya que proporciona información importante sobre la proximidad espacial entre el anfitrión (HP- $\beta$ -CD) y la molécula huésped (timol en este caso), a través de la observación de las correlaciones cruzadas.

Esta técnica (RMN-2D) explota la existencia de un efecto determinante para la elucidación de estructuras, denominado efecto Overhauser (NOE), que se origina por la interacción entre dos protones próximos en el espacio, pudiendo observar la interacción en los espectros NOESY o ROESY.

Para poder interpretar estos espectros, consideraremos que la presencia de picos cruzados (tabla de doble entrada **Figura IV.14**), entre los protones de dos especies en el espectro NOE, confirma la existencia de un contacto espacial a 0,4 nm.

Así, para obtener más información conformacional sobre el compuesto obtenido, se obtuvo el 2D ROESY del complejo de inclusión, que se muestra en la **Figura IV.14**.



**Figura IV.14.:** Espectro ROESY del complejo timol-HP- $\beta$ -CDs en metanol- $d_4$ .

Como podemos observar, el complejo timol-HP- $\beta$ -CDs presenta una correlación (proximidad espacial), apreciable del protón -OH de timol con los protones H-5 de HP- $\beta$ -CD. Similares interacciones se observan entre el protón T2 de timol y los protones H-3 de HP- $\beta$ -CD.

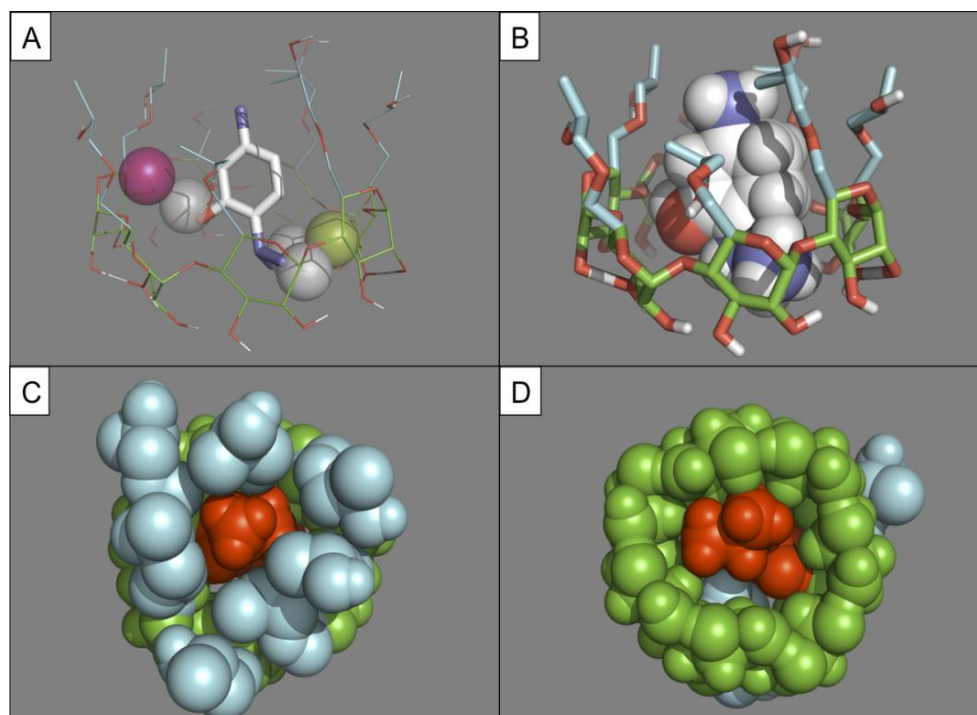
Estos resultados confirman que timol se incluyó en la cavidad de HP- $\beta$ -CD.

#### 1.2.2.3. Acoplamiento molecular (*Docking*)

Con el propósito de dar una explicación plausible a la interacción entre HP- $\beta$ -CD y timol una vez complejados, se realizaron simulaciones tridimensionales de acoplamiento molecular (*Docking*). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.15**, donde podemos observar que timol penetra en la cavidad interna (hidrófoba) de HP- $\beta$ -CDs, localizando fuertes interacciones de Van der Waals entre átomos de ambas moléculas. Así, los hidrógenos T2" del grupo isopropilo de timol interaccionan con los átomos de hidrógeno H3 de HP- $\beta$ -CD (esfera verde en la **Figura IV.15.A**), y el hidrógeno del grupo hidroxilo de timol, interactúa con los átomos de hidrógeno H5 de HP- $\beta$ -CD (esfera lila de la **Figura IV.15.A**). Los átomos de carbono de los grupos hidroxipropilo de HP- $\beta$ -CD, se muestran en color azul claro, mientras que el resto de átomos de carbono de HP- $\beta$ -CD se presentan en color verde **Figura IV.15.B**.

La **Figura IV.15.C** representa la vista desde la parte superior del complejo (perspectiva cónica), donde timol se muestra en color rojo, los átomos del grupo hidroxipropil de HP- $\beta$ -CDs aparecen en color azul, y el resto de átomos de HP- $\beta$ -CD se representan en color verde, y su vista desde abajo **Figura IV.15. D**, donde timol se muestra en color rojo, los átomos del grupo hidroxipropil de HP- $\beta$ -CDs en color azul, y los otros átomos de HP- $\beta$ -CDs en color verde.

Los resultados de simulación concuerdan con los datos obtenidos por espectroscopía <sup>1</sup>H-RMN y 2D-ROESY (**Figura IV.14**). Además, como se muestra en la conformación esférica de las moléculas (**Figura IV.15.B, C, D**), timol se encuentra fuertemente unido al núcleo hidrofóbico de HP- $\beta$ -CD.



**Figura IV.15.:** *Diferentes perspectivas tridimensionales de los complejos entre timol y HP- $\beta$ -CDs obtenidos mediante Docking.*

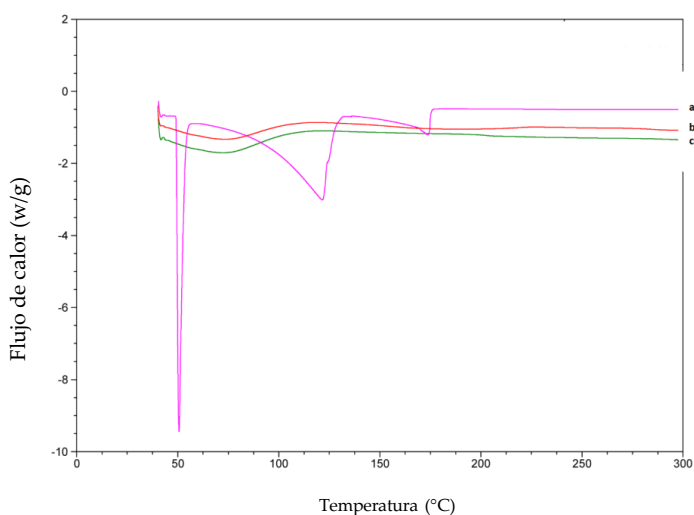
#### 1.2.2.4. Calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la termogravimetría se utilizan habitualmente para determinar las propiedades físicas de una sustancia en función de la temperatura, bajo una atmósfera controlada, proporcionando información sobre su comportamiento térmico, graficando los datos obtenidos en termogramas (Volonté y Quiroga, 2013).

La DSC es un método de rutina empleado para el reconocimiento de complejos de inclusión en estado sólido, ya que cuando las moléculas huéspedes penetran en la cavidad de las CDs, se produce una variación de ciertos parámetros fisicoquímicos (respecto al huésped libre) al elevar la temperatura, pudiendo observar desplazamientos en los puntos de fusión, ebullición o sublimación (Miller y col., 2007). Los termogramas obtenidos por DSC para los

complejos se muestran en la **Figura IV.16** y en la **Figura IV.17** los derivados del análisis termogravimétrico.

La curva de DSC obtenida para timol, presenta tres bandas endotérmicas a aproximadamente 50 °C, 120 °C y la tercera se sitúa en el intervalo 165-170 °C. El primer punto de inflexión (50 °C) se asocia a su punto de fusión (**Figura IV.16. a**), mientras que los otros responden a la oxidación y volatilización de este monoterpreno, que queda plenamente justificado por la pérdida de peso (95%) obtenida en el análisis por TG (**Figura IV.17.c**) para el compuesto libre.

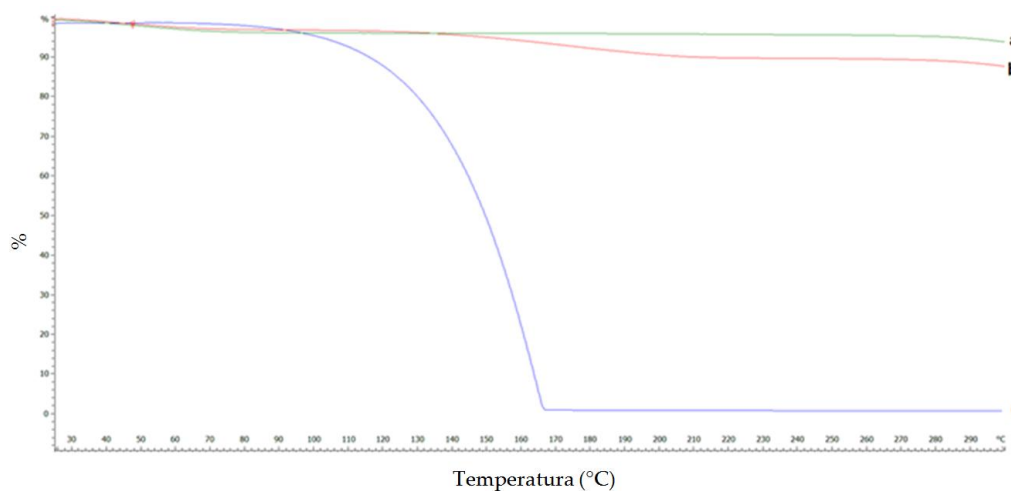


**Figura IV.16.:** Curvas de DSC de timol en rosa (a), MWI timol-HP-β-CDs en rojo (b), HP-β-CDs en verde (c).

Si nos fijamos en la gráfica obtenida para HP-β-CD (**Figura IV.16.c**), observamos que aparece un amplio pico endotérmico a aproximadamente 70 °C, asociado a un marcado proceso de deshidratación (Kohata y col., 1993; Marini y col., 1996). Sin embargo, cuando timol forma un complejo de inclusión con HP-β-CDs, se produce una reducción evidente de esta señal, evidenciando que tiene lugar un proceso de exclusión de moléculas de agua de la cavidad apolar, previo a la formación del complejo (**Figura IV.16 b**).

Si seguimos escudriñando las gráficas de DSC, observamos que en la curva correspondiente al complejo de inclusión entre timol-HP-β-CD (**Figura IV.16 b**)

no aparecen los picos endotérmicos característicos de timol (**Figura IV.16 a**), lo que indica que este monoterpeno es protegido del tratamiento térmico debido a la formación del complejo de inclusión con HP- $\beta$ -CD, justificando así el efecto barrera que muestran las CDs, protegiendo a los compuestos encapsulados de la acción de factores ambientales externos (Williams y col., 1998).



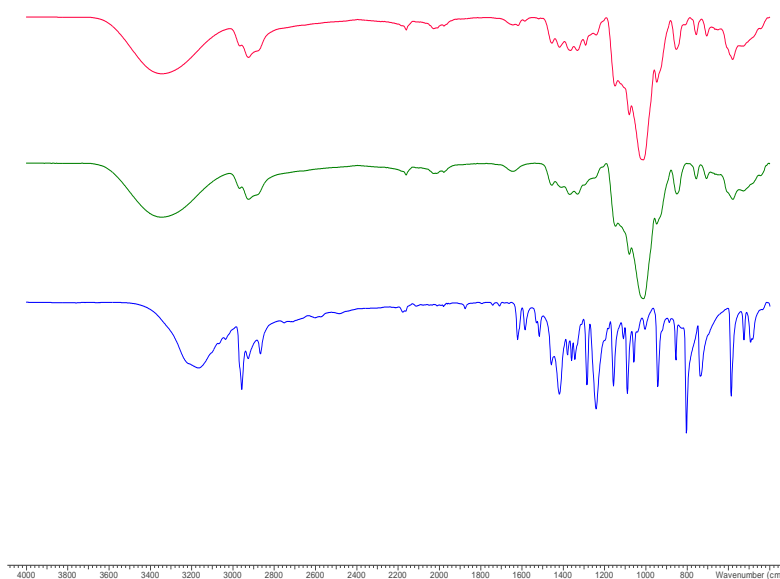
**Figura IV.17.:** Curvas de TG de a) HP- $\beta$ -CDs en verde, b) MWI timol-HP- $\beta$ -CDs en rosa, c) timol en azul.

#### 1.2.2.5. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica utilizada habitualmente para confirmar la formación de complejos de inclusión (Ahmed y col., 1991). Así, se empleó FTIR para evidenciar la formación del complejo entre timol y HP- $\beta$ -CD, obteniendo su espectro de infrarrojo y el de las moléculas aisladas (**Figura IV.18**).

Como podemos observar en la (**Figura IV.18**), en el espectro de infrarrojos (IR) de HP- $\beta$ -CD aparecen numerosos picos en el intervalo de longitudes de onda ( $\lambda$ ) comprendido entre 600 y 3500  $\text{cm}^{-1}$ , siendo los más representativos los siguientes: 3341  $\text{cm}^{-1}$  (O-H, vibraciones de tensión); 2923  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, vibraciones de tensión); 1643  $\text{cm}^{-1}$  (O-H vibraciones de flexión); 1157  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, vibración de flexión); 1012  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C, vibraciones de estiramiento); 850  $\text{cm}^{-1}$  (enlace de tipo  $\alpha$  glucosídico); 2967  $\text{cm}^{-1}$  (anti-vibración simétrica de los grupos metilo); 1375  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de flexión de metilo).

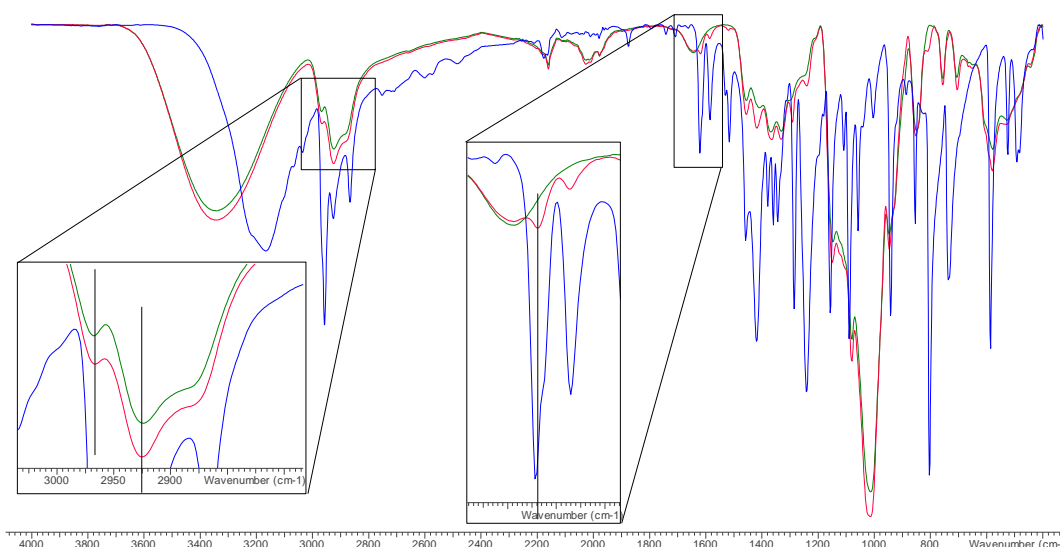
El espectro IR de timol (**Figura IV.18**) muestra para el enlace O-H una banda ancha de estiramiento a  $\lambda= 3166 \text{ cm}^{-1}$ , y un pico más estrecho derivado de la flexión en el plano a  $\lambda= 1457 \text{ cm}^{-1}$ . Con respecto a las señales correspondientes a los enlaces C=C del anillo aromático, aparecen tres bandas de combinación (overtones) de intensidad débil a  $\lambda= 1621, 1585$  y  $1458 \text{ cm}^{-1}$ , que revelan la tri-sustitución del anillo, además de una flexión (bending) C-H fuera del plano a  $\lambda= 736 \text{ cm}^{-1}$  y dos bandas de estiramiento asimétrico a  $2866$  y  $2958 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, apareciendo para C-H la flexión en el plano a  $1089 \text{ cm}^{-1}$  y  $1058 \text{ cm}^{-1}$ . Con respecto a los sustituyentes del anillo aromático, el metilo ( $\text{CH}_3$ ) aparece a  $\lambda= 1375 \text{ cm}^{-1}$  observando a  $\lambda= 1380 \text{ cm}^{-1}$  una señal dobleteada (muela), característica del isopropilo.



**Figura IV.18.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), MWI timol-HP- $\beta$ -CDs (línea roja), y timol (línea azul).

Con respecto al espectro obtenido para el complejo (**Figura IV.19**), se observa que las bandas correspondientes a las moléculas de timol (libre) aparecen cubiertos generalmente, por los picos del complejo timol-HP- $\beta$ -CD, ya que la cantidad de molécula huésped en los complejos de inclusión es baja, habitualmente entre 10-15% (w/w), (Yang, y col., 2005).

Como se observa en la **Figura IV.19**, las dos bandas de HP- $\beta$ -CD que aparecen a  $\lambda = 2923$  y  $2967$   $\text{cm}^{-1}$  corresponden a un enlace C-H con vibraciones de tensión y anti-simétrica de los grupos metilo, respectivamente; dichas señales se desplazaron ligeramente hasta  $2925$  y  $2965$   $\text{cm}^{-1}$  y poseen mayor intensidad cuando la CD compleja a timol.



**Figura IV.19.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), MWI timol-HP- $\beta$ -CDs (línea roja), y timol (línea azul). Las líneas verticales indican el máximo de la curva de HP- $\beta$ -CDs.

Además, en el complejo HP- $\beta$ -CD-timol desaparece a  $\lambda = 1380$   $\text{cm}^{-1}$  la señal dobleteada (muela) característica del isopropilo, demostrando que el grupo isopropilo de timol se introduce en la cavidad interna (apolar) de la HP- $\beta$ -CD.

Por otra parte, el pico observado del enlace C=C del anillo aromático de timol, con una vibración de estiramiento en  $1621$   $\text{cm}^{-1}$ , aparece en el complejo HP- $\beta$ -CD-timol desplazado a  $1619$   $\text{cm}^{-1}$ . Estos ligeros cambios entre los compuestos libres y su forma complejada, proporcionan una evidencia de las interacciones hospedador-huésped.





## CAPÍTULO V. CARVACROL



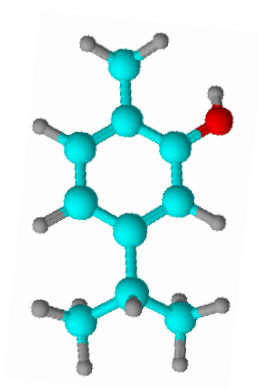
## 1. CARVACROL

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), es el monoterpeno fenólico mayoritario del aceite esencial de orégano, pero además se encuentra presente en otras plantas aromáticas y especias como el comino negro (*Nigella sativa* L.), y la mejorana (*Origanum majorana* L.) (Silva y col., 2012). Junto con su isómero timol, carvacrol es uno de los constituyentes de los aceites esenciales más estudiados.

Los estudios de More y col. (2007) evidenciaron que se puede obtener de forma sintética mediante síntesis química y biotecnológica, a través de la ingeniería metabólica de microorganismos. Más tarde, los estudios de Yadav y Kamble (2009) demostraron la viabilidad de la síntesis química para carvacrol con buen rendimiento (próximo al 82%), aplicando un proceso limpio de alquilación de o-cresol con propileno, o alcohol isopropílico, sobre catalizadores ácidos.

Carvacrol (**Figura V.1.**) es un líquido denso de color amarillo, poco soluble en agua (1,25 g/L a 25 °C), pero muy soluble en diversos disolventes orgánicos ( $P_{ow}$ : log P 3,49).



**Figura V.1.:** Estructura química de carvacrol.

Para este compuesto, se ha descrito una toxicidad aguda ( $DL_{50}$ ) por vía oral de  $810 \text{ mg kg}^{-1}$ , y administrado a ratas de forma intravenosa o intraperitoneal su dosis letal media es de 80 y  $73,3 \text{ mgkg}^{-1}$  de peso, respectivamente (Andersen y col., 2006). Sin embargo, en humanos es muy tóxico, con una dosis letal oral de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$ , ya que provoca la irritación de las mucosas de la boca, nariz y ojos; e incluso puede cursar con náuseas, vómitos y diarrea.

Por otro lado, aunque carvacrol presenta un olor agradable, su uso como conservante en alimentos está limitado por su fuerte sabor cuando se añade en grandes cantidades, lo que afecta negativamente a las propiedades organolépticas de los alimentos (Zhou y col., 2007).

Está autorizado su empleo en alimentos, ya que se le considera seguro para el consumo humano, apareciendo por ello en la categoría de aditivos alimentarios permitidos para la adición directa a los alimentos (FDA, 2016). Además, carvacrol fue incluido por el Consejo de Europa en la lista de aromas químicos que se pueden utilizar en las bebidas alcohólicas, productos horneados, goma de mascar, condimentos, productos lácteos congelados, pudín de gelatina, bebidas no alcohólicas y caramelos blandos (Ultee y col., 1999; De Vincenzi y col., 2004).

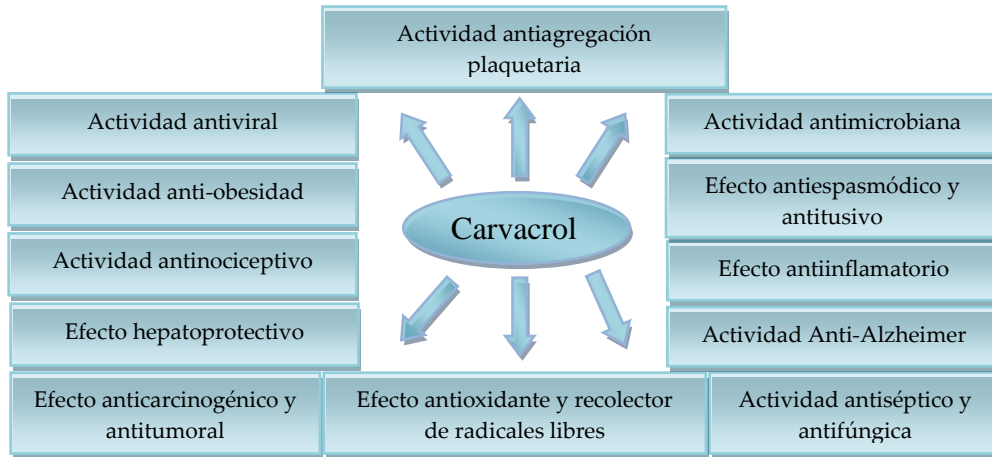
Además del interés creciente por las industrias agroalimentarias en el empleo de carvacrol como aromatizante o conservante natural, en los últimos años se han publicado numerosos estudios encaminados a elucidar los mecanismos de acción y efectos biológicos de carvacrol, sobre diferentes dianas de interés en química clínica (Suntres, Coccimiglio y Alipour, 2015).

### 1.1.1. Carvacrol y salud

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que este fenol ejerce diferentes actividades biológicas (**Figura V.2**).

El aumento generalizado de la obesidad en el mundo es un hecho, así como lo es la ineficacia de la aplicación de fármacos sintéticos, hecho que ha motivado una continua búsqueda de remedios naturales alternativos.

En este sentido, se ha evaluado la efectividad de carvacrol en la prevención y tratamiento de la obesidad (Haque y col., 2014).

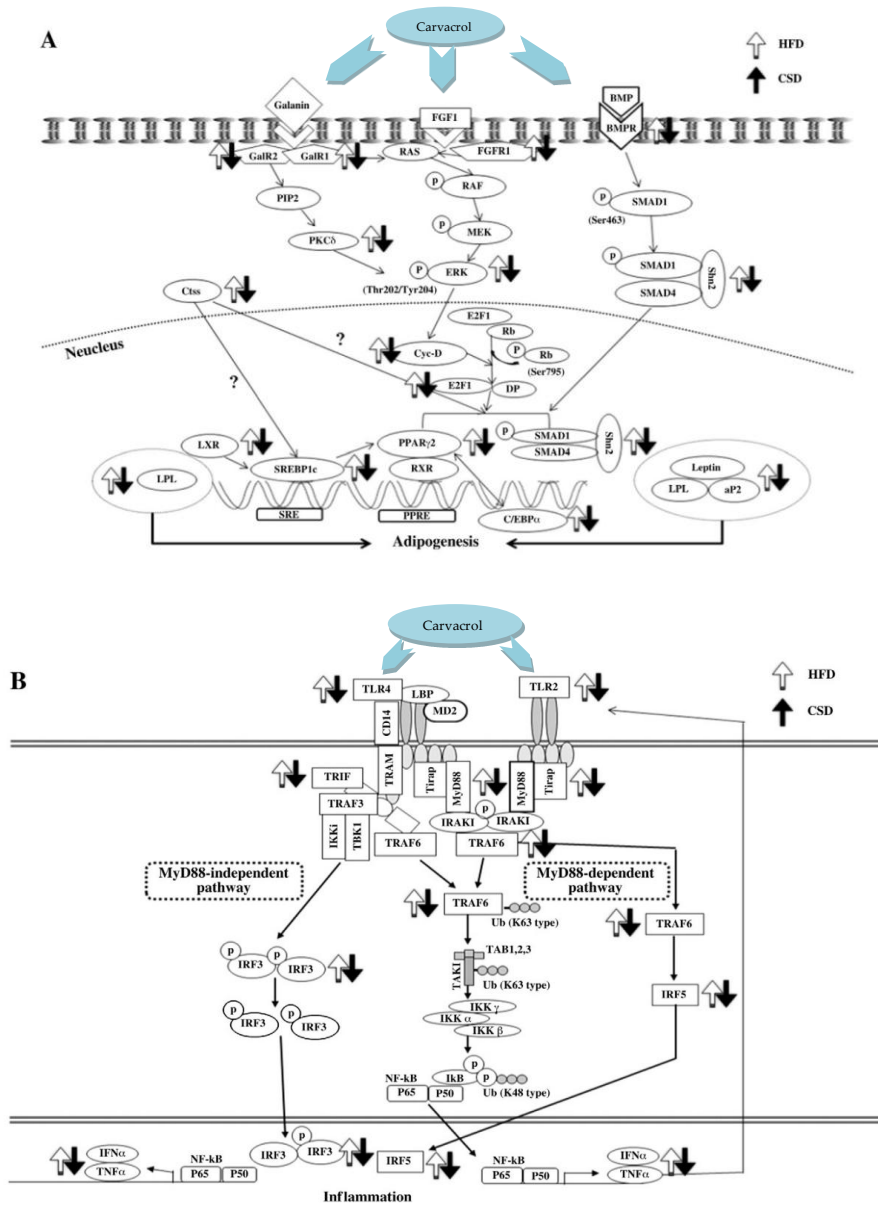


**Figura V.2.:** Actividades biológicas atribuidas a carvacrol (Alagawany y col., 2015).

Así, en un estudio llevado a cabo con ratones obesos sometidos a una dieta rica en grasa (DAG), suplementada con concentraciones de carvacrol del 0,01 %, 0,05 % y 0,1 %; observaron una reducción significativa del peso corporal en los ratones, de forma dosis dependiente, tras 28 días de ingesta. Estos mismos ratones se sometieron a un seguimiento durante 10 semanas más, enriqueciendo la dieta con un 0,1 % de carvacrol (equivalente a 100 mg/kg de peso corporal), constatando que, si bien se observó en los ratones con una dieta suplementada con carvacrol una ganancia de peso corporal y grasa visceral, ésta fue inferior a la observada en los ratones a los que se suministró una dieta sin el suplemento (Cho y col., 2012).

En este sentido, Cho y colaboradores evidenciaron que una dieta suplementada con carvacrol, reduce el peso corporal en ratones debido a la modulación de la adipogénesis y la termogénesis en el tejido adiposo visceral, probablemente llevado a cabo por la supresión de la proteína morfogenética ósea [Bone Morphogenetic Proteins (BMP)] y la señalización mediada por galanina, péptido orexígeno producido por neuronas situadas en área lateral del hipotálamo, implicado en la regulación del apetito y muestra cierta selectividad para demandar el consumo de grasa (**Figura V.3 A**); y también por la atenuación de la producción de citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo visceral

debido a la inhibición de los receptores tipo Toll 2 (TLR2) y la señalización mediada por TLR4 (Figura V.3 B) (Cho y col. , 2012).



**Figura V.3.:** Representación esquemática de la regulación de los genes BMP, FGF-1 y vías de señalización mediada por galanina (A) y de la vía de señalización mediada por TLR2 y 4 regulados por carvacrol (B).

Por otra parte, la actividad antiinflamatoria de carvacrol ha sido evidenciada en numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Botelho y col., 2009; Landa y col., 2009; Hotta y col., 2010).

De hecho, se ha descrito su capacidad para inhibir la expresión de la enzima ciclooxigenasa (COX-2), que desempeña un papel clave en los procesos de inflamación, dolor y homeostasis circulatoria, estimulando además los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)  $\alpha$  y  $\gamma$  (Hotta y col., 2010), implicados en la regulación de los procesos de homeostasis energética, metabolismo de lípidos y carbohidratos, proliferación celular e inflamación (Yessoufou y Wahli, 2010).

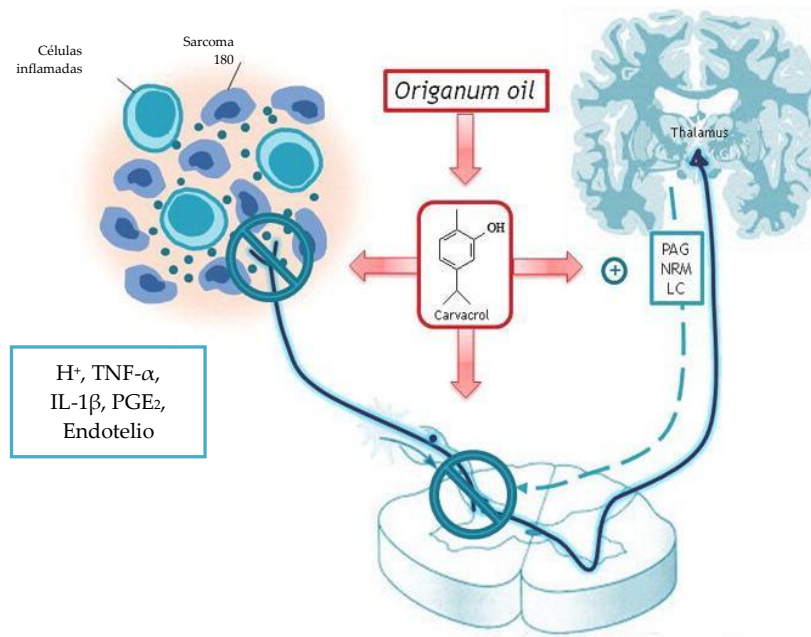
Además, en un estudio realizado en macrófagos peritoneales murinos estimulados por LPS se comprobó que la producción y el efecto del óxido nitroso (NO) es inhibido por carvacrol, probablemente debido a su capacidad del mismo para activar a PPAR, que implica la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y, por ende, la disminución de los niveles de iNOS.

En otro estudio llevado a cabo por Da Silva y col. (2013) se confirmó que carvacrol tenía actividad antiinflamatoria, ya que concentraciones de carvacrol de 100 mg/kg suministrado con la dieta, reducían la expresión de los mediadores de inflamación IL-1 $\beta$  y prostanoideos (PGE<sub>2</sub>) e inducían la liberación de citoquina IL-10.

Además, se ha podido constatar mediante el estudio llevado a cabo por Milligan y col. (2012), que el efecto antiinflamatorio de carvacrol está directamente relacionado con su actividad antinociceptiva y analgésica, ya que actúa como mediador en la liberación de diversas citoquinas que intervienen en el control del dolor neuropático, como la IL-10. Diversos autores han demostrado que además carvacrol es capaz de modular la transmisión GABAérgica (Melo y col., 2010; Guimarães y col., 2014). Todos estos efectos confirman que carvacrol puede contribuir a una disminución de la estimulación de las vías nociceptivas, facilitando de esta forma el control del dolor (**Figura V.4**).

Por otro lado, se ha evidenciado que la propiedad analgésica de carvacrol debida a la inhibición de los mediadores periféricos (prostaglandinas), así como los mediadores centrales (receptores no opioides), podría estar relacionada con su

marcado carácter antioxidante, ya que en un estudio realizado *in vivo* con un modelo noniceptivo de ratones, se comprobó que carvacrol aliviaba el dolor contra el retorcimiento y el estiramiento provocado por el ácido acético y la fase inflamatoria inducida por la formalina (Guimaraes y col., 2010).



**Figura V.4.:** Representación esquemática del mecanismo de control del dolor por carvacrol.

En cuanto a su efecto hepatoprotector, también parece estar asociado a la capacidad antioxidante de carvacrol.

En un estudio llevado a cabo por Aristatile y col., (2009) en ratas albinas Wistar, a las que se les indujo hepatotoxicidad y daño oxidativo mediante D-galactosamina (D-GalN), observaron un aumento en las actividades de ciertas enzimas: aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa y de los marcadores de la oxidación lipídica como son los hidroperóxidos lipídicos. Además, D-GalN ocasionó la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) tanto en plasma, como en eritrocitos, en hígado y en riñón.



Tras administrar a las ratas carvacrol por vía oral durante 21 días, evidenciaron que todos los niveles de los marcadores mencionados anteriormente volvieron a la normalidad. Estos resultados sugieren que carvacrol ejerce efecto hepatoprotector y antioxidante.

Su potencial antioxidante está siendo evaluado por diversos grupos de investigación y se ha descrito que es capaz de inhibir la actividad de la 3-Nitrotirosina, y la formación de malondialdehído. Además, se le considera un excelente captador de radicales libres y un agente anti-lipidoperoxidativo (Silva y col., 2012; Beena y Rawat, 2013). Por ello se postula que su poder antioxidante se debe a su carácter de ácido débil, ya que al reaccionar con un radical libre, dona su H con un electrón no apareado, formando carvacrol un radical estable (secuestra al radical), deslocalizándolo por resonancia, impidiendo así que siga actuando (Lima y Cardoso, 2013).

Por lo que respecta a la citotoxicidad, ésta se incrementa por la presencia de carvacrol, ya que es capaz de aumentar la concentración de  $Ca^{+2}$  e induce la producción de especies reactivas de oxígeno en células Caco-2 y OC2 (cáncer oral humano), lo que lleva a postular que carvacrol podría tener efecto anticancerígeno (Dušan y col., 2006; Llana-Ruiz-Cabello y col., 2015). Diferentes estudios demuestran la actividad proapoptótica de carvacrol en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, en la línea celular Caco-2 de cáncer de colon y en el glioblastoma humano (Koparal y Zeytinoglu, 2003; Dušan y col., 2006; Liang y Lu, 2012; Llana-Ruiz-Cabello y col., 2015).

De hecho, en un estudio *in vivo* llevado a cabo por Jayakumar y col. (2012), en el que se indujo cáncer de hígado en ratas albinas Wistar mediante la administración de dimetilnitrosamina, se comprobó que carvacrol suministrado en una dosis de 15 mg/kg producía una disminución del efecto provocado por la dimetilnitrosamina, debido a su gran capacidad de captar radicales libres, pudiendo prevenir la peroxidación lipídica y el daño en las células hepáticas.

Además, en otro estudio realizado *in vitro* se examinan los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de carvacrol en la línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2, demostrando su capacidad para inhibir el crecimiento celular de HepG2, mediante la inducción de la apoptosis a través de

la activación de la caspasa-3, la escisión de PARP y la disminución de la expresión génica de Bcl-2 (Yin y col., 2012).

Hay que tener en cuenta que cuando las células cancerígenas pasan al torrente sanguíneo, las plaquetas interaccionan con ellas formando pequeños trombos, donde el tumor queda en el centro y las plaquetas forman una pared externa. Esta acción puede ser controlada por la capacidad antioxidante de carvacrol, ya que puede inhibir a la enzima ciclooxigenasa mostrando un efecto de antiagregación plaquetaria (Karkabounas y col., 2006).

Se ha descrito que al catalizar la hidrólisis de hialuronato, un constituyente de la matriz extracelular (ECM), la hialuronidasa reduce la viscosidad del hialuronato, incrementándose así la permeabilidad del tejido. La ruptura de la ECM está relacionada con el estrés oxidativo, la degradación de proteínas como el colágeno y la elastina, y la hidrólisis catalizada por hialuronidasa de ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos.

El sistema ácido hialuronano/hialuronidasa participa también en muchas condiciones fisiopatológicas y la progresión del cáncer. Se postula por ello que la hialuronidasa degrada la ECM alrededor de los tumores y ayuda a las células cancerígenas a escapar de la masa del tumor primario.

Así, se ha demostrado que el polisacárido hialuronano es un ejemplo de componente de la ECM en el microentorno cancerígeno que promueve la progresión del cáncer de mama de dos formas: i) en primer lugar por su sobreproducción en células tumorales, que se sirven del mismo para protegerse frente a los ataques de los agentes quimioterápicos y los ROS/RNS del sistema inmune, y ii) en segundo lugar, por la función de los fragmentos del mismo una vez degradado por los radicales libres o la hialuronidasa.

Los fragmentos de la degradación de hialuronano, liberados al medio por la acción de los ROS/RNS y hialuronidasa, son pro-inflamatorios y activan señalizaciones celulares que inducen la supervivencia, migración, vascularización e invasión de las células tumorales.

En este sentido, las sustancias como carvacrol que limiten la producción aberrante de hialuronano, su fragmentación o que bloqueen las interacciones con

sus receptores, serían muy prometedoras para el avance en el desarrollo de nuevas terapias para pacientes oncológicos.

En efecto, numerosos autores han evidenciado que carvacrol es capaz de inducir la fragmentación del ADN, la activación de la síntesis de las caspasas 3, 6 o 9, y provocar la apoptosis en el cáncer de mama y reducir su crecimiento (Arunasree, 2010; Yin y col. 2012; Al-Fatlawi y col., 2014). Así pues, se llegó a la conclusión de que carvacrol tiene un papel importante en el tratamiento contra el cáncer (Mehdi y col., 2011).

Con respecto a su actividad antiviral, carvacrol podría ser efectivo frente a rotavirus y norovirus murino-1 (Pilau y col., 2011). En un estudio llevado a cabo por Gilling y col. (2014), se demostró la capacidad de carvacrol a una concentración menor del 0,5%, para inhibir el crecimiento del norovirus murino (MNV), tras una hora de exposición, debido a su acción directa sobre la cápsida viral provocando la pérdida de la integridad de la célula. Además, en otro estudio realizado en lechugas con virus entéricos, aplicando carvacrol a una concentración de 0,5% se observó la inhibición de calcivirus felino; inhibiendo también al virus de la hepatitis A al duplicar la concentración de monoterpeno (1%).

En este sentido, se aconseja la evaluación de carvacrol como posible desinfectante natural ya que es capaz de reducir considerablemente la carga de virus entéricos en lechuga tras una hora de exposición, utilizando un 1% de este compuesto natural, aconsejando su empleo para controlar la contaminación viral en la industria de las verduras frescas (Aznar y Sánchez, 2015).

En resumen, los numerosos efectos beneficiosos para la salud atribuidos a carvacrol, hacen que el empleo de este compuesto natural resulte interesante en diferentes sectores como la medicina, farmacia, agricultura o alimentación. Generalmente, está presente en la alimentación humana en bajas concentraciones como ingrediente aromatizante. Sin embargo, su potencial utilidad en aplicaciones clínicas requiere una dosis superior a la utilizada en la industria alimentaria (Suntres y col., 2015).

Pero para poder aumentar su dosis, debemos solventar ciertos inconvenientes asociados a sus propiedades físico-químicas, como la baja

solubilidad en agua, su fuerte sabor e inestabilidad frente a diferentes factores ambientales como oxígeno, luz y temperatura.

Así, entre las diferentes alternativas disponibles, en este capítulo se plantea el empleo de CDs como agentes complejantes de carvacrol, con el fin de aumentar su solubilidad y protegerlo al mismo tiempo frente a la oxidación o pérdidas por volatilidad, haciéndolo en consecuencia más estable.

## 1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.2.1. Cálculo de $K_c$

Al incluirse en el interior de la cavidad de las CDs, las moléculas de carvacrol modifican ciertas propiedades físico-químicas. El complejo formado puede disociarse bajo ciertas condiciones, haciendo que la molécula complejada recupere sus propiedades iniciales. Esta propiedad moduladora de las CDs, gobernada por una constante de equilibrio ( $K_c$ ), le confiere numerosas aplicaciones.

En primer lugar, se calcularon los valores de  $K_c$  entre carvacrol y diferentes tipos de CDs nativas y modificadas, a diferentes valores de pH, usando el método de solubilidad; con el fin de comparar los valores obtenidos y determinar que CD alberga mayor cantidad de carvacrol en su interior, y como se modifica el equilibrio en función del pH, factor a tener en cuenta para el posible empleo de los complejos en formulaciones aplicables en diferentes sectores.

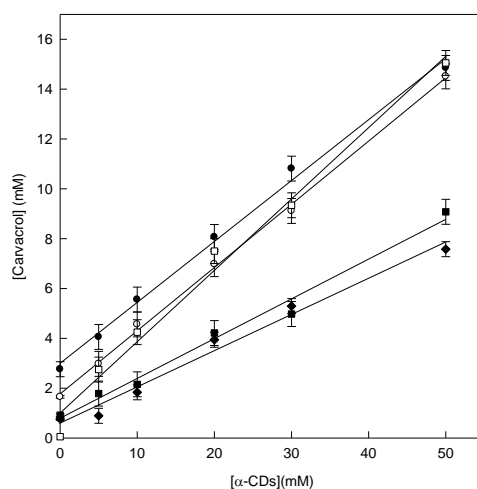
Puesto que la finalidad última se dirige a una posible aplicación industrial, se tomará como criterio de selección el valor de  $K_c$ , seleccionando como óptima aquella CD que sea capaz de complejar mayor concentración de carvacrol.

#### 1.2.1.1. Estudio de formación de complejos de inclusión a diferentes pHs

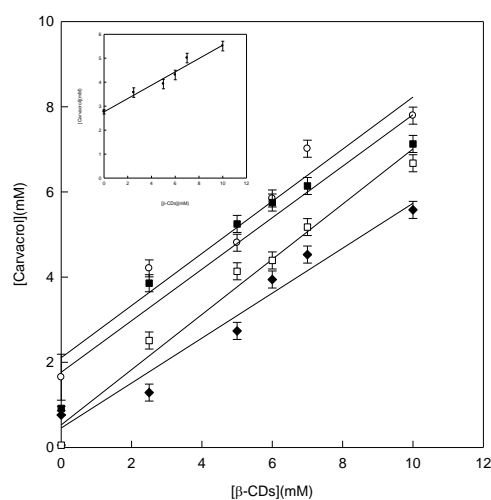
Se utilizó el método de solubilidad para calcular el valor de  $K_c$  entre carvacrol y los distintos tipos de CDs, utilizando el método descrito por Higuchi y Connors, en 1965.

El diagrama de fases de carvacrol se realizó a diferentes valores de pH (3,5; 5,5; 6,5; 7,0 y 8,5) con  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y HP- $\beta$ - CDs, con el fin de comparar los valores de  $K_c$ .

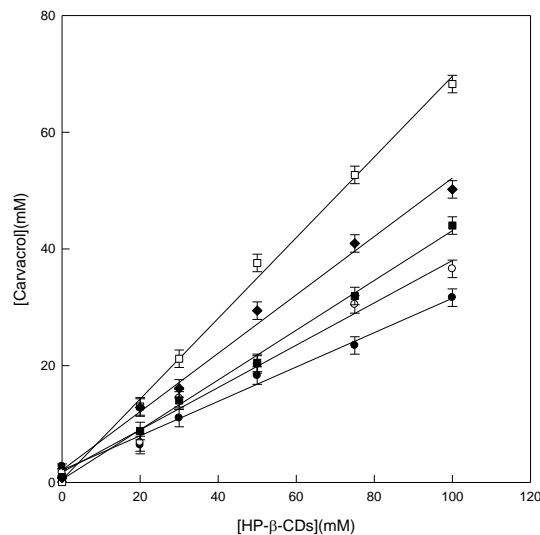
Para ello, se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de  $\alpha$ ,  $\beta$ - y HP- $\beta$ -CDs, y se saturaron con carvacrol (**Figuras V. 5-7**). Estas disoluciones se mantuvieron en un baño de ultrasonidos, a 25 °C hasta que se alcanzó el equilibrio, y se cuantificó la concentración de carvacrol soluble en cada caso, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**).



**Figura V.5.:** Diagrama de fases de carvacrol con  $\alpha$ -CDs a pH 3,5 (●), pH 5,5 (○), pH 6,5 (■), pH 7,0 (□), y pH 8,5 (◆) a 25 °C.



**Figura V.6.:** Diagrama de fases de carvacrol con  $\beta$ -CDs a pH 5,5 (○), pH 6,5 (■), pH 7,0 (□) y pH 8,5 (◆) a 25 °C. Insertada pH 3,5 (●) a 25 °C.



**Figura V.7.:** Diagrama de fases de carvacrol con HP- $\beta$ -CDs a pH 3,5 (●), pH 5,5 (○), pH 6,5 (■), pH 7,0 (□), y pH 8,5 (◆), a 25 °C.

Como podemos observar, el diagrama de fases de carvacrol mostró una tendencia lineal para los 3 tipos de CDs, ya que conforme aumenta la concentración de CDs, también aumenta la concentración de carvacrol (Tipo A<sub>L</sub>), indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados fue 1:1 en todos los casos.

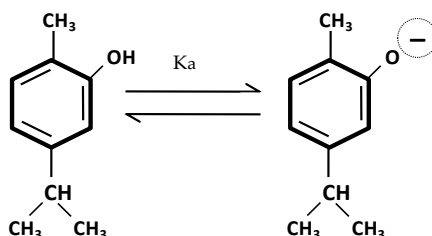
**Tabla V.1.:** Constantes de complejación ( $K_c$ ) entre carvacrol y distintos tipos de CDs a diferentes pH, calculados mediante el método de solubilidad.

pH	$\alpha$ -CDs $K_c \text{ M}^{-1}$	$\beta$ -CDs $K_c \text{ M}^{-1}$	HP- $\beta$ -CDs $K_c \text{ M}^{-1}$
pH 3,5	108 ± 16	140 ± 21	198 ± 19
pH 5,5	192 ± 24	748 ± 19	327 ± 37
pH 6,5	239 ± 42	866 ± 180	1521 ± 73
pH 7,0	400 ± 56	3466 ± 115	5042 ± 176
pH 8,5	284 ± 37	580 ± 45	973 ± 94

Como se observa en la **Tabla V.1** los valores de  $K_c$  obtenidos mediante el método de solubilidad aumentan conforme el pH se acerca a la neutralidad (7,0), este hecho es debido a que la solubilidad ( $S_0$ ) de carvacrol varía según el pH del medio (**Tabla V.2**). De hecho, se disuelve mejor a pH ácido ( $S_0 = 2,76$ ) que a un valor de pH 7,0 disminuyendo su solubilidad en un 80%. Sin embargo, a pH básico (8,5) vuelve a subir hasta 0,76 alcanzando una solubilidad cercana a la obtenida a pH 6,5 ( $S_0 = 0,92$ ).

Al igual que ocurre con timol, carvacrol también presenta una estructura aromática que condiciona su actividad, comportándose como un ácido débil ( $pK_a = 10,38$ ), dependiente del pH del medio su grado de disociación, y por tanto su solubilidad (**Figura V.8**).

En disolución acuosa a pH básico, entra en contacto con los hidróxidos alcalinos, y al ser más ácido que el agua, reacciona con ellos formando sales o iones fenóxido, más estables que el propio carvacrol debido a la deslocalización de la carga negativa por el anillo aromático.



**Figura V.8.:** *Equilibrio de disociación de carvacrol.*

Al incluirse carvacrol en el interior de la CD determina un aumento de la entropía del sistema por reducción de la energía libre, lo que provoca un aumento de la estabilidad del complejo.

Hay que tener en cuenta que los factores que intervienen en la formación de los complejos son el tamaño de las CD y de la molécula complejada y la polaridad de ésta.

Por tanto, la protonación de carvacrol y por ende su solubilidad, será determinante en la estabilidad de los complejos. De hecho, en este estudio se ha comprobado que para los tres tipos de CDs ensayadas, se observa un gran aumento en la estabilidad de los complejos obtenidos a pH 7,0; la cual es significativamente distinta a la alcanzada por los complejos formados por su ión fenóxido, que al ser más soluble que su forma no disociada, está menos favorecida su inclusión en el interior de las CDs.

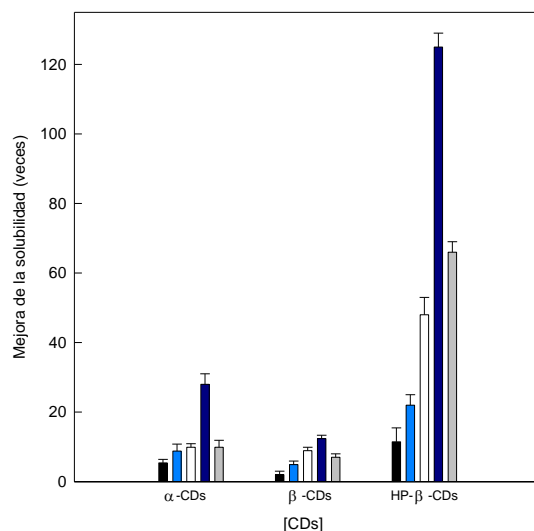
Otro factor que afecta al valor de  $K_c$ , es el tamaño de la cavidad de las CDs. Así, al evaluar el valor de las nativas (**Tabla V.1**) se observa que éste es mayor para  $\beta$ -CDs, con independencia del pH ensayado. Estas diferencias en el valor de la  $K_c$  de  $\alpha$ -CDs y  $\beta$ -CDs son debidas al tamaño de la cavidad de las CDs, siendo mayor la de  $\beta$ -CDs, por lo que se alcanza un valor de  $K_c$  8 veces superior al determinado con  $\alpha$ -CDs ( $400 \pm 56$ ).

Por tanto, el valor de la  $K_c$  entre  $\alpha$ -CDs y  $\beta$ -CDs queda explicado por las diferencias en el tamaño de la cavidad de las CDs, pero si comparamos  $\beta$ -CDs con su modificada HP- $\beta$ -CDs, se podría pensar que ambas deberían tener el mismo valor de  $K_c$  ( $3466 \pm 115$ ,  $5042 \pm 176$ , respectivamente), ya que tienen el mismo diámetro, pero no es así.

Una posible explicación de este hecho es que HP- $\beta$ -CDs forma un complejo más estable con carvacrol que el obtenido con su nativa, ya que los grupos hidroxipropil presentes en la modificada, rompen los puentes de H cerca de la cavidad de la CD, haciendo más accesible la entrada a las moléculas de carvacrol al cono apolar, provocando un aumento en la solubilidad de carvacrol. Además, hay que tener en cuenta que los grupos hidroxipropilo provocan la apertura de la cavidad de la ciclodextrina, modificando significativamente el tamaño con respecto a la nativa, favoreciendo así que la molécula de carvacrol entre completamente en la cavidad interna de la HP- $\beta$ -CDs, mientras que en  $\beta$ -CDs, sólo entra una parte de la molécula.

En resumen, la facilidad de introducción de carvacrol en las CDs dependerá del pH del medio, siendo mayor en el caso de HP- $\beta$ -CDs >  $\alpha$ -CDs >  $\beta$ -CDs a pH neutro (**Figura V.9**), factor a tener en cuenta a la hora de formar complejos de inclusión y determinar los valores de  $K_c$ .





**Figura V.9.:** Aumento de la solubilidad de carvacrol tras la formación de complejos de inclusión con  $\alpha$ -CDs (50 mM),  $\beta$ -CDs (13 mM) y Hp- $\beta$ -CDs (100 mM) a pH 3,5 (barras negras), pH 5,5 (barras azul claro), pH 6,5 (barras blancas), pH 7 (barras azul oscuro) y pH 8,5 (barras grises).

Cuando se llevan a cabo estudios de saturación de CDs, es importante calcular la eficacia de complejación (CE). Este factor tiene en cuenta, además de  $K_c$ , la solubilidad del compuesto encapsulado ( $S_0$ ) a diferentes valores de pH. Para los complejos con estequiometría 1:1, la CE puede calcularse a partir de la pendiente del diagrama de fases (**Ecuación III.12.**), ya que tiene en cuenta tanto la solubilidad de carvacrol como la  $K_c$ . El valor de CE obtenido para carvacrol con los diferentes tipos de CDs a distintos valores de pH se presenta en la **Tabla V.2.**

El producto de solubilidad varía según el pH del medio, tal y como se observa en la **Tabla V.2**, carvacrol puede convertirse de su forma neutra a su forma protonada, provocando una variación significativa en su solubilidad (**Figura V.8**), siendo las HP- $\beta$ -CDs las CDs que poseen una mayor eficacia de complejación a pH neutro.

**Tabla V.2.:** Eficacia de complejación (CE) entre carvacrol y distintos tipos de CDs a diferentes pHs.

pH	S <sub>0</sub> (mM)	CE α-CDs	CE β-CDs	CE HP-β-CDs
pH 3,5	2,76 ± 0,20	298± 56	386± 45	546± 61
pH 5,5	1,65 ± 0,16	317± 31	1234± 176	540± 29
pH 6,5	0,92 ± 0,11	220± 24	798± 89	1400± 101
pH 7,0	0,56 ± 0,03	216± 15	1871± 143	2722 ± 126
pH 8,5	0,76 ± 0,13	216 ± 61	441± 57	740± 81

### 1.2.2. Estudio de formación de complejos de inclusión con HP-β-CDs a diferentes métodos

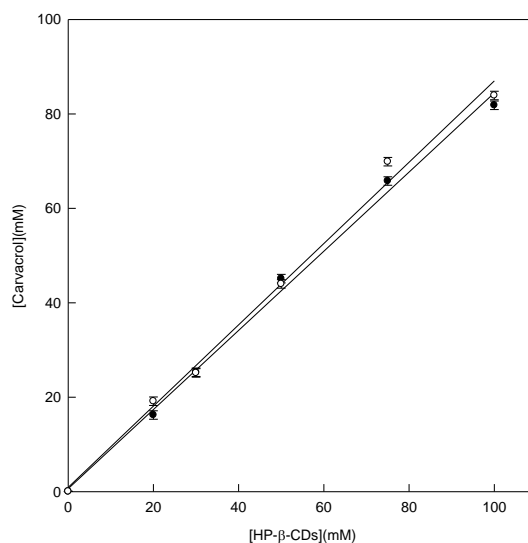
Una vez evidenciada la capacidad de HP-β-CDs para formar complejos con carvacrol y dada su mayor eficacia (CE) a pH neutro, se seleccionó para llevar a cabo la formación de complejos de inclusión a pH neutro, atomizando posteriormente las disoluciones en *Spray Dryer* para la obtención de complejos en estado sólido, ya que de esta manera se facilita su manejo y conservación (almacenamiento).

Los complejos se prepararon mediante dos métodos **i)** el MWI y, **ii)** el método de solubilidad, tal y como se describen en el apartado de materiales y métodos (**Capítulo III**).

En primer lugar, se llevó a cabo la formación de complejos de inclusión de carvacrol con HP-β-CDs mediante el método MWI, siguiendo el protocolo descrito por Hernández-Sánchez y col. (2016), con ligeras modificaciones. Para obtener el mayor rendimiento posible, se trabajó a concentraciones cercanas al límite de su solubilidad y a dos tiempos de contacto (24 y 48 horas).

Como se observa en la **Figura V.10**, la estequiometría de los complejos formados fue 1:1, ya que conforme aumenta la concentración de HP-β-CDs,

también lo hace la de carvacrol, obteniendo valores de constante ( $K_c$ ) ligeramente superiores con menor tiempo de contacto ( $8129 \pm 194$ , a las 24 horas), que los determinados tras alargar el proceso un día más ( $6811 \pm 107$ , a las 48 horas).



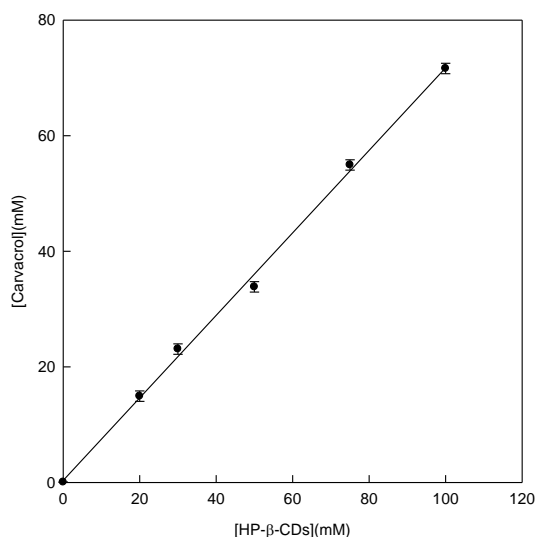
**Figura V.10.:** Método MWI con HP-β-CDs y Carvacrol a las 24 h (●), y a las 48 h (○).

Además, se evidenció un aumento de solubilidad de carvacrol tras la complejación independiente del tiempo de proceso, ya que se incrementó 151,8 y 155,6 veces a las 24 h y a las 48 h respectivamente, valores muy similares entre sí.

Así, para optimizar la formación de complejos de inclusión con carvacrol mediante este método, se seleccionó el producto obtenido a las 24 h, ya que un valor de  $K_c$  más alto asegura la formación de complejos más estables; además del consiguiente ahorro de energía y tiempo en la preparación de los complejos de inclusión (proceso más eco-eficiente), augurando una transferencia tecnológica más sencilla a la industria.

Para poder comparar ambos métodos (MWI y solubilidad), se realizaron los correspondientes diagramas de fases de carvacrol. Para ello se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de HP-β-CDs hasta una concentración de 100 mM, en un volumen total de 100 mL, tal y como se detalla

en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura V.11**.

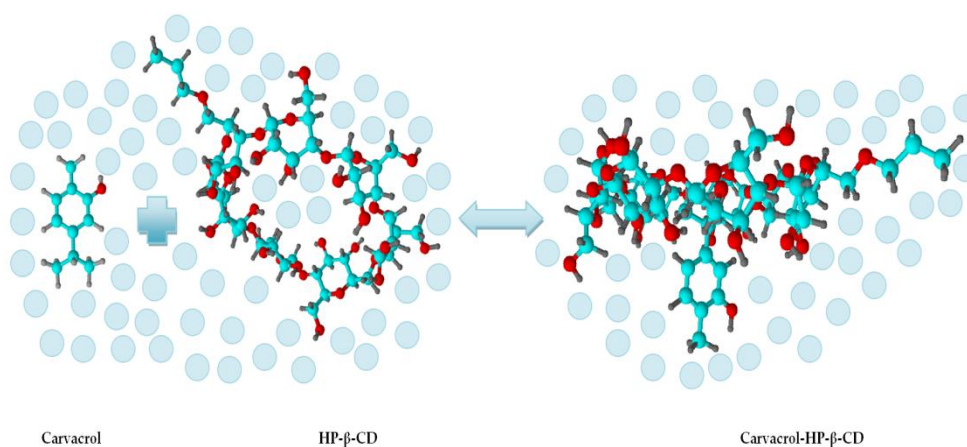


**Figura V.11.**: *Diagrama de Fases de HP-β-CDs con carvacrol.*

En este caso, el valor de  $K_c$  obtenido a pH neutro ( $6909 \pm 161 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) es mayor que en el estudio previo de formación de complejos de inclusión a diferentes pHs ( $5042 \pm 176$ ). Este aumento en el valor de la  $K_c$ , puede justificarse por el hecho de que carvacrol al ser una sustancia oleosa, tiene tendencia a asociarse consigo mismo en vez de interactuar con la CDs; pero al aumentar la cantidad de agua, conseguimos una mayor dispersión y separación de las moléculas de aceite, facilitando de esta forma su interacción con HP-β-CDs, dando lugar a un complejo más estable y por tanto, con mayor valor de  $K_c$  (Martin del Valle, 2004).

Si comparamos el aumento de la solubilidad de carvacrol mediante la preparación de complejos tanto por el método MWI como por el método de solubilidad, se comprueba que ésta es de 151,8 y 132,9 veces, respectivamente, por lo que se consigue mayor solubilidad de carvacrol por el método de MWI. Esto puede ser debido a que mediante el método MWI, las radiaciones microondas

estimulan la interacción de las moléculas de agua que presentan un momento dipolar, lo que les proporciona un incremento de energía, haciendo que estas moléculas choquen unas con otras; favoreciendo así el desplazamiento de las moléculas de agua del interior de la cavidad de la CDs, y la consiguiente entrada de carvacrol (Moneghini, Zingone, y De Zordi, 2009).



**Figura V.12.:** Formación de complejos de HP-β-CDs con carvacrol.

#### 1.2.2.1 Spray Dryer

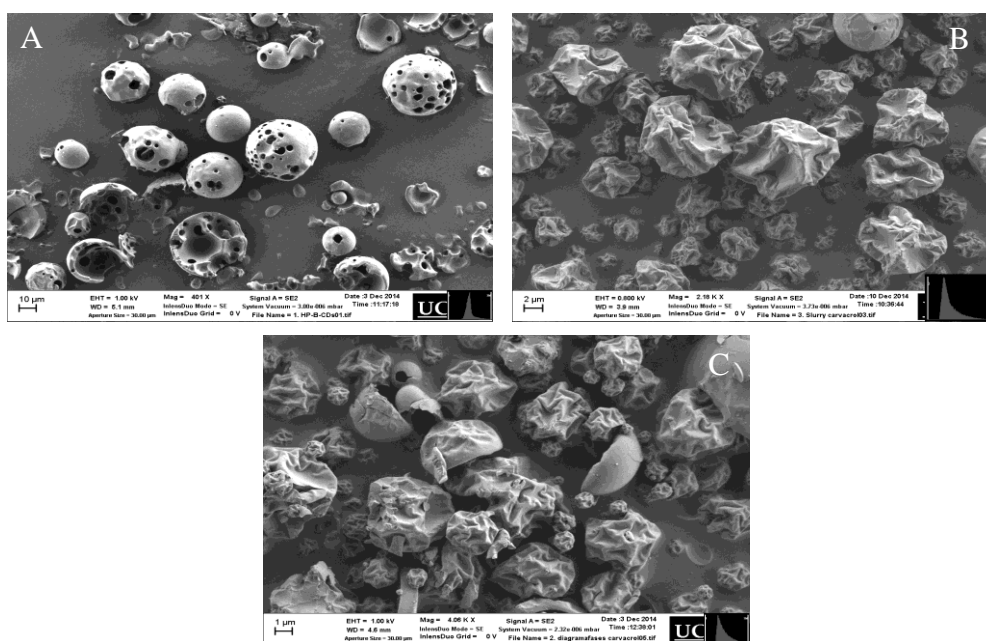
Los complejos solubles preparados con diferentes concentraciones de HP-β-CDs fueron secados por atomización para obtener los complejos en estado sólido (método descrito en el **Capítulo III**). Este método de secado es el más común y económicamente viable para la microencapsulación de ingredientes en forma de polvo para aplicaciones en alimentos (Carneiro y col., 2013; de Barros Fernandes y col., 2014).

Para llevar a cabo este estudio se comparó el rendimiento de complejación de carvacrol utilizando los dos métodos de preparación de complejos anteriormente descritos.

Según Dufour y col. (2015), la geometría de las partículas tras someterlas a un proceso de secado, se ve influenciada por el contenido de sólidos en la

disolución, y por tanto, del tiempo que tarda el soluto en alcanzar la superficie de la gota. Otros parámetros determinantes son la temperatura de entrada, la velocidad de pulverización y la boquilla de aire del equipo, que deben ajustarse adecuadamente pues afectan a la tasa de evaporación.

Tras el proceso de secado de los complejos formados, se obtuvieron micrografías (SEM), observando que las partículas del complejo formado por carvacrol- HP- $\beta$ -CD (**Figura V.13**) mostraban una geometría arrugada, debido a que la tasa de evaporación en la superficie de las gotitas, es más rápida que la velocidad a la que los componentes disueltos se difunden hacia el interior para formar una corteza alrededor de las gotitas (Vehring, 2008).



**Figura V.13.:** Micrografías de HP- $\beta$ -CDs (A), MWI (B), Método de solubilidad (C).

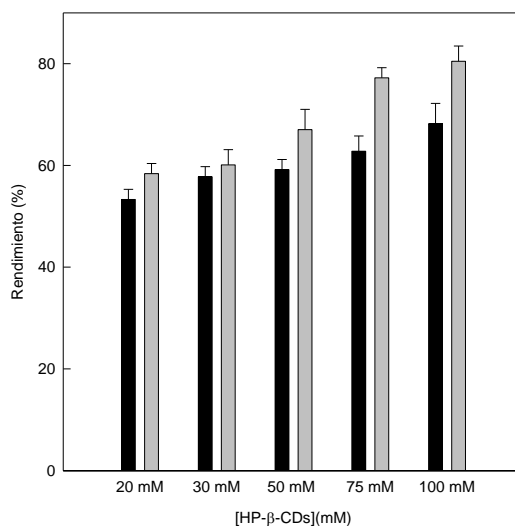
Como se puede apreciar en las micrografías B y C de la **Figura V.13**, las superficies externas muestran paredes continuas sin grietas, que influyen de manera significativa en la pérdida de compuestos volátiles. En la bibliografía se describen morfologías similares en la microencapsulación del té de montaña

(Nadeem, Torun y Özdemir, 2011), carbamazepina (Medarević y col., 2015) y en el aceite esencial de nuez y chia (Martínez y col., 2015), donde también aparecen micropartículas con morfología globular externa similar, como resultado de la rápida evaporación del agua durante el proceso de secado por atomización.

Posteriormente, se realizó el cálculo de rendimiento de secado utilizando la **Ecuación III.3.**, para el método MWI y para el método de solubilidad, sin tener en cuenta el polvo que queda en el interior del equipo al considerarse una cantidad despreciable.

Como se muestra en la **Figura V.14**, el rendimiento es mayor al 50% en todos los casos, por lo que se puede considerar que se obtiene un buen rendimiento para ambos métodos.

Es importante señalar que conforme aumenta la concentración de HP- $\beta$ -CDs se obtiene un mayor rendimiento, tanto para el método de MWI como para el método de solubilidad, alcanzando el rendimiento máximo a una concentración de 100 mM por el método de solubilidad (80,48%).



**Figura V.14.:** Rendimiento de secado por spray-drying con HP- $\beta$ -CDs y carvacrol; método MWI (barras negras) y método de solubilidad (barras grises).

La diferencia observada entre ambos métodos, puede ser debida a que a una misma concentración de CDs, tendremos mayor cantidad de carvacrol en disolución en el método de MWI que en el método de solubilidad; esto conlleva que haya una mayor cantidad de sólidos en la mezcla y que en consecuencia, aumente la viscosidad de la disolución (de Barros Fernández, 2014), provocando que estén disponibles para entrar en contacto con la pared de la cámara, pudiéndose pegar a ella, disminuyendo en definitiva el rendimiento del proceso (Tonon y col., 2008). Además, hay que tener en cuenta que las cantidades que se introducen en el equipo son pequeñas (un volumen total de 100 mL), y se pueden producir pérdidas, ya que a escala de laboratorio es difícil alcanzar rendimientos mayores al 80 % (Arpagaus y Schafroth, 2009).

Es interesante destacar que se escogió el procedimiento de secado por *Spray Dryer* para poder escalarlo a nivel industrial, ya que es un proceso rápido y efectivo y además, se ha evidenciado que al aumentar el volumen de secado, se incrementa el rendimiento del mismo, como ocurre en el estudio llevado a cabo por Eguinoa (2014), atomizando eugenol complejado con  $\beta$ -CDs.

Para poder determinar la posible pérdida de carvacrol debido al tratamiento de secado, se analizaron veinte muestras de los complejos formados, diez alícuotas antes y otras diez tras pasar por el *Spray Dryer*, determinando la concentración de carvacrol mediante GC-MS, aplicando el procedimiento descrito en materiales y métodos (**Capítulo III**).

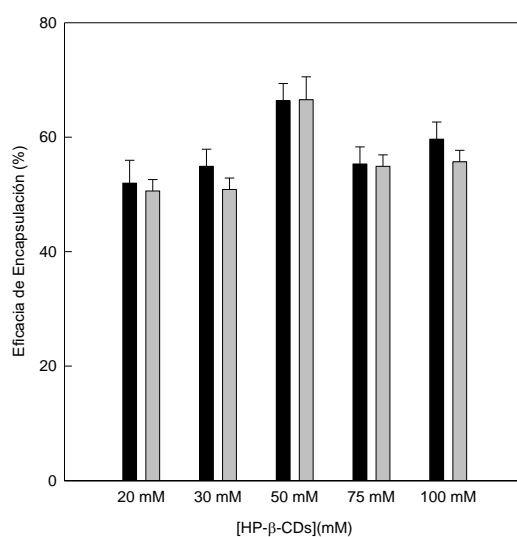
A partir de la concentración de carvacrol obtenida por los diferentes métodos empleados tras la atomización (**Figura V.15**), se determinó la eficacia de encapsulación **Ecuación III.4**, con respecto a la cantidad teórica de carvacrol presente en la disolución antes de atomizar, en cada caso.

Al comparar la eficacia de encapsulación de ambos métodos, ésta siempre es ligeramente superior para el método de MWI, ya que se mueve en un rango de 51,96 a 66,37 g/100 g; sin embargo, para el método de solubilidad es de 50,86 a 66,55 g/100 g.

Una posible explicación a estos hechos se debe a que en el MWI las CDs alcanzan un estado instantáneo de resonancia, favoreciendo de esta forma la salida de las moléculas de agua de su interior y la inclusión de carvacrol (Bergese y col., 2003).



Para corroborar los resultados obtenidos en la EE se calculó la carga de materia activa (CMA) de carvacrol según la **Ecuación III.5**, que relaciona la cantidad de materia activa encapsulada con los gramos de polvo obtenidos mediante el *Spray Dryer*.



**Figura V.15.:** Eficacia de encapsulación de carvacrol con HP-β-CDs, método de MWI (barras negras) y método de solubilidad (barras grises).

Como se puede ver en la **Tabla V.3** al igual que ocurre con la EE, los mayores valores se obtienen para el método MWI, ya que en este caso se mueve en un rango de 4,33 a 6,48 g/100 g, reduciéndose a la mitad por el método de solubilidad ya que oscila entre 2,90 a 3,64 g/100 g. Estos resultados indican que la cantidad de complejos de inclusión formados por el método MWI fueron superiores a los obtenidos por el método de solubilidad, resultados similares a los obtenidos previamente por Tao y col., 2014, para carvacrol encapsulado en β-CDs.

Llegados a este punto, hay que tener en cuenta que un mayor rendimiento de secado no implica una mayor cantidad de complejos de inclusión en el polvo

obtenido, ya que pueden estar presentes complejos de inclusión activos y CDs vacías. Por tanto, con el fin de establecer la validez del método se calculó la Kc

disolviendo el polvo en agua destilada, en una proporción 1:1 (p:v) para que los complejos estuvieran completamente disueltos

**Tabla V.3.:** Eficacia de encapsulación (EE) y carga de materia activa (CMA).

HP- $\beta$ -CDs	MWI		Solubilidad	
	EE (g/100 g)	CMA (g/100 g)	EE (g/100 g)	CMA (g/100 g)
<b>20 mM</b>	51,96 $\pm$ 5	4,97 $\pm$ 0,04	50,60 $\pm$ 4	3,06 $\pm$ 0,04
<b>30 mM</b>	54,90 $\pm$ 3	4,33 $\pm$ 0,05	50,86 $\pm$ 3	3,29 $\pm$ 0,05
<b>50 mM</b>	66,37 $\pm$ 3	6,48 $\pm$ 0,07	64,55 $\pm$ 3	3,64 $\pm$ 0,08
<b>75 mM</b>	55,31 $\pm$ 3	5,27 $\pm$ 0,08	54,50 $\pm$ 4	3,35 $\pm$ 0,03
<b>100 mM</b>	59,65 $\pm$ 3	4,34 $\pm$ 0,04	55,71 $\pm$ 2	2,90 $\pm$ 0,06

Para este ensayo, los valores de  $K_c$  obtenidos fueron  $4698 \pm 134$  para el método MWI y  $4015 \pm 118$  para el método de solubilidad, corroborando de esta forma los resultados previos (mayor valor de  $K_c$ , EE y CMA por MWI). Por lo tanto, se considera el método de MWI el más idóneo para la formación de complejos de inclusión de carvacrol con HP- $\beta$ -CDs.

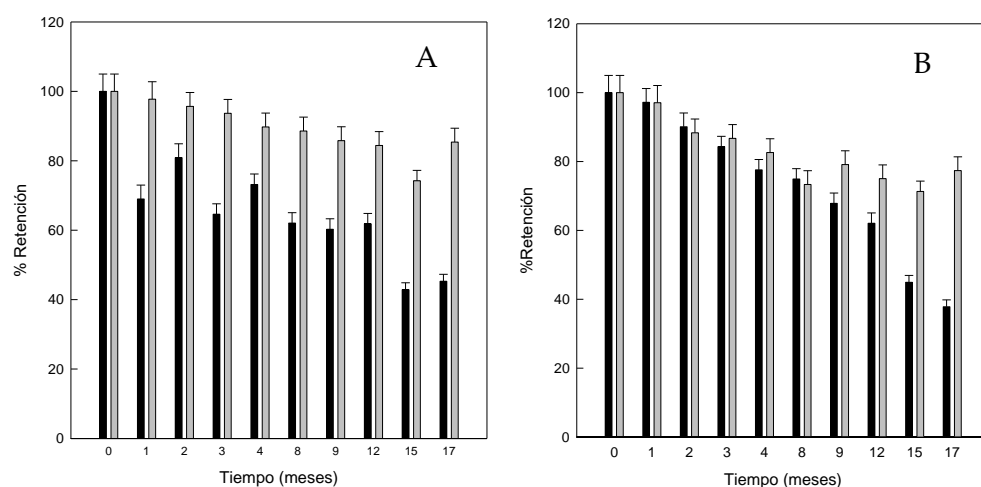
Una vez seleccionado el método óptimo para la preparación de los complejos de inclusión de carvacrol, se llevó a cabo un ensayo de estabilidad de los atomizados por MWI, ya que para que el uso de los monoterpenos encapsulados sea rentable para la industria alimentaria, es necesario que soporten periodos de almacenamiento largos antes de ser utilizados, por ello no solo es importante determinar la cantidad del compuesto en el momento inicial, sino también la cantidad retenida en función del tiempo.

Las variables a tener en cuenta para determinar la estabilidad del polvo obtenido por *Spray Dryer* son la humedad y la actividad de agua; por ello, según se describe en la bibliografía, para conseguir un polvo con el menor contenido de humedad se seleccionó una temperatura de entrada de 180 °C y una velocidad de la bomba de 0,8 L min<sup>-1</sup>, ya que estos parámetros contribuyen a la conservación

del polvo durante su almacenamiento y previenen cambios en sus características físicas y químicas (Alvarenga y col., 2012).

Para poder conocer la estabilidad de los complejos sólidos durante el almacenamiento se prepararon 100 muestras (50 por el método MWI y otras 50 por el método de solubilidad), con una concentración de 50 mM HP- $\beta$ -CDs. Las muestras se almacenaron durante 17 meses en recipientes de plástico cerrados, y se conservaron 25 muestras a una temperatura de 25 °C y otras 25 muestras a 8 °C (Capítulo III).

Como se observa en la **Figura IV.16.A**, el polvo obtenido mediante el método MWI tras 17 meses de almacenamiento, revela un porcentaje de carvacrol encapsulado mayor a temperatura de 8 °C, con un rango de 100 – 74 %, mientras que a 25 °C es de 100 – 45%; comportamiento similar al observado por el método de solubilidad, encontrando para ambas temperaturas ensayadas, una retención inferior (en torno al 5%) a la obtenida por MWI, al final del estudio.



**Figura V.16.** Estabilidad de los complejos sólidos durante su almacenaje. (A) MWI a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises), (B) método de solubilidad a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises).

Durante el almacenamiento el porcentaje de retención de carvacrol se puede ver afectado tanto por la temperatura como por la humedad. Así, observamos que a 25 °C y una humedad relativa (HR) del 50%, se produjo una liberación del 30%

de carvacrol tras un mes de almacenamiento en MWI, mientras que el descenso es menos brusco por el método de solubilidad, alcanzando ese valor tras un año de almacenamiento. En cambio, a 8 °C y una HR del 19%, se mantuvo en su interior por más tiempo (MWI), observando a esta temperatura pautas de liberación similares por ambos procedimientos. Como se ha descrito previamente, las HP- $\beta$ -CDs presenta mayor afinidad por las moléculas de agua conforme aumenta la HR debido a la cantidad de grupos hidroxilos que presenta en su superficie, lo que posibilita la liberación del compuesto complejado (dos Santos, Buera y Mazzobre, 2012).

Recapitulando, los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad, apoyan el empleo del método MWI en la preparación de los complejos sólidos de carvacrol-HP- $\beta$ -CDs, con un tiempo de contacto de 24 h, ya que además de alcanzar mayor eficacia en el proceso, conlleva otras ventajas tecnológicas y económicas de gran interés para la industria alimentaria, como el escalado del proceso a nivel industrial, reducción de costes (ahorro energético y mano de obra), además, permite un calentamiento rápido de la reacción sin sobrecalentar la superficie de contacto, agilizando la cinética del proceso. Estos resultados coinciden con los descritos previamente por Mohitm y col. (2010), tras complejar cefdinir con  $\beta$ -CDs mediante MWI y posterior atomización, concluyendo que la utilización de MWI mejora sobremanera, la disolución de los complejos formados.

#### 1.2.2.2 RMN

La efectividad de la formación de complejos de inclusión de carvacrol-HP- $\beta$ -CDs se evaluó a través del RMN, ya que ofrece la evidencia más directa de la inclusión de la molécula huésped en el interior de la CD (Hamdi, Abderrahim y Meganem, 2010). Mediante esta técnica se ha podido estudiar el modo de interacción de la HP- $\beta$ -CDs con diferentes compuestos, ya que si una molécula huésped se incorpora en la cavidad de la HP- $\beta$ -CDs, las constantes de acoplamiento de los protones en el interior de la cavidad de la HP- $\beta$ -CDs (H3 y H5) sufren una modificación; sin embargo, los protones de la zona externa de la CDs no se verán afectados (Yuan, Jin y Xu, 2012).

Así, los resultados obtenidos tras someter los complejos a <sup>1</sup>H-RMN corroboraron que la estequiometría es 1:1.

En la **Tabla V.4** se muestran los valores de desplazamiento químico de carvacrol y HP- $\beta$ -CD tanto en su estado libre, como complejado en solución de metanol-D<sub>4</sub>, así como las diferencias entre las señales de las moléculas libres y complejadas.

El cambio que se produce en los desplazamientos químicos de la molécula libre con respecto a la complejada, verifican la formación del complejo de inclusión.

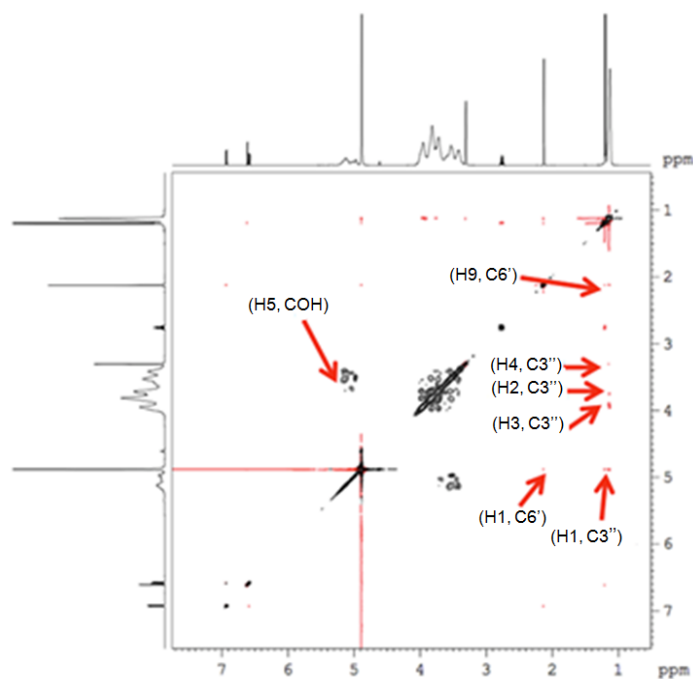
**Tabla V.4.:** Desplazamiento químico de carvacrol y HP- $\beta$ -CD tanto en su forma libre como complejada en metanol-d<sub>4</sub>.

	H-Atom	$\delta$ /ppm	$\delta$ /ppm	$\Delta\delta$ (Complejo - Libre)/ppm
		(Libre)	(Complejo)	
Carvacrol	H-C (3)	6,566	6,577	-0,011
	H-C (4)	6,619	6,611	0,008
	H-C (6)	6,917	6,929	-0,012
	H-C (2')	2,740	2,758	-0,018
	H-C (5')	2,126	2,124	0,002
	H-C (2'')	1,176	1,195	-0,019
HP- $\beta$ -CD	H-C (1)	5,074	5,121	-0,047
	H-C (2)	3,723	3,730	-0,007
	H-C (3)	3,947	3,952	-0,005
	H-C (4)	3,418	3,417	0,001
	H-C (5)	3,534	3,533	0,001
	H-C (6)	3,821	3,815	0,006
	H-C (9)	1,126	1,125	0,001

Además de determinar los desplazamientos químicos, se llevó a cabo un estudio mediante espectroscopía de RMN bidimensional (2D), ya que proporciona información importante sobre la proximidad espacial entre el anfitrión (HP- $\beta$ -CD) y la molécula huésped (carvacrol en este caso), a través de la observación de las correlaciones cruzadas.

Esta técnica se basa en la existencia de un efecto muy importante para la determinación de estructuras mediante RMN, el llamado efecto Overhauser (NOE), que se origina por la interacción entre dos protones próximos en el espacio, pudiendo observar la interacción en los espectros NOESY o ROESY.

Para poder interpretar estos espectros, consideraremos que la presencia de picos cruzados (tabla de doble entrada **Figura V.17**), entre los protones de dos especies en el espectro NOE, confirma la existencia de un contacto espacial a 0,4 nm. Así, para obtener más información conformacional sobre el compuesto obtenido, se obtuvo el 2D ROESY del complejo de inclusión de carvacrol, que se muestra en la **Figura V.17**.



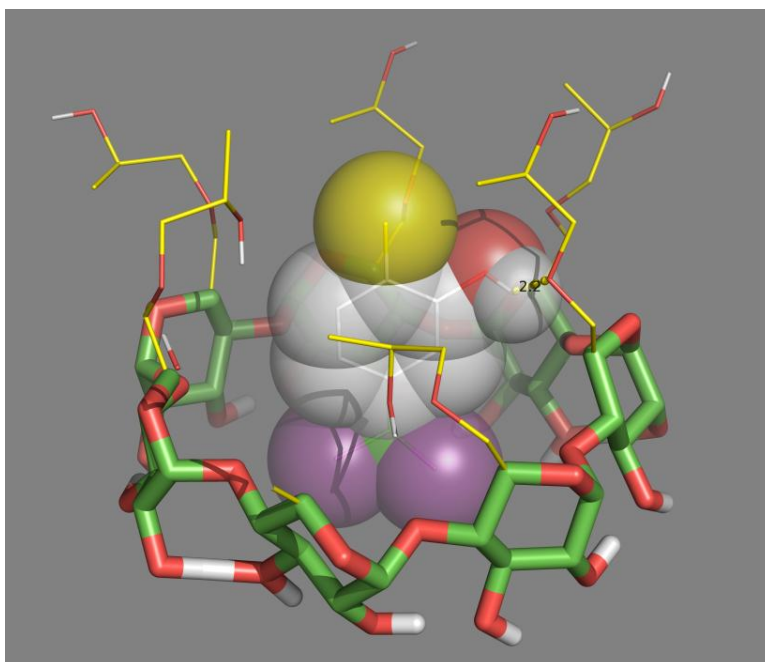
**Figura V.17.:** Espectro ROESY del complejo carvacrol-HP- $\beta$ -CDs en metanol- $d_4$ .

Como podemos observar, el complejo carvacrol-HP- $\beta$ -CDs presenta una correlación (proximidad espacial) apreciable, del protón -OH de carvacrol con los protones H-5 de HP- $\beta$ -CD. Interacciones similares se observan entre el protón C3 de carvacrol y los protones H-1, H-2, H-3 y H-4 de HP- $\beta$ -CDs, y también entre el

protón T6 de carvacrol con los protones H-1 y H-9 de HP- $\beta$ -CDs. Estos resultados confirman que carvacrol se incluyó en la cavidad de HP- $\beta$ -CD.

### 1.2.2.3 Acoplamiento molecular (*Docking*)

Con el propósito de dar una explicación plausible a la interacción entre HP- $\beta$ -CD y carvacrol una vez complejados, se realizaron simulaciones tridimensionales de acoplamiento molecular (*Docking*). La información estructural acerca de la unión de carvacrol y HP- $\beta$ -CD obtenido por el acoplamiento molecular se muestra en la **Figura V.18**. En ella podemos ver que carvacrol se une fuertemente a la cavidad interna de HP- $\beta$ -CDs.



**Figura V.18.:** Simulación para la formación del complejo de carvacrol con HP- $\beta$ -CDs.

Los hidrógenos C3' del grupo isopropilo de carvacrol (esferas color violeta), interaccionan con los átomos de hidrógeno H1, H2, H3 y H4 de HP- $\beta$ -CD (**Figura**

V.18), así mismo el hidrógeno del grupo hidroxilo de carvacrol (en gris), interactúa con los átomos de hidrógeno H5 de HP- $\beta$ -CD.

Además, la simulación muestra como el oxígeno del grupo hidroxilo de la CD (brazo rojo) interacciona con carvacrol mediante la formación de puentes de hidrógeno.

Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos de los experimentos de  $^1\text{H}$  RMN 2D-ROESY, como se muestra en la **Figura V.17**. Además, queda claro que, con esta conformación, carvacrol se une fuertemente al núcleo hidrofóbico de HP- $\beta$ -CD, como se muestra en la representación esférica de las moléculas, **Figura V.18**.

#### 1.2.2.3 Calorimetría diferencial de barrido y Termogravimetría

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la termogravimetría se utilizan habitualmente para determinar las propiedades físicas de una sustancia en función de la temperatura, bajo una atmósfera controlada, proporcionando información sobre su comportamiento térmico, graficando los datos obtenidos en termogramas (Volonté y Quiroga, 2013).

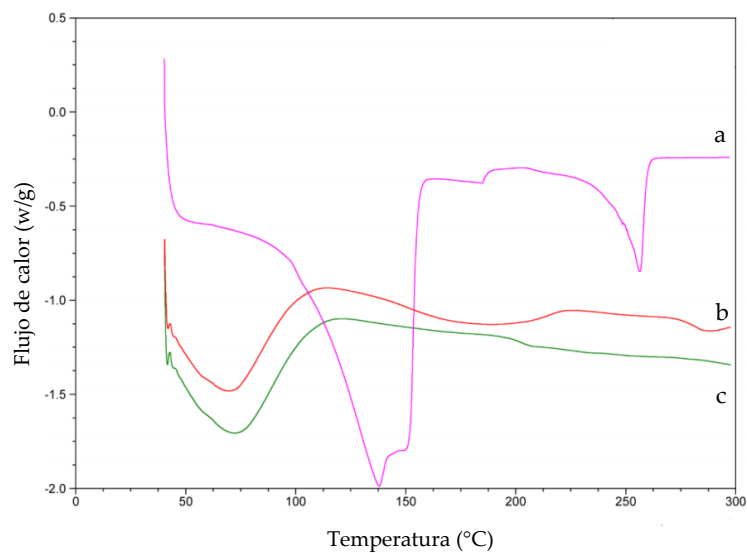
Los termogramas obtenidos por DSC para los complejos se muestran en la **Figura V.19** y en la **Figura V.20** los derivados del análisis termogravimétrico.

La curva de DSC de carvacrol presenta una banda endotérmica próxima a 140 °C. Para HP- $\beta$ -CD, debido a su naturaleza amorfa, se observó un amplio pico endotérmico aproximadamente a 70 °C (**Figura V.19.c**) asociado a la pérdida de moléculas de agua, y además se observa una pequeña variación en 210 °C debido a la transformación de la molécula (Kohata y col., 1993; Marini y col., 1996).

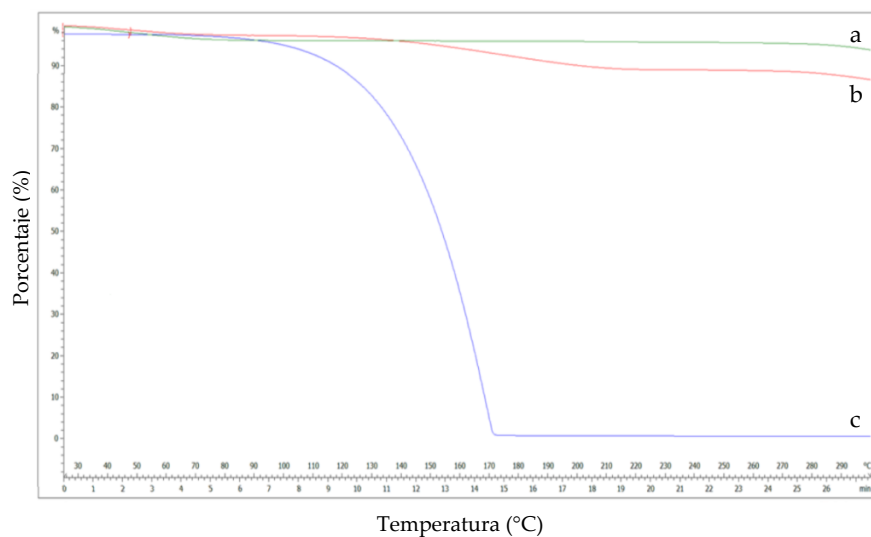
Sin embargo, cuando carvacrol está complejado en el interior de HP- $\beta$ -CDs se produce una evidente reducción de esta señal, lo que sugiere un proceso de exclusión de agua durante la formación del complejo (**Figura V.19. b**).

Si nos fijamos en la curva de DSC del complejo de inclusión formado por carvacrol-HP- $\beta$ -CD (**Figura V.19. b**), no aparecen los picos endotérmicos característicos de carvacrol (**Figura V.19 a**), lo que indica que este monoterpeneo fue protegido del tratamiento térmico debido a la formación del complejo de inclusión con HP- $\beta$ -CD (Wen y col., 2010).





**Figura V.19.:** Curvas de DSC de carvacrol (a), MWI carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (b), HP- $\beta$ -CDs (c).

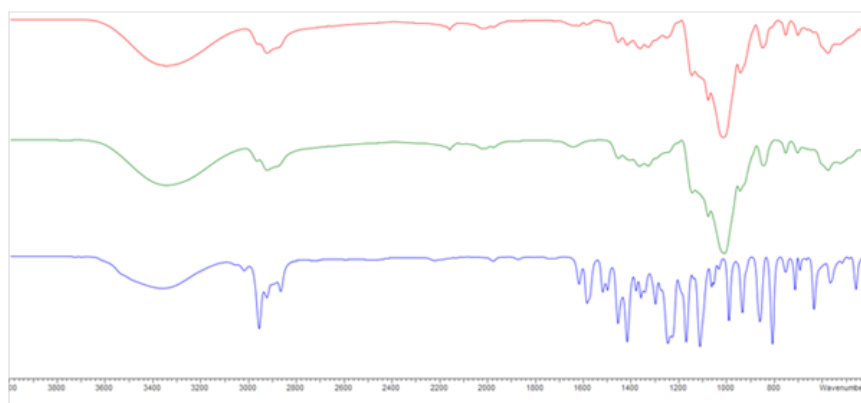


**Figura V.20.:** Termograma de a) HP- $\beta$ -CDs, b) MWI carvacrol-HP- $\beta$ -CDs, c) carvacrol.

Por otro lado, el análisis TG indicó (**Figura V.20**) que se producía una pérdida de masa entorno a los 50 °C, correspondiente a las moléculas de agua que están en el interior de HP- $\beta$ -CD. Además, la curva de TG de HP- $\beta$ -CD presenta una pérdida de peso del 5%, sin embargo la curva del complejo formado por carvacrol y HP- $\beta$ -CD tiene una pérdida de peso entorno al 2,79%, esto es debido a que hay una menor concentración de moléculas de agua en el interior de la CD, ya que han sido desplazadas por carvacrol.

#### 1.2.2.4. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica utilizada habitualmente para confirmar la formación de complejos de inclusión (Yuan, Jin y Xu, 2012). Así, se empleó FTIR para evidenciar la formación del complejo entre carvacrol y HP- $\beta$ -CD, obteniendo su espectro de infrarrojo y el de las moléculas aisladas (**Figura V.21**).



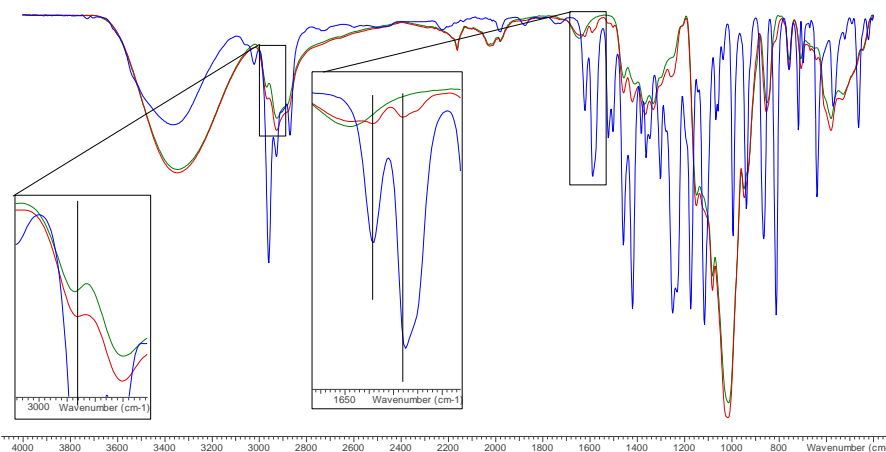
**Figura V.21.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), MWI carvacrol - HP- $\beta$ -CDs (línea roja), y carvacrol (línea azul).

Como se puede observar en el espectro de infrarrojos (IR) de HP- $\beta$ -CD (**Figura V.21**), aparecen numerosos picos en el intervalo de longitudes de onda ( $\lambda$ ) comprendido entre 600 y 3500  $\text{cm}^{-1}$ , siendo los más representativos los siguientes: 3341  $\text{cm}^{-1}$  (O-H, vibraciones de tensión); 2923  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, vibraciones de tensión);

1643  $\text{cm}^{-1}$  (O-H vibraciones de flexión); 1157  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, vibración de flexión); 1012  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C, vibraciones de estiramiento); 850  $\text{cm}^{-1}$  (enlace de tipo  $\alpha$  glucosídico); 2967  $\text{cm}^{-1}$  (anti-vibración simétrica de los grupos metilo); 1375  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de flexión de metilo).

En el espectro de IR de carvacrol (**Figura V.21**) aparecen bandas de estiramiento asociado al enlace -OH en la región 3361  $\text{cm}^{-1}$ , bandas de flexión fuera del plano del O-H a  $\lambda= 1457 \text{ cm}^{-1}$ , bandas de estiramiento en el C=C aromático a  $\lambda= 1619$  y  $\lambda= 1587 \text{ cm}^{-1}$ , del enlace C-H aromático fuera del plano a  $\lambda= 736 \text{ cm}^{-1}$ , además hay dos bandas de estiramiento simétricas y asimétricas de los metilo a  $\lambda= 2869$  y  $\lambda= 2958 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Y por último aparece una banda de flexión fuera del plano del C-H a  $\lambda= 811 \text{ cm}^{-1}$ . Con respecto a los sustituyentes del anillo aromático, el metilo ( $\text{CH}_3$ ) aparece a  $\lambda= 1375 \text{ cm}^{-1}$  observando a  $\lambda= 1380 \text{ cm}^{-1}$  una señal dobleteada (muela), característica del isopropilo.

Con respecto al espectro obtenido para el complejo, se observa en la **Figura V.22** que las bandas de las moléculas de carvacrol libre, fueron cubiertas por los picos del complejo carvacrol-HP- $\beta$ -CD debido a que la cantidad de molécula huésped no es más que 10-15% (w/w) en los complejos de inclusión (Yang, y col., 2005).



**Figura V.22.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), MWI carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (línea roja), y carvacrol (línea azul). Las líneas verticales indican el máximo de la curva HP- $\beta$ -CDs.

Además, se pudo observar que los picos de estiramiento del enlace C=C aromático de carvacrol aparecen a  $1619\text{ cm}^{-1}$  y  $1587\text{ cm}^{-1}$ . El primero de ellos mantiene la longitud de onda al formarse el complejo de inclusión de carvacrol con HP- $\beta$ -CD, sin embargo, el segundo sufre un desplazamiento a  $1589\text{ cm}^{-1}$ .

El pico correspondiente a la vibración asimétrica del grupo metilo de la fracción hidroxipropil, que aparecía a  $2967\text{ cm}^{-1}$  se desplaza a  $2965\text{ cm}^{-1}$  una vez que se ha formado el complejo de inclusión. Además, en el complejo HP- $\beta$ -CD-timol desaparece a  $\lambda = 1380\text{ cm}^{-1}$  la señal dobleteada (muela) característica del isopropilo, demostrando que el grupo isopropilo de timol se introduce en la cavidad interna (apolar) de la HP- $\beta$ -CD.

Estos ligeros cambios entre los compuestos libres y su forma complejada, proporcionan una evidencia de la interacción de carvacrol con HP- $\beta$ -CDs.

## **CAPÍTULO VI. LINALOL**

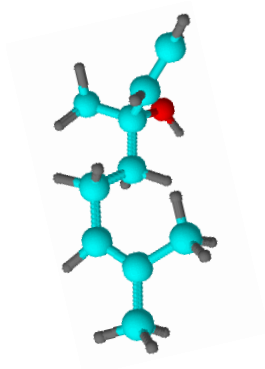


## 1. LINALOL

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) es un monoterpeno alcohólico con aroma floral (Cheng y col., 2012) presente en altas concentraciones en diferentes plantas como *Lavandula sp.*, siendo el componente mayoritario (68%) del aceite esencial de cilantro (Bakkali y col., 2008; Silva y col., 2011a), en *Ocimum Basilicum* L. (56,7–60,6%) (Hussain y col., 2008), y en la familia *Lauraceae* de la que se obtienen los aceites esenciales de laurel, canela y palo de rosa (Quintans-Júnior y col., 2013).

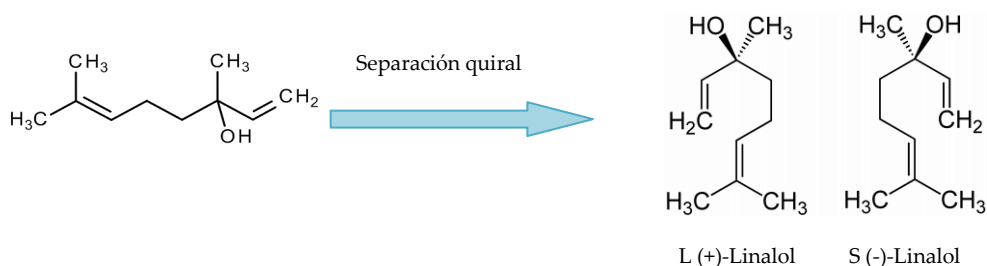
Además de las fuentes naturales descritas anteriormente, linalol se puede obtener por síntesis orgánica a partir de  $\alpha$ ,  $\beta$ -pineno u otros terpenos (geraniol, nerol, mirceno), o mediante la vía 2-metil-2-hepten-6-ona (Sell, 2003). El problema que presenta el linalol sintético es la presencia de trazas de dihidrolinalol y dehidrolinalol (Casabianca y col., 1998), e incluso impurezas cloradas que aportan un matiz metálico al aroma de linalol (Sell, 2007).



**Figura VI.1.:** Estructura química de linalol.

El linalol (**Figura VI.1**) es un líquido incoloro, relativamente soluble en agua (1,6 g/L a 25 °C) y muy soluble en diferentes disolventes orgánicos ( $P_{ow}$ : logP 2,97) con una presión de vapor de 0,27 hPa (25 °C). Este alcohol terpénico terciario

presenta un centro quiral en el carbono C<sub>3</sub>, apareciendo así dos formas enantiomeras en la naturaleza: (+)-linalol y (-)-linalol (Guimares y col., 2013) (Figura VI.2).



**Figura VI.2.:** Linalol y sus enantiómeros (Yang y col., 2016).

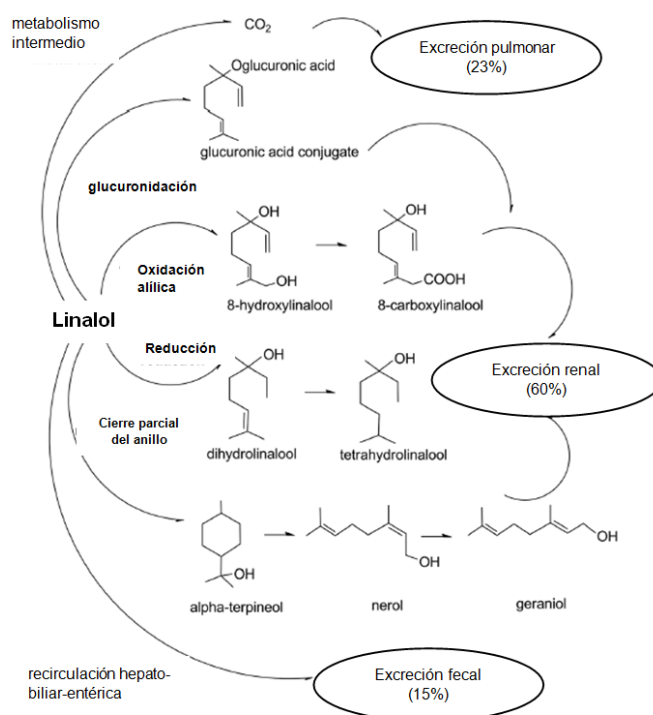
La toxicidad aguda de linalol en ratas ( $DL_{50}$ ) por vía oral es  $2790 \text{ mg kg}^{-1}$ , siendo aproximadamente el doble  $5610 \text{ mg kg}^{-1}$  por absorción cutánea. En humanos, puede provocar irritaciones en la piel por absorción cutánea, o en los ojos por contacto. Por inhalación, puede provocar tos, dolor, ahogo y dificultades respiratorias.

Linalol fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) como GRAS (generalmente reconocido como seguro), autorizando así su empleo como especia o aditivo alimentario (Letizia y col., 2003). Además, el Comité Mixto de Expertos (FAO/OMS) en Aditivos Alimentarios (JECFA) estableció una ingesta diaria admisible (IDA) de  $0-0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal / día para linalol (Aprotosoai y col., 2014). Por ello, su empleo está muy extendido en diferentes sectores, empleándose como agente aromatizante en la industria alimentaria, como fragancia en la industria de perfumes y cosmética y en diferentes formulaciones de fármacos en la industria farmacéutica (Kamatou y Viljoen, 2008).

En estudios experimentales realizados en ratas con linalol marcado con  $^{14}\text{C}$  ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal), evidenciaron que cuando es administrado por vía oral o nasogástrica se absorbe rápidamente en el tracto intestinal. Además, se ha comprobado que, en los seres humanos y animales, tras ser absorbida la mayor parte de linalol se metaboliza rápidamente en el hígado a compuestos polares, los



cuales se excretan en la orina (**Figura VI.3**) tanto en su forma libre como en su forma conjugada, e incluso se puede llegar a excretar en menor concentración en las heces (Aprotosoai y col., 2014).



**Figura VI.3.:** *Metabolismo de linalol en mamíferos (Belsito y col., 2008).*

Se ha demostrado que este monoterpeno juega un papel destacado en el sabor y aroma de numerosos alimentos (Bazemore y col., 2003; Bonnländer y col., 2006), tales como fresa (Schipilliti y col., 2011), mango (Sakho y col., 1997), y zumo de naranja (Bazemore y col., 2003). En el té, linalol es uno de los constituyentes volátiles que contribuyen de forma significativa en su aroma (Wang y col., 1994; Sharma y col., 2014). Así, podemos afirmar que linalol es el responsable del aroma del té negro (Baldermann y col., 2014; Joshi y Gulati, 2015), te oscuro (Lv y col., 2012), te oolong (Wang y col., 2010; Lin y col., 2013), y té verde (Jumtee y col., 2011).

Se le considera también en la industria un intermedio importante en la síntesis de vitamina E, e incluso interviene en la producción de la vitamina A, farnesol, iononas y citronelol. A nivel mundial, su consumo supera las 1000 toneladas (Cal y Krzyzaniak, 2006; Lapczynski, Letizia y Api, 2008). Entre otras aplicaciones, también se ha descrito su eficacia como insecticida para el control de ectoparásitos en animales domésticos (Aprotosoie y col., 2014).

### 1.1.1. Linalol y salud

Al tratarse del componente mayoritario de numerosos aceites esenciales, numerosos trabajos describen su contribución a la actividad biológica de los mismos como antimicrobianos, anti-leishmaniosis, anti-inflamatorios y antioxidantes (Celik y Ozkaya de 2002; Anjos y col., 2013; Huo y col., 2013; Beier y col., 2014, y Wu y col., 2014).

Así, en un estudio llevado a cabo con macrófagos murinos, se comprobó que linalol es capaz de atenuar la producción de los mediadores inflamatorios (TNF-  $\alpha$ , IL-6) inducidos por lipopolisacáridos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, se pudo determinar su efecto bloqueante sobre la fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  de la quinasa p38, y c-Jun, reduciendo además los daños histopatológicos de pulmón en modelos de ratón (Huo y col., 2013).

Por otra parte, se ha comprobado que la marcada actividad antioxidante de linalol inhibe la oxidación de las LDL, mejorando la absorción de colesterol a través de los receptores de macrófagos. Así mismo, al realizar los ensayos *in vivo* en ratones, se evidenció que linalol reduce significativamente la concentración triglicéridos en plasma, el colesterol total y los niveles de HMG-CoA reductasa, demostrando su actividad anti-aterogénica (Chung y col., 2008; Cho y col., 2011).

Con respecto al sistema nervioso central (CNS), diversos estudios con linalol han revelado propiedades beneficiosas, ya que actúa como sedante, anticonvulsivo, ansiolítico y antinociceptivo (Elisabetsky y col., 1999; de Almeida y col., 2009; de Moura y col., 2009; Batista y col., 2010; Coelho y col., 2013).

A determinadas dosis, linalol puede ejercer acción antinociceptiva al actuar sobre los sistemas muscarínicos (receptores M2), opiáceos, dopaminérgicos (receptores D2), adenosinérgicos (receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>), glutamatérgicos

(receptores de glutamato ionotrópicos) y sobre los canales de K<sup>+</sup> sensibles al ATP (Sakurada y col., 2011; Guimarães y col., 2013); evidenciando *in vivo* su actividad sedante y anestésica en una especie de pez denominado *Rhamdia quelen* (Heldwein y col., 2014).

También se ha descrito su eficacia como modulador de la neurotransmisión glutamatérgica tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, al actuar como antagonista del receptor de N-Metil-d-aspartato (NMDA), lo que provoca la analgesia supraespinal (Elisabetsky y col., 1995 y Brum y col., 2001; Batista y col., 2008).

En otros trabajos se ha evidenciado que la ingesta de linalol protege contra las convulsiones inducidas por picrotoxina, ácido quinolínico, pentilentetrazol y electroshock trans-corneal, retrasando la manifestación de convulsiones inducidas por NMDA (Elisabetsky, Brum, y Souza, 1999; WHO, 2005), al actuar como antagonista dosis-dependiente sobre los receptores de NMDA (Aprotosoai y col., 2014).

Otros mecanismos que podrían justificar el efecto anticonvulsivo de linalol se dirigen a su acción sobre los receptores nicotínicos, el bloqueo de los canales de calcio y la inhibición de la liberación de la acetilcolina (Nóbrega de Almeida, y col., 2011). Así, de Sousa y col. (2010) demostraron este hecho, justificando además que la eficacia de los enantiómeros de linalol en la prevención de las convulsiones tónicas difiere siendo (-)-linalol más efectivo que (+)-linalol, siendo sus efectos comparables en ratones a los obtenidos tras la administración de los fármacos anticonvulsivos fenitoína y diacepam (Aprotosoai y col., 2014).

Por otro lado, en un estudio llevado a cabo con ratones modelo 3xTg-AD, que manifiestan una fase avanzada de la enfermedad de Alzheimer, se ha comprobado que la administración oral de linalol revierte las características histopatológicas de la enfermedad y restaura las funciones cognitivas (mejora del aprendizaje y memoria espacial) y emocionales. Así, y dadas las excelentes propiedades atribuidas a linalol, puede ser un buen candidato para realizar nuevos estudios preclínicos y futuros estudios para dilucidar el mecanismo de actuación en la enfermedad de Alzheimer (Sabogal-Guáqueta, Osorio y Cardona-Gómez, 2016).

## 1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.2.1. Cálculo de $K_C$

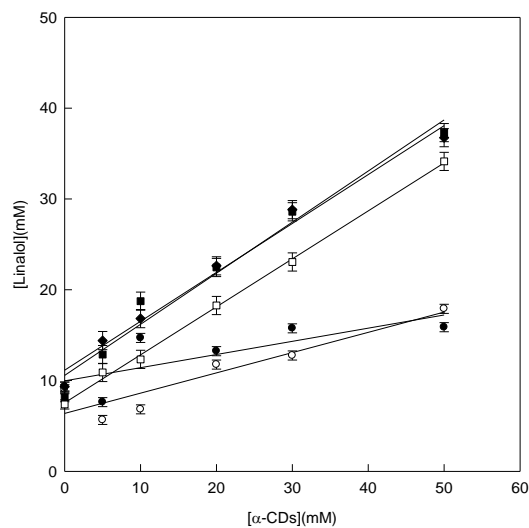
Como se ha mencionado anteriormente en los capítulos de timol y carvacrol, gracias a la propiedad inherente de las CDs para formar complejos de inclusión, se incluirá total o parcialmente la molécula de linalol en su cavidad hidrofóbica. Esta propiedad única de CDs gobernada por una constante de equilibrio ( $K_C$ ), le confiere numerosas aplicaciones de interés en la industria farmacéutica, alimentaria o en química analítica.

En primer lugar, se calcularon las constantes de complejación ( $K_C$ ) entre linalol y diferentes tipos de CDs nativas y modificadas a diferentes valores de pH utilizando el método de solubilidad, con el fin de comparar los valores obtenidos y determinar qué CD alberga en su interior mayor concentración de linalol, y cómo evoluciona el equilibrio en función del pH del medio de reacción; variable a tener en cuenta para el posible empleo de los complejos en formulaciones aplicables en diferentes sectores.

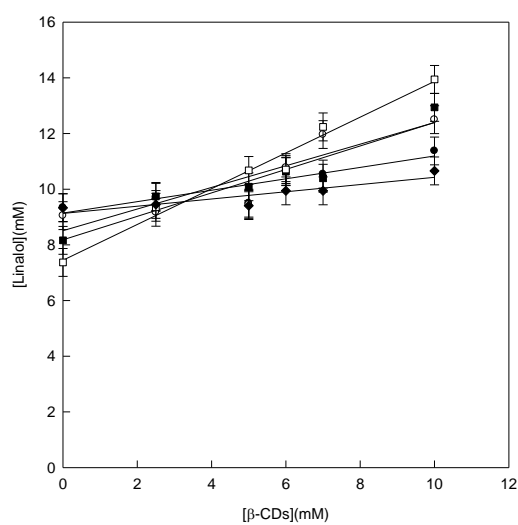
Puesto que la finalidad última se dirige a una posible aplicación industrial, se tomará como criterio de selección el valor de  $K_C$ , seleccionando como óptima aquella CD que sea capaz de complejar mayor concentración de linalol.

#### 1.2.1.1. Estudio de formación de complejos de inclusión a diferentes pHs

Para llevar a cabo el cálculo de la  $K_C$  entre linalol y los distintos tipos de CDs se utilizó el método de solubilidad descrito por Higuchi y Connors, en 1965. El diagrama de fases de linalol se realizó a diferentes valores de pH (3,5; 5,5; 6,5; 7,0 y 8,5) con  $\alpha$ -,  $\beta$ - y HP- $\beta$ - CDs, con el fin de comparar los valores de  $K_C$ . Para ello, se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de  $\alpha$ ,  $\beta$ - y HP- $\beta$ - CDs, y se saturaron con linalol. Estas disoluciones se mantuvieron en un baño de ultrasonidos, a 25 °C, hasta que se alcanzó el equilibrio y se cuantificó la concentración de linalol soluble en cada caso, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**). Se representó la concentración de linalol total frente a la concentración de CDs y los diagramas de fases obtenidos se muestran en las **Figura VI.4-6**.

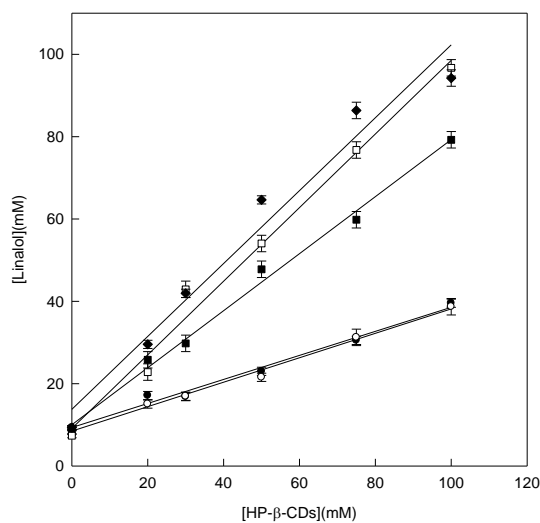


**Figura VI.4.:** Diagrama de fases de linalol con  $\alpha$ -CDs a pH 3,5 (●), pH 5,5 (○), pH 6,5 (■), pH 7,0 (□), y pH 8,5 (◆) a 25 °C.



**Figura VI.5.:** Diagrama de fases de linalol con  $\beta$ -CDs a pH 5,5 (○), pH 6,5 (■), pH 7,0 (□) y pH 8,5 (◆) a 25 °C. Insertada pH 3,5 (●) a 25 °C.

Como se observa en las **Figuras VI.4, 5 y 6**, los diagramas de fases de linalol obtenidos para los 3 tipos de CDs mostraron una tendencia lineal, ya que conforme aumenta la concentración de CDs en el medio de reacción, también lo hace la concentración de linalol (Tipo A<sub>L</sub>), indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados fue 1:1 en todos los casos.



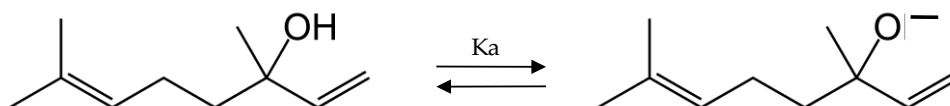
**Figura VI.6.:** Diagrama de fases de linalol con HP- $\beta$ -CDs a pH 3,5 (●), pH 5,5 (○), pH 6,5 (■), pH 7,0 (□), y pH 8,5 (◆), a 25 °C.

**Tabla VI.1.:** Constantes de complejación ( $K_c$ ) entre linalol y distintos tipos de CDs a diferentes pH, calculados mediante el método de solubilidad.

pH	$\alpha$ -CDs $K_c \text{ M}^{-1}$	$\beta$ -CDs $K_c \text{ M}^{-1}$	HP- $\beta$ -CDs $K_c \text{ M}^{-1}$
pH 3,5	$17 \pm 6$	$28 \pm 4$	$44 \pm 6$
pH 5,5	$25 \pm 4$	$74 \pm 5$	$49 \pm 7$
pH 6,5	$121 \pm 9$	$91 \pm 4$	$225 \pm 14$
pH 7,0	$148 \pm 12$	$241 \pm 26$	$921 \pm 21$
pH 8,5	$105 \pm 8$	$16 \pm 5$	$559 \pm 17$

Como se observa en la **Tabla VI.1** los valores de  $K_c$  obtenidos mediante el método de solubilidad aumentan conforme el pH se acerca a la neutralidad (7,0), este hecho es debido a que la solubilidad ( $S_0$ ) de linalol varía según el pH del medio (**Tabla VI.2**). De hecho, se disuelve mejor a pH ácido ( $S_0 = 9,34$ ) que a un valor de pH 7,0 disminuyendo su solubilidad en un 21% ( $S_0 = 7,37$ ). Sin embargo, a pH básico (8,5) vuelve a subir hasta 9,33 alcanzando una solubilidad cercana a la obtenida a pH 6,5 ( $S_0 = 8,16$ ).

Hay que tener en cuenta que linalol tiene un grupo hidroxilo en el carbono quiral  $C_3$ , esto implica que la molécula se comporte como un ácido débil ( $pK_a=18,46$ ), por lo que su grado de disociación estará condicionado por el pH del medio, y por tanto, su solubilidad (**Figura VI.7**).



**Figura VI.7.:** Equilibrio de disociación de linalol.

Al tener carácter de ácido muy débil, la salida del protón del alcohol está poco favorecida, además de no existir la posibilidad de deslocalizar la carga negativa sobre el átomo de oxígeno por resonancia. En consecuencia, su acidez será mucho menor a la observada en timol y carvacrol.

Los principales factores que limitan la formación del complejo son la relación entre los tamaños de las ciclodextrinas y la sustancia complejada, y la polaridad de la molécula huésped. Así, la protonación de linalol y en definitiva su solubilidad, es determinante en la estabilidad de los complejos.

De hecho, para los tres tipos de CDs ensayadas (ver **Tabla VI.1**), observamos un incremento en la estabilidad (valores de  $K_c$ ) de los complejos obtenidos a pH 7, que difiere significativamente de la estabilidad de los complejos de inclusión obtenidos tanto a pH ácido o básico. A pesar de esta mejora a pH neutro, en general los valores de constante son mucho más bajos que los

obtenidos para los monoterpenos fenólicos, probablemente condicionado tanto por su estructura como por la marcada inestabilidad de linalol, ya que se isomeriza con facilidad dando lugar a alcoholes primarios (geraniol y nerol), pudiendo incluso formar ciclos, por lo que su inclusión en la cavidad de la CD está menos favorecida.

Con respecto al tamaño de la cavidad, si nos fijamos en el valor de  $K_c$  obtenido para las nativas evaluadas (ver **Tabla VI.1**), no siempre se alcanzaron mayores valores con las  $\beta$ -CDs, sino que a determinados pH es mayor para  $\alpha$ -CDs, debido probablemente a que tiene una estructura lineal y menor tamaño que los monoterpenos aromáticos timol y carvacrol evaluados en capítulos anteriores, que presentan un tamaño apropiado para incluirse en la cavidad de  $\beta$ -CDs (0,62 nm); en cambio  $\alpha$ -CDs (0,49 nm) tiene un tamaño más pequeño, interactuando bien con cadenas carbonadas alifáticas como la de linalol, alcanzando a pH 6,5 un valor de  $K_c$  1,3 veces superior al determinado con  $\beta$ -CDs ( $91 \pm 4$ ). A esto hay que sumarle que linalol se caracteriza por su inestabilidad química, ya que es capaz de oxidarse, reducirse y polimerizarse con facilidad, por lo que al ponerse en contacto con CDs en condiciones ácidas y básicas (diferentes valores de pH), puede sufrir diversas transformaciones intramoleculares que pueden modificar su estructura y en consecuencia modificar su capacidad para incluirse en la cavidad hidrofóbica de las CDs.

La diferencia de tamaño de la cavidad de las CDs explica los valores de  $K_c$  obtenidos para  $\alpha$ -CDs y  $\beta$ -CDs, pero al comparar los valores de  $K_c$  obtenidos para  $\beta$ -CDs y su modificada HP- $\beta$ -CDs, que fueron de  $241 \pm 26$  y de  $921 \pm 21$  respectivamente a pH neutro observamos diferencias significativas, que como ya hemos comentado anteriormente, no podríamos justificar atendiendo al tamaño, ya que la nativa y su modificada deberían tener el mismo diámetro por diferir sólo en el cambio de átomos de H por grupos hidroxipropilo.

Así, basándonos en esta idea, se puede explicar que el valor de  $K_c$  obtenido para HP- $\beta$ -CD (valor 3,82 veces superior al obtenido con  $\beta$ -CD), es mayor que el de su nativa debido a que forma un complejo más estable, que puede justificarse por la intensidad de las fuerzas hidrofóbicas e interacciones de Van der Waals implicadas; además la presencia de grupos hidroxipropilo presentes en la modificada rompe los puentes de H cerca de la cavidad de la CD, hace que sea

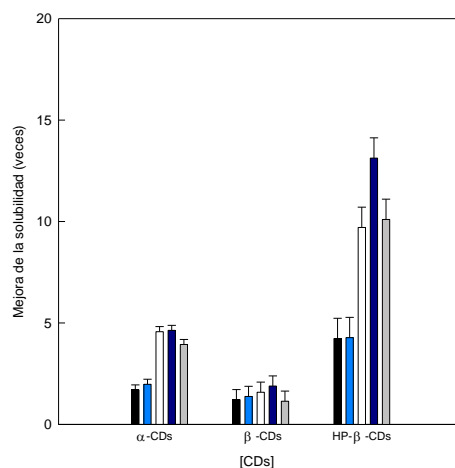


más accesible la entrada a las moléculas de linalol a la cavidad apolar, provocando un aumento de su solubilidad.

Todos los factores que se han descrito anteriormente, favorecen en mayor o menor medida la entrada de linalol en el interior de la cavidad de la CD, pero a todos ellos hay que incluir que los grupos hidroxipropilo provocan la apertura de la cavidad de la ciclodextrina, modificando significativamente el tamaño con respecto a la nativa, favoreciendo así que la molécula de linalol entre completamente en la cavidad interna de la HP- $\beta$ -CDs, mientras que en  $\beta$ -CDs, sólo entra una parte de la molécula.

Además, si comparamos el valor de  $K_c$  de timol, carvacrol y linalol con HP- $\beta$ -CDs, observamos que el mayor es del carvacrol > timol > linalol, esto es debido a que tanto carvacrol como timol presentan una estructura más hidrofóbica (anillo aromático) que la de linalol, factor que influye de forma decisiva en el valor de la  $K_c$ .

En resumen, la encapsulación de linalol en CDs va a depender del pH del medio, siendo mayor en el caso de HP- $\beta$ -CDs >  $\beta$ -CDs >  $\alpha$ -CDs a pH neutro (**Figura VI.8**), factor a tener en cuenta a la hora de formar complejos de inclusión y determinar valores de  $K_c$ .



**Figura VI.8.:** Aumento de la solubilidad de linalol tras la formación de complejos de inclusión con  $\alpha$ -CDs (50 mM),  $\beta$ -CDs (13 mM) y Hp- $\beta$ -CDs (100 mM) a pH 3,5 (barras negras), pH 5,5 (barras azul claro), pH 6,5 (barras blancas), pH 7 (barras azul oscuro) y pH 8,5 (barras grises).

Cuando se llevan a cabo estudios de saturación de CDs, es importante calcular la eficacia de complejación (CE). Este valor tiene en cuenta, además de  $K_C$ , la solubilidad en agua del compuesto encapsulado ( $S_0$ ) (**Ecuación III.12.**). En el caso de linalol, el valor de CE obtenido para cada tipo de CDs estudiadas a distintos valores de pH se muestra en la **Tabla VI.2.**

**Tabla VI.2.:** Eficacia de complejación (CE) entre linalol y distintos tipos de CDs a diferentes pH.

pH	$S_0$ (mM)	CE $\alpha$ -CDs	CE $\beta$ -CDs	CE HP- $\beta$ -CDs
pH 3,5	9,34 $\pm$ 0,20	159 $\pm$ 16	261 $\pm$ 13	411 $\pm$ 25
pH 5,5	9,05 $\pm$ 0,16	226 $\pm$ 14	670 $\pm$ 34	443 $\pm$ 35
pH 6,5	8,16 $\pm$ 0,11	987 $\pm$ 23	743 $\pm$ 42	1836 $\pm$ 67
pH 7,0	7,37 $\pm$ 0,03	1090 $\pm$ 53	1776 $\pm$ 63	6788 $\pm$ 167
pH 8,5	9,33 $\pm$ 0,13	979 $\pm$ 33	149 $\pm$ 15	5215 $\pm$ 143

Como se muestra en la **Tabla VI.2** la solubilidad de linalol varía según el pH del medio, ya que como se ha descrito anteriormente, linalol no solo puede evolucionar a la formación de isómeros al variar el pH del medio, sino que al ser un ácido débil, a pH neutro puede ceder un protón al agua, formando su base conjugada (fuerte), provocando así una variación en su solubilidad. Además, tal y como indica la **Tabla VI.2**, las HP- $\beta$ -CDs son las CDs que poseen una mayor eficacia de complejación a pH neutro.

### 1.2.2. Estudio de formación de complejos de inclusión con HP- $\beta$ -CDs a diferentes métodos

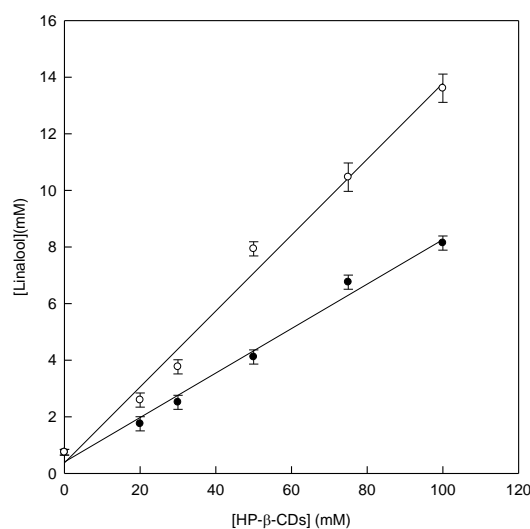
Una vez evidenciada la capacidad de HP- $\beta$ -CDs para formar complejos con linalol y dada su mayor eficacia (CE) a pH neutro, se selecciono para llevar a cabo la formación de complejos de inclusión a pH neutro, atomizando posteriormente

las disoluciones en *Spray Dryer* para la obtención de complejos en estado sólido, ya que de esta manera se facilita su manejo y conservación (almacenamiento).

Los complejos se prepararon mediante dos métodos. Al igual que en el caso de timol y carvacrol, se procedió a optimizar la preparación de los complejos sólidos por dos vías, **i)** el MWI y, **ii)** el método de solubilidad, tal y como se describen en el apartado de materiales y métodos (**Capítulo III**), con la finalidad de seleccionar aquel que ofreciese mejores prestaciones.

En primer lugar, se llevó a cabo la formación de complejos de inclusión de linalol con HP- $\beta$ -CDs mediante el método MWI, siguiendo el protocolo descrito por Hernández-Sánchez y col. (2016), con ligeras modificaciones. Para obtener el mayor rendimiento posible, se trabajó a concentraciones cercanas al límite de su solubilidad y a dos tiempos de contacto (24 y 48 horas).

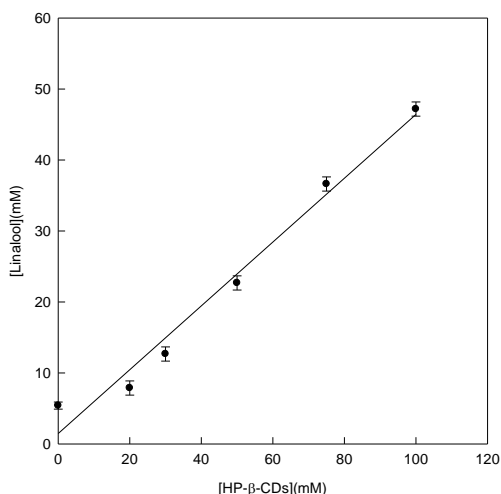
Como se observa en la **Figura VI.9**, la estequiometría de los complejos formados fue 1:1, ya que conforme aumenta la concentración de HP- $\beta$ -CDs, también lo hace la de linalol, obteniendo valores de constante ( $K_c$ ) con mayor tiempo de contacto ( $413 \pm 32$ , a las 48 horas), que duplican los determinados a las 24 horas ( $210 \pm 25$ ).



**Figura VI.9.:** Método MWI con HP- $\beta$ -CDs y linalol a las 24 h (●), y a las 48 h (○).

Además, se llevo a cabo el cálculo del aumento de la solubilidad de linalol tanto a las 24 h como a las 48 h, obteniendo un incremento de 10,9 y 18,2 veces, respectivamente respecto al no complejoado. Estos resultados justifican la selección del complejo obtenido a las 48 h por MWI, ya que un valor de  $K_c$  más alto asegura la formación de complejos más estables.

Con el fin de comparar ambos métodos (MWI y solubilidad), se realizaron los correspondientes diagramas de fases de linalol. Para ello se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de HP- $\beta$ -CDs hasta una concentración de 100 mM, en un volumen total de 100 mL, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura VI.10**.



**Figura VI.10.:** *Diagrama de Fases de HP- $\beta$ -CDs con linalol.*

Así, el valor de  $K_c$  obtenido a pH neutro ( $557 \pm 16 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) es menor que en el estudio de formación de complejos de inclusión a diferentes pHs ( $921 \pm 21$ ). Esta disminución en el valor de la  $K_c$  puede justificarse por la tendencia de linalol a asociarse consigo mismo en vez de interactuar con la CDs, y al aumentar la cantidad de agua en el medio de reacción le es más difícil interactuar con HP- $\beta$ -CDs (Martin del Valle, 2004).

Si comparamos el aumento de la solubilidad de linalol mediante la preparación de complejos tanto por el método MWI como por el método de solubilidad, se comprueba que ésta es de 18,2 y 8,8 veces, respectivamente, por lo que se consigue mayor solubilidad de linalol por el método de MWI. Esto puede ser debido a que mediante el método MWI, las radiaciones microondas estimulan la interacción de las moléculas de agua que presentan un momento dipolar, lo que les proporciona un incremento de energía, haciendo que estas moléculas choquen unas con otras; favoreciendo así el desplazamiento de las moléculas de agua del interior de la cavidad de la CDs, y la consiguiente entrada de linalol (Moneghini, Zingone, y De Zordi, 2009).

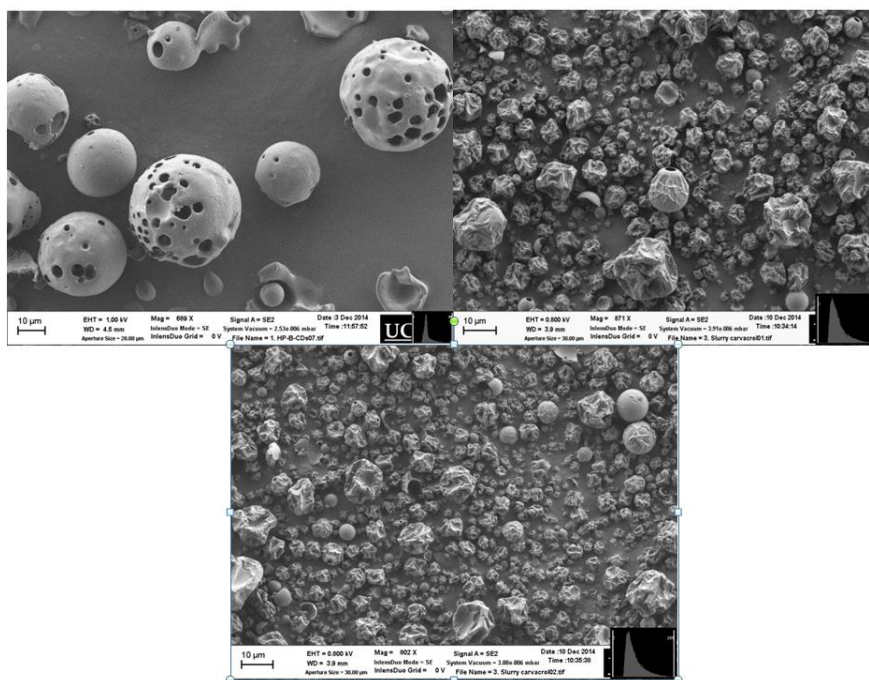
#### 1.2.2.1. *Spray Dryer*

Al igual que en el caso de timol y carvacrol los complejos solubles preparados con diferentes concentraciones de HP- $\beta$ -CDs se sometieron a un proceso de atomización para obtener los complejos en estado sólido (método descrito en el **Capítulo III**). Para llevar a cabo este estudio se comparó el rendimiento de complejación de linalol utilizando los dos métodos de preparación de complejos anteriormente descritos. Para ello, se llevó a cabo el secado por atomización para conseguir un polvo seco, mediante la eliminación de la humedad de la emulsión (Rocha, Fávares-Trindade y Grosso, 2012).

La forma de las partículas tras el proceso de atomización se puede ver influenciada por diversos factores como son el contenido de sólidos en la disolución, la temperatura de entrada, la velocidad de pulverización y la boquilla de aire del equipo, los cuales afectan a la tasa de evaporación (Dufour y col., 2015). Así, la forma arrugada de las partículas del complejo formado por linalol-HP- $\beta$ -CD (**Figura VI.11**) se debe a que la tasa de evaporación en la superficie de las gotitas es más rápida que la velocidad a la que los componentes disueltos se difunden hacia el centro, para formar una corteza alrededor de las gotitas (Vehring, 2008).

Como se muestra en las micrografías **B** y **C** de la **Figura VI.11**, las superficies externas muestran paredes continuas sin grietas, que influyen de manera significativa en la pérdida de compuestos volátiles. Al igual que ocurre en los casos de timol y carvacrol.

Posteriormente, se realizó el cálculo de rendimiento de secado utilizando la **Ecuación III.3** (materiales y métodos), para el método MWI y para el método de solubilidad, sin tener en cuenta el polvo que queda en el interior del equipo, por considerarse una cantidad despreciable.



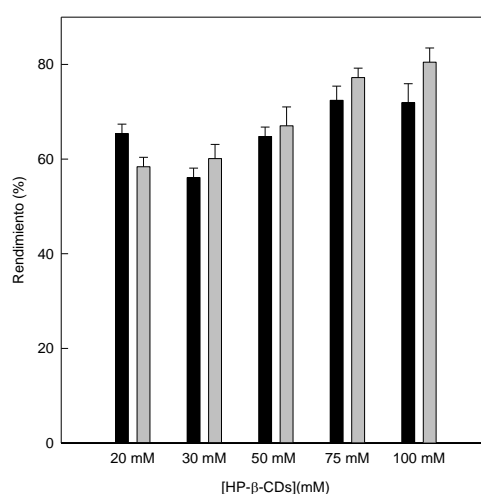
**Figura VI.11.:** Micrografías de HP- $\beta$ -CDs (A), MWI (B), Método de solubilidad (C).

Como se puede comprobar en la **Figura VI.12**, el rendimiento es mayor al 56% en todos los casos, por lo que se puede considerar que se obtiene un buen rendimiento para ambos métodos.

Pero es evidente, que al aumentar la concentración de HP- $\beta$ -CDs se obtiene un mayor rendimiento, tanto para el método de MWI como para el método de solubilidad, alcanzando el máximo rendimiento a 100 mM para el método de solubilidad (80%).

La diferencia entre ambos métodos puede ser debida a que, en el método de MWI, en la misma proporción de CDs hay mayor cantidad de linalol que en el

método de solubilidad (situado en el exterior de las CDs formando complejos de no inclusión o micelas), esto conlleva que haya una mayor cantidad de sólidos en la mezcla y que aumente la viscosidad de la disolución (de Barros Fernández, 2014) lo que provoca que estén disponibles para estar en contacto con la pared de la cámara, pudiéndose pegar a ella, y disminuir el rendimiento del proceso (Tonon y col., 2008)

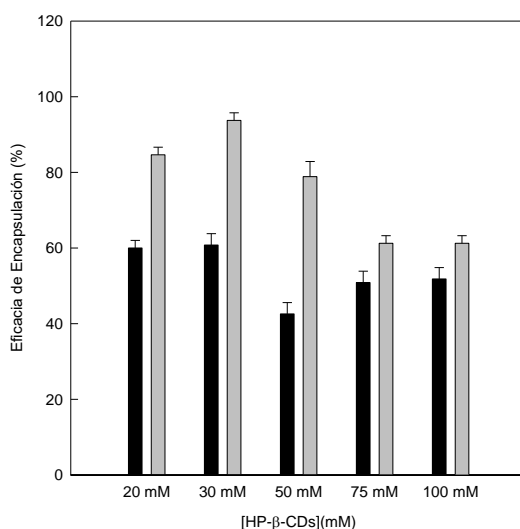


**Figura VI.12.:** Rendimiento de secado por *spray-drying* con HP-β-CDs y linalol, método MWI (barras negras) y método de solubilidad (barras grises).

Además, hay que tener en cuenta que las cantidades que se introducen en el equipo son pequeñas (un volumen total de 100 mL) por ello siempre se pueden producir pérdidas, ya que a escala de laboratorio es difícil alcanzar rendimientos mayores al 80 % (Arpagaus y Schafroth, 2009).

Por todo ello, se llevó a cabo la determinación de la pérdida de linalol debido al tratamiento de secado, al igual que en el caso de timol y carvacrol, analizando veinte muestras de los complejos formados, diez alícuotas antes y otras diez tras pasar por el *Spray Dryer*, determinando la concentración de linalol mediante GC-MS, aplicando el procedimiento descrito en materiales y métodos (Capítulo III). Además, se evaluó la concentración de linalol en los complejos sólidos tras la atomización (Figura VI.13.), la cual se utilizó para el cálculo de la eficacia de encapsulación, para los complejos obtenidos por ambos métodos

(MWI y solubilidad), en base a la cantidad teórica de linalol en la disolución inicial y su relación con la cantidad de linalol presente en los complejos sólidos al final del proceso.



**Figura VI.13.:** Eficacia de encapsulación de linalol con HP-β-CDs, método de MWI (barras negras) y método de solubilidad (barras grises).

Al comparar la eficacia de encapsulación de ambos métodos, ésta es siempre menor para el método de MWI, ya que se mueve en un rango de 42,6 a 60,8 g/100 g sin embargo para el método de solubilidad es de 61,3 a 93,7 g/100 g. Esto hecho, al contrario que ocurría con timol y carvacrol, puede justificarse por el hecho de que las CDs formen complejos tanto de inclusión como de no inclusión y que los complejos formen agregados solubles capaces también de solubilizar moléculas de linalol formando complejación sin inclusión en su cavidad o mediante la formación de estructuras similares a micelas, justificando de este modo la mayor presencia de linalol en la cavidad hidrofóbica cuando los complejos se obtienen por diagrama de fases, mientras que cuando se obtienen bajo condiciones forzadas (mayor T<sup>a</sup> por MWI), quedarán más moléculas de linalol en el exterior de la cavidad formando complejos sin inclusión o estructuras micelares, favoreciendo las pérdidas del mismo en el proceso de atomización, disminuyendo así la eficacia (Loftsson y col., 2005).



Para poder confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de eficacia de encapsulación, se calculó la carga de materia activa (CMA) de linalol según la **Ecuación III.5**, en la que se relaciona la cantidad de materia activa encapsulada con los gramos de polvo obtenidos mediante el *Spray Dryer*.

Como se puede ver en la **Tabla VI.3**, al igual que ocurre con la eficacia de encapsulación, los menores valores se obtienen para el método MWI, ya que en este caso se mueve en un rango de 0,58 a 0,8 g/100 g, mientras que para el método de solubilidad los valores oscilan entre 1,97 y 3,36 g/100 g, indicando que la cantidad de complejos de inclusión formados por el método de solubilidad fueron muy superiores a los obtenidos por el método de MWI.

**Tabla VI.3.:** Eficacia de encapsulación (EE) y carga de materia activa (CMA).

HP- $\beta$ -CDs	MWI		Solubilidad	
	EE (g/100 g)	CMA (g/100 g)	EE (g/100 g)	CMA (g/100 g)
<b>20 mM</b>	60,02 $\pm$ 5	0,70 $\pm$ 0,04	84,66 $\pm$ 4	2,74 $\pm$ 0,04
<b>30 mM</b>	60,79 $\pm$ 3	0,80 $\pm$ 0,05	93,75 $\pm$ 3	3,36 $\pm$ 0,05
<b>50 mM</b>	42,58 $\pm$ 3	0,62 $\pm$ 0,07	78,87 $\pm$ 3	2,91 $\pm$ 0,08
<b>75 mM</b>	50,88 $\pm$ 3	0,58 $\pm$ 0,08	61,27 $\pm$ 4	2,16 $\pm$ 0,03
<b>100 mM</b>	51,82 $\pm$ 3	0,58 $\pm$ 0,04	61,26 $\pm$ 2	1,97 $\pm$ 0,06

Llegados a este punto, conviene destacar que el hecho de alcanzar un mayor rendimiento de secado no implica una mayor cantidad de complejos de inclusión en el polvo obtenido, ya que en la cantidad de polvo recuperado pueden estar presentes complejos de inclusión activos (cargados con linalol) y CDs vacías. Así, con el fin de establecer la validez del método de atomización y justificar los resultados obtenidos, se calculó la  $K_c$  disolviendo el polvo en agua destilada en una proporción 1:1 (p:v) para asegurar la disolución de los complejos.

Para este ensayo los valores de  $K_c$  obtenidos fueron  $160 \pm 11$  para el método de MWI y  $164 \pm 8$  para el método de solubilidad. Por lo tanto, el método de solubilidad es el método más idóneo para la formación de complejos de inclusión de linalol con HP- $\beta$ -CDs, ya que permite alcanzar un valor de  $K_c$  más alto, mayor EE, así como una mayor carga de materia activa.

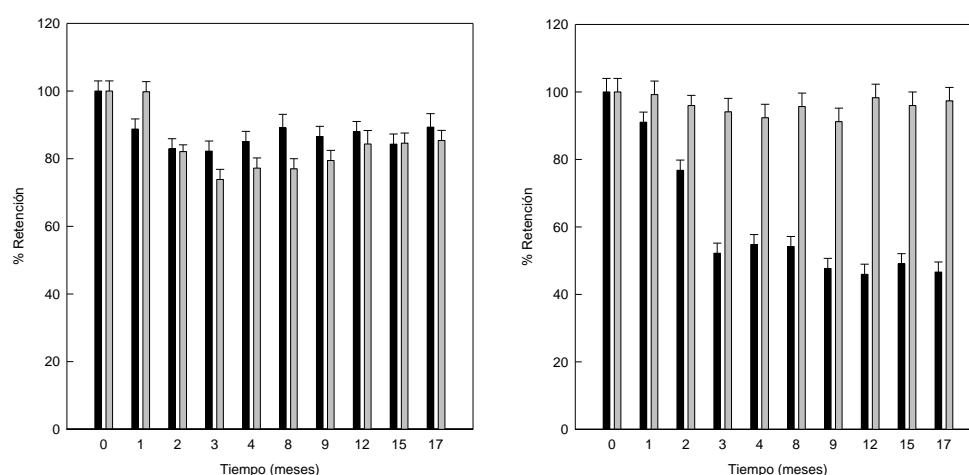
Una vez establecido el método óptimo para la formación de complejos de inclusión de linalol, al igual que en el caso de timol y carvacrol, se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de los atomizados obtenidos, ya que en general, los complejos se almacenan durante largos períodos de tiempo antes de ser utilizados, por ello no solo es importante determinar la cantidad del compuesto activo en el momento inicial, sino también la cantidad retenida en función del tiempo.

Las variables a tener en cuenta para determinar la estabilidad del polvo obtenido por *Spray Dryer* son la humedad y la actividad de agua; por ello, según se describe en la bibliografía, para conseguir un polvo con el menor contenido de humedad se seleccionó una temperatura de entrada de 180 °C y una velocidad de la bomba de 0,8 L min<sup>-1</sup>, ya que estos parámetros contribuyen a la conservación del polvo durante su almacenamiento y previenen cambios en sus características físicas y químicas (Alvarenga y col., 2012).

Fijadas las variables, para evaluar la estabilidad de los complejos sólidos se prepararon 100 muestras (50 por el método MWI y otras 50 por el método de solubilidad), con una concentración de 50 mM HP- $\beta$ -CDs. Las muestras se almacenaron durante 17 meses en recipientes de plástico cerrados, y 25 de ellas se conservaron a temperatura ambiente (25 °C) y el resto, refrigeradas a 8 °C (**Capítulo III**).

Como se observa en la **Figura VI.14.A** el polvo obtenido mediante el método MWI durante los 17 meses de almacenamiento, presenta un porcentaje de retención de linalol encapsulado muy similar en las muestras almacenadas a 8 °C, con un rango de 100 – 73,86 %, como las de a 25 °C con 100–84,29%. Sin embargo, el polvo obtenido por el método de solubilidad es capaz de mantener mayor cantidad de linalol retenido en las muestras almacenadas a 8 °C. Esto puede ser debido a que a temperaturas bajas también hay una menor HR, y por tanto menos moléculas de agua para competir con linalol por la cavidad hidrofóbica de la CD.

De hecho, se ha descrito que las HP- $\beta$ -CDs presentan mayor afinidad por las moléculas de agua conforme aumenta la HR debido a la cantidad de grupos hidroxilos que tiene en su superficie, lo que posibilita la liberación del compuesto complejado (dos Santos, Buera y Mazzobre, 2012).



**Figura VI.14.** Estabilidad de los complejos sólidos durante su almacenaje. (A) MWI a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises), (B) método de solubilidad a 25 °C (barras negras) y 8 °C (barras grises).

Sin embargo, a 25 °C el comportamiento se invierte, reteniendo al final del estudio los complejos obtenidos por MWI el 90% de linalol, mientras que por diagrama de fases, los complejos pierden el 50%. A pesar de ello, justificable por el incremento de HR a esa temperatura, la cantidad de linalol remanente siempre será mayor (con independencia de la temperatura de almacenamiento), en los complejos obtenidos por diagrama de fases, ya que si nos fijamos en la **Tabla VI.3**, una concentración de HP- $\beta$ -CDs 30 mM, la CMA para los complejos obtenidos por el método de solubilidad es 3,36 g/100 g, que aun perdiendo el 50% a 25 °C tras 17 meses, albergaría todavía en su interior 1,68 g/100 g, un 50% que la que presentan los complejos obtenidos por MWI (0,8 g/100 g) a tiempo cero.

En resumen, los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad, apoyan el empleo del método de solubilidad en la preparación de los complejos sólidos de linalol-HP- $\beta$ -CDs.

## 1.2.2.1. RMN

Para confirmar la formación de los complejos de inclusión de linalol-HP- $\beta$ -CDs se estudió la interacción de ambas moléculas mediante el empleo de la técnica de RMN, ya que ofrece una evidencia “inequívoca” de la inclusión de la molécula huésped en el interior de la CDs (Marques, 2010). Así, los resultados obtenidos tras someter los complejos a <sup>1</sup>H-RMN corroboraron que la estequiometría es 1:1. En la **Tabla VI.4** se muestran los valores de desplazamiento químico de linalol y HP- $\beta$ -CD, tanto en su estado libre como complejado en solución de metanol-d<sub>4</sub>, así como las diferencias entre las señales de las moléculas libres y complejadas.

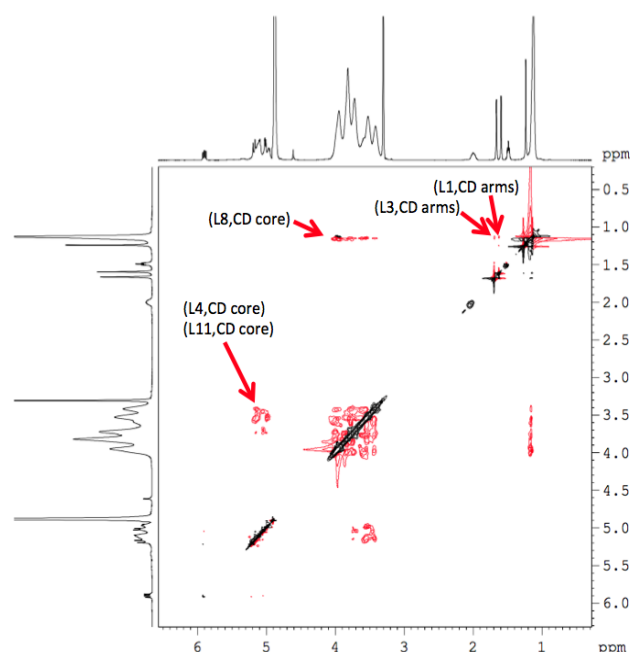
**Tabla VI.4.:** Desplazamiento químico de linalol y HP- $\beta$ -CD tanto en su forma libre como complejada en metanol-d<sub>4</sub>.

	H-Atom	$\delta$ /ppm (Libre)	$\delta$ /ppm (Complejo)	$\Delta\delta$ (Complejo - Libre)/ppm
Linalol	H-C (3)	6,566	6,577	-0,011
	H-C (4)	6,619	6,611	0,008
	H-C (6)	6,917	6,929	-0,012
	H-C (2')	2,740	2,758	-0,018
	H-C (5')	2,126	2,124	0,002
	H-C (2'')	1,176	1,195	-0,019
HP- $\beta$ -CD	H-C (1)	5,074	5,121	-0,047
	H-C (2)	3,723	3,730	-0,007
	H-C (3)	3,947	3,952	-0,005
	H-C (4)	3,418	3,417	0,001
	H-C (5)	3,534	3,533	0,001
	H-C (6)	3,821	3,815	0,006
	H-C (9)	1,126	1,125	0,001

El cambio que se produce en los desplazamientos químicos de la molécula libre con respecto a la complejada, verifican la formación del complejo de inclusión.

Una vez obtenidos los desplazamientos químicos, se llevó a cabo un estudio mediante espectroscopía de RMN bidimensional (2D), ya que proporciona información importante sobre la proximidad espacial entre el anfitrión (HP- $\beta$ -CD)

y la molécula huésped (linalol en este caso), a través de la observación de las correlaciones cruzadas. Esta técnica presenta el llamado efecto Overhauser (NOE) que como ya se ha mencionado en los capítulos de timol y carvacrol, se origina por la interacción entre dos protones próximos en el espacio, pudiendo observar dicha interacción en los espectros NOESY o ROESY, considerando que la presencia de picos cruzados (tabla de doble entrada **Figura VI.15**), entre los protones de dos especies en el espectro NOE, confirma la existencia de un contacto espacial a 0,4 nm.

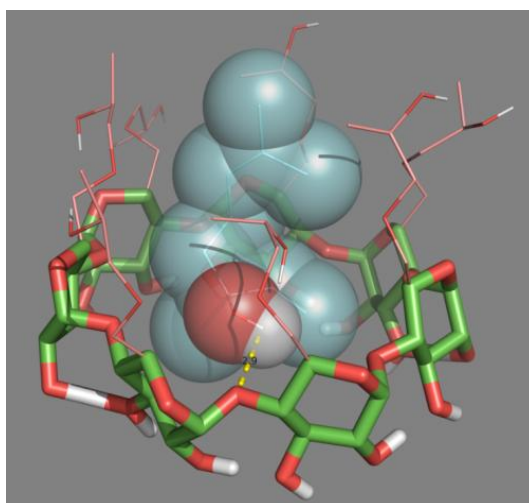


**Figura VI.15.:** Espectro ROESY del complejo linalol-HP- $\beta$ -CDs en metanol- $d_4$ .

Con el fin de obtener más información conformacional, se obtuvo el 2D ROESY del complejo de inclusión (**Figura VI.15**), observando una correlación (proximidad espacial), apreciable del protón del -OH de linalol con los protones H-5 de HP- $\beta$ -CD; apareciendo interacciones similares entre los protones L4, L8 y L11 de linalol con los protones H1, H2, H3 y H4 de HP- $\beta$ -CDs. Estos resultados confirman que linalol se incluyó en la cavidad de HP- $\beta$ -CDs.

### 1.2.2.2. Acoplamiento molecular (*Docking*)

Para poder entender cómo interactúa HP- $\beta$ -CD con linalol una vez complejados, se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular (*Docking*), mostrando la posible interacción tridimensional entre sus átomos en la **Figura VI.16**; donde se confirma que el hidrógeno del grupo hidroxilo de linalol (oxígeno en rojo e hidrógeno en gris), interactúa con los átomos de hidrógeno H5 de HP- $\beta$ -CD. De hecho, la simulación muestra como el oxígeno del grupo hidroxilo de la CD (brazo rojo) interacciona con linalol mediante la formación de puentes de hidrógeno (línea amarilla discontinua) con el H del grupo -OH (2,9 en la **Figura VI.16**), interaccionando los hidrógenos L4, L8 y L11 de linalol con los átomos de hidrógeno H1, H2, H3 y H4 de HP- $\beta$ -CDs.

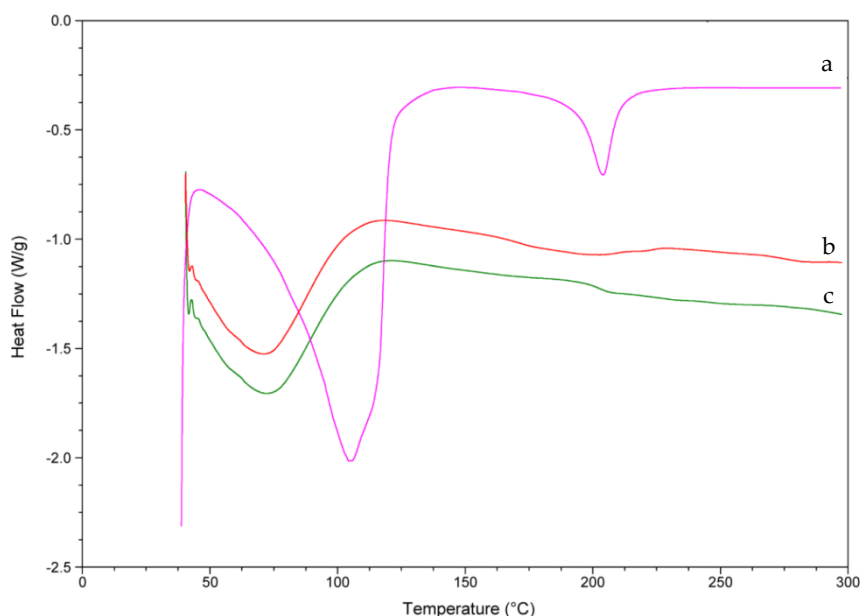


**Figura VI.16.:** *Perspectiva tridimensional de los complejos entre linalol y HP- $\beta$ -CDs obtenido mediante Docking.*

Los resultados de simulación concuerdan con los datos obtenidos por espectroscopía  $^1\text{H-RMN}$  y 2D-ROESY (**Figura VI.15**). Además, como se muestra en la conformación esférica de las moléculas (**Figura VI.16**), linalol se encuentra fuertemente unido al núcleo hidrofóbico de HP- $\beta$ -CD.

### 1.2.2.3. Calorimetría diferencial de barrido y Termogravimetría

Como ya se ha descrito anteriormente, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la termogravimetría se utilizan habitualmente para determinar las propiedades físicas de una sustancia. Mediante este estudio se han obtenido los termogramas para DSC de los complejos y los reactantes aislados, que se muestran en la **Figura VI.17** y en la **Figura VI.18** los correspondientes al análisis termogravimétrico.

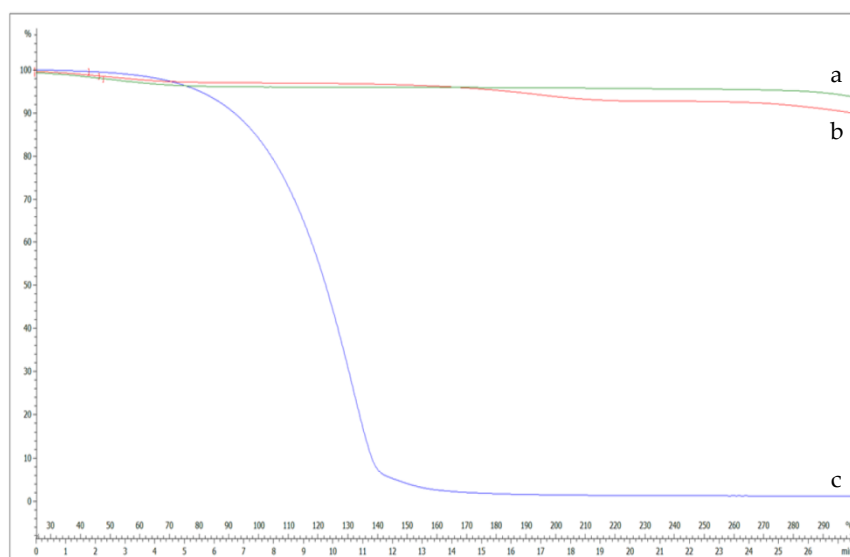


**Figura VI.17.:** Curvas de DSC de linalol (a), complejo linalol-HP-β-CDs (b), HP-β-CDs (c).

La curva de DSC de linalol presenta una banda endotérmica cercana a 100 °C, que corresponde al proceso de volatilización (**Figura VI.17.a**). Para HP-β-CD, debido a su naturaleza amorfa, se observó un amplio pico endotérmico aproximadamente a 70 °C (**Figura VI.17.c**) asociado con la pérdida de las moléculas de agua, apareciendo además una pequeña variación en 210 °C debido a la transformación de la molécula (Kohata y col., 1993; Marini y col., 1996), y un pequeño descenso de la curva en torno a los 300 °C, debido probablemente a la

descomposición de la molécula. Sin embargo, cuando linalol está complejado en el interior de HP- $\beta$ -CDs se produce una reducción evidente de estas señales, lo que sugiere un proceso de exclusión de agua durante la formación del complejo (Figura VI.17.b).

La curva de DSC del complejo de inclusión formado por linalol-HP- $\beta$ -CD (Figura VI.17.b) no muestra los picos endotérmicos característicos de linalol (Figura VI.17.a), lo que indica que este monoterpene fue protegido del tratamiento térmico debido a la formación del complejo de inclusión con HP- $\beta$ -CD (Wen y col., 2010). Resultados similares a los descritos fueron obtenidos para linalol con  $\beta$ -CDs (Menezes, y col., 2014). Justificados los resultados obtenidos por DSC, se procedió a interpretar los derivados del análisis termogravimétrico (Figura VI.18).



**Figura VI.18.:** Termogramas de a) HP- $\beta$ -CDs, b) complejo linalol-HP- $\beta$ -CDs, c) linalol.

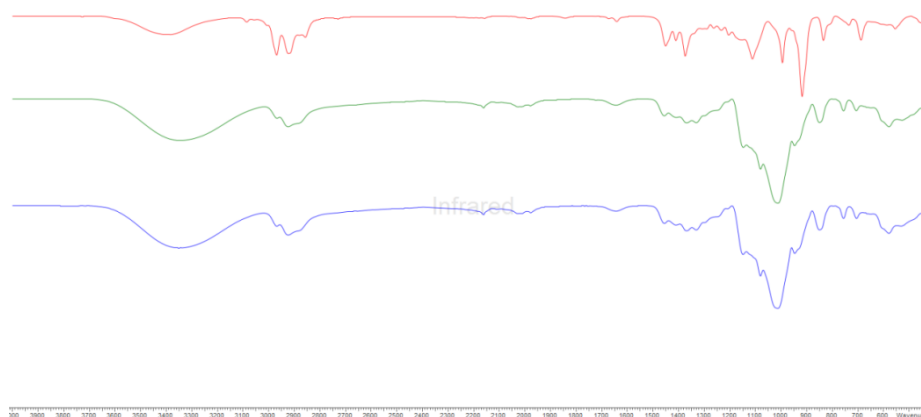
Como se observa en la Figura VI.18.a, la curva de TG de HP- $\beta$ -CD presenta una pérdida de peso del 5%, sin embargo, la curva del complejo formado por linalol e HP- $\beta$ -CD tiene una pérdida de peso de 2,58%, debido a que en el complejo hay menor concentración de moléculas de agua en el interior de la CD,



ya que han sido desplazadas por linalol. Resultados similares fueron descritos por Fernandes y col., (2004), con complejos de linalol y  $\beta$ -CDs.

#### 1.2.2.4. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica utilizada habitualmente para confirmar la formación de complejos de inclusión (Yuan, Jin y Xu, 2012). Así, se empleó FTIR para evidenciar la formación del complejo entre linalol y HP- $\beta$ -CD, obteniendo su espectro de infrarrojo y el de las moléculas aisladas (**Figura VI.19**).

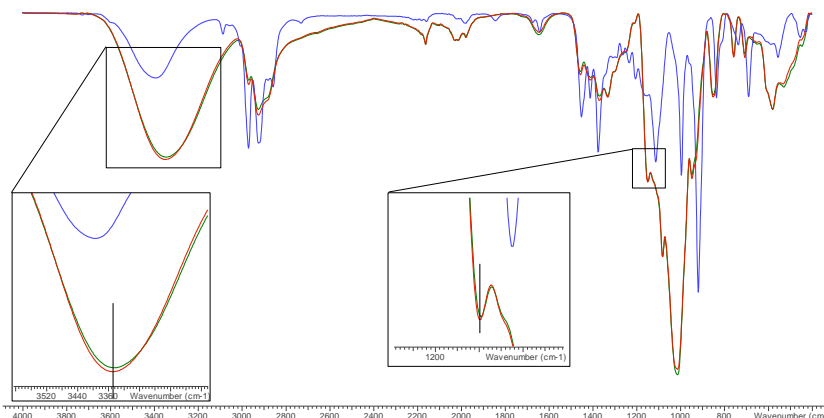


**Figura VI.19.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), MWI linalol-HP- $\beta$ -CDs (línea azul), y linalol (línea roja).

Si nos fijamos en el espectro de infrarrojos (IR) de HP- $\beta$ -CD (**Figura VI.19**), aparecen numerosos picos en el intervalo de longitudes de onda ( $\lambda$ ) comprendido entre 600 y 3500  $\text{cm}^{-1}$ , siendo los más representativos los siguientes: 3342  $\text{cm}^{-1}$  (O-H, vibraciones de tensión); 2923  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, vibraciones de tensión); 1643  $\text{cm}^{-1}$  (O-H vibraciones de flexión); 1157  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, vibración de flexión); 1012  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C, vibraciones de estiramiento); 850  $\text{cm}^{-1}$  (enlace de tipo  $\alpha$  glucosídico); 2967  $\text{cm}^{-1}$  (anti-vibración simétrica de los grupos metilo); 1375  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de flexión de metilo).

En el espectro de IR de linalol (**Figura VI.19**) aparecen bandas de estiramiento asociado al enlace -OH a  $\lambda = 3396 \text{ cm}^{-1}$ , bandas de flexión fuera del plano del O-H a  $\lambda = 1457 \text{ cm}^{-1}$ , y dos bandas de estiramiento simétricas y asimétricas de los metilo a  $\lambda = 2968$  y  $\lambda = 2923 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Aparece una banda de tensión del grupo C-O a  $\lambda = 917 \text{ cm}^{-1}$ . Por otra parte, las bandas de tensión del grupo alilo (C=C) se reflejan en un pico que aparece a  $\lambda = 1644 \text{ cm}^{-1}$ . Con respecto a los sustituyentes metilo ( $\text{CH}_3$ ), aparecen a  $\lambda = 1375 \text{ cm}^{-1}$ .

Como se muestra en la **Figura VI.20**, los espectros de HP- $\beta$ -CD y del complejo formado por linalol e HP- $\beta$ -CD son prácticamente iguales, a excepción de algunas bandas.



**Figura VI.20.:** Espectro de FTIR de HP- $\beta$ -CDs (línea verde), complejo linalol-HP- $\beta$ -CDs (línea roja), y linalol (línea azul). Las líneas verticales indican el máximo de la curva HP- $\beta$ -CDs.

La primera de ellas es la banda de tensión del grupo O-H que estaba en  $3342 \text{ cm}^{-1}$  y se movió a  $3351$ , este cambio se produjo debido al puente de hidrógeno intermolecular formado entre linalol e HP- $\beta$ -CD. Otra banda que se modifica es la que corresponde a la zona de vibración de tensión del C-O, esta banda aparecía a  $1147 \text{ cm}^{-1}$  y se mueve a  $1149 \text{ cm}^{-1}$  en el complejo, esto indica que se producen diversas interacciones entre la CD y linalol.

La banda característica del grupo hidroxipropil de la CD no sufre cambio alguno debido a la complejación, indicando que este grupo no interacciona con linalol, confirmando que la molécula se encuentra en el interior de HP- $\beta$ -CD.

## **CAPÍTULO VII. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**



## 1. EFECTO DE LA COMPLEJACIÓN DE TIMOL, CARVACROL Y LINALOL EN HP- $\beta$ -CDs, SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

### 1.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha crecido la demanda de compuestos naturales en la industria alimentaria, ya que ha aumentado el interés por desarrollar, por un lado, nuevos conservantes con menos efectos colaterales y más biodegradables, que ralenticen el deterioro de los alimentos y eviten la proliferación de microorganismos patógenos, y por el otro, nuevos envases “activos” que incorporen estos compuestos (Asbahani y col., 2015). Este impulso se debe fundamentalmente a la percepción negativa que tienen los consumidores hacia los conservantes “artificiales”, obtenidos por síntesis química (Seow y col., 2014).

Habitualmente, la industria alimentaria ha utilizado los AEs como aromatizantes, pero numerosos trabajos que encontramos en la bibliografía evidencian que contienen una gran cantidad de compuestos antimicrobianos de amplio espectro, apoyando su empleo en la conservación de alimentos (Hyldgaard, Mygind, y Meyer, 2012).

Los AEs están formados por diversos componentes y a distintas concentraciones, por ello su actividad antimicrobiana no puede atribuirse a la acción de un único compuesto (Bajpai, Baek, y Kang, 2012), para lo que habría que trabajar con compuestos aislados.

En la bibliografía se describe que la acción antimicrobiana de los AE se debe a su capacidad para penetrar, a través de las membranas bacterianas, al interior de la célula, provocando la inhibición (en mayor o menor grado), de las propiedades funcionales de la célula (Smith-Palmer y col., 1998; Fisher y Phillips, 2009; Guinoiseau y col., 2010; Bajpai y col., 2012). En la **Tabla VII.1** se da una descripción general de los AEs, los microorganismos a los que afectan y posibles mecanismos de acción.

**Tabla VII.1.:** Aceites esenciales, procedencia y mecanismo de acción (Hyldgaard, Mygind, y Meyer, 2012).

Nombre común	Especie de AE	Constituyente mayoritario del AE	Organismo modelo y MIC	Mecanismo	Referencias
<b>Comino</b>	<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cuminaldehído (29,0%), $\alpha$ -terpinen-7al (20,7%), $\gamma$ -terpineno (12,9%)	<i>B.cereus</i> (0,05 $\mu$ L/mL) <i>B.subtilis</i> (0,05 $\mu$ L/mL o 1000 $\mu$ g/mL)	Cambios leves en el citoplasma; dotación de células intactas.	De y col. (1999); Pajohi (2011)
<b>Lima</b>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Limoneno (69,1%), <i>p</i> -cimeno (12,8%)	<i>A. flavus</i> (560 $\mu$ g/mL) <i>A. parasiticus</i> (1130 $\mu$ g/mL) <i>E. coli</i> (0.2% v/v)	Reduce la producción de aflatoxinas. Afecta a la integridad de la membrana. Libera el contenido celular.	Rammanee y Hong-pattarakere, (2011); Turgis y col., (2009)
<b>Menta</b>	<i>Mentha longifolia</i>	Mentol (32,5%), mentona (20,7%), pulegona (17,8%), 1,8-cineol (5,6%),	<i>Salmonella typhimurium</i> (1560 $\mu$ g/mL); <i>E. coli</i> (780 $\mu$ g/mL); <i>Micrococcus luteus</i> (190 $\mu$ g/mL)	Daño en la pared celular.	Hafedh y col., (2010)
<b>Orégano</b>	<i>Origanum compactum</i>	Carvacrol (36,5%), timol (29,7%), <i>p</i> -cimeno (24,3%), $\gamma$ -terpineno (1,1%)	<i>P. aeruginosa</i> (1 % v/v) <i>S. aureus</i>	Eliminación del gradiente K <sup>+</sup> , inhibición de la respiración celular; coagulación del material citoplasmático; permeabilidad de la membrana; liberación de vesículas.	Bouhdid y col., (2009) Babili y col., (2011).
	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol (68,1%), <i>p</i> -cimeno (15,9%), $\alpha$ -pineno (2,6%), mirceno (2,0%)	<i>P. aeruginosa</i> (1648 $\mu$ g/mL) <i>S.aureus</i> (0,6 $\mu$ L/mL o 575 $\mu$ g/mL); <i>Candida</i> spp. (10–20 $\mu$ L/mL); <i>E. coli</i> (0,625 $\mu$ L/mL)	Supresión de la producción enterotoxina; liberación del contenido celular; cambios morfológicos de la célula; liberación de K y P	Lambert y col., (2001) Burt, Reinders (2003) De Souza y col., (2008, 2010)
<b>Tomillo</b>	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol (31,4%), <i>p</i> -cimeno (17,0%), carvacrol (12,4%), $\gamma$ -terpineno (11,1%)	<i>Erwinia carotovora</i> (1600 $\mu$ g/mL) <i>E. coli</i> (0,05% v/v o 2 $\mu$ g/mL) <i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> (0,02% v/v) <i>S.aureus</i> (0,02% v/v o 5 $\mu$ g/mL) <i>S.enteritidis</i> (0,04% v/v) <i>C. albicans</i> (1 $\mu$ g/mL)	Permeabilidad de la membrana; cambios en el perfil de proteínas de membrana.	Panizzi y col. (1993), Smith-Palmer y col., (1998), Nguefack y col., (2004), Horváth y col. (2009)
<b>Lavanda</b>	<i>Lavandula angustifolia</i>	Linalil acetato (36,7%), linalol (31,4%), terpineol (14,9%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (2 $\mu$ g/mL), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1,5 $\mu$ g/mL), <i>C. albicans</i> (3 $\mu$ g/mL)	Permeabilidad de la membrana	de Rapper y col., (2013), Danh y col., (2013)

Dentro de los componentes de los AEs, timol, carvacrol y linalol han demostrado tener actividad antimicrobiana frente a una amplia gama de microorganismos.

### 1.1.1. Timol

A pesar de que el mecanismo de acción antibacteriano de timol no se ha elucidado completamente, se cree que podría estar implicado en la disrupción de la membrana externa e interna de la célula, ejerciendo además una marcada interacción con las proteínas de membrana y ciertas dianas intracelulares (Hyldgaard, Mygind y Meyer, 2012). Así, se ha postulado que timol se integra en la bicapa lipídica, provocando alteraciones en la membrana celular; y a bajas concentraciones, se ha evidenciado que induce cambios adaptativos en el perfil lipídico de la membrana, para compensar su efecto fluidificante, y poder mantener así su estructura (Turina y col., 2006; Di Pasqua y col., 2007).

Diferentes estudios han demostrado que timol interacciona con la membrana celular haciendo que ésta pierda su permeabilidad, ya que es capaz de provocar la pérdida del potencial de membrana, iones potasio, ATP y carboxifluoresceína (Helander y col., 1998; Lambert y col., 2001; Walsh y col., 2003; Xu y col., 2008; Chauhan y Kang, 2014) (**Figura VII.1**). Aunque ha sido demostrado que timol tiene efecto protector sobre los lipopolisacáridos de la membrana bacteriana (LPS), al tratar *E. coli* con timol se observa la liberación de los LPS y la disrupción de la membrana externa (Helander y col., 1998; Shapira y Mimran, 2007; Veras y col., 2012).

En un ensayo similar frente a otro patógeno (*Salmonella entérica*), Di Pasqua y col., (2010), evidenciaron que concentraciones sub-letales de timol provocaban una acumulación de proteínas de membrana externa y una regulación positiva sobre la síntesis de proteínas de membrana; sin embargo, al repetir el ensayo con *Erwinia spp.*, se producía una regulación negativa sobre las proteínas de la membrana externa (Horváth y col., 2009). Tras exponer *S. entérica* a timol, éste regula positivamente las chaperonas de choque térmico 60 (GroEL) y 70 (DnaK), que son proteínas clave en la protección frente al estrés térmico y al inadecuado plegamiento de las proteínas (Di Pasqua y col., 2010; Hartl y col., 2011).

Además, se observó que timol afecta a la ruta metabólica del citrato, alterando el funcionamiento de muchas enzimas implicadas directa o indirectamente, en la síntesis de ATP (Di Pasqua y col., 2010). Esta acción de timol a nivel intracelular, evidencia que interviene en procesos implicados en la generación de energía, reduciendo la capacidad de la célula para recuperar su estado normal tras ser expuesta a timol (Hyldgaard, Mygind y Meyer, 2012).

### 1.1.2. Carvacrol

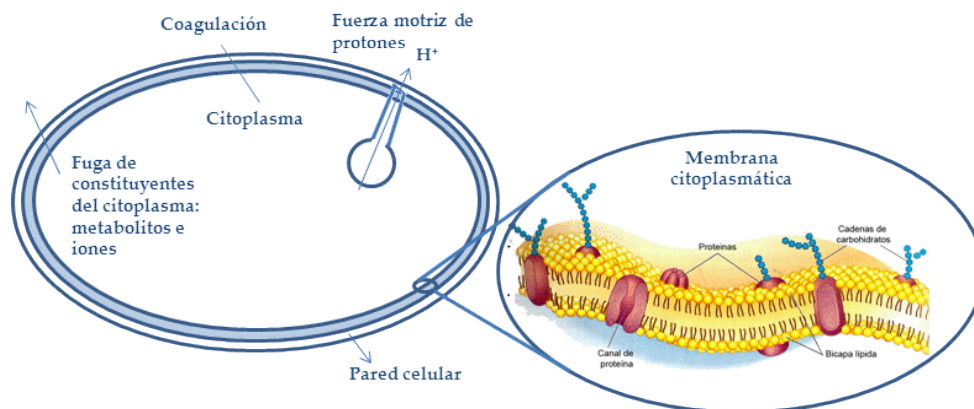
Se ha demostrado que carvacrol afecta en mayor o menor extensión a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (La Storia y col., 2011), debido a que promueve la liberación de LPS de la membrana externa (Helander et al., 1998; Guarda y col., 2011). Aunque carvacrol afecta a la membrana externa, se piensa que su sitio de acción es la membrana citoplasmática, ya que afecta al transporte pasivo de iones a través de dicha membrana. Al igual que ocurre con timol, carvacrol posee un grupo hidroxilo, que actúa como transportador de cationes monovalentes a través de la membrana, ya que al incorporarse al interior de la célula libera un protón ( $H^+$ ) dentro del citoplasma celular, generando un ión fenóxido que capta el ion  $K^+$ , y lo transporta al medio exterior (Ultee y col., 2002; Ben Arfa y col., 2006; La Storia y col., 2011) (**Figura VII.1**).

Sin embargo, Veldhuizen y col. (2006) demostraron que el grupo hidroxilo de carvacrol no es esencial para justificar su actividad antimicrobiana ya que, a pesar de su capacidad para intercambiar protones a través de la membrana, no se puede obviar el efecto antimicrobiano que ejercen los componentes no-hidroxílicos de carvacrol.

Las evidencias sugieren que el sitio de acción de carvacrol es la membrana celular, aumentando la fluidez y permeabilidad (Hyldgaard, Mygind y Meyer, 2012); en efecto, se ha demostrado que las células que han sido expuestas a carvacrol modifican la composición de ácidos grasos de la membrana, como mecanismo de adaptación, para intentar mantener su estructura y funcionalidad (Ultee y col., 2000; Di Pasqua y col., 2006, 2007). La permeabilización de la membrana por la acción de carvacrol ha sido confirmada monitorizando diferentes parámetros: iones  $H^+$ ,  $K^+$ , carboxifluoresceína y ATP, e incluso ácidos



nucléicos (Helander y col., 1998; Ultee y col., 1999; Lambert y col., 2001; Cristani y col., 2007; Xu y col., 2008).



**Figura VII.1.** Modo de acción de timol, carvacrol y linalol en la célula (Burt, 2004).

### 1.1.3. Linalol

Se ha demostrado que linalol aumenta la permeabilidad de las membranas celulares con carga negativa (Alviano y col., 2005; Silva y col., 2011; Diao et al. 2013). Los alcoholes alifáticos como linalol, poseen una marcada capacidad para unirse a diferentes estructuras moleculares como proteínas o glicoproteínas; por ello, linalol presenta una gran afinidad por las membranas celulares y un elevado potencial para penetrar a través de las paredes, facilitando así la salida de material citoplásmico al exterior de la célula (Hemaiswarya y Doble 2009; Wang y col., 2012).

Así, se ha demostrado que linalol posee una marcada actividad antimicrobiana frente a numerosos microorganismos, entre ellos *C. albicans* (MIC 2145 µg/mL), *B. cereus* (1073 µg/mL), *C. jejuni* (515 µg/mL), *L. monocytogenes* (1000-2145 µg/mL) y *S. tyhimurium* (1000 µg/mL) (Carson y Riley, 1995; Kim y col., 1995; Bagamboula y col., 2004; Fisher y Phillips, 2006, 2008; Ait-Ouazzou y col., 2011).

En resumen, la actividad antimicrobiana descrita anteriormente para determinados componentes mayoritarios de ciertos aceites esenciales como timol, carvacrol y linalol, sugieren su aplicación en la conservación de alimentos.

Sin embargo, son componentes muy volátiles y químicamente lábiles como resultado de la oxidación, interacciones químicas o volatilización. Además, debido a su escasa solubilidad en agua, se requieren habitualmente elevadas concentraciones para alcanzar el efecto deseado, factores que limitan su aplicación y eficacia.

Además, hay que tener en cuenta la composición heterogénea de los alimentos donde van a ejercer su efecto conservante, en especial el contenido en grasa y proteínas, la actividad del agua, el pH y las enzimas, componentes que pueden interferir y reducir también su eficacia (Burt, 2004; Firouzi y col., 2007; Friedly y col., 2009). Si a esto se le suma que poseen un olor y sabor intensos, nos encontramos con bastantes limitaciones que debemos intentar solventar para utilizarlos con plenas garantías (Friedly y col., 2009; Tiwari y col., 2009; Sokovic y col., 2010; Bajpai y col., 2012; Solorzano-Santos y Miranda-Novales, 2012; Chorianopoulos y col., 2006; Li y col., 2011).

De entre las diferentes aproximaciones que encontramos en la literatura, la encapsulación ofrece soluciones viables a corto plazo y se han utilizado con éxito en la industria alimentaria, ya que esta técnica protege al principio activo de la humedad y las condiciones ambientales adversas (temperatura, radiación, oxidación), mejorando así su estabilidad y viabilidad.

En esta línea, Oussalah, Caillet, Salmiéri, Saucier y Lacroix (2004) evaluaron la capacidad del aceite esencial de orégano o pimiento al 1% encapsulados en proteína láctea para controlar el crecimiento de *Pseudomonas spp.* y *E. coli* 0157:H7, previamente inoculadas en carne de vacuno. Las películas con aceites esenciales redujeron los recuentos microbianos a lo largo de los 7 días de conservación respecto al control; mostrando las de orégano mayor inhibición del crecimiento microbiano.

Así, Peretto y col. (2014), prepararon películas comestibles de puré de fresa con carvacrol y cinamato de metilo y las aplicaron en envases plásticos para conseguir una liberación controlada de estos monoterpenos, sin entrar en contacto directo con la fruta. Las fresas frescas se envasaron y se mantuvieron a 10 °C durante 10 días, conteniendo un 90 % de humedad relativa. Tras finalizar el ensayo, evidenciaron que las fresas que habían sido envasadas con la película comestible permanecieron más firmes, y exhibían colores más brillantes; sin

embargo, las envasadas de forma tradicional (sin la película comestible), se deterioraron más rápidamente.

Resultados similares alcanzaron Pan y col., 2014 al evaluar el efecto antimicrobiano de timol encapsulado en caseinato de sodio frente al timol libre en lácteos, demostrando que timol encapsulado era más eficaz en la inhibición de los patógenos presentes en la leche, prolongando su efecto durante más tiempo.

Echegoyen y Nerin (2015), evaluaron el efecto del aceite esencial de canela incorporado a películas de polipropileno en la conservación de champiñones, observando que este tipo de envasado prevenía la pérdida de color y peso de los champiñones, al comparar con los sometidos a envasado tradicional. Estos mismos autores demostraron el efecto antioxidante y antimicrobiano de películas de polipropileno con extracto de romero en carne fresca de ternera, comprobando que tanto la concentración de mioglobina como la conservación de la carne se vieron positivamente favorecidas por la acción de estos materiales.

## 1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

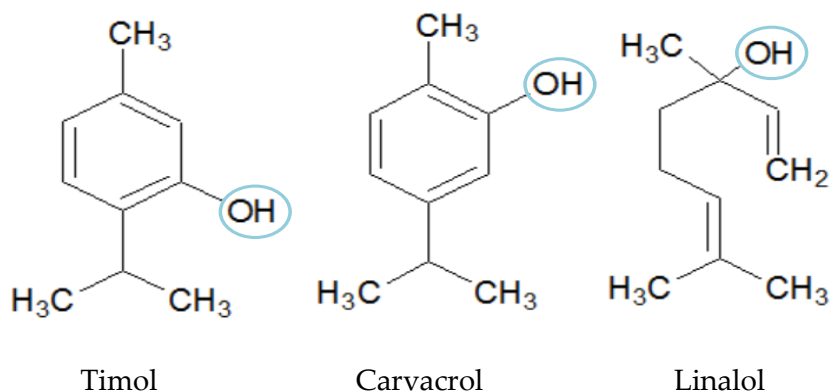
### 1.2.1. Medida de la actividad antimicrobiana

En este capítulo, se evaluó el efecto de la inclusión de timol, carvacrol y linalol en CDs, sobre su actividad antimicrobiana, para una posible aplicación como conservantes naturales; utilizando el método de dilución de caldo de Brandt y col. (2010). Se seleccionaron estos tres monoterpenos por tratarse de compuestos naturales, para los que se ha descrito previamente en la bibliografía una marcada actividad biocida. Para poder comparar su espectro de acción, se seleccionó un microorganismo Gram (-) como *E. coli* y otro Gram (+) como *S.aureus*.

Estructuralmente, si bien los tres monoterpenos tienen el mismo número de grupos hidroxilo (**Figura VII.2**), sólo dos de ellos presentan estructura aromática, pudiendo “secuestrar” los radicales por resonancia, actuando así carvacrol y timol como potentes antioxidantes.

En cambio, linalol es un alcohol terpénico terciario insaturado, que se caracteriza por su inestabilidad química, dando reacciones de oxidación, reducción y polimerización con suma facilidad. Aunque carece de estructura

aromática, presenta dos dobles enlaces (electrones  $\pi$  disponibles), que ejercen un efecto deslocalizador del radical, aunque no tan acusado como el esperado para los monoterpenos aromáticos.



**Figura VII.2.:** Grupos hidroxilos de timol, carvacrol y linalol.

Así, en primer lugar, se determinó la actividad antimicrobiana intrínseca de timol, carvacrol y linalol en ausencia de CDs, mediante el método descrito por Brandt y col., 2010. El estudio se realizó en caldo de triptona y soja (*Tryptic Soy Broth*, TSB, en versión anglosajona), partiendo de un inóculo inicial para cada microorganismo (*E. coli* y *S. aureus*) de 5,0 Log<sub>10</sub> unidades formadoras de colonias/mL (CFU/mL). Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto (libre o complejado), se adicionaron alícuotas de 100  $\mu$ L de esta suspensión bacteriana por pocillo a placas de microtitulación estériles de 96 pocillos, de fondo plano y 300  $\mu$ L de capacidad, siguiendo el protocolo que se describe en materiales y métodos (**Capítulo III**). Las concentraciones de los complejos de inclusión y de los aceites de timol, carvacrol y linalol utilizadas, variaron entre 0,20 y 37,75 mM.

Una vez preparadas las placas con las soluciones antimicrobianas y las suspensiones bacterianas, se determinó la absorbancia basal a 630 nm (DO<sub>630</sub>) en un lector de placas a (tiempo 0 h). Posteriormente, las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h, realizando una nueva lectura (DO<sub>630</sub>). Como criterio para la asignación de actividad antimicrobiana se utilizó la siguiente: aquellos pocillos

donde se observó una disminución de absorbancia  $\leq 0,05$  tras 24 h de incubación se consideró "inhibición positiva", y las concentraciones más bajas de los correspondientes agentes antimicrobianos se consideraron como sus valores MIC (Hill y col., 2013).

En primer lugar, se determinó la MIC de los terpenos libres en disolución acuosa para utilizar como controles (**Tabla VII.2**), que fueron sometidos a los protocolos de formación de complejos descritos en materiales y métodos (MWI, **sección 1.2.1**) y (solubilidad, **sección 1.2.2**), sin la adición de CDs al medio.

Como se observa en la **Tabla VII.2**, en estado libre timol sólo mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, siendo más efectivo en 1,4 veces cuando el monoterpeno se preparó por el método de solubilidad.

Con respecto a carvacrol, mostró actividad antimicrobiana frente a ambos patógenos en estado libre, necesitando menor concentración de monoterpeno libre (3,4 veces *E. coli* y 2,2 veces para *S. aureus*) como ocurría con timol, cuando se preparó por el método de solubilidad.

Sin embargo, linalol no mostró actividad antimicrobiana en estado libre, que puede justificarse por la baja concentración de linalol presente en el medio y su inestabilidad química.

Para corroborar los resultados obtenidos, a todos los pocillos donde se observó inhibición en el ensayo anterior, se les determinó la concentración bactericida mínima (MBC), utilizando placas de Petri con TSA, siguiendo el protocolo que se describe en materiales y métodos (**Capítulo III**).

**Tabla VII.2.:** Concentración mínima inhibitoria de los compuestos libres (en ausencia de CDs), frente a *E. coli* y *S. aureus*.

Monoterpeno	MIC (mM) <i>E. coli</i>		MIC (mM) <i>S. aureus</i>	
	MWI	Solubilidad	MWI	Solubilidad
<b>Timol</b>	--	--	5,59	3,92
<b>Carvacrol</b>	8,20	3,73	8,20	2,39
<b>Linalol</b>	--	--	--	--

Tras someter las placas a incubación, inoculadas previamente con timol o carvacrol (MWI y de solubilidad) para *S. aureus*, y carvacrol (MWI y de solubilidad) para *E. coli*, se observaron colonias en la superficie en todos los casos tras el período de incubación, no alcanzando por ello en estado libre la MBC que justifique su acción bactericida, probablemente debido a mermas por volatilidad en ambos casos, favorecidas por la temperatura.

Así, una vez establecida la actividad antimicrobiana basal de cada monoterpeno en ausencia de CDs, se procedió a estudiar el efecto de la presencia de HP- $\beta$ -CDs en su actividad antimicrobiana.

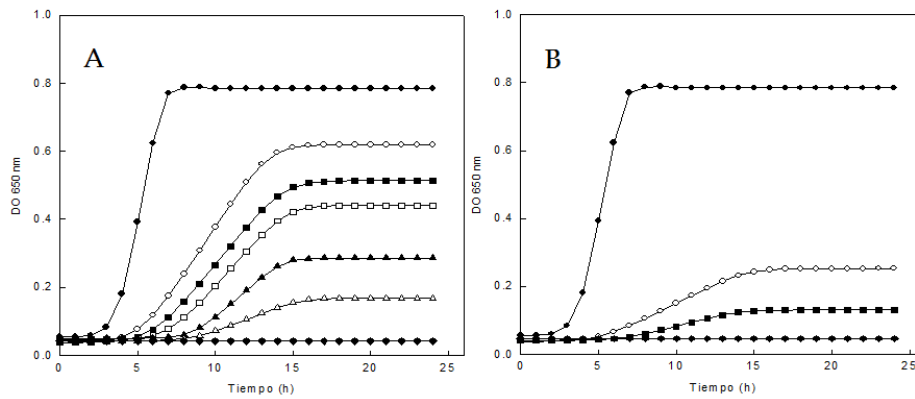
#### 1.2.1.1. Estudio con *E. coli*

Para llevar a cabo el estudio con *E. coli*, los complejos atomizados preparados por el método MWI y por el de solubilidad se disolvieron en agua destilada estéril (1:1, p/v).

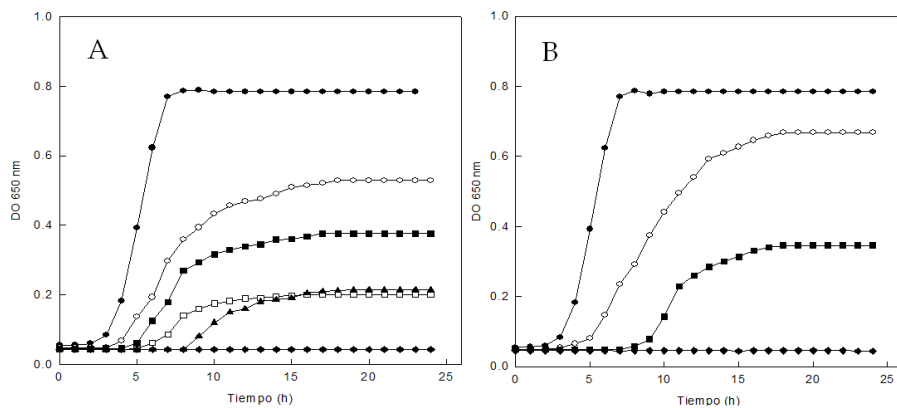
La presencia de complejos sólidos en el medio de cultivo supuso una mayor concentración de timol, carvacrol y linalol en el medio de reacción, con respecto al ensayo en ausencia de CDs, que tuvo un efecto favorable en la MIC en todos los casos.

Como se muestra en las **Figuras VII.3-5**, conforme aumenta la concentración de HP- $\beta$ -CDs en el medio, aumenta la concentración de cada uno de los monoterpenos objeto de estudio, incrementando el poder de inhibición frente a *E. coli* con respecto al control (ausencia de monoterpeno).

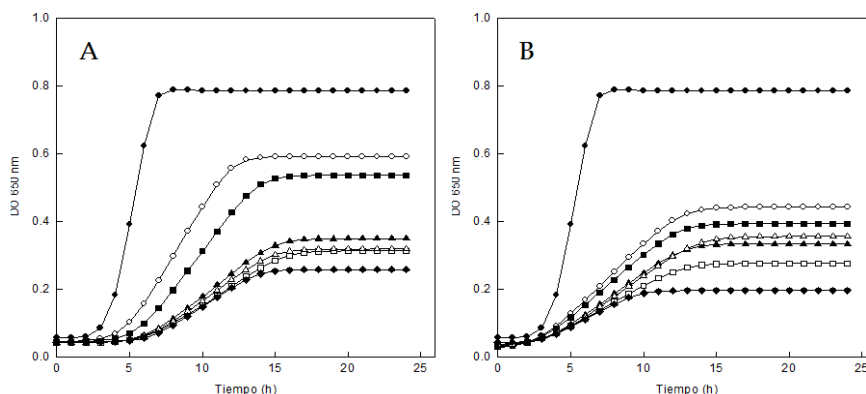
Con respecto a carvacrol complejoado, si bien observamos el mismo comportamiento general que el descrito para timol (menor concentración requerida para inhibir el crecimiento de *E. coli* cuando los complejos se obtuvieron por el método de solubilidad), se requiere aproximadamente la mitad de concentración de carvacrol complejoado (14,60 mM) por el método MWI para alcanzar la inhibición total del crecimiento, que en el caso de timol correspondía a 37,75 mM.



**Figura VII.3.:** Efecto de la concentración de timol complejo en HP-β-CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *E. coli*, (○) 1,92 mM, (■) 3,84 mM, (□) 7,68 mM, (▲) 11,45 mM, (△) 25 mM y (◆) 37,75 mM de timol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *E. coli*, (○) 0,99 mM, (■) 1,99 mM, (◆) 3,97, 6, 04; 12,52, y 20,86 mM (no mostrados), de timol.



**Figura VII.4.:** Efecto de la concentración de carvacrol complejo en HP-β-CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *E. coli*, (○) 1,25 mM, (■) 2,49 mM, (□) 4,98 mM, (▲) 6,90 mM, (◆) 14,60, y 25,03 mM (no mostrado) de carvacrol (B) por el método de solubilidad. (●) Control *E. coli*, (○) 0,95 mM, (■) 1,89 mM, (◆) 3,78, 5,87, 11,26 y 19,95 mM (no mostrados), de carvacrol.



**Figura VII.5.:** Efecto de la concentración de linalol complejo en HP- $\beta$ -CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *E. coli*, (○) 0,20 mM, (■) 0,40 mM, (□) 0,78 mM, (▲) 1,15 mM, (Δ) 1,69 mM y (◆) 3,53 mM de linalol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *E. coli*, (○) 0,84 mM, (■) 1,67 mM, (□) 3,34 mM, (▲) 5,95 mM, (Δ) 8,95 mM y (◆) 12,92 mM de linalol.

Como era de esperar para linalol, debido a su estructura y reactividad, la actividad inhibitoria para los complejos obtenidos por ambos métodos fue menos acusada que en el caso de timol y carvacrol, se demuestra que la complejación favorece la actividad antimicrobiana de este monoterpeneo, que recordemos no ejercía dicha actividad sin complejar (en estado libre), consiguiendo inhibir un 69% el crecimiento de *E. coli* tras 24 h de incubación, con una concentración 3,53 mM (complejos obtenidos por MWI) y un 78% con una concentración 12,92 mM (complejos obtenidos por método solubilidad).

Al contrario que ocurría en los dos casos anteriores, el efecto inhibitorio es más acusado para los complejos obtenidos por MWI, requiriendo en consecuencia menor concentración (aproximadamente 3 veces menos), para alcanzar una tasa inhibitoria similar.

Hay que tener en cuenta que por ambos métodos se compleja menor cantidad de éste monoterpeneo, de hecho, los valores de constante de complejación obtenidos para linalol ( $K_C = 557 \pm 16$ ) por el método de solubilidad, son muy inferiores a los alcanzados para timol ( $K_C = 2148 \pm 176$ ) y carvacrol ( $K_C =$



6909 ± 161), en consecuencia, la concentración de monoterpeno en contacto con la bacteria es bastante más baja.

A partir de las curvas de crecimiento (**Figuras VII.3-VII.5**), se determinó, en cada caso, la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y la fase lag (**Tablas VII.3-5**) para *E. coli* utilizando el modelo de ajuste propuesto por Baranyi y Roberts (1994).

**Tabla VII.3:** Velocidad de crecimiento y fase lag de timol con *E. coli*.

Timol (mM)	MWI		Timol (mM)	Solubilidad	
	$\mu$ (abs/h)	F. lag (h)		$\mu$ (abs/h)	F. lag (h)
1,92	0,0705	5,1975	0,99	0,0230	5,0973
3,84	0,0564	5,9662	1,99	0,0115	6,3952
7,68	0,0519	6,9921	3,97	0	24
11,45	0,0404	8,5086	6,04	0	24
25	0,0179	8,5368	12,52	0	24
37,75	0	24	20,86	0	24
Control	0,2367	3,5850	Control	0,2367	3,5850

Los resultados obtenidos revelan que conforme aumenta la concentración de monoterpeno en el medio, disminuye la velocidad de crecimiento de la bacteria, incrementando su capacidad inhibitoria hasta llegar a la inhibición completa.

Así, a una concentración de timol 3,84 mM, la  $\mu$  disminuye 4,2 veces para los complejos obtenidos por el método MWI, siendo bastante más significativa la reducción de  $\mu$  (20,6 veces) para los complejos obtenidos por el método de solubilidad, requiriendo para ello un 50% menos de materia activa en el medio (1,99 mM).

En el caso de carvacrol, se requiere a una concentración menor (2,49 mM) que con timol, para que la  $\mu$  experimente un retardo similar (4,3 veces) para los complejos obtenidos por el método MWI. En el ensayo realizado con los

complejos obtenidos por el método de solubilidad, la reducción de  $\mu$  (4,6 veces) fue menos acusada que para timol, si bien hay que tener en cuenta que la concentración ensayada (1,89 mM) fue inferior en 0,10 mM a la de timol.

**Tabla VII.4:** Velocidad de crecimiento y fase lag de carvacrol con *E. coli*.

Carvacrol (mM)	MWI		Carvacrol (mM)	Solubilidad	
	$\mu$ (abs/h)	F. lag		$\mu$ (abs/h)	F. lag
1,25	0,0608	3,1666	0,95	0,0679	4,3127
2,49	0,0547	4,4304	1,89	0,0508	8,0423
4,98	0,0326	5,4201	3,78	0	24
6,90	0,0253	7,3378	5,87	0	24
14,60	0	24	11,26	0	24
25,03	0	24	19,95	0	24
Control	0,2367	3,5850	Control	0,2367	3,5850

En cuanto al ensayo con linalol (Tabla VII.5), observamos que la  $\mu$  disminuye 3,97 veces (complejos obtenido por MWI) y 6,18 veces (complejos obtenidos por diagrama de fases) a 0,40 mM y 1,67 mM, respectivamente, si bien hay que resaltar que el efecto sobre la velocidad parece ser antagónico (favoreciendo la velocidad de crecimiento), a concentraciones superiores a 3,6 mM (alcanzadas en los complejos obtenidos por diagrama de fases), probablemente debido a que un aumento en el medio de moléculas de linalol favorezca la interacción entre ellas, pudiendo dar lugar a transposiciones intramoleculares (vía carbocation), reagrupamiento de los enlaces olefínicos, llegando incluso a formar derivados cíclicos, cambiando totalmente la actividad del compuesto inicial y por ende, la concentración de linalol en el medio de reacción.

**Tabla VII.5:** Velocidad de crecimiento y fase lag de linalol con *E. coli*.

Linalool (mM)	MWI		Linalool (mM)	Solubilidad	
	$\mu$ (abs/h)	F. lag		$\mu$ (abs/h)	F. lag
0,20	0,0754	4,6741	0,84	0,0429	2,7942
0,40	0,0596	5,5003	1,67	0,0383	2,8319
0,78	0,0289	6,1744	3,34	0,0246	2,8628
1,15	0,0347	6,1126	5,95	0,0315	3,1986
1,69	0,0318	6,1761	8,95	0,0311	3,4299
3,53	0,0288	6,3774	12,92	0,0233	3,0950
Control	0,2367	3,5850	Control	0,2367	3,5850

En general y a la vista de los resultados obtenidos para los tres compuestos objeto de estudio, la diferencia observada entre ambos métodos puede ser debida a la velocidad con la que se libera el monoterpeno de la cavidad de HP- $\beta$ -CDs (Hedges y col., 1995), mostrando mayor capacidad antimicrobiana los complejos sólidos de timol y carvacrol preparados por el método de solubilidad.

Este efecto ha sido descrito previamente por Tao y col. (2014), en el que evaluaron la actividad antimicrobiana de los complejos de timol y AE de tomillo en  $\beta$ -CDs obtenidos por varios métodos, evidenciando que la MIC no sólo dependía del método de preparación de los complejos de inclusión, sino también de la velocidad de liberación del compuesto objeto de estudio.

Además, observamos que para timol y carvacrol, la fase lag de *E. coli* (3,58 min/control) aumenta a medida que disminuye la  $\mu$ , coincidiendo con el incremento en el medio de complejos (mayor concentración), con respecto al control, pasando a 8,53 y 7,34 h para el método MWI y a 6,59 y 8,08 h para el método de solubilidad, para timol y carvacrol respectivamente; siendo menos acusado para linalol (6,3774 h por el método MWI), no observando retardo en el crecimiento respecto al control de *E. coli*, con los complejos obtenidos por el método de solubilidad, a pesar de que comentamos anteriormente, si tiene

influencia favorable (retardo) en la velocidad de crecimiento hasta una cierta concentración, pasando al superarla a ejercer un efecto antagónico.

Como se observa en las **Tablas VII. 3 y 4**; a partir de una concentración de 3,97 mM de timol y 3,78 de carvacrol para los complejos obtenidos por el método de solubilidad, conseguimos inhibir totalmente el crecimiento de la bacteria a lo largo de las 24 horas programadas para el estudio, efecto no observado para linalol.

Por lo tanto, si comparamos los resultados relativos a la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* para los complejos obtenidos por ambos métodos, encontramos diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Así, se evidenció que los complejos de timol y carvacrol obtenidos por el método de solubilidad ejercían mayor actividad antimicrobiana que los preparados por MWI, ya que a partir de una concentración 10 mM de HP- $\beta$ -CDs se obtuvo una  $\mu = 0$ , para los complejos sólidos de timol (3,97 mM) y carvacrol (3,78 mM) con *E.coli*, concentraciones de los monoterpenos 9,5 (timol) y 3,8 (carvacrol) veces inferiores, a las requeridas para los complejos obtenidos por MWI. Sin embargo, para linalol, si bien se ralentiza la velocidad de crecimiento, en ningún caso  $\mu = 0$ .

Recapitulando, sólo los complejos de timol y carvacrol exhiben acción bacteriostática sobre *E. coli*, resultados que concuerdan con los descritos en la bibliografía por otros autores para los monoterpenos libres, evidenciando la acción bacteriostática de carvacrol (MBC = 150 mg/kg) y timol (MBC = 250 mg/kg) de forma aislada, así como sus mezclas (75 mg/kg carvacrol/62,5 mg/kg timol) sobre *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (García-García, López-Malo y Palou, 2011).

Como se muestra en la **Tabla VII.6**, la MIC obtenida para carvacrol complejo es inferior a la obtenida en ausencia de CDs (**Tabla VII.2**).

**Tabla VII.6.:** Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida para *E. coli* de los complejos de monoterpenos obtenidos por ambos métodos.

Monoterpeno	MIC (mM) <i>E. coli</i>		MBC (mM) <i>E. coli</i>	
	MWI	DF	MWI	DF
<b>Timol</b>	6,68	3,82	13,37	3,87
<b>Carvacrol</b>	4,63	2,44	9,26	2,51
<b>Linalool</b>	--	--	--	--

En el caso de timol, si bien en ausencia de CDs no se alcanza la MIC, al estar complejado en CDs se alcanza una MIC a una concentración 6,68 mM y 3,82 mM, para el método MWI y el de solubilidad, respectivamente. Puesto que timol y carvacrol son isómeros, podríamos suponer que su acción antimicrobiana debería ser similar. Sin embargo, evaluando los resultados obtenidos en este estudio se comprueba que la MIC de timol es mayor (necesita mayor concentración para ejercer la actividad antimicrobiana), que la requerida para carvacrol, justificando estos resultados que la posición del grupo  $-OH$  es determinante en su acción antimicrobiana (**Figura VII.2**).

Determinada la MIC para cada compuesto, se procedió a evaluar la concentración bactericida mínima (MBC) en placas de Petri con TSA. Así, a aquellos pocillos donde se observó inhibición en el ensayo MIC, se les determinó la capacidad bactericida mediante la difusión de 0,1 mL de cada pocillo, conteniendo la concentración correspondiente de carvacrol o timol monoterpeno complejado, en placas de Petri con TSA y se incubaron durante 24 horas a 35 °C, tal y como se describe en materiales y métodos (**Capítulo III**).

Como se puede observar en la **Tabla VII.6**, los resultados obtenidos evidencian que timol y carvacrol no solo tienen efecto bacteriostático sino que además ejercen un efecto bactericida sobre *E. coli*, al no aparecer crecimiento en placa, resultados que concuerdan con los descritos por Tao y col., 2014 para la misma bacteria con timol y el aceite esencial de tomillo complejado en  $\beta$ -CDs, o

los descritos para complejos de carvacrol en  $\beta$ -CDs frente a *E. coli* y *Salmonella entérica* (Santos y col, 2015).

En ambos casos la MBC es mayor a la MIC, ya que se requiere mayor concentración de monoterpeno para que ejerzan la acción bactericida, siendo ambas menores para carvacrol que para timol. Por lo tanto, la encapsulación de timol y carvacrol con CDs no solo no afecta a su capacidad antimicrobiana, sino que la mejora, ya que ambos complejos ejercen su acción frente a *E. coli* a concentraciones mucho más bajas que las correspondientes a los monoterpenos libres o sus aceites esenciales (Tao y col., 2014; Marchese y col., 2016).

Una vez calculadas MIC y MBC para *E. coli*, se llevó a cabo un estudio para comprobar el efecto antimicrobiano de combinaciones de timol, carvacrol y linalol. Para ello se utilizaron combinaciones de los distintos AE complejados (1:1; 1:2; 1:5; 2:1 y 5:1), previo a la dilución (1:1) con agua destilada estéril. Una vez disueltas las mezclas, se determinó la concentración real de cada combinación por GC-MS (% área), evaluando posteriormente su eficacia mediante el método de dilución de caldo (Brandt y col 2010).

Para evaluar el efecto antimicrobiano de las combinaciones ensayadas se utilizó el índice de mínima concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) como se describe en materiales y métodos (**Capítulo III**), utilizando los valores MIC determinados previamente para los monoterpenos aislados y los calculados para sus respectivas combinaciones (**TablasVII.7-8**). En algunas combinaciones con linalol, no fue matemáticamente posible obtener valor de CIF (Ecuación III.6, materiales y métodos), ya que no pudo determinarse previamente la MIC en el ensayo con el monoterpeno aislado, representado en las **TablasVII.7-8** por NI.

En función del valor obtenido para CIF, a la combinación ensayada se le asignó o no efecto antimicrobiano atendiendo al siguiente criterio: *i*) si  $CIF \leq 1$  habrá sinergia; *ii*) si  $CIF = 1$  habrá efecto aditivo; *iii*) si  $1 < CIF < 2$  no habrá efecto (indiferencia); *iv*) y para valores de  $CIF > 2$ , el efecto será antagónico (Pei y col., 2009).

**Tabla VII.7:** Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP- $\beta$ -CD- (timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método MWI sobre *E. coli*.

Método	Combinación	<sup>1</sup> Ratio de combinación	MIC (mM)	CIF	Efecto	
MWI	Timol/Carvacrol	5:1	(85-15)%	2,55/0,45	0,44	Sinergia
		2:1	(70-30)%	2,55/1,17	0,63	Sinergia
		1:1	(50-50)%	4,82/1,80	0,75	Sinergia
		1:2	(30-70)%	2,41/2,35	0,87	Sinergia
		1:5	(17-83)%	2,41/2,93	0,99	Sinergia
	Timol/Linalol	5:1	(95-5)%	9,64/--	1,45	Indiferencia
		2:1	(80-20)%	20,42/--	3,06	Antagónico
		1:1	(55-45)%	--	NI	--
		1:2	(37-63)%	--	NI	--
		1:5	(10-90)%	--	NI	--
	Carvacrol/Linalol	5:1	(98-2)%	5,86/--	1,26	Indiferencia
		2:1	(80-20)%	--	NI	--
		1:1	(57-43)%	--	NI	--
		1:2	(34-66)%	--	NI	--
		1:5	(15-85)%	--	NI	--

<sup>1</sup>Ratio: % de monoterpeno determinados por GC-MS. NI: no fue posible el cálculo de CIF; (-): no alcanzada la MIC.

Al analizar los resultados obtenidos se observa una interacción aditiva cuando el efecto de la combinación de ambos monoterpenos es igual a la suma de sus efectos individuales. El antagonismo se manifiesta cuando el efecto de uno o ambos componentes es menor al aplicarse juntos que cuando se hace por separado, al contrario que cuando observamos un efecto sinérgico, a consecuencia de que el efecto antimicrobiano combinado de ambas sustancias es más efectivo que la suma de sus efectos individuales respectivos (Burt, 2004); por último, la ausencia de interacción se expresa como indiferencia (Bassolé y Juliani, 2012).

Como se observa en la **Tabla VII.7**, todas las combinaciones evaluadas de timol y carvacrol revelan un efecto sinérgico ( $CIF \leq 1$ ), quedando la última combinación ensayada (1:5) muy próxima al efecto aditivo ( $CIF = 1$ ), evidenciando así que la presencia de ambos complejos de inclusión potencia su efecto antimicrobiano. Los resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía por

otros autores, encontrando interacciones aditivas y sinérgicas para estos monoterpenos isómeros (Azeredo y col., 2011; Bassolé y Juliani, 2012; Hyldgaard y col., 2012).

Así, si comparamos los valores de MIC frente a *E. coli* de los complejos de timol y carvacrol obtenidos por el método de MWI, aislados y combinados (**Tablas VII.6-7**), se obtiene en todas las combinaciones ensayadas una MIC bastante inferior, como ocurre por ejemplo con la combinación (5:1) de (timol:carvacrol), que corresponde a una concentración (85%-15%, determinada por GC-MS) en el medio de reacción; requiriendo para carvacrol una MIC de 0,45 mM, un 90% menos de monoterpeno que cuando actúa de forma aislada (MIC = 4,63 mM), y 2,55 mM de timol, que corresponde a un 62% menos de monoterpeno que cuando actúa de forma aislada (MIC = 6,68 mM).

Estos resultados evidencian el marcado efecto inhibitorio frente a *E. coli* de las combinaciones de carvacrol y timol, similares a los valores obtenidos por Pei y col., (2009), para combinaciones de timol y carvacrol frente a la misma bacteria, en ausencia de CDs.

Con respecto a las mezclas de linalol con carvacrol y timol, ninguna de las combinaciones ensayadas mostró resultados favorables, descartando estas combinaciones para posibles aplicaciones en muestras reales.

Sin embargo, en los complejos preparados por el método de solubilidad (**Tabla VII.8**), para las combinaciones de timol-carvacrol no solo aparece el efecto sinérgico como ocurría con los obtenidos por el método MWI, sino que también se aprecia indiferencia y antagonismo, a medida que incrementamos la concentración de carvacrol.

Para justificar este comportamiento partimos en primer lugar de los valores de MIC (**Tabla VII.6**) obtenidos para los complejos de timol (3,82) y carvacrol (2,44) por diagrama de fases, valores inferiores en un 50% aproximadamente a los requeridos para los complejos obtenidos por el método MWI (MIC = 6,68 para timol y MIC = 4,63 para carvacrol).



**Tabla VII.8:** Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP- $\beta$ -CD- (timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método de solubilidad sobre *E. coli*.

Método	Combinación	<sup>1</sup> Ratio de combinación	MIC (mM)	CIF	Efecto	
Solubilidad	Timol/Carvacrol	5:1	(90-10)%	1,79/0,37	0,84	Sinergia
		2:1	(71-29)%	0,90/0,53	0,46	Sinergia
		1:1	(50-50)%	0,90/1,23	0,74	Sinergia
		1:2	(36-64)%	2,77/2,12	1,59	Indiferencia
		1:5	(28-72)%	2,77/4,91	2,73	Antagónico
	Timol/Linalol	5:1	(95-5)%	2,44/0,52	0,64	Sinergia
		2:1	(80-20)%	3,59/0,87	0,94	Sinergia
		1:1	(53-47)%	14,3/10,7	3,75	Antagónico
		1:2	(38-62)%		NI	--
		1:5	(28-72)%		NI	--
	Carvacrol/Linalol	5:1	(86-14)%	9,81/0,52	4,02	Antagónico
		2:1	(78-22)%	19,6/3,47	8,04	Antagónico
		1:1	(57-43)%	19,6/10,7	16,04	Antagónico
		1:2	(35-65)%		NI	--
		1:5	(15-85)%		NI	--

<sup>1</sup>Ratio: % de monoterpeno determinados por GC-MS. NI: no fue posible el cálculo de CIF; (-): no alcanzada la MIC.

Estos resultados apoyan la presencia en disolución de mayor concentración de monoterpeno cuando se obtienen por el método de solubilidad (equilibrio), ya que en este caso no forzamos la entrada del compuesto en la cavidad hidrófoba de la CD incrementando la temperatura, como ocurre con el método MWI.

Llegados a este punto debemos tener en cuenta que a pesar de que habitualmente determina la estequiometría de los complejos y sus respectivas constantes de estabilidad a partir de los diagramas de fases (solubilidad del compuesto frente a la concentración de ciclodextrinas), en ocasiones se encuentran discrepancias en los valores de constante calculados por diferentes autores (Loftsson, Magnusdottir, Masson, y Sigurjonsdottir, 2002), motivados por un error de concepto.

Atendiendo a la química clásica de la ciclodextrina, se supone habitualmente que cuando una molécula apolar forma un complejo con la ciclodextrina, algún resto lipofílico de la misma entra en su cavidad hidrófoba. En

otras palabras, que siempre y “sólo” se forma un complejo de inclusión, y que una vez formados se encuentran en una solución ideal, donde los complejos individuales son independientes entre sí. Diferentes trabajos revelan que este comportamiento descrito es una simplificación significativa de un sistema mucho más complejo y nos llevan a subestimar el valor de constante calculado.

Así, las ciclodextrinas son capaces de formar con la molécula huésped complejos tanto de inclusión como de no inclusión. Además, las ciclodextrinas y sus complejos forman agregados solubles en agua en disoluciones acuosas, y estos agregados son capaces también de solubilizar moléculas lipófilas insolubles en agua mediante complejación sin inclusión en su cavidad o mediante la formación de estructuras similares a micelas (Loftsson, Jarho, Masson, y Järvinen, 2005), justificando de este modo la mayor presencia de monoterpenos en disolución cuando los complejos se obtienen por diagrama de fases, ya que probablemente haya más moléculas en el interior de la cavidad apolar que cuando se obtienen bajo condiciones forzadas (mayor  $T^a$  por MWI), quedando en este último caso más moléculas en el exterior de la cavidad formando complejos sin inclusión o estructuras micelares, disminuyendo la capacidad de actuación de la CD como bomba depósito de monoterpeno, requiriendo por ello mayor concentración de los mismos para alcanzar la MIC por MWI.

Otro factor a tener en cuenta es el valor de constante ( $K_c$ ) determinado para cada monoterpeno por el método de solubilidad,  $2148 \pm 176$  para timol y  $6909 \pm 161$  para carvacrol. Observamos que la capacidad de carvacrol para introducirse en el interior de HP- $\beta$ -CDs es el doble que la de timol.

En consecuencia, la sinergia entre ambos es efectiva hasta sobrepasar el 50% de carvacrol, observando indiferencia con el 64% de carvacrol y un efecto antagónico por encima del 72%. Este comportamiento justificable por el hecho de que a medida que aumentamos la concentración de este monoterpeno, su mayor avidez por la cavidad apolar de las CDs (50% superior a la de timol), favorezca la competencia con las moléculas de agua, que están en cantidad limitante, por introducirse en la cavidad apolar de las CDs ocupadas por timol, disminuyendo así la concentración efectiva de carvacrol en disolución acuosa; efecto que es de esperar sea más acusado cuanto mayor sea la concentración de carvacrol en la

mezcla y por ende, menor la de timol, justificando así el comportamiento antagónico.

Curiosamente, las mayores reducciones se observaron siempre en combinaciones de concentraciones más bajas de carvacrol. Estos resultados podrían ser el resultado de la saturación de las dianas celulares disponibles, que limitan la acción de los monoterpenos ensayados en las células bacterianas de *E. coli*, tras la perturbación inicial de la membrana (Juven y col., 1994).

Así, podemos afirmar que la concentración de carvacrol en las mezclas con timol es limitante para alcanzar la sinergia frente a *E. coli*, no recomendando combinaciones que sobrepasen el 50% de carvacrol.

Es importante resaltar que con los complejos obtenidos mediante diagrama de fases, se aprecia efecto sinérgico para dos combinaciones de timol con linalol, no recomendando superar el 20% de éste último en la mezcla, ya que deja de ser efectiva frente a *E. coli*.

Sin embargo, sus mezclas con carvacrol no mostraron un incremento de la actividad antimicrobiana, sino efecto antagónico hasta el 60% de carvacrol, debido probablemente, como se ha descrito anteriormente, a la avidez de carvacrol por la cavidad apolar de las CDs, no observando efecto alguno a concentraciones inferiores de este monoterpeno.

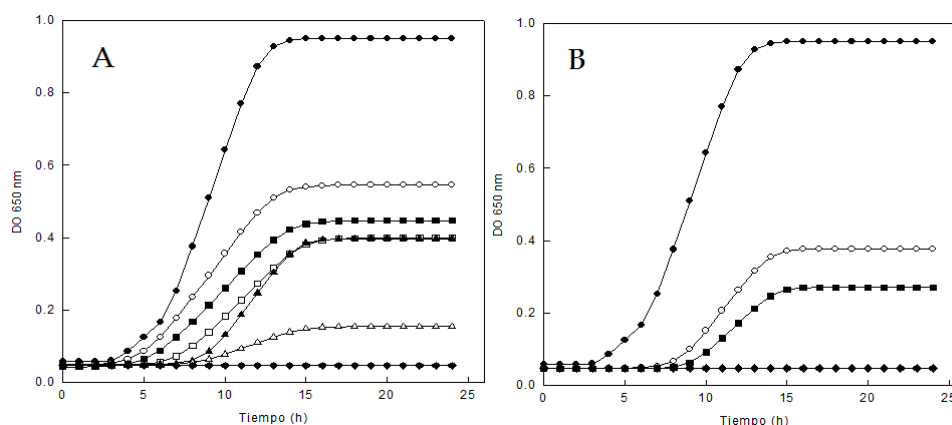
#### 1.2.1.2. Estudio con *S. aureus*

Para llevar a cabo el estudio con *S. aureus*, se procedió de forma similar al ensayo realizado con *E. coli*, disolviendo en primer lugar los complejos en estado sólido preparados por ambos métodos (MWI y solubilidad) en agua destilada estéril (1:1, p/v).

De nuevo, la presencia de complejos sólidos en el medio de cultivo supuso una mayor concentración de timol, carvacrol y linalol en el medio de reacción, con respecto al ensayo en ausencia de CDs, que tuvo un efecto favorable en la MIC en todos los casos.

Como se muestra en las **Figuras VII.6-8**, conforme aumenta la concentración de HP- $\beta$ -CDs en el medio, aumenta la concentración de cada uno

de los monoterpenos objeto de estudio, incrementando el poder de inhibición frente a *S. aureus* respecto al control (ausencia de monoterpeno).

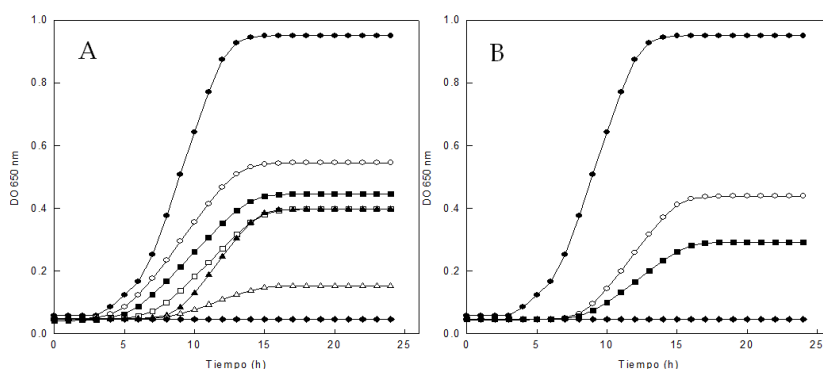


**Figura VII.6.:** Efecto de la concentración de timol complejo en HP- $\beta$ -CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *S. aureus*, (○) 1,92 mM, (■) 3,84 mM, (□) 7,68 mM, (▲) 11,45 mM, (△) 25 mM y (◆) 37,75 mM de timol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *S. aureus*, (○) 0,99 mM, (■) 1,99 mM, (◆) 3,97, 6,04, 12,52 y 20,86 mM (no mostrados), de timol.

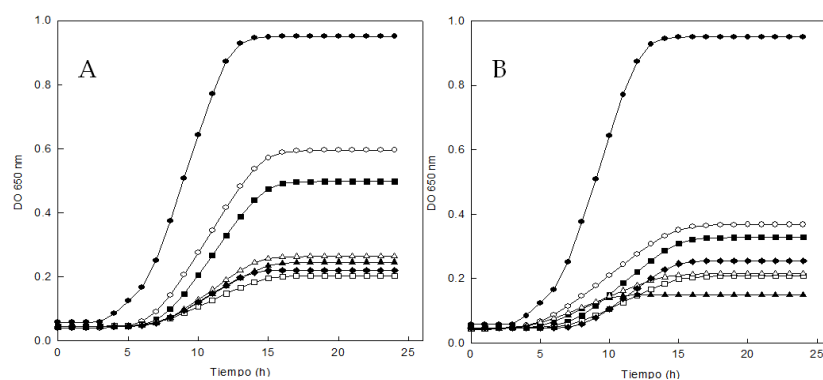
Si nos fijamos en las **Figuras VII.6 y VII.7**, observamos el mismo comportamiento para timol y carvacrol complejados, es decir, se requiere mucha menor concentración para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, cuando los complejos se obtuvieron por el método de solubilidad.

Al igual que ocurría al ensayar el efecto inhibitorio de los complejos de linalol frente a *E. coli*, la elevada reactividad de este compuesto condiciona su capacidad para incluirse en la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina ( $K_C = 557 \pm 16$ , por el método de solubilidad), del orden de 2 y 5 veces inferior a la alcanzada con timol y carvacrol respectivamente y en consecuencia, justifica su menor capacidad para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. A pesar de ello, la complejación posibilita que linalol ejerza actividad antimicrobiana, actividad no observada en ausencia de HP- $\beta$ -CDs. Así, para los complejos de linalol se consigue reducir el crecimiento de *S. aureus* un 75% y un 85% a concentraciones de 0,78 mM (método MWI) y 5,95 (método de solubilidad), respectivamente,

reduciendo su capacidad de inhibición a concentraciones superiores a las descritas para los complejos obtenidos por ambos métodos.



**Figura VII.7.:** Efecto de la concentración de carvacrol complejo en HP- $\beta$ -CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *S. aureus*, (○) 1,25 mM, (■) 2,49 mM, (□) 4,98 mM, (▲) 6,90 mM, (Δ) 14,60 mM y (◆) 25,03 mM de carvacrol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *S. aureus*, (○) 0,95 mM, (■) 1,89 mM, (◆) 3,78, 5, 87, 11,26 y 19,95 mM (no mostrados), de carvacrol.



**Figura VII.8.:** Efecto de la concentración de linalol complejo en HP- $\beta$ -CDs en su capacidad antimicrobiana por el método MWI. (A) (●) Control *S. aureus*, (○) 0,20 mM, (■) 0,40 mM, (□) 0,78 mM, (▲) 1,15 mM, (Δ) 1,69 mM y (◆) 3,53 mM de linalol. (B) por el método de solubilidad. (●) Control *S. aureus*, (○) 0,84 mM, (■) 1,67 mM, (□) 3,34 mM, (▲) 5,95 mM, (Δ) 8,95 mM y (◆) 12,92 mM de linalol.

Como podemos observar **Tablas VII.9**, a medida que aumenta la concentración de timol en el medio, disminuye la velocidad de crecimiento de *S.*

*aureus*, incrementando su capacidad inhibitoria hasta llegar a la inhibición completa. Así, a una concentración de timol 3,84 mM, la  $\mu$  disminuye 2,85 veces para los complejos obtenidos por el método MWI, siendo similar la reducción de  $\mu$  (3,24 veces) para los complejos obtenidos por el método de solubilidad, requiriendo para ello un 50% menos de materia activa en el medio (1,99 mM).

**Tabla VII.9.:** Velocidad de crecimiento y fase lag de timol con *S.aureus*.

Timol (mM)	MWI		Timol (mM)	Solubilidad	
	$\mu$ (abs/h)	F. lag		$\mu$ (abs/h)	F. lag
1,92	0,0618	5,0006	0,99	0,0580	8,2605
3,84	0,0481	5,4649	1,99	0,0422	9,0234
7,68	0,0462	7,0984	3,97	0	24
11,45	0,0599	8,7102	6,04	0	24
25	0,0159	8,0643	12,52	0	24
37,75	0	24	20,86	0	24
Control	0,1368	6,8624	Control	0,1368	6,8624

**Tabla VII.10.:** Velocidad de crecimiento y fase lag de carvacrol con *S. aureus*.

Carvacrol (mM)	MWI		Carvacrol (mM)	Solubilidad	
	$\mu$ (abs/h)	F. lag		$\mu$ (abs/h)	F. lag
1,25	0,06180	5,0005	0,95	0,0598	8,4261
2,49	0,04810	5,4640	1,89	0,0350	8,5874
4,98	0,0461	7,0984	3,78	0	24
6,90	0,0599	8,7102	5,87	0	24
14,60	0,0159	8,0643	11,26	0	24
25,03	0	24	19,95	0	24
Control	0,1368	6,8624	Control	0,1368	6,8624

Con respecto a carvacrol, se requiere a una concentración menor (2,49 mM) que con timol, para que la  $\mu$  experimente un retardo similar (2,8 veces) para los complejos obtenidos por el método MWI.

En el ensayo realizado con los complejos obtenidos por el método de solubilidad, se observa una reducción de  $\mu$  (3,9 veces) respecto a la de timol, requiriendo para ello una concentración de carvacrol 1,89 mM, inferior en 0,10 mM a la de timol.

**Tabla VII.11.:** Velocidad de crecimiento y fase lag de linalol con *S. aureus*.

Linalool (mM)	MWI		Linalool (mM)	Solubilidad	
	$\mu$ (abs/h)	F. lag		$\mu$ (abs/h)	F. lag
0,20	0,0718	6,7330	0,84	0,0338	5,0684
0,40	0,0628	7,4608	1,67	0,0362	7,1777
0,78	0,0204	7,0064	3,34	0,0210	7,1774
1,15	0,0264	7,2127	5,95	0,0206	5,0449
1,69	0,0319	7,4169	8,95	0,0218	4,2045
3,53	0,0276	7,2820	12,92	0,0326	8,2164
Control	0,1368	6,8624	Control	0,1368	6,8624

En cuanto al ensayo con linalol (Tabla VII.11), observamos que la  $\mu$  para *S. aureus* disminuye 2,17 veces (complejos obtenido por MWI) y 3,78 veces (complejos obtenidos por diagrama de fases) a 0,40 mM y 1,67 mM, respectivamente, si bien hay que resaltar que el efecto sobre la velocidad parece ser antagónico (favoreciendo la velocidad de crecimiento), a concentraciones de los complejos superiores a 5,95 mM (obtenidos por diagrama de fases) y 1,15 mM (obtenidos por MWI), probablemente debido a que un aumento en el medio de moléculas de linalol favorezca la interacción entre ellas, como se describió en el caso de *E. coli*; cambiando totalmente la actividad del compuesto inicial y por ende, la concentración de linalol en el medio de reacción.

La diferencia en el efecto antimicrobiano observada entre ambos métodos de formación de complejos puede justificarse por la velocidad con la que se libera el monoterpeno de la cavidad de HP- $\beta$ -CDs (Tao y col., 2014), mostrando mayor capacidad antimicrobiana los complejos sólidos de timol y carvacrol preparados por el método de solubilidad.

Si nos fijamos en la fase lag de *S. aureus* (6,8624 min/control), para timol y carvacrol aumenta a medida que disminuye la  $\mu$ , coincidiendo con el incremento en el medio de complejos (mayor concentración), con respecto al control, pasando a 8,0643 h para el método MWI y a 9,0234 y 8,5874 h para el método de solubilidad, para timol y carvacrol respectivamente; siendo menos acusado para linalol (7,4608 h por el método MWI y 8,2164 h por el método de solubilidad).

Como se observa en las **Tablas VII. 9 y 10**; a partir de una concentración de 3,97 mM de timol y 3,78 mM de carvacrol para los complejos obtenidos por el método de solubilidad, conseguimos inhibir totalmente el crecimiento de *S. aureus* a lo largo de las 24 horas programadas para el estudio, efecto no observado para linalol.

Así, si comparamos los resultados de actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* para los complejos obtenidos por ambos métodos, encontramos diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Así, se evidenció que los complejos de timol y carvacrol obtenidos por el método de solubilidad ejercían mayor actividad antimicrobiana que los preparados por MWI, ya que a partir de una concentración 10 mM de HP- $\beta$ -CDs se obtuvo una  $\mu = 0$ , para los complejos sólidos de timol (3,97 mM) y carvacrol (3,78 mM) con *S. aureus*, concentraciones de los monoterpenos 9,5 (timol) y 6,6 (carvacrol) veces inferiores, a las requeridas para los complejos obtenidos por MWI. Sin embargo, para linalol, si bien se observa un retardo en la velocidad de crecimiento, en ningún caso  $\mu = 0$ .

En resumen, sólo los complejos de timol y carvacrol exhiben acción bacteriostática sobre *S. aureus*, obteniendo valores de MIC ligeramente inferiores a los alcanzados en ausencia de HP- $\beta$ -CDs (**Tabla VII.12**); resultados que concuerdan con los descritos en la bibliografía por otros autores para los monoterpenos libres, evidenciando la acción bacteriostática de carvacrol y timol (3,5-7,0% en peso), incorporados a films poliméricos (EVA) frente a *S. epidermis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli* (Nostro y col., 2012).



En el caso de timol complejado, se alcanza la MIC a una concentración 4,83 mM para el método MWI, frente a 5,59 mM para timol libre y 3,91 mM para el método de solubilidad, valor similar al obtenido para el monoterpeno libre. En cambio, los valores de MIC obtenidos para carvacrol por el MWI son tres unidades superiores a los descritos para timol, tanto en su forma libre como complejada; sin embargo, por el método de solubilidad, la de carvacrol es aproximadamente una unidad inferior a la de timol.

**Tabla VII.12.:** Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida frente a *S. aureus*.

Monoterpeno	MIC (mM) <i>S. aureus</i>		MBC (mM) <i>S. aureus</i>	
	MWI	DF	MWI	DF
<b>Timol</b>	4,83	3,91	4,83	6,12
<b>Carvacrol</b>	7,04	2,61	7,04	3,14
<b>Linalool</b>	--	--	--	--

Determinada la MIC para cada compuesto, se procedió a evaluar la concentración bactericida mínima (MBC) en placas de Petri con TSA. Así, a aquellos pocillos donde se observó inhibición en el ensayo MIC, se les determinó la capacidad bactericida mediante la difusión de 0,1 mL de cada pocillo, conteniendo la concentración correspondiente de carvacrol o timol monoterpeno complejado, en placas de Petri con TSA y se incubaron durante 24 horas a 35 °C, tal y como se describe en materiales y métodos (**Capítulo III**).

Como se puede observar en la **Tabla VII.12**, los resultados obtenidos evidencian que timol y carvacrol no solo tienen efecto bacteriostático sino que además ejercen un efecto bactericida sobre *S. aureus*, al no aparecer crecimiento en placa, resultados que concuerdan con los descritos por de Oliveira y col., 2010; Ait-Ouazzou y col., 2011 y Pesavento y col., 2015, que evidencian la acción antimicrobiana de los aceites esenciales de tomillo, orégano y romero, y los monoterpenos timol y carvacrol frente a *S. aureus* y *Listeria monocitogenes*.

Si bien en ambos casos la MBC coincide con la MIC para los complejos obtenidos por el método MWI, la MBC es superior (se requiere mayor concentración de monoterpeno para que ejerzan la acción bactericida), cuando los complejos se obtienen por el método de solubilidad. Por lo tanto, la encapsulación de timol y carvacrol con CDs no solo no afecta a su capacidad antimicrobiana, sino que la mejora, ya que ambos complejos ejercen su acción frente a *S. aureus* a concentraciones ligeramente inferiores a las correspondientes a los monoterpenos libres (Tao y col., 2014; Marchese y col., 2016).

Una vez calculadas MIC y MBC para *S. aureus*, se llevó a cabo un estudio para comprobar el efecto antimicrobiano de combinaciones de timol, carvacrol y linalol. Para ello se utilizaron combinaciones de los distintos AE complejados (1:1; 1:2; 1:5; 2:1 y 5:1), previo a la dilución (1:1) con agua destilada estéril. Una vez disueltas las mezclas, se determinó la concentración real de cada combinación por GC-MS (% área), evaluando posteriormente su eficacia mediante el método de dilución de caldo (Brandt y col 2010).

Para evaluar el efecto antimicrobiano de las combinaciones ensayadas se utilizó el índice de mínima concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) como se describe en materiales y métodos (**Capítulo III**), utilizando los valores MIC determinados previamente para los monoterpenos aislados y los calculados para sus respectivas combinaciones (**Tablas VII.13-14**). En algunas combinaciones con linalol, no fue matemáticamente posible obtener valor de CIF (Ecuación III.6, materiales y métodos), ya que no pudo determinarse previamente la MIC en el ensayo con el monoterpeno aislado, representado en las **Tablas VII.13-14** por NI.

Como se observa en la **Tabla VII.13**, todas las combinaciones evaluadas de complejos de timol y carvacrol preparados por el método de MWI, revelan un efecto sinérgico ( $CIF \leq 1$ ) sobre *S. aureus*, siendo la combinación 1:2 (timol:carvacrol) la que mostró menor concentración inhibitoria fraccionaria (<CIF), evidenciando así que la presencia de ambos complejos de inclusión potencia su efecto antimicrobiano. Los resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía por otros autores, encontrando sinérgicas para combinaciones de estos monoterpenos isómeros frente a diferentes microorganismos, entre ellos *S. aureus* (Bassolé y Juliani, 2012; Hyldgaard y col., 2012).

**Tabla VII.13:** Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP- $\beta$ -CD- (timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método MWI sobre *S. aureus*.

Método	Combinación	<sup>1</sup> Ratio de combinación	MIC (mM)	CIF	Efecto	
MWI	Timol/Carvacrol	5:1	(85-15)%	2,55/0,45	0,59	Sinergia
		2:1	(75-25)%	2,41/0,90	0,63	Sinergia
		1:1	(50-50)%	2,55/1,17	0,70	Sinergia
		1:2	(40-60)%	1,21/1,17	0,42	Sinergia
		1:5	(30-70)%	1,21/2,93	0,67	Sinergia
	Timol/Linalol	5:1	(95-5)%	4,82/0,25	0,99	Sinergia
		2:1	(80-20)%	10,21/5,3	2,11	Antagónico
		1:1	(60-40)%	--	NI	--
		1:2	(55-45)%	--	NI	--
		1:5	(27-73)%	--	NI	--
	Carvacrol/Linalol	5:1	(95-5)%	5,85/0,12	0,83	Sinergia
		2:1	(80-20)%	23,41/5,3	4,85	Antagónico
		1:1	(57-43)%	--	NI	--
		1:2	(35-65)%	--	NI	--
		1:5	(15-85)%	--	NI	--

<sup>1</sup>Ratio: % de monoterpeno determinados por GC-MS. NI: no fue posible el cálculo de CIF; (-): no alcanzada la MIC.

Así, si comparamos los valores de MIC frente a *S. aureus* de los complejos de timol y carvacrol obtenidos por el método de MWI, aislados y combinados (Tablas VII.12-13), se obtiene en todas las combinaciones ensayadas una MIC bastante inferior, como ocurre por ejemplo con la combinación (5:1) de (timol:carvacrol), que corresponde a una concentración (85%-15%, determinada por GC-MS) en el medio de reacción; requiriendo para carvacrol una MIC de 0,45 mM, un 94% menos de monoterpeno que cuando actúa de forma aislada (MIC = 7,04 mM), y 2,55 mM de timol, que corresponde a un 47% menos de monoterpeno que cuando actúa de forma aislada (MIC = 4,83 mM).

Con respecto a las mezclas de linalol con carvacrol y timol, sólo en aquellas combinaciones donde la concentración de linalol era baja (5%) se observó efecto sinérgico, que se convirtió en antagónico a una concentración del 20%, no alcanzando la MIC en el resto de combinaciones.

Si nos fijamos ahora en los complejos preparados por el método de solubilidad (Tabla VII.14), para las combinaciones de timol-carvacrol no solo aparece el efecto sinérgico como ocurriría con los obtenidos por el método MWI, sino que también se aprecia indiferencia, a medida que incrementamos la concentración de carvacrol.

**Tabla VII.14:** Efecto antimicrobiano de combinaciones de complejos de HP- $\beta$ -CD- (timol, carvacrol y linalol), obtenidos por el método de solubilidad sobre *S. aureus*.

Método	Combinación	<sup>1</sup> Ratio de combinación	MIC (mM)	CIF	Efecto	
Solubilidad	Timol/Carvacrol	5:1	(93-7)%	1,79/0,37	0,60	Sinergia
		2:1	(71-29)%	1,79/1,06	0,87	Sinergia
		1:1	(50-50)%	1,79/2,45	1,40	Indiferencia
		1:2	(46-54)%	2,77/2,12	1,52	Indiferencia
		1:5	(28-72)%	1,38/2,45	1,29	Indiferencia
	Timol/Linalol	5:1	(95-5)%	4,88/1,03	0,80	Sinergia
		2:1	(80-20)%	7,17/1,74	1,17	Indiferencia
		1:1	(53-47)%	14,3/10,7	3,67	Antagónico
		1:2	(28-72)%	--	NI	--
		1:5	(17-83)%	--	NI	--
	Carvacrol/Linalol	5:1	(89-11)%	4,24/0,52	2,27	Antagónico
		2:1	(62-38)%	--	NI	--
		1:1	(45-55)%	--	NI	--
		1:2	(37-63)%	--	NI	--
		1:5	(15-85)%	--	NI	--

<sup>1</sup>Ratio: % de monoterpeno determinados por GC-MS. NI: no fue posible el cálculo de CIF; (-): no alcanzada la MIC.

Para justificar este comportamiento partimos en primer lugar de los valores de MIC (Tabla VII.12) obtenidos para los complejos de timol (3,91 mM) y carvacrol (2,61 mM) por diagrama de fases, valores inferiores en un 20% y 63% respectivamente, a los requeridos para los complejos obtenidos por el método MWI (MIC = 4,83 mM para timol y MIC = 7,04 mM para carvacrol), siendo aproximadamente un 30% menor la MIC obtenida para timol frente a la de carvacrol por MWI, invirtiéndose este comportamiento (porcentaje similar) cuando los complejos se obtienen por diagrama de fases.

Al igual que se evidenció en el ensayo con *E. coli*, estos resultados apoyan la presencia en disolución de mayor concentración de monoterpeno cuando se obtienen por el método de solubilidad (equilibrio). En consecuencia, la sinergia entre ambos es efectiva hasta sobrepasar el 30% de carvacrol, observando indiferencia a partir del 50% de carvacrol.

Así, podemos afirmar que la concentración de carvacrol en las mezclas con timol es limitante para alcanzar la sinergia frente a *S. aureus*, no recomendando combinaciones que sobrepasen el 30% de carvacrol.

Es importante resaltar que con los complejos obtenidos mediante diagrama de fases, se aprecia efecto sinérgico para dos combinaciones de timol con linalol, no recomendando superar el 20% de éste último en la mezcla, ya que deja de ser efectiva frente a *S. aureus*. Sin embargo, sus mezclas con carvacrol no mostraron un incremento de la actividad antimicrobiana, sino efecto antagónico hasta el 80% de carvacrol, no observando efecto alguno a concentraciones inferiores de este monoterpeno.

A pesar del comportamiento descrito por algunos autores para ciertos aceites esenciales como el de cilantro (Silva y col., 2011), justificando el mayor efecto antimicrobiano frente a bacterias gram negativas sobre gram positivas por las diferencias en la cubierta bacteriana; los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana de los monoterpenos objeto de estudio sobre *E. coli* (Gram -) y *S. aureus* (Gram +) son similares, no evidenciando diferencias en los valores de MIC frente a ambas bacterias, para los complejos obtenidos por el método de solubilidad, a pesar de que la membrana externa de las gram negativas (como *E. coli*), tiene una distribución de lípidos asimétrica con los fosfolípidos y lipopolisacaridos situados en la capa interna, aportando una marcada carga negativa a la membrana en la capa exterior; mientras las gram positivas (como *S. aureus*), tienen una pared celular formada por peptidoglicano de mayor espesor, que les confiere rigidez.

Estos resultados aconsejan el empleo de los monoterpenos carvacrol y timol en aplicaciones terapéuticas o alimenticias. Dado que la encapsulación con HP- $\beta$ -CDs de timol, carvacrol y linalol aumenta su solubilidad y mejora el mecanismo de acción antimicrobiana respecto a los compuestos no complejados, al requerir menor concentración para conseguir la inhibición de *E. coli* y *S. aureus*, se aconseja

su dosificación en forma de complejos sólidos (solos o combinados) a formulaciones industriales, no sólo como agentes aromatizantes de alimentos, sino como conservantes para prevenir el deterioro bacteriano, ya que como se ha evidenciado en este trabajo, las CDs permiten una liberación efectiva y controlada del monoterpeno a lo largo del tiempo.

## **CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES**





## 1. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones globales:

1. Los tres monoterpenos estudiados, timol, carvacrol y linalol, pueden ser complejados en CDs, aumentando su solubilidad acuosa por la formación de complejos 1:1.
2. La formación de complejos de inclusión de timol, carvacrol y linalol con CDs varía en función del pH del medio, obteniendo mejores valores de  $K_c$  a pH neutro. Para los tres monoterpenos los valores más altos de  $K_c$  se obtuvieron con HP- $\beta$ -CDs, seguida para timol y linalol de  $\beta$ -CDs y  $\alpha$ -CDs y para carvacrol de  $\alpha$ -CDs y  $\beta$ -CDs; factor a tener en cuenta a la hora de formar complejos de inclusión y determinar valores de  $K_c$ .
3. Si bien se han evaluado dos métodos de preparación de complejos sólidos con timol, carvacrol y linalol con HP- $\beta$ -CDs, los resultados obtenidos para  $K_c$ , eficacia de encapsulación, carga de materia activa y estabilidad de los complejos, apoyan el empleo del método de irradiación por microondas en la preparación de complejos sólidos timol y carvacrol, aconsejando que para linalol los complejos se obtengan por el método de solubilidad.
4. Los resultados obtenidos por resonancia magnética nuclear y acoplamiento molecular confirman la inclusión de timol, carvacrol y linalol en el interior de HP- $\beta$ -CDs. Además, los análisis llevados a cabo por termogravimetría, calorimetría diferencial de barrido y espectrometría infrarroja por transformada de Fourier sobre los reactantes aislados y sus respectivos complejos, confirman que en todos los casos la formación de complejos entre el monoterpeno objeto de estudio y la HP- $\beta$ -CDs es efectiva.

5. Los complejos de timol, carvacrol y linalol con HP- $\beta$ -CDs obtenidos por el método de solubilidad e irradiación por microondas, disminuyen la velocidad de crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, respecto a su estado libre, afirmando que la complejación con HP- $\beta$ -CDs aumenta la capacidad antimicrobiana de los monoterpenos. De los dos métodos evaluados, los complejos sólidos de timol y carvacrol obtenidos por el método de solubilidad, mostraron mayor actividad antimicrobiana tanto para *E. coli* como para *S. aureus*. Sin embargo, con los complejos formados con linalol, aunque se observa una disminución en la velocidad de crecimiento, en ningún caso se alcanza la concentración mínima inhibitoria.
  
6. El estudio de las combinaciones de los complejos de timol, carvacrol y linalol refleja que la acción combinada de timol y carvacrol favorece la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*; revelando carvacrol ser un reactivo limitante. Así, se recomienda no sobrepasar el 50% o el 30% de carvacrol en mezclas con timol frente a *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

## **CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA**



## 1. BIBLIOGRAFÍA

- Administration, U.F. and D., 2016. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; Flavoring Agents and Related Substances. Fed. Regist 21 (3).
- Adrar, N., Oukil, N., Bedjou, F., 2016. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products* 88, 112–119.
- Agarwal, V., Lal, P., Pruthi, V., 2008. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia* 165, 13–19.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., 2004. Suppression of the Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation Pathway by Spice-Derived Phytochemicals: Reasoning for Seasoning. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030, 434–441.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Bouwmeester, H.J., 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in plant science* 10, 594–602.
- Ahmed, S.M., Naggi, A., Guerrini, M., Focher, B., 1991. Inclusion complexes of bopirimine with  $\beta$ -cyclodextrin in solution and in solid state. *International journal of pharmaceutics* 77, 247–254.
- Ain, S., Kumar, B., Pathak, K., 2015. Cyclodextrins: Versatile Carrier In Drug Formulations And Delivery Systems. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences* 5.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., Pagán, R., 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 12, 320–329.
- Akbari, M., Ezati, P., Nazari, M., 2015. Physiological and pharmaceutical properties of peppermint as a multipurpose and valuable medicinal plant. *Scientific Journal of Medical Science* 4, 413–420.

- Alagawany, M., El-Hack, M.A., Farag, M.R., Tiwari, R., Dhama, K., 2015. Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health: A review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 3, 73–84.
- Albuquerque, E.L., Lima, J.K., Souza, F.H., Silva, I.M., Santos, A.A., Araújo, A.P.A., Blank, A.F., Lima, R.N., Alves, P.B., Bacci, L., 2013. Insecticidal and repellence activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* against urban ants species. *Acta tropica* 127, 181–186.
- Alejandro, M.M., 2001. Aceites Esenciales. Recuperado de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf> 20–8.
- Al-Fatlawi A.A., Rahisuddin, Ayaz A., 2014. Cytotoxicity and pro-apoptotic activity of carvacrol on human breast cancer cell line MCF-7. *World Journal Pharmaceutical Science* 2(10), 1218-1223.
- Alfonsi, R., Attivi, D., Astier, A., Socha, M., Morice, S., Gibaud, S., 2013. Characterization of mitotane (o, p'-DDD)-cyclodextrin inclusion complexes: Phase-solubility method and NMR, in: *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Elsevier, pp. 186–192.
- Ali, T., Behnaz, M., Aliakbar, H., 2014. Effect of planting date on yield and percentage of cuminaldehyde and beta pinene in herb of three cumin (*Cuminum cyminum* L.) varieties in Saveh region. *International Journal of Biosciences (IJB)* 4, 154–162.
- Allan, K.E., Lenahan, C.E., Ellis, A.V., 2009. UV light stability of  $\alpha$ -cyclodextrin/resveratrol host-guest complexes and isomer stability at varying pH. *Australian journal of chemistry* 62, 921–926.
- Al-Marzouqi, A.H., Shehatta, I., Jobe, B., Dowaidar, A., 2006. Phase solubility and inclusion complex of itraconazole with  $\beta$ -cyclodextrin using supercritical carbon dioxide. *Journal of pharmaceutical sciences* 95, 292–304.
- Alvarenga Botrel, D., Vilela Borges, S., Victória de Barros Fernandes, R., Dantas Viana, A., Maria Gomes da Costa, J., Reginaldo Marques, G., 2012. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science & Technology* 47, 2289–2296.

- Alviano, W.S., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, D.S., Bizzo, H.R., Souto-Pradón, T., Rodrigues, M.L., Bolognese, A.M., Alviano, C.S., Souza, M.M.G., 2005. Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral microbiology and immunology* 20, 101–105.
- Amiri, H., 2012. Volatile constituents and antioxidant activity of flowers, stems and leaves of *Nasturtium officinale* R. Br. *Natural product research* 26, 109–115.
- Andersen, A., 2006. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *International journal of toxicology* 25, 29–127.
- Anderson, R.C., Krueger, N.A., Genovese, K.J., Stanton, T.B., MacKinnon, K.M., Harvey, R.B., Edrington, T.S., Callaway, T.R., Nisbet, A.J., 2012. Effect of thymol or diphenyliodonium chloride on performance, gut fermentation characteristics, and *Campylobacter* colonization in growing swine. *Journal of Food Protection*® 75, 758–761.
- Andreu-Sevilla, A.J., López-Nicolás, J.M., Carbonell-Barrachina, Á.A., García-Carmona, F., 2011. Comparative Effect of the Addition of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, or  $\gamma$ -Cyclodextrin on Main Sensory and Physico-Chemical Parameters. *Journal of food science* 76, S347–S353.
- Angell, W. F., France, P. A., 2001. *Detergent composition having granular cyclodextrin*. PCT Int Appl WO 01 18,163.
- Anjos, P.J., Lima, A.O., Cunha, P.S., De Sousa, D.P., Onofre, A.S., Ribeiro, T.P., Medeiros, I.A., Antonioli, Â.R., Quintans-Júnior, L.J., Santos, M.R., 2013. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. *Zeitschrift für Naturforschung C* 68, 181–190.
- Aprosoaie, A.C., Hăncianu, M., Costache, I.-I., Miron, A., 2014. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and fragrance journal* 29, 193–219.
- Arima, H., Motoyama, K., Irie, T., 2011. Recent findings on safety profiles of cyclodextrins, cyclodextrin conjugates, and polypseudorotaxanes. *Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics, and biomedicine: Current and future industrial applications* 91–122.

- Aristatile, B., Al-Numair, K.S., Veeramanian, C., Pugalendi, K.V., 2009. Antihyperlipidemic effect of carvacrol on D-galactosamine induced hepatotoxic rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology* 20, 15–28.
- Armstrong, J.S., 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 28, 253–260.
- Arpagaus, C., Schafroth, N., 2009. Spray drying of biodegradable polymers in laboratory scale. *Respiratory Drug Delivery Europe* 269–74.
- Arranz, E., Jaime, L., de las Hazas, M.L., Reglero, G., Santoyo, S., 2015. Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. *Industrial Crops and Products* 67, 121–129.
- Arunasree, K.M., 2010. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine* 17, 581–588.
- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2011.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* 23, 1631–1640.
- Atwood, J. L. Inclusion phenomenon and molecular recognition. New York: Plenum. 1990.
- Ávalos García, A., y Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.
- Ayala-Zavala, J.F., Del-Toro-Sánchez, L., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A., 2008. High Relative Humidity In-Package of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Advantage or Disadvantage Considering Microbiological Problems and Antimicrobial Delivering Systems? *Journal of Food Science* 73, R41–R47.
- Aydin, Y., Kutlay, Ö., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K., Aydin, S., 2007. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta medica* 73, 1365–1371.



- Azcón-Bieto, J., Talón, M., Taiz, L., Taiz, E., Zeiger, E., Ancibor, E.E.A., Blum, A., Nguyen, E., Pessarakli, M., Pessarakli, M., 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. Reino Unido.
- Azimova, S. S., 2012. Lipidic, Lipophilic Components and Essential Oil from Plant Sources, Springer Science LLC, p. 810.
- Babili, F.E., Bouajila, J., Souchard, J.P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., Moulis, C., Valentin, A., 2011. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of food science* 76, C512–C518.
- Bachir, R.G., Benali, M., 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2, 739–742.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology* 21, 33–42.
- Bailen, M., Julio, L. F., Diaz, C. E., Sanz, J., Martínez-Díaz, R. A., Cabrera, R., ... & Gonzalez-Coloma, A., 2013. Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 49, 102-107.
- Bajpai, V.K., Baek, K.-H., Kang, S.C., 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International* 45, 722–734.
- Bakırel, T., Bakırel, U., Keleş, O.Ü., Ülgen, S.G., Yardibi, H., 2008. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of ethnopharmacology* 116, 64–73.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Baldermann, S., Yang, Z., Katsuno, T., Tu, V.A., Mase, N., Nakamura, Y., Watanabe, N., 2014. Discrimination of green, oolong, and black teas by GC-MS analysis of characteristic volatile flavor compounds. *American Journal of Analytical Chemistry* 5, 620.

- Baličević, R., Ravlić, M., Knežević, M., Marić, K., Mikić, I., 2014. Effect of marigold (*Calendula officinalis* L.) cogermination, extracts and residues on weed species hoary cress (*Cardaria draba* (L.) Desv.). *Herbologia* 14, 23–32.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., Marzona, M., 2000. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with  $\beta$ -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 709–713.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A., 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology* 75, 125–132.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology* 23, 277–294.
- Basan, H., Göğçer, N.G., Ertas, N., Orbey, M.T., 2001. Quantitative determination of piroxicam in a new formulation (piroxicam- $\beta$ -cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 26, 171–178.
- Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006.
- Batista, P.A., de Paula Werner, M.F., Oliveira, E.C., Burgos, L., Pereira, P., da Silva Brum, L.F., dos Santos, A.R.S., 2008. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. *Neuroscience letters* 440, 299–303.
- Batista, P.A., de Paula Werner, M.F., Oliveira, E.C., Burgos, L., Pereira, P., da Silva Brum, L.F., Story, G.M., Santos, A.R., 2010. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *The Journal of Pain* 11, 1222–1229.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2008. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. John Wiley & Sons.
- Bax, A.D., Davis, D.G., 1985. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 63, 207–213.
- Bazemore, R., Rouseff, R., Naim, M., 2003. Linalool in orange juice: origin and thermal stability. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 196–199.

- Bazzano, M., Barolo, C., Buscaino, R., D'Agostino, G., Ferri, A., Sangermano, M., Pisano, R., 2016. Controlled Atmosphere in Food Packaging Using Ethylene-  $\alpha$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes Dispersed in Photocured Acrylic Films. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 55, 579–585.
- Beckman, C.H., 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57, 101–110.
- Beena, K.D., Rawat, D.S., 2013. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23, 641–645.
- Beier, R.C., Byrd, J.A., Kubena, L.F., Hume, M.E., McReynolds, J.L., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., 2014. Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: Effects on poultry. *Poultry science* 93, 267–272.
- Belsito, D., Bickers, D., Bruze, M., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J.H., Sipes, I.G., Tagami, H., 2008. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic acetates when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology* 46, S1–S27.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology* 43, 149–154.
- Benencia, F., Courreges, M.C., 1999. Antiviral activity of sandalwood oil against herpes simplex viruses-1 and-2. *Phytomedicine* 6, 119–123.
- Benesi, H.A., Hildebrand, J.H., 1949. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* 71, 2703–2707.
- Bentayeb, K., Vera, P., Rubio, C., Nerín, C., 2014. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils. *Food chemistry* 148, 204–208.
- Bergese, P., Colombo, I., Gervasoni, D., Depero, L.E., 2003. Microwave generated nanocomposites for making insoluble drugs soluble. *Materials Science and Engineering: C* 23, 791–795.

- Betancourth García, C., Salazar González, C., Rodriguez, M., 2011. Soil coverage evaluation with calendula (*Calendula officinalis* L.), crotalaria (*Crotalaria* sp. L.) and oat (*Avena* sp. L.) in *Meloidogyne* spp. control in quito orange (*Solanum quitoense* Lam.). *Revista de Ciencias Agrícolas* 28, 43–57.
- Bhalerao, R., 2015. Essential Oils: At A Glance. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences* 4(11), 718-738.
- Bhardwaj, R., Dorr, R.T., Blanchard, J., 2000. Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclodextrins. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 54, 233–239.
- Bhaskara-Amrit, U.R., Agrawal, P.B., Warmoeskerken, M.M., 2011. Applications of  $\beta$ -cyclodextrins in textiles. *Autex research journal* 11, 94–101.
- Bhaskaran, N., Shukla, S., Srivastava, J.K., Gupta, S., 2010. Chamomile: an anti-inflammatory agent inhibits inducible nitric oxide synthase expression by blocking RelA/p65 activity. *International journal of molecular medicine* 26, 935.
- Bikmoradi, A., Seifi, Z., Poorolajal, J., Araghchian, M., Safiaryan, R., Oshvandi, K., 2015. Effect of inhalation aromatherapy with lavender essential oil on stress and vital signs in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-blinded randomized clinical trial. *Complementary therapies in medicine* 23, 331–338.
- Bilensoy, E., 2011. Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics, and biomedicine: current and future industrial applications. John Wiley & Sons.
- Bilensoy, E., Hincal, A.A., 2009. Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert opinion on drug delivery* 6, 1161–1173.
- Bioinformatics and High Performance Computing Research Group. (2016). "Vina\_vision" en España, disponible en [http://bio-hpc.eu/software/vina\\_vision](http://bio-hpc.eu/software/vina_vision) [15 de noviembre 2016].
- Bisht, D.S., Menon, K.R.K., Singhal, M.K., 2014. Comparative Antimicrobial Activity of Essential oils of *Cuminum cyminum* L. and *Foeniculum vulgare* Mill. seeds against *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 17, 617–622.

- Bonita, J.S., Mandarano, M., Shuta, D., Vinson, J., 2007. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological research* 55, 187–198.
- Bonito, M.C., Cicala, C., Marcotullio, M.C., Maione, F., Mascolo, N., 2011. Biological activity of bicyclic and tricyclic diterpenoids from *Salvia* species of immediate pharmacological and pharmaceutical interest. *Natural product communications* 6, 1205–1215.
- Bonnländer, B., Cappuccio, R., Liverani, F.S., Winterhalter, P., 2006. Analysis of enantiomeric linalool ratio in green and roasted coffee. *Flavour and fragrance journal* 21, 637–641.
- Botelho, M.A., Martins, J.G., Ruela, R.S., Santos, J.A., Soares, J.B., França, M.C., Montenegro, D., Ruela, W.S., Barros, L.P., Queiroz, D.B., 2009. Protective effect of locally applied carvacrol gel on ligature-induced periodontitis in rats: a tapping mode AFM study. *Phytotherapy Research* 23, 1439–1448.
- Botrel, D.A., Vilela Borges, S., 2012. Victória de Barros Fernandes. R., Dantas Viana, A., Maria Gomes da Costa, J., & Reginaldo Marques, G 2289–2296.
- Bouchemal, K., y Mazzaferro, S., 2012. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin–guest interactions. *Drug Discovery Today* 17(11), 623–629.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A., 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of applied microbiology* 109, 1139–1149.
- Boulmedarat, L., Bochot, A., Lesieur, S., Fattal, E., 2005. Evaluation of buccal methyl- $\beta$ -cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model. *Journal of pharmaceutical sciences* 94, 1300–1309.
- Boyle, W., 1955. Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review* 66, 25 – 28.
- Braga, P.C., Dal Sasso, M., Culici, M., Bianchi, T., Bordoni, L., Marabini, L., 2006. Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology* 77, 130–136.
- Brandariz, I., Iglesias, E., 2013. Local Anesthetics: Acid-base Behaviour and Inclusion with Cyclodextrins. *Current Organic Chemistry* 17, 3050–3063.

- Brandt, A.L., Castillo, A., Harris, K.B., Keeton, J.T., Hardin, M.D., Taylor, T.M., 2010. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. *Journal of Food Science* 75, M557–M563.
- Breslow, R., Hammond, M., Lauer, M., 1980. Selective transamination and optical induction by  $\alpha$ -beta-cyclodextrin-pyridoxamine artificial enzyme. *Journal of the American Chemical Society* 102, 421–422.
- Brewster, M.E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced drug delivery reviews* 59, 645–666.
- Brum, L.S., Emanuelli, T., Souza, D.O., Elisabetsky, E., 2001. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. *Neurochemical Research* 26, 191–194.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., Sacchetti, G., 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) flower calices. *Food chemistry* 85, 415–421.
- Buedenbender, S., Schulz, G.E., 2009. Structural base for enzymatic cyclodextrin hydrolysis. *Journal of molecular biology* 385, 606–617.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology* 94, 223–253.
- Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology* 36, 162–167.
- Buschmann, H.-J., Schollmeyer, E., 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *Journal of cosmetic science* 53, 185–192.
- Cal, K., Krzyzaniak, M., 2006. Stratum corneum absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans. *Journal of dermatological science* 42, 265–267.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A., Fandino, I., 2007. The use of essential oils in ruminants as modifiers of rumen microbial fermentation. *structure* 100, 5.

- Cannavà, C., Crupi, V., Ficarra, P., Guardo, M., Majolino, D., Mazzaglia, A., Stancanelli, R. y Venuti, V., 2010. Physico-chemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin/genistein complex. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 51(5), 1064-1068.
- Cappello, B., De Rosa, G., Giannini, L., La Rotonda, M.I., Mensitieri, G., Miro, A., Quaglia, F., Russo, R., 2006. Cyclodextrin-containing poly (ethyleneoxide) tablets for the delivery of poorly soluble drugs: potential as buccal delivery system. *International journal of pharmaceutics* 319, 63–70.
- Carneiro, H.C., Tonon, R.V., Grosso, C.R., Hubinger, M.D., 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering* 115, 443–451.
- Carnesecchi, S., Bras-Gonçalves, R., Bradaia, A., Zeisel, M., Gossé, F., Poupon, M.-F., Raul, F., 2004. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer letters* 215, 53–59.
- Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V, 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews* 19(1), 50-62.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., 2011. Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* 203–238.
- Carson, C.F., Riley, T.V., 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied bacteriology* 78, 264–269
- Casabianca, H., Graff, J.B., Faugier, V., Fleig, F., Grenier, C., 1998. Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. A powerful tool for authenticity control of essential oils. *Journal of high resolution chromatography* 21, 107–112.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Vidic, D., Parić, A., 2012. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products* 37, 479–485.

- Cava-Roda, R.M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M.T., Marín-Iniesta, F., 2012. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in milk. *Food and Bioprocess Technology* 5, 2120–2131.
- Çelik, S., Ozkaya, A., 2002. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *BMB Reports* 35, 547–552.
- Chadha, R., Saini, A., Gupta, S., Arora, P., Thakur, D., Jain, D.V.S., 2010. Encapsulation of rifampicin by natural and modified  $\beta$ -cyclodextrins: characterization and thermodynamic parameters. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 67, 109–116.
- Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Trouillas, J., Remmal, A., 2004. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 909–914.
- Chao, S.C., Young, D.G., Oberg, C.J., 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research* 12, 639–649.
- Chauhan, A.K., Kang, S.C., 2014. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser. typhimurium* in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Research in microbiology* 165, 559–565.
- Chaudhary, V.B., Patel, J.K., 2013. Cyclodextrin inclusion complex to enhance solubility of poorly water soluble drugs: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4, 68.
- Chawla, S., Thakur, M., 2013. Overview of mint (*Mentha L.*) as a promising health-promoting herb. *International Journal of pharmaceutical research and development* 5, 73–80.
- Chekem, M.S.G., Lunga, P.K., Tamokou, J.D.D., Kuate, J.R., Tane, P., Vilarem, G., Cerny, M., 2010. Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* species. *Pharmaceuticals* 3, 2900–2909.



- Cheng, B.-H., Lin, C.-Y., Yeh, T.-F., Cheng, S.-S., Chang, S.-T., 2012. Potential source of S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaf: essential oil profile and enantiomeric purity. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 7623–7628.
- Chibuzor, O., 2011. Natural Insect Pest Control—A Review. *International Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1, 35.
- Chilajwar, S.V., Pednekar, P.P., Jadhav, K.R., Gupta, G.J., Kadam, V.J., 2014. Cyclodextrin-based nanosponges: a propitious platform for enhancing drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* 11, 111–120.
- Cho, S., Choi, Y., Park, S., Park, T., 2012. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 192–201.
- Cho, S.-Y., Jun, H., Lee, J.H., Jia, Y., Kim, K.H., Lee, S.-J., 2011. Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2 and ubiquitin-dependent mechanisms. *FEBS letters* 585, 3289–3296.
- Choi, E.-M., Hwang, J.-K., 2004. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 75, 557–565.
- Choi, M.-J., Ruktanonchai, U., Soottitantawat, A., Min, S.-G., 2009. Morphological characterization of encapsulated fish oil with  $\beta$ -cyclodextrin and polycaprolactone. *Food research international* 42, 989–997.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G., Haroutounian, S., 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 8261–8267.
- Chorianopoulos, N.G., Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Evergetis, E.T., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J., 2006. A newly developed assay to study the minimum inhibitory concentration of *Satureja spinosa* essential oil. *Journal of applied microbiology* 100, 778–786.

- Chun, I.K., Yun, D.S., 1993. Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state. *International journal of pharmaceutics* 96, 91–103.
- Chung, M.J., Park, K.W., Kim, K.H., Kim, C.-T., Baek, J.P., Bang, K.-H., Choi, Y.-M., Lee, S.-J., 2008. Asian plantain (*Plantago asiatica*) essential oils suppress 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-co-enzyme A reductase expression in vitro and in vivo and show hypocholesterolaemic properties in mice. *British Journal of Nutrition* 99, 67–75.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of ethnopharmacology* 79, 213–220.
- Civitelli, L., Panella, S., Marcocci, M.E., De Petris, A., Garzoli, S., Pepi, F., Vavala, E., Ragno, R., Nencioni, L., Palamara, A.T., 2014. In vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. *Phytomedicine* 21, 857–865.
- Coelho, V., Mazzardo-Martins, L., Martins, D.F., Santos, A.R.S., da Silva Brum, L.F., Picada, J.N., Pereira, P., 2013. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (–)-linalool in mice. *Journal of natural medicines* 67, 876–880.
- Comini, S., Mentink, L., 1991. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat. Appl. EP 440539*.
- Connors, K. A., 1987. *Binding Constants*. Wiley: New York, 103-108.
- Cramer, F. *Einschlussverbindungen (Inclusion Compounds)*; Springer-Verlag: Berlin, 1954.
- Cravotto, G., Binello, A., Baranelli, E., Carraro, P., Trotta, F., 2006. Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Current Nutrition & Food Science* 2, 343–350.
- Crini, G., 2014. Review: a history of cyclodextrins. *Chemical reviews* 114, 10940–10975.
- Crini, G., Morcellet, M., 2002. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *Journal of separation science* 25, 789–813.

- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6300–6308.
- Crosthwaite, D., 1998. The internationalization of British construction companies 1990-96: an empirical analysis. *Construction Management & Economics* 16, 389–395.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants* 24, 1250–1319.
- Crupi, V., Fontana, A., Giarola, M., Majolino, D., Mariotto, G., Mele, A., Melone, L., Punta, C., Rossi, B., Trotta, F., 2013. Connection between the vibrational dynamics and the cross-linking properties in cyclodextrins-based polymers. *Journal of Raman Spectroscopy* 44, 1457–1462.
- Da Cruz Cabral, L., Pinto, V.F., Patriarca, A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology* 166, 1–14.
- Dahanukar, S.A., Kulkarni, R.A., Rege, N.N., 2000. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian journal of pharmacology* 32, S81–S118.
- Dale, O., Nilsen, T., Loftsson, T., Tønnesen, H.H., Klepstad, P., Kaasa, S., Holand, T., Djupesland, P.G., 2006. Intranasal midazolam: a comparison of two delivery devices in human volunteers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 1311–1318.
- Dampc, A., Luczkiewicz, M., 2013. *Rhododendron tomentosum* (Ledum palustre). A review of traditional use based on current research. *Fitoterapia* 85, 130–143.
- Danh, L.T., Triet, N.D.A., Zhao, J., Mammucari, R., Foster, N., 2013. Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO<sub>2</sub>, hexane and hydrodistillation. *Food and Bioprocess Technology* 6, 3481–3489.
- Danon, J.J., 2016. Pedal to the metal: high order rotaxanes, catenanes & knots via metal template synthesis. University of Manchester.

- Da Porto, C., Decorti, D., Kikic, I., 2009. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry* 112, 1072–1078.
- Darakshan, M., Khan, N.A., 2013. Cyclodextrins-“world’s smallest beauty cases.” *International Journal of Bioassays* 2, 1174–1179.
- Dardeer, H.M., 2014. Importance of cyclodextrins into inclusion complexes. *International Journal of Advanced Research* 24, 414–428.
- Darshan, S., Doreswamy, R., 2004. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytotherapy research* 18, 343–357.
- DaSilva Lima, M., Quintans-Júnior, L.J., de Santana, W.A., Kaneto, C.M., Soares, M.B.P., Villarreal, C.F., 2013. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European journal of pharmacology* 699, 112–117.
- Davis, F., Higson, S., 2011. *Macrocycles: construction, chemistry and nanotechnology applications*. John Wiley & Sons.
- Dawidowicz, A.L., Olszowy, M., 2014. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural product research* 28, 1952–1963.
- De, M., Krishna De, A., Banerjee, A.B., 1999. Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytotherapy Research* 13, 616–618.
- De Almeida, I., Alviano, D.S., Vieira, D.P., Alves, P.B., Blank, A.F., Lopes, A.H.C., Alviano, C.S., 2007. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitology research* 101, 443–452.
- De Almeida, L.F.R., de Oliveira Portella, R., Bufalo, J., Marques, M.O.M., Facanali, R., Frei, F., 2016. Non-Oxygenated Sesquiterpenes in the Essential Oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. Increase during the Day in the Dry Season. *PloS one* 11.
- De Almeida, E.R., Rafael, K.R. de O., Couto, G.B.L., Ishigami, A.B.M., 2009. Anxiolytic and Anticonvulsant Effects on Mice of Flavonoids, Linalool, and  $\alpha$ -Tocopherol Presents in the Extract of Leaves of *Cissus sicyoides* L.(Vitaceae). *BioMed Research International*.

- De Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Neto, N. J. G., De Oliveira, M. E. G., & De Souza, E. L., 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44(5), 1541-1548.
- Deb, D.D., Parimala, G., Devi, S.S., Chakraborty, T., 2011. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chemico-biological interactions* 193, 97–106.
- De Barros Fernandes, R.V., Borges, S.V., Botrel, D.A., 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate polymers* 101, 524–532.
- De Bie, A., Van Ommen, B., Bär, A., 1998. Disposition of [<sup>14</sup>C]  $\gamma$ -Cyclodextrin in Germ-Free and Conventional Rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 27, 150–158.
- De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G.A. 2009. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability. John Wiley & Sons.
- De Logu, A., Loy, G., Pellerano, M.L., Bonsignore, L., Schivo, M.L., 2000. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research* 48, 177–185.
- De Moura Linck, V., da Silva, A.L., Figueiró, M., Piato, A.L., Herrmann, A.P., Birck, F.D., Caramao, E.B., Nunes, D.S., Moreno, P.R.H., Elisabetsky, E., 2009. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine* 16, 303–307.
- De Oliveira, T.L.C., de Araújo Soares, R., Ramos, E.M., das Graças Cardoso, M., Alves, E., Piccoli, R.H., 2011. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International journal of food microbiology* 144, 546–555.
- De Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Neto, N.J.G., de Souza, E.L., 2010. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International journal of food microbiology* 137, 312–316.

- De Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., van Vuuren, S., 2013. The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.
- Der Marderosian, A., Beutler, J.A., 2002. The review of natural products: the most complete source of natural product information. *Facts and Comparisons*.
- De Souza, E.L., de Barros, J.C., de Oliveira, C.E.V., da Conceição, M.L., 2010. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International journal of food microbiology* 137, 308–311.
- De Sousa, D.P., Nobrega, F.F., Santos, C.C., de Almeida, R.N., 2010. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. *Natural product communications* 5, 1847–1851.
- De Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E. de O., Barbosa Filho, J.M., Marques, M.O.M., 2008. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) essential oil. *Food Science and Technology (Campinas)* 28, 418–422.
- Devappa, R.K., Makkar, H.P., Becker, K., 2011. *Jatropha* diterpenes: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88, 301–322.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., Silano, M., 2004. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* 75, 801–804.
- Diamanti, A.C., Igoumenidis, P.E., Mourtzinis, I., Yannakopoulou, K., Karathanos, V.T., 2017. Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins. *Food Chemistry*.
- Diao, W.-R., Hu, Q.-P., Feng, S.-S., Li, W.-Q., Xu, J.-G., 2013. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) against selected foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 6044–6049.
- Dinesha, R., Thammannagowda, S.S., Prabhu, M.S.L., Madhu, C.S., Srinivas, L., 2014. The antioxidant and DNA protectant activities of Star Anise (*Illicium verum*) aqueous extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2.

- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G., 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4863–4870.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2745–2749.
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., Mauriello, G., 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics* 10, 1040–1049.
- Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de febrero de 1995, relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes.
- Directiva 2003/15/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de febrero de 2003, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos.
- Djordjevic, D., Cercaci, L., Alamed, J., McClements, D.J., Decker, E.A., 2008. Stability of citral in protein-and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry* 106, 698–705.
- Dobetsberger, C., Buchbauer, G., 2011. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 26, 300–316.
- Dodziuk, H., 2006. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications. John Wiley & Sons.
- Dongare, V., Kulkarni, C., Kondawar, M., Magdum, C., Haldavnekar, V., Arvindekar, A., 2012. Inhibition of aldose reductase and anti-cataract action of trans-anethole isolated from *Foeniculum vulgare* Mill. fruits. *Food chemistry* 132, 385–390.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G., 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology* 44, 1908–1914.

- Dos Passos Menezes, P., Serafini, M.R., de Carvalho, Y.M.B.G., Santana, D.V.S., Lima, B.S., Quintans-Júnior, L.J., Marreto, R.N., de Aquino, T.M., Sabino, A.R., Scotti, L., 2016. Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin containing carvacrol. *Journal of Molecular Structure* 1125, 323–330.
- Dos Santos, C., Buera, M.P., Mazzobre, M.F., 2012. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of  $\beta$ -cyclodextrins complexes. *Food chemistry* 132, 2030–2036.
- Duan, M.S., Zhao, N., Össurardóttir, Í.B., Thorsteinsson, T., Loftsson, T., 2005. Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: formation of aggregates and higher-order complexes. *International journal of pharmaceutics* 297, 213–222.
- Duchêne, D., Bochet, A., 2016. Thirty years with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 514, 58–72.
- Dufossé, L., Souchon, I., Feron, G., Latrasse, A., Spinnler, H.E., 1999. In Situ Detoxification of the Fermentation Medium during  $\gamma$ -Decalactone Production with the Yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnology progress* 15, 135–139.
- Dufour, G., Bigazzi, W., Wong, N., Boschini, F., De Tullio, P., Piel, G., Cataldo, D., Evrard, B., 2015. Interest of cyclodextrins in spray-dried microparticles formulation for sustained pulmonary delivery of budesonide. *International journal of pharmaceutics* 495, 869–878.
- Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., Dobroslava, B., 2006. Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro* 20, 1435–1445.
- Dweck, A., 2009. Toxicology of essential oils reviewed. *Personal Care* 65–77.
- Eastburn, S.D., Tao, B.Y., 1994. Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnology advances* 12, 325–339.
- Echegoyen, Y., Nerín, C., 2015. Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. *Food chemistry* 170, 30–36.
- Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research* 21, 308–323.



- Eguinoa Gallo, A., 2014. Evaluación del uso de ciclodextrinas para el control de la difusión de componentes activos desde películas comestibles a sistemas alimentarios.
- Ehrnhöfer-Ressler, M.M., Fricke, K., Pignitter, M., Walker, J.M., Walker, J., Rychlik, M., Somoza, V., 2013. Identification of 1, 8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 3451–3459.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics* 483, 220–243.
- El-Awadi, M.E., Hassan, E.A., 2010. Physiological responses of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) plants to some growth substances. The effect of certain amino acids and a pyrimidine derivative. *Journal of American Science* 6, 120–125.
- Elisabetsky, E., Brum, L.S., Souza, D.O., 1999. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine* 6, 107–113.
- Elisabetsky, E., Marschner, J., Souza, D.O., 1995. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical research* 20, 461–465.
- Elizaquível, P., Azizkhani, M., Aznar, R., Sánchez, G., 2013. The effect of essential oils on norovirus surrogates. *Food Control* 32, 275–278.
- El-Mogy, M.M., Alsanius, B.W., 2012. Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food control* 28, 157–162.
- Ema/Chmp/333892/2013. Noviembre, 2014. Background review for cyclodextrins used as excipients. European Medicines Agency.
- Emamghoreishi, M., Talebianpour, M.S., 2015. Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 17, 42–47.
- Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P., Mazzanti, G., 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and chemical toxicology* 43, 1381–1387.

- Evergetis, E., Michaelakis, A., Papachristos, D.P., Badieritakis, E., Kapsaski-Kanelli, V.N., Haroutounian, S.A., 2016. Seasonal variation and bioactivity of the essential oils of two *Juniperus* species against *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894). *Parasitology research* 115, 2175–2183.
- Fenyvesi, É., Vikmon, M.A., Szente, L., 2016. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: Benefits and limitations. *Critical reviews in food science and nutrition* 56(12), 1981–2004.
- Ferguson, L.R., Philpott, M., 2008. Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 313–329.
- Fernandes, L.P., Éhen, Z., Moura, T.F., Novák, C., Sztatisz, J., 2004. Characterization of *Lippia sidoides* oil extract-b-cyclodextrin complexes using combined thermoanalytical techniques. *Journal of thermal analysis and calorimetry* 78, 557–573.
- Ferruelo, A., de las Heras, M.M., Redondo, C., de Fata, F.R., Romero, I., Angulo, J.C., 2014. Los polifenoles del vino ejercen su efecto antineoplásico sobre la línea celular PC-3 andrógeno resistente a través de la inhibición de la actividad transcripcional del promotor de COX-2 mediada por NF- $\kappa$ B. *Actas Urológicas Españolas* 38, 429–437.
- Figueiras, A., Hombach, J., Veiga, F., Bernkop-Schnürch, A., 2009. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71, 339–345.
- Fisher, K., Phillips, C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in food science & technology* 19, 156–164.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of applied microbiology* 106, 1343–1349.
- Frascareli, E.C., Silva, V.M., Tonon, R.V., Hubinger, M.D., 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and bioproducts processing* 90, 413–424.
- French, D., 1957. The schardinger dextrins. *Advances in carbohydrate chemistry* 12, 189–260.

- Freudenberg, K., Cramer, F., Plieninger, H., 1953. Verfahren zur herstellung von einschlussverbindungen physiologisch wirksamer organischer verbindungen. German Patent DE 895.
- Friedly, E.C., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Roman, M., O'Bryan, C., Chalova, V.I., 2009. In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. *Journal of food science* 74, M67–M72.
- Foley, P. R., Kaiser, C. E., Sadler, J. D., Burckhardt, E. E., Liu, Z., 2000. *Detergent composition with cyclodextrin perfume complexes to mask malodours*. PCT Int Appl WO 01 23,516.
- Frömring, K.-H., Szejtli, J., 1993. *Cyclodextrins in pharmacy*. Springer Science & Business Media.
- Fujishima, N., Kusaka, K., Umino, T., Urushinata, T., Terumi, K., 2001. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. Japanese patent JP 136, 898.
- Fukuda, M., Miller, D.A., Peppas, N.A., McGinity, J.W., 2008. Influence of sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin (Captisol®) on the dissolution properties of a poorly soluble drug from extrudates prepared by hot-melt extrusion. *International journal of pharmaceutics* 350, 188–196.
- Gao, S., Wang, L., 1998. Application of cyclodextrin in environmental science. *Huanjing Kexue Jinzhan* 6, 80–86.
- García, C.B., González, C.S., Rodríguez, M., 2011. Evaluación de coberturas de suelo con caléndula (*Calendula officinalis* L.), Crotalaria (*Crotalaria* Sp. L.) y avena (*Avena* Sp. L.) En el control de *Meloidogyne* Spp. En lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Revista de Ciencias Agrícolas* 28, 43–57.
- García-García, R., López-Malo, A., Palou, E., 2011. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of food science* 76, M95–M100.
- Gautam, N., Mantha, A.K., Mittal, S., 2014. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed research international* 2014.

- Gbenou, J.D., Ahounou, J.F., Akakpo, H.B., Laleye, A., Yayi, E., Gbaguidi, F., Baba-Moussa, L., Darboux, R., Dansou, P., Moudachirou, M., 2013. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Molecular biology reports* 40, 1127–1134.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology* 111, 170–174.
- Gilling, D.H., Kitajima, M., Torrey, J.R., Bright, K.R., 2014. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of applied microbiology* 116, 1149–1163.
- Gomes-Carneiro, M.R., Dias, D.M., De-Oliveira, A., Paumgartten, F.J., 2005. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of  $\alpha$ -bisabolol in the Salmonella/microsome assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 585, 105–112.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L., Mira, L., & Corvo, M. L. (2008). Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 15(16), 1586-1605.
- Gómez Torrente, M.L., 2015. Análisis no dirigido del aceite esencial de las variedades de mandarino Clemenules y Clemenpons.
- González, C.S.-M., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems: review. *Food science and technology international= Ciencia y tecnología de alimentos internacional* 8, 121–137.
- Gordon, W.P., Forte, A.J., McMurtry, R.J., Gal, J., Nelson, S.D., 1982. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. *Toxicology and applied pharmacology* 65, 413–424.
- Gould, S., Scott, R.C., 2005. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): a toxicology review. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1451–1459.
- Goyal, A. K., Johal, E. S., Rath, G., 2011. Nanotechnology for water treatment. *Current Nanoscience* 7, 640–654.

- Gradinaru, A.C., Miron, A., Trifan, A., Spac, A., Brebu, M., Aprotosoia, A.C., 2014. Screening of antibacterial effects of anise essential oil alone and in combination with conventional antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii De Medici Si Naturalisti Din Iasi* 118, 537–43.
- Granel, A., y Rambla, J. L. 2013. Biosynthesis of volatile compounds. The molecular biology and biochemistry of fruit ripening, 135-161.
- Grayson, D.H., 2000. Monoterpenoids. *Natural product reports* 17, 385–419.
- Greatbanks, D., Pickford, R., 1987. Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. *Magnetic resonance in chemistry* 25, 208–215.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International journal of food microbiology* 146, 144–150.
- Guenther, E., 2013. *The Essential Oils-Vol 1: History-Origin in Plants-Production-Analysis*. Read Books Ltd.
- Guimarães, A.G., Oliveira, G.F., Melo, M.S., Cavalcanti, S.C., Antonioli, A.R., Bonjardim, L.R., Silva, F.A., Santos, J.P.A., Rocha, R.F., Moreira, J.C.F., 2010. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 107, 949–957.
- Guimarães, A.G., Quintans, J.S., Quintans-Júnior, L.J., 2013. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytotherapy Research* 27, 1–15.
- Guimarães, A.G., Scotti, L., Scotti, M.T., Júnior, F.J.M., Melo, N.S., Alves, R.S., Júnior, W.D.L., Bezerra, D.P., Gelain, D.P., Júnior, L.J.Q., 2014. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study. *Life sciences* 116, 8–15.
- Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P. G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., & Berti, L, 2010. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 29(7), 873-879.

- Gulluce, M., Karadayi, M., Guvenalp, Z., Ozbek, H., Arasoglu, T., Baris, O., 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food chemistry* 130, 248–253.
- Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry* 103, 1449–1456.
- Gupta, A., Sharma, S., Naik, S.N., 2011. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 703–707.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology* 124, 91–97.
- Hafedh, H., Fethi, B.A., Mejdi, S., Emira, N., Amina, B., 2010. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *African Journal of Microbiology Research* 4, 1122–1127.
- Hamdi, H., Abderrahim, R., Meganem, F., 2010. Spectroscopic studies of inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and benzidine diammonium dipicrate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75, 32–36.
- Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman, L.A., 2011. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. *International Journal of Current Research* 33, 86–98.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. En H. Thomar , *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* (255-295). Reykjavik: Wiley.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V, 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(6), 1081-1085.

- Hamoud, R., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., 2014. Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. *Phytomedicine* 21, 443–447.
- Hanan, A., 2013. Evaluation of insecticidal activities of *Mentha piperita* and *Lavandula angustifolia* essential oils against house fly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae). *Journal of Entomology and Nematology* 5, 50–54.
- Haque, M.R., Ansari, S.H., Najmi, A.K., Ahmad, M.A., 2014. Monoterpene phenolic compound thymol prevents high fat diet induced obesity in murine model. *Toxicology mechanisms and methods* 24, 116–123.
- Harabagiu, V., Simionescu, B.C., Pinteala, M., Merrienne, C., Mahuteau, J., Guégan, P., Cheradame, H., 2004. Synthesis and characterization of persilylated cyclodextrins. *Carbohydrate polymers* 56, 301–311.
- Harangi, J., Béke, G., Harangi, M., Mótóyán, J.A., 2012. The digestable parent cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 73, 335–339.
- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332.
- Hata, T., Sakaguchi, I., Mori, M., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., Watabe, K., 2003. Induction of apoptosis by *Citrus paradisi* essential oil in human leukemic (HL-60) cells. *In vivo (Athens, Greece)* 17, 553–559.
- Hatae, S., Nakajima, K., 1986. Skin whitening cosmetics. *Jpn Kokai JP* 86109, 705.
- Hayes, A.J., Markovic, B., 2003. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. *Food and chemical toxicology* 41, 1409–1416.
- Health, W.H.O.D. of M., Abuse, S., 2005. Mental health atlas 2005. World Health Organization.
- Hedges, A.R., 1998. Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews* 98, 2035–2044.
- Hedges, A.R., Shieh, W.J., Sikorski, C.T., 1995. Use of cyclodextrins for encapsulation in the use and treatment of food products.

- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G., von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry* 46, 3590–3595.
- Heldwein, C.G., Silva, L. de L., Gai, E.Z., Roman, C., Parodi, T.V., Bürger, M.E., Baldisserotto, B., Flores, É.M. de M., Heinzmann, B.M., 2014. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary anaesthesia and analgesia* 41, 621–629.
- Hemaiswarya, S., Doble, M., 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16, 997–1005.
- Hernández Sánchez, M. D. P., 2011. Encapsulación de Aceites Esenciales de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria.
- Hernández-Sánchez, P., López-Miranda, S., Guardiola, L., Serrano-Martínez, A., Gabaldón, J.A., Nuñez-Delicado, E., 2016. Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with  $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Higuchi, T.K., Connors, A., 1965. Phase-solubility techniques.
- Holland, L., Rizzi, G., Malton, P., 1999. Cosmetic compositions comprising cyclic oligosaccharides and fragrance. PCT Int Appl WO 67, 716.
- Horváth, G., Kovács, K., Kocsis, B., Kustos, I., 2009. Effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and its main constituents on the outer membrane protein composition of *Erwinia* strains studied with microfluid chip technology. *Chromatographia* 70, 1645–1650.
- Horvathova, E., Navarova, J., Galova, E., Sevcovicova, A., Chodakova, L., Snahnicanova, Z., Melusova, M., Kozics, K., Slamenova, D., 2014. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 6632–6639.
- Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., Inoue, H., 2010. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. *Journal of lipid research* 51, 132–139.



- Hsouna, A.B., Trigui, M., Mansour, R.B., Jarraya, R.M., Damak, M., Jaoua, S., 2011. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International journal of food microbiology* 148, 66–72.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 1841–1856.
- Huo, M., Cui, X., Xue, J., Chi, G., Gao, R., Deng, X., Guan, S., Wei, J., Soromou, L.W., Feng, H., 2013. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of surgical research* 180, e47–e54.
- Hurtubise, R.J., 1990. *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications*. Wiley-VCH.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry* 108, 986–995.
- Hussain, M.A., Diluccio, R.C., Maurin, M.B., 1993. Complexation of moricizine with nicotinamide and evaluation of the complexation constants by various methods. *Journal of pharmaceutical sciences* 82, 77–79.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Ibrahim, M.S., Shehatta, I.S., Al-Nayeli, A.A., 2002. Voltammetric studies of the interaction of lumazine with cyclodextrins and DNA. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 28, 217–225.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry* 93, 551–556.
- Irie, T., Uekama, K., 1999. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 36, 101–123.

- Irie, T., Uekama, K., 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *Journal of pharmaceutical sciences* 86, 147–162.
- Ito, K., Akahoshi, Y., Ito, M., Kaneko, S., 2016. Sedative effects of inhaled essential oil components of traditional fragrance *Pogostemon cablin* leaves and their structure–activity relationships. *Journal of traditional and complementary medicine* 6, 140–145.
- Ito, Y., Nagai, N., Shimomura, Y., 2010. Reduction in Intraocular Pressure by the Instillation of Eye Drops Containing Disulfiram Included with 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in Rabbit. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33, 1574–1578.
- Jaafari, A., Mouse, H.A., Rakib, E.M., Tilaoui, M., Benbakhta, C., Boulli, A., Abbad, A., Ziad, A., 2007. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17, 477–491.
- Jaafari, A., Tilaoui, M., Mouse, H.A., M'bark, L.A., Aboufatima, R., Chait, A., Lepoivre, M., Ziad, A., 2012. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22, 534–540.
- Jadhav, G.S., Vavia, P.R., 2008. Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a danazol- $\beta$ -cyclodextrin complex. *International journal of pharmaceuticals* 352, 5–16.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology* 26, 816–835.
- Jambhekar, S.S., Breen, P., 2016. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug discovery today* 21, 356–362.
- Jarho, P., Urtti, A., Pate, D.W., Suhonen, P., Järvinen, T., 1996. Increase in aqueous solubility, stability and in vitro corneal permeability of anandamide by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *International journal of pharmaceuticals* 137, 209–216.

- Jayakumar, S., Madankumar, A., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Kamaraj, S., Divya, M.G.J., Devaki, T., 2012. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and cellular biochemistry* 360, 51–60.
- Jeena, K., Liju, V.B., Viswanathan, R., Kuttan, R., 2014. Antimutagenic Potential and Modulation of Carcinogen-Metabolizing Enzymes by Ginger Essential Oil. *Phytotherapy Research* 28, 849–855.
- Jones, S.P., Parr, G.D., 1986. Polarographic detection of beta-cyclodextrin inclusion complexes. *International journal of pharmaceutics* 33, 105–114.
- Joshi, R., Gulati, A., 2015. Fractionation and identification of minor and aroma-active constituents in Kangra orthodox black tea. *Food chemistry* 167, 290–298.
- Jumtee, K., Komura, H., Bamba, T., Fukusaki, E., 2011. Predication of Japanese green tea (Sen-cha) ranking by volatile profiling using gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis. *Journal of bioscience and bioengineering* 112, 252–255.
- Jung, T.-H., Ha, H.-J., Ahn, J.-J., Kwak, H.-S., 2008. Development of cholesterol-reduced mayonnaise with crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin and added phytosterol. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 28, 211–217.
- Junquera, E., Pena, L., Aicart, E., 1995. A Conductimetric Study of the Interaction of  $\beta$ -Cyclodextrin or Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin with Dodecyltrimethylammonium Bromide in Water Solution. *Langmuir* 11, 4685–4690.
- Junquera, E., Romero, J.C., Aicart, E., 2001. Behavior of tricyclic antidepressants in aqueous solution: self-aggregation and association with  $\beta$ -cyclodextrin. *Langmuir* 17, 1826–1832.
- Juvancz, Z., Szejtli, J., 2002. The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21, 379–388.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology* 76, 626–631.

- Kamal, A., Ramalingam, T., Venugopal, N., 1991. Enantioselective hydrolysis of aryloxypropionic esters by bovine serum albumin: Enhancement in selectivity by  $\beta$ -cyclodextrin. *Tetrahedron: asymmetry* 2, 39–42.
- Kamatou, G.P., Viljoen, A.M., 2008. Linalool-a review of a biologically active compound of commercial importance. *Natural Product C<sup>o</sup>mmunications* 3, 1183–1192.
- Kang, D.-J., Im, J.-H., Kang, J.-H., Kim, K.H., 2015. Whole cell bioconversion of vitamin D<sub>3</sub> to calcitriol using *Pseudonocardia* sp. KCTC 1029BP. *Bioprocess and biosystems engineering* 38, 1281–1290.
- Kang, S.-H., Kim, Y.-S., Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Jeong, J.-H., Dong, X., Lee, J.-W., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., Park, P.-J., 2016. Anticancer Effect of Thymol on AGS Human Gastric Carcinoma Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 28–37.
- Kant, M.R., Bleeker, P.M., Van Wijk, M., Schuurink, R.C., Haring, M.A., 2009. Plant volatiles in defence. *Advances in botanical research* 51, 613–666.
- Kappe, C.O., 2004. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 43, 6250–6284.
- Karkabounas, S., Kostoula, O.K., Daskalou, T., Veltsistas, P., Karamouzis, M., Zelovitis, I., Metsios, A., Lekkas, P., Evangelou, A.M., Kotsis, N., 2006. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Experimental oncology* 28, 121–125.
- Katiki, L.M., Chagas, A.C.S., Bizzo, H.R., Ferreira, J.F.S., Amarante, A.F.T. do, 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. *Veterinary Parasitology* 183, 103–108.
- Kaur, S., Kumar, S., Kaur, P., Chandel, M., 2010. Study of antimutagenic potential of phytoconstituents isolated from *Terminalia arjuna* in the Salmonella/Microsome Assay. *American Journal of Biomedical Sciences* 2, 164–177.
- Kawashima, K., 1980. Prevention of discoloration of food colorants. *Jpn. Kokai JP* 8071464.

- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., 2016. Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate polymers* 131, 264–272.
- Khani, A., y Heydarian, M., 2014. Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.). *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(12), 956-961.
- Khater, H.F., Ramadan, M.Y., El-Madawy, R.S., 2009. Lousicidal, ovicidal and repellent efficacy of some essential oils against lice and flies infesting water buffaloes in Egypt. *Veterinary parasitology* 164, 257–266.
- Khosravi, A.R., Minoeianhaghighi, M.H., Shokri, H., Emami, S.A., Alavi, S.M., Asili, J., 2011. The potential inhibitory effect of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essential oils on the growth of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 216–224.
- Kiazolu, J.B., Intisar, A., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, R., Wu, Z., Zhang, W., 2016. Phytochemical screening and chemical variability in volatile oils of aerial parts of *Morinda morindoides*. *Natural product research* 1–4.
- Kim, E.-Y., Baik, I.-H., Kim, J.-H., Kim, S.-R., Rhyu, M.-R., 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean Journal of Food Science and Technology* 36, 333–338.
- Kim, H.O., Hill, R.D., 1984. Physical characteristics of wheat starch granule gelatinization in the presence of cycloheptaamylose. *Cereal chemistry* (USA).
- Kim, J.-R., Ji, C.W., Seo, B.Y., Park, C.G., Lee, K.-S., Lee, S.-G., 2013. Toxicity of Plant Essential Oils and Their Spray Formulations against the Citrus Flatid Planthopper *Metcalfa pruinosa* Say (Hemiptera: Flatidae). *The Korean Journal of Pesticide Science* 17, 419–427.
- Kim, S.-Y., Kang, D.-H., Kim, J.-K., Ha, Y.-G., Hwang, J.Y., Kim, T., Lee, S.-H., 2011. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal of food science* 76, M41–M46.

- Kim, S., Kim, H.-J., Yeo, J.-S., Hong, S.-J., Lee, J.-M., Jeon, Y., 2011. The effect of lavender oil on stress, bispectral index values, and needle insertion pain in volunteers. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 17, 823–826.
- Kim, S.-I., Lee, D.-W., 2014. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17, 13–17.
- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry* 43, 2839–2845.
- Kiss, T., Fenyvesi, F., Pasztor, N., Feher, P., Varadi, J., Kocsan, R., Szente, L., Fenyvesi, E., Szabo, G., Vecsernyes, M., 2007. Cytotoxicity of different types of methylated  $\beta$ -cyclodextrins and ionic derivatives. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 62, 557–558.
- Kłyś, M., 2007. The influence of the herbs sage and wormwood on the migration of *Rhyzopertha dominica* (F.)(Coleoptera: Bostrichidae) populations. *Journal of stored products research* 43, 558–563.
- Kohata, S., Jyodoi, K., Ohyoshi, A., 1993. Thermal decomposition of cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and modified  $\beta$ -CyD) and of metal-( $\beta$ -CyD) complexes in the solid phase. *Thermochimica acta* 217, 187–198.
- Koo, J.Y., Kim, H.J., Jung, K.-O., Park, K.-Y., 2004. Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-fluorouracil. *Journal of medicinal food* 7, 117–121.
- Koparal, A.T., Zeytinoğlu, M., 2003. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549, in: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. Springer, pp. 207–211.
- Kozłowski, C.A., Sliwa, W., 2013. Cyclodextrin polymers: recent applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*.
- Kozłowski, C.A., Sliwa, W., 2010. Use of cyclodextrin polymers in separation of organic species. Nova Science Publishers.
- Kristmundsdóttir, T., Loftsson, T., Holbrook, W.P., 1996. Formulation and clinical evaluation of a hydrocortisone solution for the treatment of oral disease. *International journal of pharmaceutics* 139, 63–68.

- Kublik, H., Bock, T.K., Schreier, H., Müller, B.W., 1996. Nasal absorption of 17- $\beta$ -estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 42, 320–324.
- Kulkarni, S.S., Bhalke, R.D., Pande, V.V., Kendre, P.N., 2014. Herbal Plants In Photo Protection And Sun Screening Action: An Overview. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 4, 1104–1113.
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S., 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products* 34, 802–817.
- Kurkov, S.V., Loftsson, T., 2013. Cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics* 453, 167–180.
- Kwak, H.S., Kim, S.H., Kim, J.H., Choi, H.J., Kang, J., 2004. Immobilized  $\beta$ -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk. *Archives of pharmacal research* 27, 873–877.
- Kwaterczak, A., Duszczyk, K., Bielejewska, A., 2009. Comparison of chiral separation of basic drugs in capillary electrophoresis and liquid chromatography using neutral and negatively charged cyclodextrins. *Analytica chimica acta* 645, 98–104.
- Kyung, K.H., 2012. Antimicrobial properties of allium species. *Current opinion in biotechnology* 23, 142–147.
- Lach, J.L., Chin, T.-F., 1964. Schardinger dextrin interaction IV. Inhibition of hydrolysis by means of molecular complex formation. *Journal of pharmaceutical sciences* 53, 924–927.
- Lai, W.-W., Yang, J.-S., Lai, K.-C., Kuo, C.-L., Hsu, C.-K., Wang, C.-K., Chang, C.-Y., Lin, J.-J., Tang, N.-Y., Chen, P.-Y., 2009. Rhein induced apoptosis through the endoplasmic reticulum stress, caspase-and mitochondria-dependent pathways in SCC-4 human tongue squamous cancer cells. *In Vivo* 23, 309–316.
- Lakkakula, J.R., Krause, R.W.M., 2014. A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications. *Nanomedicine* 9, 877–894.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology* 91, 453–462.

- Landa, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Vanek, T., Marsik, P., 2009. In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. *Archives of pharmacal research* 32, 75–78.
- Landy, D., Mallard, I., Ponchel, A., Monflier, E., Fourmentin, S., 2012. Cyclodextrins for remediation technologies, in: *Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Springer, pp. 47–81.
- Landy, D., Tetart, F., Truant, E., Blach, P., Fourmentin, S., Surpateanu, G., 2007. Development of a competitive continuous variation plot for the determination of inclusion compounds stoichiometry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 57, 409–413.
- Lapczynski, A., Letizia, C.S., Api, A.M., 2008. Addendum to Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology* 46, S190–S192.
- Laribi, B., Kouki, K., M'Hamdi, M., Bettaieb, T., 2015. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia* 103, 9–26.
- La Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F., Mauriello, G., 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Research in microbiology* 162, 164–172.
- Lavoine, N., Givord, C., Tabary, N., Desloges, I., Martel, B., Bras, J., 2014. Elaboration of a new antibacterial bio-nano-material for food-packaging by synergistic action of cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 26, 330–340.
- Laza-Knoerr, A.L., Gref, R., Couvreur, P., 2010. Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of drug targeting* 18, 645–656.
- Lee, B.K., Kim, J.H., Jung, J.W., Choi, J.W., Han, E.S., Lee, S.H., Ko, K.H., Ryu, J.H., 2005. Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Toxicology letters* 157, 49–56.
- Letizia, C.S., Cocchiara, J., Lalko, J., Api, A.M., 2003. Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology* 41, 943–964.
- Li, M., Muthaiyan, A., A O'Bryan, C., E Gustafson, J., Li, Y., G Crandall, P., C Ricke, S., 2011. Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. *Current pharmaceutical biotechnology* 12, 1240–1254.



- Li, Y., Li, M.Y., Wang, L., Jiang, Z.H., Li, W.Y., Li, H., 2004. [Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia Annul L*]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Sichuan University. Medical science edition* 35, 337–339.
- Li, Z., Chen, S., Gu, Z., Chen, J., Wu, J., 2014. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. *Trends in Food Science & Technology* 35, 151–160.
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., Du, G., Wu, J., Chen, J., 2007.  $\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Applied microbiology and biotechnology* 77, 245–255.
- Liang, W.Z., Lu, C.H., 2012. Carvacrol-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life sciences* 90, 703–711.
- Licata, M., Tuttolomondo, T., Dugo, G., Ruberto, G., Leto, C., Napoli, E.M., Rando, R., Rita Fede, M., Virga, G., Leone, R., 2015. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian oregano biotypes. *Journal of Essential Oil Research* 27, 293–306.
- Liju, V.B., Jeena, K., Kuttan, R., 2013. Chemopreventive activity of turmeric essential oil and possible mechanisms of action. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 15, 6575–6580.
- Lima, R.K., Cardoso, M.G., 2013. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. *Revista Fitos Eletrônica* 3, 14–24.
- Lin, J., Zhang, P., Pan, Z., Xu, H., Luo, Y., Wang, X., 2013. Discrimination of oolong tea (*Camellia sinensis*) varieties based on feature extraction and selection from aromatic profiles analysed by HS-SPME/GC-MS. *Food chemistry* 141, 259–265.
- Linde, G.A., Junior, A.L., de Faria, E.V., Colauto, N.B., de Moraes, F.F., Zanin, G.M., 2010. The use of 2D NMR to study  $\beta$ -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides. *Food research international* 43, 187–192.
- Linde, G.A., Junior, A.L., de Faria, E.V., Colauto, N.B., de Moraes, F.F., Zanin, G.M., 2009. Taste modification of amino acids and protein hydrolysate by  $\alpha$ -cyclodextrin. *Food research international* 42, 814–818.

- Linde, G.A., Laverde Jr, A., Colauto, N.B., 2011. Changes to taste perception in the food industry: use of cyclodextrins, in: *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. Springer, pp. 99–118.
- Liu, F.-S., 2009. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy – a quick review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 48, 239–244.
- Liu, L., Spindler, R., y Vakili-Tahami, G. R, 2013. Low pH retinoid topical compositions. U.S. Patent No. 8,529,920. Washington, DC: U.S.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., Cameán, A.M., 2015. In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro* 29, 647–656.
- Loewenfeld, C.B., 1980. *Guía de las hierbas y especias*.
- Loftsson, T., 1995. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs in aqueous solutions. *Drug Stability* 1, 22–33.
- Loftsson, T., Brewster, M. E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 1017–1025.
- Loftsson, T., Brewster, M.E., 2010. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of pharmacy and pharmacology* 62, 1607–1621.
- Loftsson, T., Brewster, M.E., 2011. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63, 1119–1135.
- Loftsson, T., Duchêne, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics* 329, 1–11.
- Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M., Järvinen, T., 2005. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* 2, 335–351.
- Loftsson, T., Leeves, N., Bjornsdottir, B., Duffy, L., Masson, M., 1999. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *Journal of pharmaceutical sciences* 88, 1254–1258.
- Loftsson, T., Magnúsdóttir, A., Másson, M., Sigurjónsdóttir, J.F., 2002. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *Journal of pharmaceutical sciences* 91, 2307–2316.

- Loftsson, T., Ólafsdóttir, B.J., Friðriksdóttir, H., Jónsdóttir, S., 1993. Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1, 95–101.
- Loftsson, T., Stefansson, E., 1997. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug development and industrial pharmacy* 23, 473–481.
- Loksuwan, J., 2007. Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food hydrocolloids* 21, 928–935.
- López, C.A., de Vries, A.H., Marrink, S.J., 2011. Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS Comput Biol* 7, e1002020.
- López-de-Dicastillo, C., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., 2011a. Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering* 104, 380–386.
- López-de-Dicastillo, C., Jordá, M., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Munoz, P., 2011b. Development of active polyvinyl alcohol/ $\beta$ -cyclodextrin composites to scavenge undesirable food components. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 11026–11033.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E., 2008a. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food chemistry* 111, 262–267.
- Lucas-Abellán, C., Gabaldon-Hernandez, J.A., Penalva, J., Fortea, M.I., Nunez-Delicado, E., 2008. Preparation and characterization of the inclusion complex of chlorpyrifos in cyclodextrins to improve insecticide formulations. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 8081–8085.
- Lucas-Abellán, C., Guillén, I., Mercader-Ros, M.T., Serrano-Martínez, A., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J.A., 2014. Fluorimetric determination of sulphathiazole in honey by means the formation of CDs inclusion complexes. *Carbohydrate polymers* 103, 87–93.

- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M.T., Zafrilla, M.P., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E., 2008b. ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 2254–2259.
- Luciano, F.B., Holley, R.A., 2009. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. *International journal of food microbiology* 131, 240–245.
- Luk, S.-U., Lee, T.K.-W., Liu, J., Lee, D.T.-W., Chiu, Y.-T., Ma, S., Ng, I.O.-L., Wong, Y.-C., Chan, F.L., Ling, M.-T., 2011. Chemopreventive effect of PSP through targeting of prostate cancer stem cell-like population. *PloS one* 6, e19804.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., Li, C., 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International* 44, 3057–3064.
- Lv, H.-P., Zhong, Q.-S., Lin, Z., Wang, L., Tan, J.-F., Guo, L., 2012. Aroma characterisation of Pu-erh tea using headspace-solid phase microextraction combined with GC/MS and GC-olfactometry. *Food Chemistry* 130, 1074–1081.
- Ma, J.-W., Tsao, T.C.-Y., Hsi, Y.-T., Lin, Y.-C., Chen, Y., Chen, Y., Ho, C.-T., Kao, J.-Y., Way, T.-D., 2016. Essential oil of *Curcuma aromatica* induces apoptosis in human non-small-cell lung carcinoma cells. *Journal of Functional Foods* 22, 101–112.
- Macedo, I.T., Bevilaqua, C.M., de Oliveira, L.M., Camurça-Vasconcelos, A.L., Vieira, L. da S., Oliveira, F.R., Queiroz-Junior, E.M., Tomé, A. da R., Nascimento, N.R., 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary parasitology* 173, 93–98.
- Machado, M., Dinis, A.M., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Custódio, J.B., do Céu Sousa, M., 2010. Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitology research* 106, 1205–1215.

- Madrid, J.M., Villafruela, M., Serrano, R., Mendicuti, F., 1999. Experimental thermodynamics and molecular mechanics calculations of inclusion complexes of 9-methyl anthracenoate and 1-methyl pyrenoate with  $\beta$ -cyclodextrin. *The Journal of Physical Chemistry B* 103, 4847–4853.
- Maestri, D.M., Nepote, V., Lamarque, A.L., Zygodlo, J.A., 2006. 5 Natural products as antioxidants.
- Magalhães, L., Nitschke, M., 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29, 138–142.
- Maguna, F.P., Romero, A.M., Garro, O.A., Okulik, N.B., 2006. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet*. Argentina: Facultad de Agroindustrias.
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Bányász, T., Fülöp, L., Varró, A., Nánási, P.P., 2002. Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. *British journal of pharmacology* 136, 330–338.
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Bányász, T., Fülöp, L., Varró, A., Nánási, P.P., 2004. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European journal of pharmacology* 487, 29–36.
- Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R.C., 2006. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life sciences* 78, 2081–2087.
- Mahmoud, S.S., Croteau, R.B., 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in plant science* 7, 366–373.
- Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., Snoussi, M., De Feo, V., 2015. Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules* 20, 12016–12028.
- Mann, T.S., Agnihotri, V.K., Kumar, D., Pal, P.K., Koundal, R., Kumar, A., Padwad, Y.S., 2014. In vitro cytotoxic activity guided essential oil composition of flowering twigs of *Stevia rebaudiana*. *Natural product communications* 9, 715–718.

- Mannila, J., Järvinen, K., Holappa, J., Matilainen, L., Auriola, S., Jarho, P., 2009. Cyclodextrins and chitosan derivatives in sublingual delivery of low solubility peptides: A study using cyclosporin A,  $\alpha$ -cyclodextrin and quaternary chitosan N-betainate. *International journal of pharmaceutics* 381, 19–24.
- Manolikas, M.K., Sawant, M.R., 2003. Study of solubility of isoproturon by its complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Chemosphere* 51, 811–816.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., Manosroi, A., 2006. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer letters* 235, 114–120.
- Marchese, A., Orhan, I.E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S.F., Gortzi, O., Izadi, M., Nabavi, S.M., 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry* 210, 402–414.
- Marini, A., Berbenni, V., Bruni, G., Giordano, F., Villa, M., 1996. Dehydration of  $\beta$ -cyclodextrin: facts and opinions. *Thermochimica acta* 279, 27–33.
- Marles, R.J., Farnsworth, N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2, 137–189.
- Marques, H.C., Hadgraft, J., Kellaway, I.W., 1990. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *International Journal of Pharmaceutics* 63, 259–266.
- Marques, H.M.C., 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 313–326.
- Martín del Valle, E.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry* 39, 1033–1046.
- Martín, M.A., Ballesteros, M., Del Castillo, B., 1985. The influence of solvent polarity and viscosity on fluorescence of quinolizinium salts. *Analytica Chimica Acta* 170, 95–100.
- Martínez, M. J. E. (2012). *La Aromaterapia en mi vida*. Bloomington: Palibrio.
- Martínez, M.L., Curti, M.I., Rocca, P., Llabot, J.M., Penci, M.C., Bodoira, R.M., Ribotta, P.D., 2015. Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology* 270, 271–277.

- Mas, M. del C.G., Rambla, J.L., Torrente, M.G., Buj, A., Gresa, M.L., Granell, A., 2015. Análisis no dirigido del aceite esencial de las variedades de mandarino *Clemenules* y *Clemenpons*. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos* 232–241.
- Masango, P., 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production* 13, 833–839.
- Másson, M., Loftsson, T., Jónsdóttir, S., Fridriksdóttir, H., Petersen, D.S., 1998. Stabilisation of ionic drugs through complexation with non-ionic and ionic cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics* 164, 45–55.
- Mastelic, J., Jerkovic, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., Smrečki, V., Žarković, N., Brčić-Kostić, K., Vikić-Topić, D., 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 3989–3996.
- Matias, E.F., Alves, E.F., Silva, M.K., Carvalho, V.R., Figueredo, F.G., Ferreira, J.V., Coutinho, H.D., Silva, J.M., Ribeiro-Filho, J., Costa, J.G., 2016. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. *Industrial Crops and Products* 87, 45–53.
- Matsubara, E., Fukagawa, M., Okamoto, T., Fukuda, A., Hayashi, C., Ohnuki, K., Shimizu, R., Kondo, R., 2010. Multifunctional biological activities of natural products (4)-multifunctional biological activities of *Laurus nobilis* L.-volatiles emitted from the leaves of *Laurus nobilis* L. improve vigilance performance in visual discrimination task. *Aroma Research* 11, 370–379.
- Matsue, T., Osa, T., Evans, D.H., 1984. Determination of some physical constants of cyclodextrin complexes by electrochemical methods. *Journal of inclusion phenomena* 2, 547–554.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* 108, 652–659.
- Medarević, D., Kachrimanis, K., Djurić, Z., Ibrić, S., 2015. Influence of hydrophilic polymers on the complexation of carbamazepine with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 78, 273–285.

- Medina-Torres, L., Santiago-Adame, R., Calderas, F., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Núñez-Ramírez, D.M., Bernad-Bernad, M.J., Manero, O., 2016. Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Industrial Crops and Products* 90, 1–8.
- Meeran, N., Fizur, M., Stanely Mainzen Prince, P., 2012. Protective effects of thymol on altered plasma lipid peroxidation and nonenzymic antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 26, 368–373.
- Mehdi, S.J., Ahmad, A., Irshad, M., Manzoor, N., Rizvi, M.M.A., 2011. Cytotoxic effect of carvacrol on human cervical cancer cells. *Biology and Medicine* 3, 307–12.
- Melo, F.H., Venâncio, E.T., De Sousa, D.P., De França Fonteles, M.M., De Vasconcelos, S.M., Viana, G.S., De Sousa, F.C., 2010. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundamental & clinical pharmacology* 24, 437–443.
- Mendes, S.S., Bomfim, R.R., Jesus, H.C.R., Alves, P.B., Blank, A.F., Estevam, C.S., Antonioli, A.R., Thomazzi, S.M., 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 391–397.
- Meneses, R., Ocazonez, R.E., Martínez, J.R., Stashenko, E.E., 2009. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 8, 1.
- Menezes, P.P., Serafini, M.R., Quintans-Júnior, L.J., Silva, G.F., Oliveira, J.F., Carvalho, F.M.S., Souza, J.C.C., Matos, J.R., Alves, P.B., Matos, I.L., 2014. Inclusion complex of (-)-linalool and  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 115, 2429–2437.
- Menezes, P.P., Serafini, M.R., Santana, B.V., Nunes, R.S., Quintans, L.J., Silva, G.F., Medeiros, I.A., Marchioro, M., Fraga, B.P., Santos, M.R., 2012. Solid-state  $\beta$ -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochimica acta* 548, 45–50.



- Meo, P.L., D'Anna, F., Riela, S., Gruttadauria, M., Noto, R., 2006. Polarimetry as a useful tool for the determination of binding constants between cyclodextrins and organic guest molecules. *Tetrahedron letters* 47, 9099–9102.
- Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E., 2010. Effect of HP- $\beta$ -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry* 118, 769–773.
- Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellán, C., Gabaldón, J.A., Fortea, M.I., Martínez-Cachá, A., Núñez-Delicado, E., 2010. Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 4675–4680.
- Michiels, J., Missotten, J., Dierick, N., Fremaut, D., Maene, P., De Smet, S., 2008. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 2371–2381.
- Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules* 15, 9252–9287.
- Miguel, M.G., Dandlen, S.A., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Marques, M.H., 2009. Comparative evaluation of the antioxidant activities of thymol and carvacrol and the corresponding  $\beta$ -cyclodextrin complexes, in: *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009* 853. pp. 363–368.
- Miller, L.A., Carrier, R.L., Ahmed, I., 2007. Practical considerations in development of solid dosage forms that contain cyclodextrin. *Journal of pharmaceutical sciences* 96, 1691–1707.
- Milligan, E.D., Penzkover, K.R., Soderquist, R.G., Mahoney, M.J., 2012. Spinal Interleukin-10 Therapy to Treat Peripheral Neuropathic Pain. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface* 15, 520–526.
- Milner, J.A., 2001. A historical perspective on garlic and cancer. *The Journal of nutrition* 131, 1027S–1031S.
- Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., Imanishi, J., 2003. The Inhibitory Effect of Essential Oils on Herpes Simplex Virus Type-1 Replication In Vitro. *Microbiology and immunology* 47, 681–684.

- Miro, A., Rondinone, A., Nappi, A., Ungaro, F., Quaglia, F., La Rotonda, M.I., 2009. Modulation of release rate and barrier transport of Diclofenac incorporated in hydrophilic matrices: role of cyclodextrins and implications in oral drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72, 76–82.
- Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., & Romdhane, M., 2009. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *Journal of Food Science* 74, 358–363.
- Moein, M.R., Zomorodian, K., Pakshir, K., Yavari, F., Motamedi, M., Zarshenas, M.M., 2015. *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague Chemical Composition of Essential Oil and Antimicrobial Activities of Respective Fractions. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine* 20, 50–56.
- Mohan, P.K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C.V., Joseph, R., 2012. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 62, 77–84.
- Mohit, V., Harshal, G., Neha, D., Vilasrao, K., Rajashree, H., 2011. A comparative study of complexation methods for cefdinir-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin system. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 71, 57–66.
- Moneghini, M., Zingone, G., De Zordi, N., 2009. Influence of the microwave technology on the physical–chemical properties of solid dispersion with Nimesulide. *Powder technology* 195, 259–263.
- Monzote, L., Garcia, M., Montalvo, A.M., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2007. In vitro activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. *Phytotherapy Research* 21, 1055–1058.
- More, U.B., Narkhede, H.P., Dalal, D.S., Mahulikar, P.P., 2007. Synthesis of biologically active carvacrol compounds using different solvents and supports. *Synthetic communications* 37, 1957–1964.
- Morin-Crini, N., Crini, G., 2013. Environmental applications of water-insoluble  $\beta$ -cyclodextrin–epichlorohydrin polymers. *Progress in Polymer Science* 38, 344–368.

- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* 30, 2785–2791.
- Mosinger, J., Tománková, V., Němcová, I., Zýka, J., 2001. Cyclodextrins in analytical chemistry. *Analytical letters* 34, 1979–2004.
- Mulay, M.S., Sagariatil, V.H.B., Gaikwad, P.D., Pawar, S.P., 2011. Taste masking by inclusion complexation: A review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development* 3, 35–47.
- Muñoz-Botella, S., Del Castillo, B., Martyn, M.A., 1995. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *ARS Pharmaceutica* 36, 187–198.
- Muñoz de la Peña, A., Diez, N.M., García, M.M., Gil, D.B., Cañada-Cañada, F., 2007. A chemometric sensor for determining sulphaguanidine residues in honey samples. *Talanta* 73, 304–313.
- Munro, I.C., Newberne, P.M., Young, V.R., Bär, A., 2004. Safety assessment of  $\gamma$ -cyclodextrin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39, 3–13.
- Mura, P., 2014. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 101, 238–250.
- Mura, P., 2015. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 113, 226–238.
- Murphy, K., Kubin, Z.J., Shepherd, J.N., Ettinger, Rh., 2010. Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. *Phytomedicine* 17, 674–678.
- Nadeem, H.Ş., Torun, M., Özdemir, F., 2011. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT-Food Science and Technology* 44, 1626–1635.
- Nasir, A., Harikumar, S.L., Kaur, A., 2012. Cyclodextrins: An excipient tool in drug delivery. *International Research Journal of Pharmacy* 3, 11.

- Nasr, M., Sendi, J.J., Moharramipour, S., Zibae, A., 2015. Evaluation of *Origanum vulgare* L. essential oil as a source of toxicant and an inhibitor of physiological parameters in diamondback moth, *Plutella xylostella* L.(Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B., 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1, 1806–1815.
- Németh, K., Tárkányi, G., Varga, E., Imre, T., Mizsei, R., Iványi, R., Visy, J., Szemán, J., Jicsinszky, L., Szente, L., 2011. Enantiomeric separation of antimalarial drugs by capillary electrophoresis using neutral and negatively charged cyclodextrins. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 54, 475–481.
- Ng, H.S., Ooi, C.W., Mokhtar, M.N., Show, P.L., Ariff, A., Tan, J.S., Ng, E.-P., Ling, T.C., 2013. Extractive bioconversion of cyclodextrins by *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase in aqueous two-phase system. *Bioresource technology* 142, 723–726.
- Nguefack, J., Leth, V., Zollo, P.A., Mathur, S.B., 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 94, 329–334.
- Ni, X., Suhail, M.M., Yang, Q., Cao, A., Fung, K.-M., Postier, R.G., Woolley, C., Young, G., Zhang, J., Lin, H.-K., 2012. Frankincense essential oil prepared from hydrodistillation of *Boswellia sacra* gum resins induces human pancreatic cancer cell death in cultures and in a xenograft murine model. *BMC complementary and alternative medicine* 12, 1.
- Nieddu, M., Rassa, G., Boatto, G., Bosi, P., Trevisi, P., Giunchedi, P., Carta, A., Gavini, E., 2014. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. *Carbohydrate polymers* 102, 393–399.
- Nóbrega de Almeida, R., Agra, M. de F., Negromonte Souto Maior, F., De Sousa, D.P., 2011. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules* 16, 2726–2742.

- Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., Bisignano, G., 2012. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied microbiology and biotechnology* 96, 1029–1038.
- Novy, P., Davidova, H., Serrano-Rojero, C.S., Rondevaldova, J., Pulkrabek, J., Kokoska, L., 2015. Composition and Antimicrobial Activity of *Euphrasia rostkoviana* Hayne Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015.
- Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M., 2005. Polyphenol oxidase from Dominga table grape. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 6087–6093.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M.M., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F., 1999. Hydroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. *Archives of biochemistry and biophysics* 367, 274–280.
- Ono, N.A.O., Miyamoto, Y., Ishiguro, T., Motoyama, K., Hirayama, F., Iohara, D., Seo, H., Tsuruta, S., Arima, H., Uekama, K., 2011. Reduction of bitterness of antihistaminic drugs by complexation with  $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of pharmaceutical sciences* 100, 1935–1943.
- Ortiz, A.C., Lombardo, M.C.M., 2009. Algunas plantas medicinales de la comarca de Andújar: usos, aplicaciones, ecología y cultivo. *Boletín del Instituto de Estudios Giennenses* 289–322.
- Ota, T., Takeda, F., 1981. Cyclodextrins as cheese additives. *Jpn. Kokai JP* 8175060.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 5598–5605.
- Özbek, H., Uğraş, S., Dülger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Öztürk, G., Öztürk, A., 2003. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia* 74, 317–319.
- Pajohi, M.R., Tajik, H., Farshid, A.A., Hadian, M., 2011. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seed and nisin in a food model. *Journal of applied microbiology* 110, 943–951.

- Palá-Paúl, J., Brophy, J. J., Goldsack, R. J., & Fontaniella, B., 2004. Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia. *Biochemical systematics and ecology* 32(1), 55-62.
- Pan, K., Chen, H., Davidson, P.M., Zhong, Q., 2014. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 1649–1657.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of ethnopharmacology* 39, 167–170.
- Patrizia, R., Marelle G, B., Luc, D., Ivonne MCM, R., 2011. Levels of Genotoxic and Carcinogenic Ingredients in Plant Food Supplements and Associated Risk Assessment. *Food and Nutrition Sciences* 2011.
- Pavela, R., 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Industrial Crops and Products* 76, 174–187.
- Pei, R., Zhou, F., Ji, B., Xu, J., 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of food science* 74, M379–M383.
- Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K.S., Gomes, M.D.M., Lima, F.C., Lahlou, S., Magalhaes, P.J.C., Ceccatto, V.M., Coelho-de-Souza, A.N., Leal-Cardoso, J.H., 2010. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & clinical pharmacology* 24, 341–350.
- Pelissari, F.M., Grossmann, M.V., Yamashita, F., Pineda, E.A.G., 2009. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 7499–7504.
- Pelletier, M.J., 1999. Analytical applications of Raman spectroscopy. United Kingdom Wiley-Blackwell.
- Peretto, G., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R.J., Sarreal, S.B.L., Hua, S.S.T., Sambo, P., McHugh, T.H., 2014. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology* 89, 11–18.

- Pérez-Cruz, F., Aguilera-Venegas, B., Lapier, M., Sobarzo-Sánchez, E., Villares, E.U., Olea-Azar, C., 2013. Host-guest interaction between new nitrooxoisoaporphine and  $\beta$ -cyclodextrins: Synthesis, electrochemical, electron spin resonance and molecular modeling studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 102, 226–234.
- Pérez-Urria Carril, E., Ávalos García, A., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA* 2, 119–145.
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A.R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M.C., Nostro, A.L., 2015. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control* 54, 188–199.
- Phillips, C., Laird, K., 2014. *Vapour of a citrus essential oil blend and its antimicrobial properties*. U.S. Patent Application No. 14/048,454.
- Pilau, M.R., Alves, S.H., Weiblen, R., Arenhart, S., Cueto, A.P., Lovato, L.T., 2011. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 1616–1624.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M., 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate polymers* 101, 121–135.
- Piras, A., Rosa, A., Marongiu, B., Atzeri, A., Dessì, M.A., Falconieri, D., Porcedda, S., 2012. Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Seeds of *Myristica fragrans* by Supercritical CO<sub>2</sub>: Chemical Composition and Cytotoxic Activity on Caco-2 Cancer Cells. *Journal of food science* 77, C448–C453.
- Pitha, J., Hoshino, T., 1992. Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange. *international Journal of Pharmaceutics* 80, 243–251.
- Pizarro, L., Stange, C., 2009. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e investigación agraria* 36, 143–162.

- Polatoğlu, K., Karakoç, Ö.C., Yücel, Y.Y., Gücel, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Demirci, F., 2016. Insecticidal activity of edible *Crithmum maritimum* L. essential oil against Coleopteran and Lepidopteran insects. *Industrial Crops and Products* 89, 383–389.
- Politeo, O., Jukic, M., Milos, M., 2007. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry* 101, 379–385.
- Poulose, A.J., Croteau, R., 1978. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 187, 307–314.
- Prakash Rao, B., Suresh, S., Narendra, C., 2006. Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina de rifampicina.
- Pranckutė, R., Kaunietis, A., Kuisienė, N., Čitavičius, D., 2014. Development of synbiotics with inulin, palatinose,  $\alpha$ -cyclodextrin and probiotic bacteria. *Polish Journal of Microbiology* 63, 33–41.
- Prasad, N., Strauss, D., Reichart, G., 1999. *Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals*. European Patent. 1,084,625.
- Primo Yúfera, Eduardo. Química Orgánica Básica y aplicada. De la molécula a la industria, 2009. España: Reverté. Tomo I y Tomo II
- Quintans-Júnior, L.J., Barreto, R.S., Menezes, P.P., Almeida, J.R., Viana, A.F.S., Oliveira, R., Oliveira, A.P., Gelain, D.P., Lucca Júnior, W., Araújo, A.A., 2013.  $\beta$ -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 113, 167–172.
- Radi, A.-E., Eissa, S., 2010. Electrochemistry of cyclodextrin inclusion complexes of pharmaceutical compounds. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal* 3, 74–85.
- Radu, C.-D., Parteni, O., Ochiuz, L., 2016. Applications of cyclodextrins in medical textiles—review. *Journal of Controlled Release* 224, 146–157.
- Rafati, A.A., Bagheri, A., Iloukhani, H., Zarinehzhad, M., 2005. Study of inclusion complex formation between a homologous series of n-alkyltrimethylammonium bromides and  $\beta$ -cyclodextrin, using conductometric technique. *Journal of molecular liquids* 116, 37–41.



- Raj, G.A., Chandrasekaran, M., Krishnamoorthy, S., Jayaraman, M., Venkatesalu, V., 2015. Phytochemical profile and larvicidal properties of seed essential oil from *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae), against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology research* 114, 3385–3391.
- Rajewski, R.A., Stella, V.J., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences* 85, 1142–1169.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R., 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 5062–5069.
- Rammanee, K., Hongpattarakere, T., 2011. Effects of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food and Bioprocess Technology* 4, 1050–1059.
- Rao, B. P., Zurréis, S., Balasangameshwer, C. N., 2006. Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina de rifampicina. *Ars Pharmaceutica* 47, 37-59.
- Rattan, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop protection* 29, 913–920.
- Rattanachaiakunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of bioscience and bioengineering* 110, 614–619.
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250–264.
- Ravichandran, M., Hettiarachchy, N.S., Ganesh, V., Ricke, S.C., Singh, S., 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety* 31, 462–471.
- Ravindra, N.S., Kulkarni, R.N., 2015. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: Variation among clones and plant parts. *Scientia Horticulturae* 184, 31–35.

- Regnier, T., Combrinck, S., Du Plooy, W., Botha, B., 2010. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology* 57, 176–182.
- Reichling, J., Koch, C., Stahl-Biskup, E., Sojka, C., Schnitzler, P., 2005. Virucidal activity of a  $\beta$ -triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta medica* 71, 1123–1127.
- Reineccius, G.A., 2009. Edible films and coatings for flavor encapsulation, in: *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer, pp. 269–294.
- Reineccius, T.A., Reineccius, G.A., Peppard, T.L., 2002. Encapsulation of flavors using cyclodextrins: comparison of flavor retention in alpha, beta, and gamma types. *Journal of food science* 67, 3271–3279.
- Reineccius, T.A., Reineccius, G.A., Peppard, T.L., 2003. Flavor release from cyclodextrin complexes: Comparison of alpha, beta, and gamma types. *Journal of food science* 68, 1234–1239.
- Reineccius, T.A., Reineccius, G.A., Peppard, T.L., 2005. The effect of solvent interactions on  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrin/flavor molecular inclusion complexes. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 388–392.
- Reineccius, G.A., Risch, S.J., 1986. Encapsulation of artificial flavors by  $\beta$ -cyclodextrin. *Perfum. Flavor* 11, 1–6.
- Rekharsky, M.V., Goldberg, R.N., Schwarz, F.P., Tewari, Y.B., Ross, P.D., Yamashoji, Y., Inoue, Y., 1995. Thermodynamic and nuclear magnetic resonance study of the interactions of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin with model substances: phenethylamine, ephedrine, and related substances. *Journal of the American Chemical Society* 117, 8830–8840.
- Ribeiro-Claro, P.J., Amorim da Costa, A.M., Vueba, M.L., Pina, M.E., Amado, A.M., 2006. Para-halogenated benzaldehyde molecules included in cyclodextrins: a combined spectroscopic and thermal analysis. *Journal of Raman Spectroscopy* 37, 472–479.
- Ribeiro, A.B., Mateus, E.P., Rodríguez-Maroto, J.-M., 2011. Removal of organic contaminants from soils by an electrokinetic process: the case of molinate and bentazone. *Experimental and modeling. Separation and purification technology* 79, 193–203.

- Roberts, S.C., 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature chemical biology* 3, 387–395.
- Robu, V., Covaci, G., Popescu, I.M., 2015. The use of essential oils in organic farming. *Research Journal of Agricultural Science* 47, 134–137.
- Rocha, G.A., Fávoro-Trindade, C.S., Grosso, C.R.F., 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing* 90, 37–42.
- Roos, Y., Karel, M., 1991. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *Journal of Food Science* 56, 38–43.
- Rota, C., Carraminana, J.J., Burillo, J., Herrera, A., 2004. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*® 67, 1252–1256.
- Rubió, L., Motilva, M.-J., Romero, M.-P., 2013. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Critical reviews in food science and nutrition* 53, 943–953.
- Ruiz, E., 2013. Métodos de análisis térmicos, in Volonté, M.G, y Quiroga, P., *Análisis Farmacéutico*, Universidad de la Plata, Buenos aires, 159-185.
- Russo, R., Ciociaro, A., Berliocchi, L., Cassiano, M.G.V., Rombolà, L., Ragusa, S., Bagetta, G., Blandini, F., Corasaniti, M.T., 2013. Implication of limonene and linalyl acetate in cytotoxicity induced by bergamot essential oil in human neuroblastoma cells. *Fitoterapia* 89, 48–57.
- Sabogal-Guáqueta, A.M., Osorio, E., Cardona-Gómez, G.P., 2016. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. *Neuropharmacology* 102, 111–120.
- Saeidnia, S., Gohari, A.R., 2012. Trypanocidal monoterpenes, Lead compounds to design future trypanocidal drugs. *Studies in natural product chemistry* 173–190.
- Saenger, W., 1984. Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. In *Inclusion Compounds*, edited by Atwood, U. L., Davies, J. E., McNicol, D. D. Academic Press, Londres, 2, 231-259.

- Sakho, M., Chassagne, D., Crouzet, J., 1997. African mango glycosidically bound volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 883–888.
- Sakurada, T., Mizoguchi, H., Kuwahata, H., Katsuyama, S., Komatsu, T., Morrone, L.A., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Sakurada, S., 2011. Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 97, 436–443.
- Salehi, T., Karimi, J., Hasanshahi, G., Askarianzadeh, A., Abbasipour, H., Garjan, A.S., 2014. The Effect of Essential Oils from *Laurus nobilis* and *Myrtus communis* on the Adults of Mediterranean Flour Moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 17, 553–561.
- Samojlik, I., Lakić, N., Mimica-Dukić, N., Đaković-Švajcer, K., Božin, B., 2010. Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.)(Apiaceae). *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 8848–8853.
- Sánchez, C., Aznar, R., Sánchez, G., 2015. The effect of carvacrol on enteric viruses. *International journal of food microbiology* 192, 72–76.
- Sánchez, M.F.O., 2006. *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. aiyana ediciones.
- Sánchez, R.A., Restrepo, J., 2009. Comparación de la composición de aceites esenciales de salvia amarga (*Eupatorium odoratum*) obtenidos por hidrodestilación y dióxido de carbono supercrítico. *El hombre y la máquina* 76.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews* 3, 1–16.
- Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., De Los Mozos-Pascual, M., Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., Santana-Méridas, O., 2013. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products* 49, 150–159.

- Sangalli, M.E., Zema, L., Maroni, A., Foppoli, A., Giordano, F., Gazzaniga, A., 2001. Influence of betacyclodextrin on the release of poorly soluble drugs from inert and hydrophilic heterogeneous polymeric matrices. *Biomaterials* 22, 2647–2651.
- Santoro, G.F., das Graças Cardoso, M., Guimarães, L.G.L., Salgado, A.P.S., Menna-Barreto, R.F., Soares, M.J., 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology research* 100, 783–790.
- Santos, E.H., Kamimura, J.A., Hill, L.E., Gomes, C.L., 2015. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Science and Technology* 60, 583–592.
- Sarrazin, S. L. F., da Silva, L. A., de Assunção, A. P. F., Oliveira, R. B., Calao, V. Y., da Silva, R., ... & Mourão, R. H. V., 2015. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. *Molecules*, 20(2), 1860-1871.
- Sarwar, A., Latif, Z., 2015. GC–MS characterisation and antibacterial activity evaluation of *Nigella sativa* oil against diverse strains of *Salmonella*. *Natural product research* 29, 447–451.
- Sauceda, E.N.R., 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 7, 153–170.
- Sauter, I.P., Rossa, G.E., Lucas, A.M., Cibulski, S.P., Roehe, P.M., da Silva, L.A.A., Rott, M.B., Vargas, R.M.F., Cassel, E., von Poser, G.L., 2012. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* 40, 292–295.
- Scatchard, G., 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 660–672.
- Schardinger, F., 1911. Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus stärkekleister durch microben. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II* 29, 188–197.
- Schardinger, F., 1904. Acetongärung. *Wiener klinische Wochenschrift* 17, 207–209.

- Schardinger, F., 1903. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 6, 865–880.
- Schipilliti, L., Dugo, P., Bonaccorsi, I., Mondello, L., 2011. Headspace-solid phase microextraction coupled to gas chromatography–combustion-isotope ratio mass spectrometer and to enantioselective gas chromatography for strawberry flavoured food quality control. *Journal of Chromatography A* 1218, 7481–7486.
- Schmid, G., 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends in Biotechnology* 7, 244–248.
- Schneider, H.-J., Hacket, F., Rudiger, V., 1998. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews* 98, 1755–1785.
- Schneiderman, E., Stalcup, A.M., 2000. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 745, 83–102.
- Schnitzler, P., Koch, C., Reichling, J., 2007. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1859–1862.
- Scientific Committee on Food (SCF), “Opinion of the Scientific Committee on Food on Estragole (1-allyl-4- methoxybenzene),” European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussel, 26 September 2001, pp. 1-10.
- Scientific Committee on Food (SCF), “Opinion of the Scientific Committee on Food on the safety of the presence of safrole (1-allyl-3,4-methylene dioxybenzene) in Flavourings and Other Food Ingredients with Flavouring Properties,” European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussel, 9 January 2002, pp. 1-10.
- Sell, C., 2003. *A fragrant introduction to terpenoid chemistry*. Royal Society of Chemistry.
- Sell, C. S., 2007. In *Kirk–Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 5th edn. John Wiley: New York, vol. 24, 468–592.

- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., Yuk, H.-G., 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical reviews in food science and nutrition* 54, 625–644.
- Serrano, M., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Valero, D., 2005. The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative food science & emerging technologies* 6, 115–123.
- Shapira, R., Mimran, E., 2007. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. *Microbial Drug Resistance* 13, 157–165.
- Sharma, P., Ghosh, A., Tudu, B., Bhuyan, L.P., Tamuly, P., Bhattacharyya, N., Bandyopadhyay, R., Chatterjee, A., 2014. Detection of linalool in black tea using a quartz crystal microbalance sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 190, 318–325.
- Sharma, M., Kishore, K., Gupta, S. K., Joshi, S., & Arya, D. S, 2001. Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Molecular and cellular biochemistry* 225(1-2), 75-83.
- Sheikh, B.A., Pari, L., Rathinam, A., Chandramohan, R., 2015. Trans-anethole, a terpenoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Biochimie* 112, 57–65.
- Shelef, L.A., 1984. Antimicrobial effects of spices<sup>1</sup>. *Journal of food safety* 6, 29–44.
- Sigurðoardóttir, A.M., Loftsson, T., 1995. The effect of polyvinylpyrrolidone on cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin. *International journal of pharmaceutics* 126, 73–78.
- Sigurdsson, H.H., Konráðsdóttir, F., Loftsson, T., Stefansson, E., 2007. Topical and systemic absorption in delivery of dexamethasone to the anterior and posterior segments of the eye. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 85, 598–602.
- Silva, F., Domingues, F.C., 2015. Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. *Critical reviews in food science and nutrition* 57(1), 35-47.

- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonca, D.I., Domingues, F.C., 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 19, 42–47.
- Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology* 60, 1479–1486.
- Silva, F.V., Guimarães, A.G., Silva, E.R., Sousa-Neto, B.P., Machado, F.D., Quintans-Júnior, L.J., Arcanjo, D.D., Oliveira, F.A., Oliveira, R.C., 2012. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *Journal of medicinal food* 15, 984–991.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of ethnopharmacology* 89, 277–283.
- Singh, R., Bharti, N., Madan, J., Hiremath, S.N., 2010. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes—a review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2, 171–183.
- Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., Mukherjee, A., 2014. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 68, 71–77.
- Sittichok, S., Phaysa, W., Soonwera, M., 2013. Repellency activity of essential oil on thai local plants against american cockroach (*Periplaneta americana* L.; Blattidae: Blattodea). *Journal of Agricultural Technology* 9, 1613–1620.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology* 26, 118–122.
- Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A., 1999. Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 518–523.
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D., van Griensven, L.J., 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* 15, 7532–7546.



- Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology* 23, 136–141.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., Pagán, R., 2010. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1928–1939.
- Song, W., Yu, X., Wang, S., Blasier, R., Markel, D.C., Mao, G., Shi, T., Ren, W., 2011. Cyclodextrin-erythromycin complexes as a drug delivery device for orthopedic application. *International Journal of Nanomedicine* 6, 3173–3186.
- Sopade, P.A., Halley, P.J., D'ARCY, B.R., Bhandari, B., Caffin, N., 2004. Dynamic and Steady-State Rheology of Australian Honeys at Subzero temperatures. *Journal of food process engineering* 27, 284–309.
- Spears, J.K., Karr-Lilienthal, L.K., Fahey Jr, G.C., 2005. Influence of supplemental high molecular weight pullulan or  $\gamma$ -cyclodextrin on ileal and total tract nutrient digestibility, fecal characteristics, and microbial populations in the dog. *Archives of animal nutrition* 59, 257–270.
- Stella, V.J., He, Q., 2008. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology* 36, 30–42.
- Strassburger, K., Starup, W., Levey, V., Mattingly, T., Briggs, J., Harrison, J., 2010. Enhanced stability of citral in juice beverages by applying cyclodextrin micro emulsion technology, in: *Flavors in Noncarbonated Beverages*. ACS Symposium Series. pp. 143–158.
- Stuart, B., 2004. Chapter I: "Introduction". In *"Infrared spectroscopy: fundamentals and applications"*. pp. 1-13. Wiley, Chichester (U.K).
- Sudekum, M., Poppenga, R.H., Raju, N., Braselton, W.E., 1992. Pennyroyal oil toxicosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200, 817–818.
- Suhail, M.M., Wu, W., Cao, A., Mondalek, F.G., Fung, K.-M., Shih, P.-T., Fang, Y.-T., Woolley, C., Young, G., Lin, H.-K., 2011. *Boswellia sacra* essential oil induces tumor cell-specific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine* 11, 1.

- Suntres, Z.E., Coccimiglio, J., Alipour, M., 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition* 55, 304–318.
- Suzuki, M., Ito, K., Fushimi, C., Kondo, T., 1993. The Freezing Point Depression Method for the Determination of Binding Parameters of Drugs by Polyvinylpyrrolidone and Polyoxyethylene n-Dodecylether. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 41, 1616–1620.
- Szczepanik, M., Zawitowska, B., Szumny, A., 2012. Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy J* 30, 129–142.
- Szejtli, J., 2013. *Cyclodextrin technology*. Springer Science & Business Media.
- Szejtli, J., 2004. Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry* 76, 1825–1845.
- Szejtli, J., 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical reviews* 98, 1743–1754.
- Szejtli, J., 1985. Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins. *Controlled drug bioavailability* 3, 365–420.
- Szejtli, J., 1982. *Cyclodextrins and their inclusion complexes*. Akademiai Kiado.,.
- Szentandrassy, N., Szigeti, G., Szegedi, C., Sárközi, S., Magyar, J., Bányász, T., Csernoch, L., Kovács, L., Nánási, P.P., Jóna, I., 2004. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. *Life sciences* 74, 909–921.
- Szente, L., Harangi, J., Greiner, M., Mandel, F., 2006. Cyclodextrins Found in Enzyme-and Heat-Processed Starch-Containing Foods. *Chemistry & biodiversity* 3, 1004–1014.
- Szente, L., Szejtli, J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 15, 137–142.
- Szente, L., Szejtli, J., 1987. Stabilization of flavors by cyclodextrins, in: *abstracts of papers of the american chemical society*. amer chemical soc 1155 16th st, nw, Washington, DC 20036, p. 96–AGFD.

- Szente, L., Szemán, J., Sohajda, T., 2016. Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 130, 347-365.
- Tananuwong, K., Reid, D.S., 2004. DSC and NMR relaxation studies of starch-water interactions during gelatinization. *Carbohydrate polymers* 58, 345-358.
- Tao, F., Hill, L.E., Peng, Y., Gomes, C.L., 2014. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology* 59, 247-255.
- Tarimci, N., 2011. Cyclodextrins in the cosmetic field. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications* 131-144.
- Tatsuya, S., 1999. *Stabilisation of fragrance in bathing preparations*. Japanese Patent 11,209,787.
- Tawfeeq, A., Culham, A., Davis, F., y Reeves, M., 2016. Does fertilizer type and method of application cause significant differences in essential oil yield and composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)?. *Industrial Crops and Products* 88, 17-22.
- Tejashri, G., Amrita, B., Darshana, J., 2013. Cyclodextrin based nanosponges for pharmaceutical use: A review. *Acta pharmaceutica* 63, 335-358.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Sokmen, A., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food chemistry* 84, 519-525.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J., 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 5987-6000.

- Toloza, A.C., Zygadlo, J., Mougabure Cueto, G., Biurrún, F., Zerba, E., Picollo, M.I., 2006. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *Journal of medical entomology* 43, 889–895.
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., y Razzaghi-Abyaneh, M, 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International journal of food microbiology* 139(3), 127-133.
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., Saija, A., 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry* 89, 549–554.
- Tong, J., Chen, L., 2013. Review: preparation and application of magnetic chitosan derivatives in separation processes. *Analytical Letters* 46, 2635–2656.
- Tong, S., Guan, Y.-X., Yan, J., Zheng, B., Zhao, L., 2011. Enantiomeric separation of (R, S)-naproxen by recycling high speed counter-current chromatography with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector. *Journal of Chromatography A* 1218, 5434–5440.
- Tong, S., Zhang, H., Shen, M., Ito, Y., Yan, J., 2014. Enantioseparation of mandelic acid derivatives by high performance liquid chromatography with substituted  $\beta$ -cyclodextrin as chiral mobile phase additive and evaluation of inclusion complex formation. *Journal of Chromatography B* 962, 44–51.
- Tonon, R.V., Brabet, C., Hubinger, M.D., 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering* 88, 411–418.
- Torres-Labandeira, J.J., Davignon, P., Pitha, J., 1991. Oversaturated solutions of drug in hydroxypropylcyclodextrins: parenteral preparation of pancratistatin. *Journal of pharmaceutical sciences* 80, 384–386.
- Trinh, J., Dodd, T. M., Bartolo, R., Lucas, J. M., 1999. Cyclodextrin based compositions for reducing body odour. US Patent 5,897,855.

- Tripathi, R., Mohan, H., Kamat, J.P., 2007. Modulation of oxidative damage by natural products. *Food chemistry* 100, 81–90.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry* 31, 455–461.
- Turgis, M., Han, J., Caillet, S., Lacroix, M., 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control* 20, 1073–1079.
- Turina, A. del V., Nolan, M.V., Zygodlo, J.A., Perillo, M.A., 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical chemistry* 122, 101–113.
- Tuttolomondo, T., Dugo, G., Ruberto, G., Leto, C., Napoli, E.M., Cicero, N., Gervasi, T., Virga, G., Leone, R., Licata, M., 2015. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Natural product research* 29, 1928–1934.
- Tzortzakis, N.G., 2007a. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 111–116.
- Tzortzakis, N.G., 2007b. Methyl jasmonate-induced suppression of anthracnose rot in tomato fruit. *Crop Protection* 26, 1507–1513.
- Uekama, K., 1979. Inclusion complexes of cyclodextrins with organic drug molecules. *The Japanese journal of antibiotics* 32, S103.
- Uekama, K., Adachi, H., Irie, T., Yano, T., Saita, M., Noda, K., 1992. Improved transdermal delivery of prostaglandin E1 through hairless mouse skin: combined use of carboxymethyl-ethyl- $\beta$ -cyclodextrin and penetration enhancers. *Journal of pharmacy and pharmacology* 44, 119–121.
- Uekama, K., Irie, T., Hirayama, F., 1978a. Participation of cyclodextrin inclusion catalysis in photolysis of chlorpromazine to give promazine in aqueous solution. *Chemistry Letters* 7, 1109–1112.
- Uekama, K., Hirayama, F., Nasu, S., Matsuo, N., Irie, T., 1978b. Determination of the stability constants for inclusion complexes of cyclodextrins with various drug molecules by high performance liquid chromatography. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 26, 3477–3484.

- Uekama, K., Narisawa, S., Hirayama, F., Otagiri, M., Kawano, K., Ohtani, T., Ogino, H., 1983. Improvement of thermal and photochemical stability of benzaldehyde by cyclodextrin complexation. *International Journal of Pharmaceutics* 13, 253–261.
- Ulloth, J.E., Almaguel, F.G., Padilla, A., Bu, L., Liu, J.-W., De Leon, M., 2007. Characterization of methyl- $\beta$ -cyclodextrin toxicity in NGF-differentiated PC12 cell death. *Neurotoxicology* 28, 613–621.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* 68, 1561–1568.
- Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174, 233–238.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* 65, 4606–4610.
- Ungaro, F., Giovino, C., Catanzano, O., Miro, A., Mele, A., Quaglia, F., La Rotonda, M.I., 2011. Use of cyclodextrins as solubilizing agents for simvastatin: effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on lactone/hydroxyacid aqueous equilibrium. *International journal of pharmaceutics* 404, 49–56.
- Usano-Aleman, J., Palá Paúl, J., Díaz, S., 2014. Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *REDUCA (Biología)* 7.
- Valente, A.J., Söderman, O., 2014. The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins. *Advances in colloid and interface science* 205, 156–176.
- Van Den Berg, S.J., Restani, P., Boersma, M.G., Delmulle, L., Rietjens, I.M., 2011. Levels of genotoxic and carcinogenic compounds in plant food supplements and associated risk assessment. *Food and Nutrition Sciences* 2, 989.
- Vehring, R., 2008. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical research* 25, 999–1022.
- Veiga, F., Pecorelli, C., Ribeiro, L., 2006. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. *Minerva Coimbra: Coimbra*.

- Veldhuizen, E.J., Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L., Zweijtzer, C., Burt, S.A., Haagsman, H.P., 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 54, 1874–1879.
- Vieira, D.F., Azevedo, M.M., Marins, A.K., Pinheiro, P.F., de Queiroz, V.T., Costa, A.V., 2011. Composição química do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. XI EPG, Anais Encontro latino americano de pós graduação. Alegre–ES, Brasil.
- Veras, H.N., Rodrigues, F.F., Colares, A.V., Menezes, I.R., Coutinho, H.D., Botelho, M.A., Costa, J.G., 2012. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia* 83, 508–512.
- Vigan, M., 2010. Essential oils: renewal of interest and toxicity. *European Journal of Dermatology* 20, 685–692.
- Villalonga, R., Cao, R., Fragoso, A., 2007. Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology. *Chemical Reviews* 107, 3088–3116.
- Villaverde, J., 2007. Time-dependent sorption of norflurazon in four different soils: use of  $\beta$ -cyclodextrin solutions for remediation of pesticide-contaminated soils. *Journal of Hazardous materials* 142, 184–190.
- Villaverde, J., Morillo, E., Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M., Maqueda, C., 2004. Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Norflurazon and  $\beta$ -Cyclodextrin To Improve Herbicide Formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4, 864–869.
- Villaverde, J., Pérez-Martínez, J.I., Maqueda, C., Ginés, J.M., Morillo, E., 2005. Inclusion complexes of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterisation. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. *Chemosphere* 60, 656–664.
- Villiers, A., 1891. Sur la fermentation de la fécula par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 112, 536–538.
- Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 13–19.

- Voncina, B., 2011. Application of cyclodextrins in textile dyeing. INTECH Open Access Publisher.
- Voncina, B., Vivod, V., 2013. Cyclodextrins in textile finishing. INTECH Open Access Publisher.
- Vunda, S.L.L., Sauter, I.P., Cibulski, S.P., Roehe, P.M., Bordignon, S.A.L., Rott, M.B., Apel, M.A., von Poser, G.L., 2012. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitology research* 111, 961–966.
- Vuong, L. T., 2014. *Skin anti-oxidant enhancing formulation and associated method U.S. Patent No. 8,668,942*. Washington, DC: U.S.
- Walsh, S.E., Maillard, J.-Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E., Charbonneau, D.L., Bartolo, R.G., 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 94, 240–247.
- Wang, D., Ando, K., Morita, K., Kubota, K., Kobayashi, A., 1994. Optical isomers of linalool and linalool oxides in tea aroma. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 58, 2050–2053.
- Wang, H.F., Wang, Y.K., 2008. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five. *Journal of cosmetic science* 59, 509–522.
- Wang, K., Liu, F., Liu, Z., Huang, J., Xu, Z., Li, Y., Chen, J., Gong, Y., Yang, X., 2010. Analysis of chemical components in oolong tea in relation to perceived quality. *International journal of food science & technology* 45, 913–920.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Efferth, T., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules* 17, 2704–2713.
- Wen, J., Liu, B., Yuan, E., Ma, Y., Zhu, Y., 2010. Preparation and physicochemical properties of the complex of naringenin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Molecules* 15, 4401–4407.
- Williams III, R.O., Mahaguna, V., Sriwongjanya, M., 1998. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 46, 355–360.



- World Health Organization., 2005. Atlas: Epilepsy Care in the World. WHO Press: Geneva.
- Woo, R. A. M., Trinh, T., Cobb, D. S., Schneiderman, E., Wolff, A. M., Rosenbalm, E. L., Ward, T. E., Chung, A. H., Reece, S., 1999. *Uncomplexed cyclodextrin compositions for odour control*. US Patent 5,942,217.
- Worwood, V.A., 2012. *The Complete Book of Essential Oils and Aromatherapy: Over 600 Natural, Non-toxic & Fragrant Recipes to Create Health Beauty a Safe Home Environment*. New world library.
- Wu, Q., Yu, L., Qiu, J., Shen, B., Wang, D., Soromou, L.W., Feng, H., 2014. Linalool attenuates lung inflammation induced by *Pasteurella multocida* via activating Nrf-2 signaling pathway. *International immunopharmacology* 21, 456–463.
- Wu, S., Wei, F.X., Li, H.Z., Liu, X.G., Zhang, J.H., Liu, J.X., 2013. [Chemical composition of essential oil from *Thymus citriodorus* and its toxic effect on liver cancer cells]. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials* 36, 756–759.
- Wu, Y., Zou, L., Mao, J., Huang, J., Liu, S., 2014. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydrate polymers* 102, 497–503.
- Xavier, V.B., Vargas, R.M.F., Minteguiaga, M., Umpiérrez, N., Dellacassa, E., Cassel, E., 2013. Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: New applications for known products. *Industrial Crops and Products* 49, 492–496.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B.-P., Pei, R.-S., Xu, N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47, 174–179.
- Yadav, G.D., Kamble, S.B., 2009. Synthesis of carvacrol by Friedel–Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. *Journal of chemical technology and biotechnology* 84, 1499–1508.
- Yang, L.-J., Ma, S.-X., Zhou, S.-Y., Chen, W., Yuan, M.-W., Yin, Y.-Q., Yang, X.-D., 2013. Preparation and characterization of inclusion complexes of naringenin with  $\beta$ -cyclodextrin or its derivative. *Carbohydrate polymers* 98, 861–869.

- Yang, Y., Song, L.X., 2005. Study on the inclusion compounds of eugenol with  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and heptakis (2, 6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 53, 27–33.
- Yang, J., Wiley, C.J., Godwin, D.A., Felton, L.A., 2008. Influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 605–612.
- Yang, T., Zhu, Y., Shao, C.-Y., Zhang, Y., Shi, J., Lv, H.-P., Lin, Z., 2016. Enantiomeric analysis of linalool in teas using headspace solid-phase microextraction with chiral gas chromatography. *Industrial Crops and Products* 83, 17–23.
- Yao, Q., You, B., Zhou, S., Chen, M., Wang, Y., Li, W., 2014. Inclusion complexes of cypermethrin and permethrin with monochlorotriazinyl-beta-cyclodextrin: a combined spectroscopy, TG/DSC and DFT study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 117, 576–586.
- Yao, Y., Xie, Y., Hong, C., Li, G., Shen, H., Ji, G., 2014. Development of a myricetin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. *Carbohydrate polymers* 110, 329–337.
- Yeom, H.-J., Kang, J., Kim, S.-W., Park, I.-K., 2013. Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 200–206.
- Yessoufou, A., Wahli, W., 2010. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly* 140, w13071.
- Yin, Q., Yan, F., Zu, X.-Y., Wu, Y., Wu, X., Liao, M., Deng, S., Yin, L., Zhuang, Y., 2012. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology* 64, 43–51.
- Yuan, C., Jin, Z., Xu, X., 2012. Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: UV, FTIR, <sup>1</sup>H NMR and molecular modeling studies. *Carbohydrate polymers* 89, 492–496.

- Zaveri, M., Patel, P., Dhru, B., Patel, S., 2011. Screening of in-vitro anti-mutagenic activity of selected plants. *American Journal of Pharmaceutical Research* 1, 232–243.
- Zhang, J., Ma, P.X., 2013. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Advanced drug delivery reviews* 65, 1215–1233.
- Zhang, N., Tang, L., Hu, W., Wang, K., Zhou, Y., Li, H., Huang, C., Chun, J., Zhang, Z., 2014. Insecticidal, fumigant, and repellent activities of sweet wormwood oil and its individual components against red imported fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Science* 14, 241.
- Zhao, Q., Tamsamani, J., Agrawal, S., 1995. Use of cyclodextrin and its derivatives as carriers for oligonucleotide delivery. *Antisense research and development* 5, 185–192.
- Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H.U.I., Yang, Z., Li, J., Li, J., Yan, W., 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Safety* 27, 124–133.
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M., 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* 18(13), 1181-1190.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M.J., Pinto, E., Salgueiro, L., 2011. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *Journal of medical microbiology* 60, 612–618.

