



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado Nutrición y Seguridad
Alimentaria

Estudio de la complejación de flavonoides en
ciclodextrinas.

Autor:

Maravillas Pérez Abril

Directores:

Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

Dra. Dña. Carmen Lucas Abellán

Murcia, Julio de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado Nutrición y Seguridad
Alimentaria

Estudio de la complejación de flavonoides en
ciclodextrinas.

Autor:

Maravillas Pérez Abril

Directores:

Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

Dra. Dña. Carmen Lucas Abellán

Murcia, Julio de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

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

La Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado y la Dra. Dña. Carmen Lucas Abellán como Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la complejación de flavonoides en ciclodextrinas” realizada por Dña. Maravillas Pérez Abril en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a de de 2017

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado el trabajo, solamente brota en mi interior un profundo agradecimiento a Dios y a tantas personas como me han acompañado y apoyado en este camino.

Deseo comenzar dando las gracias a las directoras de esta Tesis Doctoral, la Dra. Estrella Núñez Delicado y la Dra. Carmen Lucas Abellán, por la confianza depositada en mí desde los primeros comienzos de mi investigación hasta las últimas correcciones de este trabajo. Por el tiempo, la paciencia y el esfuerzo que con tanto cariño me han dedicado, por ser un gran ejemplo a seguir, por su gran capacidad para dirigir y acompañar, porque han hecho fácil lo que parecía difícil o imposible.

A Estrella, gracias por esas virtudes que le caracterizan que hacen que un reto que parece complicado o difícil de conseguir, en un instante encuentre solución y llegue a cumplirse.

A Carmen, gracias por mostrar siempre una sonrisa en su rostro, por transmitir tanta confianza, por ser amiga, compañera, por su gran capacidad para resolver todo lo que se le ponga por delante, y por todas las horas dedicadas a que este proyecto sea posible.

También darle las gracias a Maite, Ana y Eva, con las que compartí tantas cosas el tiempo que pasé en la universidad, porque les tengo un lugar reservado en mi corazón para siempre, porque fueron y siguen siendo amigas y compañeras no solo de trabajo, sino de la vida.

Gracias en general a todo el departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición de la universidad, a los compañeros de laboratorio, a José María Cayuela como director, por los momentos compartidos en medio del trabajo diario, por todo lo que me habéis podido aportar, y por formar siempre un gran equipo.

Gracias a Andrés, Elena, Silvia, Mariano, M^a Carmen y Luis del Vicerrectorado de Investigación de la universidad por ese tiempo que pudimos compartir, porque cada día eran capaces de sacarme una sonrisa, y porque los recuerdo con un cariño muy especial.

A mi marido Fernando, por ser siempre la ayuda adecuada y perfecta, por entenderme y conocerme mejor que nadie, por su amor, su cariño, porque es lo

que da el mayor sentido a todo lo que me rodea y por su empeño constante en hacerme feliz.

A mi precioso bebe de 15 meses, Francisco y al hermanito que viene de camino, porque desde la primera hora de la mañana hasta la última de la noche iluminan mi vida con su alegría y son el motor de nuestra vida.

Como dejar de ofrecer unas palabras a los que me han apoyado de manera incondicional cada día de mi vida, mis padres Joaquín y Antonia, por la educación recibida, por el amor y la admiración que siempre me transmiten, por hacerme sentir muy afortunada por tenerlos.

A mis hermanos Antonio y Miguel Ángel, mis compañeros de batalla desde los primeros años de mi vida, por todas las historias compartidas y por todos los preciosos momentos que me han regalado.

A D. José Antonio Ibáñez, mi compañero en la fe y en la vida, por todo cuanto me ha aportado. Y gracias, como no, a Dios por cada persona que ha puesto en mi vida y que han hecho posible finalizar esta Tesis Doctoral.

Termino agradeciendo a la Universidad Católica San Antonio de Murcia por haber hecho posible llevar a cabo este trabajo y por todos los medios que me ha facilitado.

GRACIAS.

*"Decidí que la sabiduría fuera mi compañera,
sabiendo que sería mi consejera en la dicha
y mi consuelo en las penas e inquietudes,
Y comprendí que no la alcanzaría si
Dios no me la daba, de Él procede todo Don".*

Sabiduría 8, 9-21

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS DOCTORAL

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- **Pérez-Abril Maravillas**, Lucas-Abellán, Carmen, Castillo Sánchez, Julian; Pérez-Sanchez, Horacio; Cerón-Carrasco, Pedro; Fortea, Isabel; Gabaldón, José Antonio; Núñez-Delicado, Estrella. Systematic investigation and molecular modelling of complexation between several groups of flavonoids and HP- β -CDs. Journal of Funtional Foods. Aceptado en Junio de 2017.

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

- **Maravillas Pérez Abril**; Carmen Lucas Abellán; María Teresa Mercader Ros; Ana Serrano Martínez; José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado. Título del trabajo: Encapsulación de naringenina y hesperetina con diferentes tipos de ciclodextrinas Nombre del congreso: VI Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Fecha de celebración: 10/09/2012 Entidad organizadora: Universidad Juarez Autónoma de Tabasco
- Carmen Lucas Abellán; **Maravillas Pérez Abril**; María Teresa Mercader Ros; Ana Serrano Martínez; José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado Título del trabajo: Estudio de la estabilidad de naringenina y hesperetina en ausencia y presencia de HP-b-CDs a pH 6,5 Nombre del congreso: VII Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Fecha de celebración: 22/10/2014 Entidad organizadora: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

- **Maravillas Pérez Abril;** Carmen Lucas Abellán; María Teresa Mercader Ros; Ana Serrano Martínez; José Antonio Gabaldón Hernández; Estrella Núñez Delicado. Título del trabajo: Encapsulación de Apigenina con HP- β -CDs a diferentes pH Nombre del congreso: VIII CONGRESO CYTA /CESIA Conocimientos para impulsar una evolución inteligente del sector alimentario Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Nacional Tipo de participación: Póster Fecha de celebración: 08/04/2015 Entidad organizadora: Ciencia y Tecnología de alimentos e Ingeniería de los Alimentos.

TESIS DOCTORAL DE
D^a Maravillas Pérez Abril

DIRECTORES

Dra. D^a Estrella Núñez Delicado

Dra. ^a Carmen Lucas Abellán

TÍTULO: “COMPLEJACIÓN DE FLAVONOIDES EN
CICLODEXTRINAS”

Los flavonoides forman parte de una familia de compuestos polifenólicos de origen natural que se caracterizan por una estructura benzo- γ -pirona común. Son uno de los grupos más importantes dentro de los compuestos presentes en vegetales, sobre todo en el género Citrus. Debido a la multitud de combinaciones de los diferentes hidroxilos, metoxilos y sustituyentes del grupo O-glucósido en su estructura benzo- γ -pirona (C6-C3-C6), han sido identificados más de 8.000 compuestos con estructura flavonoide. Cuantitativamente, son cuatro los tipos de flavonoides más comunes en el reino vegetal: flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas. Estos compuestos no sólo juegan un papel fisiológico y ecológico importante, sino también de interés comercial debido al gran número de aplicaciones que tienen en la industrias alimentaria y farmacéutica, debido a las propiedades beneficiosas para la salud que se les atribuyen.

La principal actividad asociada a los flavonoides parece estar asociada a su efecto sobre las células sanguíneas y endoteliales microvasculares, por ello las dos principales áreas de investigación sobre los efectos biológicos de flavonoides cítricos son la inflamación y el cáncer. De hecho, estudios epidemiológicos y de experimentación animal apuntan este posible efecto protector de los flavonoides sobre enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer.

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios sobre flavonoides desarrollados durante los últimos 50 años, todavía no se conocen completamente cuáles son los mecanismos celulares implicados en su acción biológica. Muchas de las propiedades farmacológicas que se les atribuyen se pueden vincular a su capacidad para inhibir las enzimas implicadas en la activación de algunos procesos celulares. In vitro, los

flavonoides han demostrado capacidad para modificar la actividad de algunos sistemas enzimáticos como: quinasas, fosfolipasas, ATPasa, lipooxygenasas, ciclooxigenasas o fosfodiesterasas. Esta actividad se puede atribuir a la capacidad de los flavonoides para interactuar con el sitio de unión de nucleótidos de enzimas reguladoras.

Debido a todas las propiedades que se les atribuyen a los flavonoides, estos son muy utilizados tanto en la industria alimentaria, como farmacéutica. Sin embargo, debido a su estructura química presentan baja solubilidad acuosa, lo que limita su biodisponibilidad y por lo tanto su actividad, dificultando así su utilización para la elaboración de alimentos funcionales enriquecidos en flavonoides y fármacos. Para resolver este problema, en el presente trabajo se ha estudiado la complejación de flavonoides con diferentes estructuras en diferentes tipos de ciclodextrinas nativas y modificadas.

Las ciclodextrinas son unos azúcares cíclicos naturales, derivadas del almidón, cuya principal propiedad es la de poseer una cavidad interna hidrofóbica que les permite formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas, entre las que se encuentran los flavonoides. Mediante el proceso de complejación, las ciclodextrinas modifican las propiedades físicas y químicas del compuesto encapsulado, viéndose afectadas entre otras, su solubilidad acuosa, estabilidad o actividad antioxidante.

El presente estudio se centra en clarificar la influencia de la estructura de los esqueletos moleculares, distribución radical y configuración espacial de los sustituyentes de los flavonoides, en el proceso de formación de complejos con ciclodextrinas. Para ello se ha estudiado la complejación de diferentes tipos de flavonoides: flavanonas, flavonas y flavonoles (naringenina, hesperetina, apigenina, kaempferol, miricetina y quercetina) en ciclodextrinas nativas y modificadas en distintas condiciones de pH, con el fin de valorar el efecto de la protonación o no de los grupos funcionales en el valor de la constante de formación de los complejos. Este estudio experimental se ha acompañado de estudios de modelado molecular que han permitido aportar datos complementarios y dar resultados más robustos sobre la interacción de cada uno de los grupos funcionales de los flavonoides con la ciclodextrina

y predecir el modo en que cada flavonoide entra en la cavidad hidrofóbica de los azúcares. Los resultados obtenidos han mostrado que es la molécula de kaempferol, a pH 6.5, la que presenta una mayor afinidad por HP- β -CDs debido a la presencia de 1 solo OH en el anillo B, sumado a la presencia de un OH en el C3 y un doble enlace C2=C3 en el anillo C.

Posteriormente y centrándonos en las flavanonas (naringenina y hesperetina) se estudió el efecto de la temperatura sobre su solubilidad acuosa, así como el efecto de la complejación en β - y HP- β -CDs sobre este mismo parámetro. Los valores de constantes de complejación fueron calculados comparando el método de solubilidad con el método de absorbancia, corroborando que los valores obtenidos mediante el primer método, eran correctos. En este caso, además, calculamos la eficacia de complejación de los dos tipos de CDs estudiados sobre ambas flavanonas, ya que este parámetro, no solamente nos aporta datos sobre la fuerza de unión del complejo formado, sino que valora la eficacia con que las CDs complejan cada molécula, en función de las condiciones del medio de reacción. Finalmente, también se estudió la estabilidad de estas dos flavanonas complejadas o no, en medio acuoso tamponado a diferentes pHs, observando como la complejación en ciclodextrinas permite estabilizar en disolución a hesperetina tanto a pH 6.5 como 8.5. Esta parte del estudio se realizó para determinar la estabilidad de los complejos formados con el fin de potenciar su utilización en el enriquecimiento de alimentos funcionales y fármacos.

Por último, se estudió como afecta la complejación con ciclodextrinas a la actividad antioxidante de apigenina, naringenina y hesperetina, puesto que el resto de flavonoides (los tres flavonoles) ya habían sido estudiados con anterioridad por nuestro grupo de investigación. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, en todos los casos, la complejación en ciclodextrinas provocó un aumento de la capacidad antioxidante de los flavonoides.

PALABRAS CLAVE: Flavonoides, ciclodextrinas, encapsulación, flavanonas, flavonas, flavonoles, modelado molecular.

TITLE: "COMPLEXATION OF FLAVONOIDS BY USING CYCLODEXTRINS"

ABSTRACT

Flavonoids are polyphenolic compounds of natural origin, characterized by a common benzo- γ -pyrone structure. They are one of the most important groups within the compounds present in vegetables, especially in the genus Citrus. Due to the multitude of combinations of the different hydroxyl, methoxyl groups and substituents of the O-glucoside group in their benzo- γ -pyrone structure (C6-C3-C6), more than 8,000 compounds with flavonoid structure have been identified. There are four types of flavonoids quantitatively most common in the plant kingdom: flavanones, flavones, flavonols and anthocyanins. These compounds play not only an important physiological and ecological role, but also a commercial interest due to their large number of applications in the food and pharmaceutical industries, because of their beneficial health properties.

The main activity of flavonoids seems to be associated with their effect on blood and microvascular endothelial cells. So the main research areas on the biological effects of citrus flavonoids are inflammation and cancer. In fact, epidemiological studies and animal experimentation point to this possible protective effect of flavonoids on cardiovascular diseases and some types of cancer. However, despite numerous studies on flavonoids developed during the last 50 years, cellular mechanisms involved in their biological action are not fully understood. Some of the pharmacological properties attributed to them may be associated to their ability to inhibit the enzymes involved in the activation of some cellular processes. In vitro, flavonoids have been demonstrated ability to modify the activity of some enzymatic systems such as: kinases, phospholipases, ATPase, lipoxygenases, cyclooxygenase or phosphodiesterases. This activity can be attributed to the ability of flavonoids to interact with the nucleotide binding site of regulatory enzymes. Because of all properties attributed to flavonoids, they are widely used in both, food and pharmaceutical industries. However, due to their chemical structure they present low aqueous solubility, which limits their bioavailability and their biological activity. To solve this problem, the present work studied the

complexation of flavonoids with different chemical structures in different types of native and modified cyclodextrins.

Cyclodextrins are natural cyclic oligosaccharides, derived from starch. Their main property is to possess a hydrophobic internal cavity that allows them to form inclusion complexes with a wide variety of molecules, among which are flavonoids. Through the complexation process, cyclodextrins modify physical and chemical properties of the guest, being affected, among others, its aqueous solubility, stability or antioxidant activity. This study focuses on clarifying the influence of molecular skeletal structure, radical distribution and spatial configuration of flavonoid substituents in the complexation process with cyclodextrins. In order to evaluate this effect, the encapsulation of different types of flavonoids, flavanones, flavones and flavonols (naringenin, hesperetin, apigenin, kaempferol, myricetin and quercetin) in native and modified cyclodextrins were studied. The influence of the media pH (protonation of the functional groups) in the value of the complexation constant was studied. This experimental study has been accompanied by molecular modeling studies that permitted to provide complementary data in order to give more robust results about the interaction of flavonoids' functional groups with cyclodextrin to predict the way in which each flavonoid enters the hydrophobic cavity. The results obtained showed that kaempferol is, at pH 6.5, which presents a higher affinity for HP- β -CD, due to the presence of only one OH-group in B-ring, added to the presence of an OH in C3 and a double bond C2 = C3 in C-ring.

Moreover, the effect of temperature on flavanones (naringenin and hesperetin) aqueous solubility was studied, as well as the effect of their complexation on β - and HP- β -CDs on the same parameter. The values of complexation constants were calculated by comparing both, the solubility and absorbance method, corroborating the validity of the obtained data. In addition, the complexation efficiency (CE) of the two types of cyclodextrins studied on both flavanones was studied, since this parameter not only provides us with data about the bond strength of the formed complex, but also evaluates the efficiency in complex formation for each molecule, depending on the conditions of the reaction medium. Later on, the stability of these two flavanones complexed in CDs or not, in aqueous medium was also studied. The results showed that the complexation in cyclodextrins

allows to stabilize in dissolution to hesperetina at both, pH 6.5 and 8.5. This part of the study was performed to determine the stability of the complexes formed in order to enhance their use in the enrichment of functional foods.

Finally, the antioxidant activity of apigenin, naringenin and hesperetin was also studied, demonstrating that the complexation in cyclodextrins caused an increase in the antioxidant capacity of the studied flavonoids.

KEYWORDS: Flavonoids, cyclodextrins, encapsulation, flavanones, flavones, flavonols, molecular docking.

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

AGRADECIMIENTOS

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS DOCTORAL

RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS	25
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	29
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	35
1. Ciclodextrinas (CDs)	37
1.1. Historia y características de las CDs	37
1.2. Características físicas de las CD	39
1.3. Formación de complejos de inclusión.....	42
1.4.1. Equilibrio.....	46
1.4. Procesos de preparación y técnicas de formación de complejos.....	47
1.4.1. Solución dinámica.....	47
1.4.1.1. Efecto de la temperatura	47
1.4.1.2. Uso de disolventes	48
1.4.1.3. Efecto del agua sobre el complejo.....	48
1.4.1.4. Huéspedes volátiles	49
1.4.2. Co-precipitación	49
1.4.3. Complejación por método “slurry.....	49
1.4.4. Complejación en pasta	49
1.4.5. Mezcla húmeda y calefacción.....	50
1.4.6. Extrusión	50
1.4.7. Mezcla en seco	50
1.5. Métodos de secado del complejo	51
1.6. Liberación del complejo encapsulado.....	51
1.7. Métodos para detectar la formación de complejos de inclusión.....	51
1.7.1. Métodos de detección de complejo sólidos.....	52
1.7.1.1. Espectroscopía Raman	52
1.7.1.2. Difracción de rayos-x.....	52
1.7.1.3. Métodos térmicos.....	52
1.7.1.4. Espectroscopía de absorción infrarroja.....	53

2.1.5.1.2. Prevención de la aterosclerosis	91
2.1.5.2. Propiedades beneficiosas de Miricetina	93
2.1.5.2.1. Efecto anticancerígeno.....	93
2.1.5.3. Propiedades beneficiosas de Kaempferol.....	94
2.1.5.3.1. Propiedades anticancerígenas.....	94
2.1.5.4. Flavanonas hesperetinas y naringeninas.....	95
2.1.5.4.1. Efecto anticancerígeno.....	96
2.1.5.4.2. Propiedades reductoras de colesterol	96
2.1.5.4.3. Propiedades antidepresivas	97
2.1.5.4.4. Enfermedades neurodegenerativas.....	97
2.1.5.4.5. Protección contra microorganismos patógenos.....	98
2.1.5.5. Propiedades beneficiosas de la flavanona	
Apigenina.....	99
2.1.6. Aplicaciones de los flavonoides.....	100
2.1.6.1. Preparados farmacéuticos	100
2.1.6.2. En el diseño de alimentos funcionales.....	101
CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	105
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	109
3.1. Reactivos	111
3.2. Análisis cromatográfico y cuantificación de compuestos	
flavonoides.....	111
3.3. Estudios de solubilidad.....	112
3.4. Cálculo de constantes Benesi-Hidebrand.....	117
3.5. Modelado molecular.....	118
3.6. Efecto de la temperatura en la solubilidad acuosa de los flavonoides	
en ausencia de CDs.....	118
3.7. Estudios de estabilidad acuosa de los flavonoides disueltos	119
3.8. Medidas de capacidad antioxidante	119
3.8.1. Reactivos	119
3.8.2. Método ORA-FL	119
CAPÍTULO IV: INVESTIGACIÓN SISTEMÁTICA Y MODELACIÓN	
MOLECULAR DE LA COMPLEJACIÓN ENTRE VARIOS GRUPOS DE	
FLAVONOIDES Y HP-β-CICLODEXTRINAS	123

4.1. Introducción.....	125
4.2. Resultados y discursión	127
4.2.1 Parámetro de solubilidad de los flavonoides	127
4.2.2. Distribución de las cargas sobre los esqueletos de los Flavonoides.....	131
4.2.3. Relación entre la estructura de los flavonoides y los valores de pH.....	134
4.2.4. Relación entre el docking molecular y los valores de Kc (pH 6,5)	135
4.2.5. Resultados comparativos para 4'-OH flavonoides (pH 6,5)	139
4.2.6. Resultados comparativos de flavonoles (pH 6,5)	139
4.2.7. Resultados comparativos de flavanonas (pH 6,5)	140
CAPÍTULO V: EFECTO DE B-CDS Y HP- B-CDS EN LA SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD DE NARINGENINA Y HESPERETINA	143
5.1. Introducción.....	145
5.2. Resultados y discursión	146
5.2.1. Efecto de la temperatura en la solubilidad.....	146
5.2.2. Efecto de la complejación en CDs.....	148
5.2.2.1. Diagrama de fases	148
5.2.2.2. Método de absorción	155
5.2.2.3. Efecto del pH en el proceso de complejación	157
5.2.3. Estabilidad de Naringenina y Hesperetina en solución acuosa.....	159
CAPÍTULO VI: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	163
6.1. Introducción.....	165
6.2. Resultados y discursión	166
6.2.1. Medida de actividad antioxidante.....	166
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES	175
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179

SIGLAS Y ABREVIATURAS

4CL: 4 cumaroil coenzima A ligasa

A: Longitud de onda

AAPH: 2, Dihidrocloreuro 2`-diazobis (2-aminopropano)

ACC: Acetil coenzima A carboxilasa

ADI: Ingesta diaria aceptable

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFB1: Aflatoxina B1

AUC: Área bajo la curva

BHA: Hidroxianisol butilado

C4H: Cinamato 4 hidoxilasa

CDs: Ciclodextrinas

CE: Eficacia de complejación

CGTasa: Ciclodextrina glucano transferasa

CHC: Hepatocelular

CHS: Chalcona sintasa

-CoA: -Coenzima A

COX: Ciclooigenasa

DC: Dicroísmo circular

DFT: teoría funcional de la densidad

DIME- β -CDs: 2,6-dimetil beta Ciclodextrina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

DTA: Análisis térmico diferencial

ECV: Enfermedad cardiovascular

FAO: Organización de las naciones unidas para la alimentación

FDA: Fármacos de los Estados Unidos

FL: Fluoresceína

FLS: Flavomol sintetasa

GT: Glucosil transferasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HPE- β -CDs: Hidroxietil beta Ciclodextrina

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

HP- β -CDs: Hidroxipropil beta Ciclodextrina

IMC: Índice de masa corporal

JECFA: Comité mixto de expertos en alimentos

Kc: Constante de complejación

L: Litro

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LOX: Lipooxigenasa

L-Phe: L-fenilalanina

L: Concentración total de ciclodextrinas

MCP-1: Proteína quimioatrayente de macrófagos tipo 1

mg: Miligramo

ml: Mililitro

mM: Milimolar

nM: Nanomolar

NO: Óxido nítrico

NOEL: Nivel sin efecto

NOS: Óxido nítrico sintasa

°C: Grados centígrados

-OH: Hidroxilo

OMS: Organización mundial de la salud

OMTs: Flavonoide O-metiltransferasa

OTGL: Termogravimetría diferencial

-
- PAL:** Fenilalanina amino liasa
- PCR:** Proteína C reactiva
- PLA2:** Fosfolipasa A2
- PREDIMED:** Prevención con dieta mediterránea
- RMN:** resonancia magnética nuclear
- S₀:** Solubilidad acuosa
- SDS:** Dodecíl sulfato sódico
- S_T:** Concentración total de soluto
- STS:** Estilbeno sintasa
- TG:** Termogravimetría
- TIME- β-CDs:** 2,3,6-trimetil beta Ciclodextrina
- Trolox C:** 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
- UV:** Ultravioleta visible
- VHC:** Virus de la hepatitis C
- VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana
- VMA:** Vaccinium myrtillus
- μl:** Microlitro
- μM:** Micromolar

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO I

Tabla I.1.: Propiedades de las CD 40

Tabla I.2.: Aprobación de las CDs 71

Tabla I.3.: Clasificación de los polifenoles 73

Tabla I.4.: Clasificación de polifenoles no flavonoides 75

Tabla I.4.b.: Clasificación de polifenoles flavonoides 76

Tabla I.5.: Propiedades beneficiosas de los flavonoides y presencia en alimentos 82

Figura I.1.: Estructura de α -, β -, γ -CDs 37

Figura I.2.: Estructura Ciclodextrina 39

Figura I.3.: Tipos de CDs modificadas 41

Figura I.4.: Estructuras supramoleculares 42

Figura I.5.: Formación del complejo huésped-CDs 44

Figura I.6.: Dimensiones de las diferentes CDs activas 46

Figura I.7.: Ilustraciones esquemáticas de la formación de complejos 54

Figura I.8.: Tipos de diagramas de fases con CDs 55

Figura I.9.: Complejo de inclusión colesteros-CDs 61

Figura I.10.: Mecanismo de liberación de los compuestos antimicrobianos desde la CDs simulación de un sistema de envase activo para frutas o vegetales frescos cortados 64

Figura I.11.: Esquema comparativo de la digestión de las CDs nativas (Kurkov y Loftsson, 2013) 70

Figura I.12.: Estructuras químicas del núcleo del flavonoide 79

Figura I.13.: Ruta común fenilpropanoide, de fenilalanina a p-cumaril.CoA 80

Figura I.14.: Ruta biosintética de flavonoides 81

Figura I.15.: Estructura y presencia en la dieta de las principales clases de flavonoide.....	83
Figura I.16.: Quercetina, miricetina y kaempferol (flavonoides)	88
Figura I.17.: Estructura de quercetina, resaltando los grupos implicados en su actividad antioxidnte. En amarillo, el grupo catecol del anillo B; en rojo, enlace insaturado del anillo C; en azul, puntos con capacidad de quelación de metales.....	91
Figura I.18.: Estructura químicas Hesperetina ($M_w = 302g / mol$) y Naringenina ($M_w = 272g / mol$) y algunos de sus glucósidos más comunes	95
Figura I.19.: Apigenina.....	99

CAPÍTULO III

Tabla III.1.: Análisis cromatográfico de los flavonoides usados en este estudio	112
Figura III.1.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Apigenina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 340nm	114
Figura III.2.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Naringenina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 290nm	114
Figura III.3.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Hesperetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 292nm	115
Figura III.4.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Kaempferol al 80% de etanol en su máximo de absorción, 370nm	115
Figura III.5.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Miricetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 378nm	116
Figura III.6.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Quercetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 362nm	116
Figura III.7.: Regresión lineal de Net AUC con diferentes concentraciones de Trolox C. $Net AUC = AUC_{muestra} - AUC_{blanco}$	121

Figura III.8.: Curva de caída de la FL inducida por AAPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox C.....	122
---	-----

CAPÍTULO IV

Tabla IV.1.: Solubilidad acuosa de los flavonoides a diferentes valores de pH y de Kc entre cada uno de ellos y HP- β -CDs a diferentes pHs.....	129
Figura IV.1.: Estructura de los diferentes flavonoides utilizados en este estudio	127
Figura IV.2.: Diagrama de fases de naringenina (A), hesperetina (B), apigenina (C), kaempferol (D), myricetina (E), quercetina (F) con HP- β -CDs en tampón acetato sódico 100 mM, pH 3,5 (●), Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 6,5 (○), tampón borato sódico 100 mM, pH 8,5(▲).....	131
Figura IV.3.: Distribución de las cargas parciales de kaempferol para diferentes estados de la molécula: A) protonada, B) neutra, C) desprotonada	134
Figura IV.4.: Resultados obtenidos de acoplamiento entre HP- β -CD con A) kaempferol, B) miricetina, C) hesperidina y D) Naringenina E) quercetina F) Apigenina a pH 3,5. Los enlaces de hidrógeno son de color azul oscuro. El anillo aromático de flavonoides en blanco, y los carbonos de la parte flexible de HP- β -CD en azul claro	137
Figura IV.5.: Resultados obtenidos de acoplamiento entre HP- β -CD con A) kaempferol, B) miricetina, C) hesperidina y D) Naringenina E) quercetina F) Apigenina a pH 6,5. Los enlaces de hidrógeno son de color azul oscuro. El anillo aromático de flavonoides en blanco, y los carbonos de la parte flexible de HP- β -CD en azul claro	138
Figura IV.6.: Resultados obtenidos de acoplamiento entre HP- β -CD con A) kaempferol, B) miricetina, C) hesperidina y D) Naringenina E) quercetina F) Apigenina a pH 8,5. Los enlaces de hidrógeno son de color azul oscuro. El anillo aromático de flavonoides en blanco, y los carbonos de la parte flexible de HP- β -CD en azul claro	139

CAPÍTULO V

- Tabla V.1.:** Constantes de complejación (K_c) para los complejos formados entre las flavanonas y los dos tipos de CDs (β - y HP- β -CDs) a diferentes pHs usando diferentes métodos para su determinación 151
- Tabla V.2.:** Solubilidad acuosa de las flavanonas a diferentes pHs y CE con diferentes tipos de CDs 154
- Figura V.1.:** Estructura química de naringenina y Hesperetina..... 146
- Figura V.2.:** Efecto de la temperatura en la solubilidad de Naringenina (A) y Hesperetina (B)..... 147
- Figura V.3.:** Diagrama de fases de naringenina (●) y hesperetina (○) en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 6,5) con β -CDs (A) y HP- β -CDs (B)..... 149
- Figura V.4.:** (A) Espectro de absorción de naringenina con concentraciones crecientes de HP- β -CDs λ_{max} 290 nm: (a) 0, (b) 0,1 (c) 0,25, (d) 0,5, (e) 0,75, (f) 1, (g) 2, (h) 3, and (i) 5 mM HP- β -CDs (A insertada) Representación de Benesi-Hildebrand para naringenina con concentraciones crecientes de HP- β -CDs. (B) Espectro de absorción hesperetina con concentraciones crecientes de HP- β -CDs λ_{max} 292 nm: (a) 0, (b) 0,1 (c) 0,25, (d) 0,5, (e) 0,75, (f) 1, (g) 2, (h)3, and (i) 5 mM (B insertada) Representación de Benesi-Hildebrand para hesperetina 156
- Figura V.5.:** Diagrama de fases de naringenina (●) o hesperetina (○) en tampon acetate de sodio 100 mM (pH 3,5) con β - (A) o HP- β -CDs (B) y tampón borato de sodio 100 mM (pH 8,5) con β - (C) o HP- β -CDs (D)..... 158
- Figura V.6.:** Tiempo de pérdida de naringenina (A) y hesperetina (B), naringenina con β -CDS (C), hesperetina con β -CDS (D), naringenina con HP- β -CDs (E) y hesperetina con HP- β -CDs (F) en diferentes soluciones acuosas de tampón acetato de sódico 100 mM (pH 3,5) (●) tampón fosfato sódico 100 mM (pH 6,5) (○) y tampón borato sódico 100 mM (pH 8,5) (◆)..... 160
- Figura V.7.:** (A) Cromatograma de naringenina en disolución en tampón acetato sódico 100 mM (pH 3,5) a 1h (-) y 48h (...). (B) Cromatograma de hesperetina en disolución acuosa tampón acetato sódico 100 mM (pH 3,5) a 1h (-) y 48h 161

CAPÍTULO VI

- Figura VI.1.:** Estructura química de Apigenina, Naringenina y Hesperetina..... 166
- Figura VI.2.:** Área bajo la curva de caída de la FL inducida por el radical AAPH de Hesperetina a diferentes concentraciones: blanco (●), 0,750 mM (○), 1.125 mM, (■), 1.875 mM (□), 2,25 mM (▲) y 2.625 mM (Δ)..... 167
- Figura VI.3.:** Regresión lineal de apigenina (●), naringenina (○) y Hesperetina (■) a diferentes concentraciones, expresados en equivalentes de Trolox (mM) 168
- Figura VI.4.:** Área bajo la curva de caída de la FL, en presencia de hesperetina (0,5mM (○) con 1,75 mM de β -CDs (●) 1,75 mM de HP- β -CDs (□)..... 169
- Figura VI.5.:** Efecto de la concentración de β -CDs en la capacidad antioxidante de apigenina. (○) 0,375 μ M y (●) 0,75 μ M de Apigenina 170
- Figura VI.6.:** Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la capacidad antioxidante de Apigenina. (○) 0,375 μ M y (●) 0,75 μ M de Apigenina 171
- Figura VI.7.:** Efecto de la concentración de β -CDs en la capacidad antioxidante de naringenina. (○) 0,375 μ M y (●) 0,75 μ M de Naringenina 171
- Figura VI.8.:** Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la capacidad antioxidante de naringenina. (○) 0,375 μ M y (●) 0,75 μ M de naringenina. 172
- Figura VI.9.:** Efecto de la concentración de β -CDs en la capacidad antioxidante de hesperetina. (●) 0,375 μ M y (○) 0,75 μ M de heperetina..... 172
- Figura VI.10.:** de la concentración de HP- β -CDs en la capacidad antioxidante de hesperetina. (●) 0,375 μ M y (○) 0,75 μ M de heperetina..... 173

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN CICLODEXTRINAS (CDs)

1.1. HISTORIA Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CDS

Las ciclodextrinas (CDs) son azúcares naturales, con forma cíclica que pueden estar formados por seis (α -CDs), siete (β -CDs) u ocho (γ -CDs) unidades de glucosa, las cuales se unen mediante enlaces (α 1-4) (**Figura I.1.**). Otras formas de referirse a las CDs son: cicloamilosas, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger (Villiers, 1891; Eastburn y Tao, 1994). Se obtienen del almidón mediante una reacción detransglucosilación intramolecular, llevada a cabo por la enzima Ciclodextrina glucano transferasa (CGTasa) de *Bacillus macerans* (Szetjili, 1998). El estudio de las CDs, se ha llevado a cabo durante más de 120 años y podría dividirse principalmente en tres grandes períodos: descubrimiento (1891- 1935), madurez (1935 - 1970) y aplicaciones (1970 - presente) (Crini 2014).

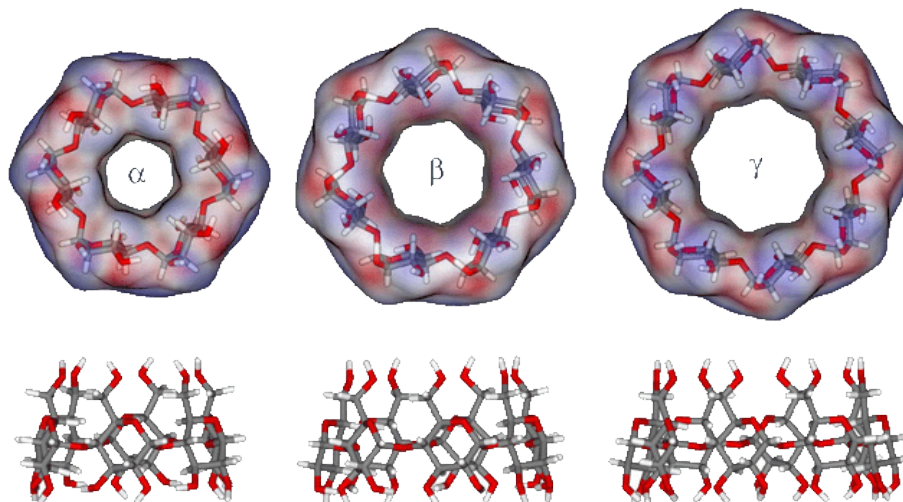


Figura I.1: Estructura de α -, β - y γ -CDs.

En 1891 Villiers observó que, al ser digerido el almidón por el microorganismo *Bacillus amylobacter* se podía obtener una pequeña cantidad de dextrinas, aproximadamente 3 g/Kg de almidón. Después de mantenerlas un tiempo en alcohol observó que aparecían precipitados de carácter cristalino, los cuales, una vez analizados, correspondían a la estructura de las CDs ($C_6H_{10}O_3$) · 3 H₂O. Probablemente Villiers, al igual que otros muchos autores, pudieron obtener CDs a causa de la contaminación con *Bacillus macerans* (Villiers, 1891). En 1903, Schardinger obtuvo unos a partir de una bacteria que no sabía cual era, precipitados cristalinos que no presentaban poder reductor, llamadas dextrina A y dextrina B. En 1904, Schardinger obtuvo alcohol etílico y acetona de material vegetal y azúcar procedente del almidón a partir de un microorganismo que aisló (Eastburn y Tao, 1994). Unos años después, en 1911, pudo observar como esta bacteria, llamado *Bacillus macerans*, era capaz de producir una cantidad importante de dextrinas cristalinas a partir del almidón (25-30%). Por ello las denominó dextrinas cristalinas α y β mientras que la dextrina cristalina γ no se aislaron hasta 1935. En 1942 se pudo observar por cristalografía, la estructura de α - y β -CDs corroborando así las estructuras propuestas años anteriores. En 1948, pudo observarse mediante difracción de rayos X la estructura de γ -CDs y fue entonces cuando se afirmó que las CDs eran capaces de formar complejos de inclusión. Se pudo ver como todos las CDs tenían una estructura troncocónica común, debido a la conformación en silla que presentan las glucosas de tal manera que los -OH secundarios de los carbonos C-2 y C-3 quedan orientados hacia la boca ancha del cono y los -OH primarios de C-6 se encuentran orientados hacia la boca estrecha del cono. Hacia la superficie más externa del cono se orientan los grupos -CH₂OH mientras que, hacia el interior se encuentran localizados los carbonos C-3 y C-5 que son más apolares y el oxígeno de los enlaces glucosídicos (**Figura I.2**). La forma concreta que tienen de posicionarse todos estos grupos dentro de la estructura tronco-cónica, da lugar a una molécula que se caracteriza por tener una superficie externa hidrofílica, soluble en agua, y una cavidad interna hidrofóbica (Szejtli, 1982).

En los años 1954-1957, varios grupos de investigación se centraron en la producción de CDs de forma enzimática (Cramer, 1954; French, 1957), con el fin de fraccionar los compuestos y determinar sus propiedades físicas y químicas. En 1961 se descubrieron otras CDs que tenían un mayor número de glucosas a las

cuales las denominó como δ -, ζ -, ξ - y η -CDs (9-12 residuos) (Hirose y Yamamoto, 2001), mientras que el grupo de investigación de Cramer continuó con los estudios sobre la complejación de las CDs. En 1953 Plieninger, Cramer y Freudenberg desarrollaron una patente, donde describían las aplicaciones más importantes de las CDs, principalmente en la protección de compuestos volátiles, formulación de fármacos, y aumento de la solubilidad de dichos compuestos.

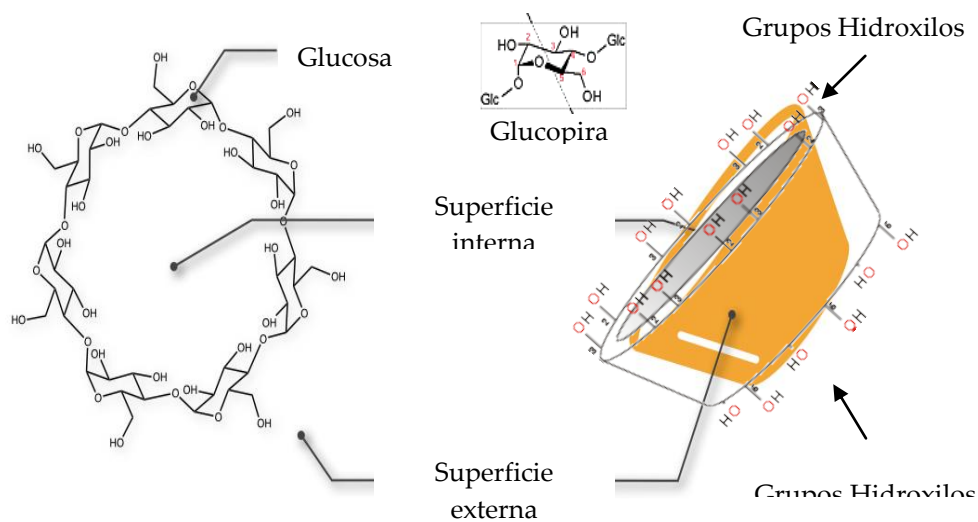


Figura I.2.: Estructura ciclodextrina.

French, en 1957 publicó la primera revisión de CDs y en ella se habló por primera vez de la toxicidad de las CDs (French, 1957). En 1968 dicha información fue corroborada por Caesar (Caesar, 1968).

Durante los 25 años siguientes, se continuó investigando sobre la toxicidad de las CDs especialmente en su uso en humanos. Por otra parte, el primer congreso internacional de CDs se celebró en 1981, decidiendo organizar este evento de forma periódica cada dos años.

1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS CDS

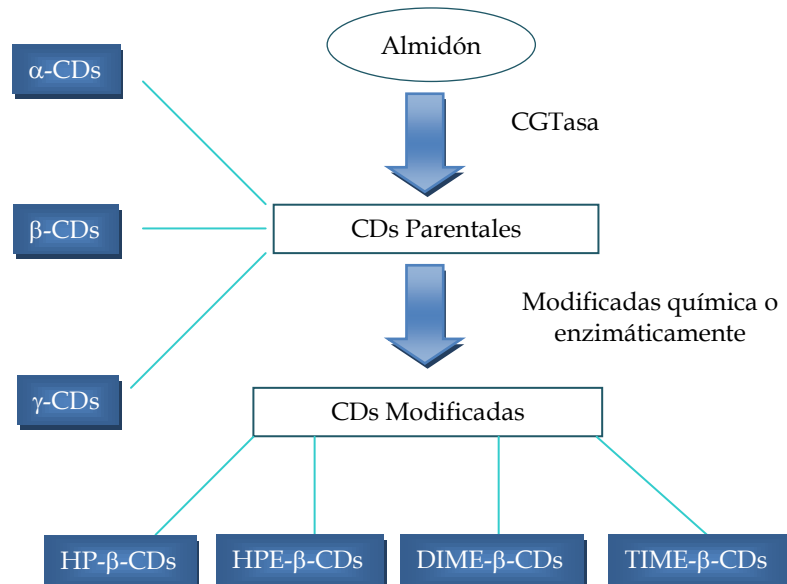
Existen tres tipos de CDs denominadas naturales, nativas o de primera generación: α -, β - y γ -CDs. Las CDs más usadas a nivel industrial son las β -CDs,

debido a su bajo coste. En la **Tabla I.1.** podemos observar las características principales de las CDs naturales.

Tabla I.1.: Propiedades de las CDs.

Propiedades	α -CDs	β -CDs	γ -CDs
Número de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25°C	14.5	1.85	23.2
Diámetro exterior	14.6	15.4	17.5
Diámetro de la cavidad	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Altura de la cavidad	7.9	7.9	7.9
Volumen de la cavidad	174	262	427

Apartir de las CDs nativas se han elaborado otros tipos de CDs denominadas CDs modificadas o derivadas de las nativas, las cuales se obtienen por esterificaciones o acilaciones de los grupos OH de los carbonos primarios y secundarios de las CDs nativas. La solubilidad de las CDs parentales es diferente a la de las modificadas en función del sustituyente adicionado, y también se verá modificado el volumen de su cavidad hidrofóbica (Szejtli, 1998). Las β -CDs son las CDs nativas que más se han modificado, aproximadamente con 20 sustituyentes diferentes. Estas CDs modificadas mejora la separación de los productos, optimizan las reacciones y la selección de reactivos. (**Figura I.3.**)



- Hidroxipropil-β-CDs.(HP-β-CDs)
- Hidroxietil-β-CDs (HPE-β-CDs)
- (2,6-dimetil)- β-CDs (DIME-β-CDs)
- (2, 3, 6-trimetil)- β-CDs (TIME-β-CDs)

Figura I.3.: Tipos de CDs modificadas.

Una de las características de estos azúcares cíclicos, es que pueden enlazarse mediante enlaces covalentes o no covalentes a otras CDs, por lo que pueden usarse en la construcción de complejos supramoleculares. Pueden crear arquitecturas moleculares como los polirrotaxanos, rotaxanos, catenanos y tubos (**Figura I.4.**) que se suelen usar para separar mezclas complejas de enantiómeros y moléculas (Szetjli, 1998).

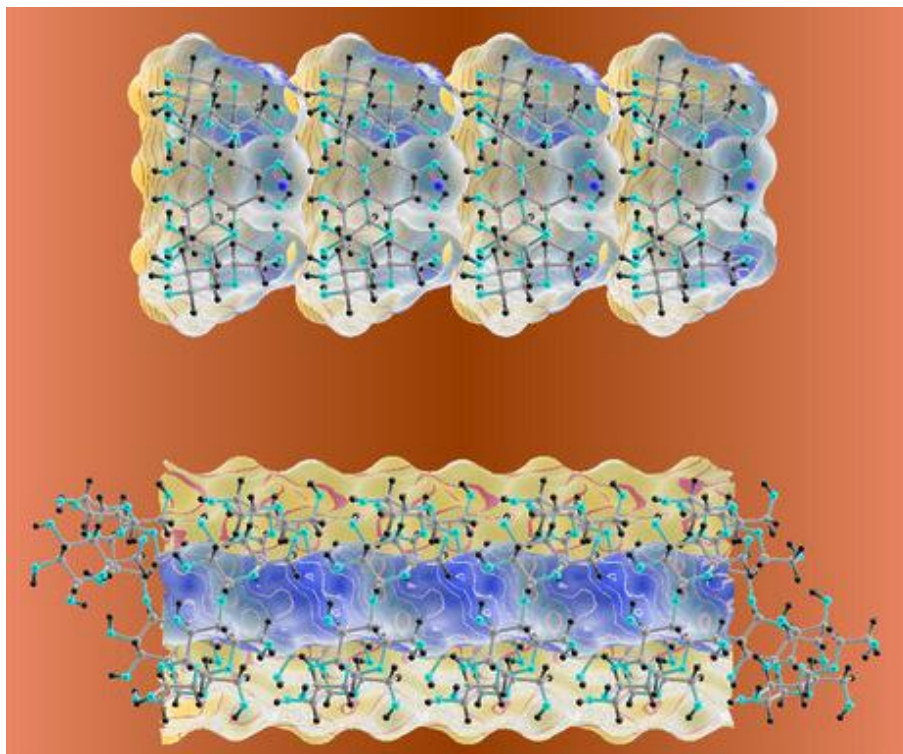


Figura I.4.: Estructuras supramoleculares.

1.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

De las propiedades físico-químicas que presentan las CDs una de las más importantes es su capacidad para formar complejos de inclusión con una amplia gama de compuestos sólidos, líquidos y gaseosos mediante complejación molecular. Para ello, es necesario que el compuesto que va a ser complejado tenga un tamaño compatible con las dimensiones de la cavidad interna de la CDs (Villiers, 1981). La polaridad de la molécula huésped hace que la formación del complejo sea más o menos estable y muchos autores describen que la formación de estos complejos es más bien un factor geométrico que químico (Muñoz-Botella y col., 1995). La complejación se produce por interacciones energéticamente favorables entre el analito y la cavidad hidrofóbica de las CDs (Martín del Valle E.M., 2004)

La formación del complejo consiste en un ajuste de dos dimensiones entre la molécula huésped y la cavidad hidrofóbica de la CD. Para ello, se produce un cambio de la entalpía (Szejtli, 1998) debido a: *i*) formación de puentes de hidrógeno entre la analito y OH de la CD, *ii*) interacciones de Van der Waals entre la analito y la CD, *iii*) traducción de la energía de tensión del analito de la CD, *iv*) pérdida de energía debida a las moléculas de H₂O del interior de la cavidad hidrofóbica de la CD e *v*) interacciones polares. Por tanto que la variación de energía libre total del sistema (ΔG_T) es la suma de todas las contribuciones individuales [$\Sigma(\Delta G)_{i-v}$] (Schneiderman y Stalcup, 2000). Por lo tanto la variación de energía libre total del sistema.

Hay muchos estudios que determinan la importancia de estos enlaces en la formación de los complejos de inclusión y la estabilidad de los complejos (Schneiderman y Stalcup, 2000). Para un huésped apolar las fuerzas más significativas, son *ii*), *iii*) y *iv*), aunque la fuerza implicada en la complejación depende de las características del analito y de la CDs que lo compleja. La principal fuerza motriz de la formación de complejos es la liberación de moléculas de agua de dentro de la cavidad hidrofóbica, ya que son desplazadas por las moléculas huésped más hidrófobas presentes en la solución para lograr una asociación apolar-apolar y una disminución en la tensión del anillo de CD, dando como resultado un estado de energía más estable (Martín del Valle, 2004)

Estas interacciones hidrofóbicas son relativamente débiles, comparadas con el resto de fuerzas que actúan en la encapsulación de moléculas en CDs. Así, al comparar la energía que se necesita para formar un enlace covalente (10² kcal/mol) con con la energía necesaria para formar un enlace por puente de hidrógeno (10 kcal/mol) y la necesaria las interacciones por fuerzas de Van der Waals (1 kcal/mol), se puede afirmar que son interacciones débiles y que en muchas ocasiones son las que dificultan la formación de complejos de inclusión estables. (Schneiderman y Stalcup, 2000). Las uniones covalentes, son siempre mucho más estables que los enlaces débiles, pero si la molécula encaja perfectamente en la cavidad hidrofóbica y permite la formación de enlaces de Van der Waals con un radio adecuado, podría dar lugar a enlaces estables y por tanto a complejos de inclusión estables, que podría aproximarse a la estabilidad conseguida con las uniones covalentes. Hay moléculas hidrofóbicas, como el benceno, que no forman enlaces por puentes de hidrógen, y por ello, son mucho

más estables. En la estabilidad de los complejos, lo que más va a influir es el carácter hidrofóbico de los sustituyentes. Los grupos que con mayor frecuencia disminuyen la estabilidad de los complejos son los ionizantes y los hidroxilos, mientras que aquellos que la incrementan son los sustituyentes metilo o etilo (Martín del Valle E.M., 2004).

Por lo tanto, la formación de los complejos de inclusión entre un analito y una

CDs comienza cuando las características geométricas, estéricas, energéticas y químicas son favorables entre los dos.

El modo en el que la molécula huésped se adapta a la cavidad interna de la CD es un paso muy importante en la complejación, ya que no sólo depende de las propiedades de la molécula huésped, sino que también entra en juego la capacidad de la molécula para deshidratación total o parcialmente, seguida de la rehidratación que tiene lugar después del proceso de incorporación, y estos procesos son característicos de cada molécula huésped (Loftsson y Brewster, 1996).

El enlace que se da entre la CD y el analito no es fijo ni permanente, sino que existe una constante que gobierna el equilibrio dinámico producido, cuya fuerza va a depender del tamaño del analito que va a ser complejado y de las interacciones que se crean con las CDs(Figura I.5.).

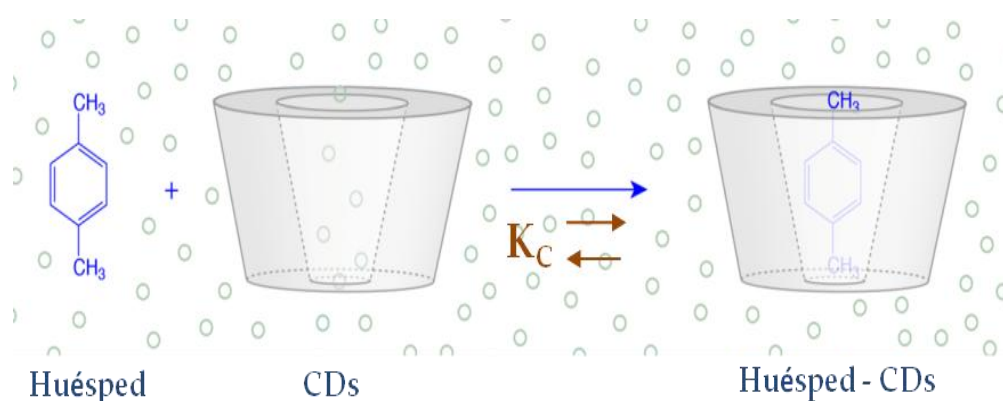


Figura I.5.: Formación del complejo huésped-CDs.

El disolvente más utilizado para formar los complejos de inclusión es el agua, pudiéndose formar en estado cristalino o en disolución. La formación de los complejos se pueden obtener en presencia de cualquier disolvente no acuoso y en un sistema de co-solventes. Las propiedades físico-químicas de cualquier molécula pueden verse modificadas al ser complejadas con CDs (Schmid, 1989). Las propiedades que pueden ser modificadas por dicho proceso pueden ser: solubilidad acuosa, estabilidad frente a la degradación del oxígeno y los efectos que provoca, luz, calor, volatilidad y sublimación, aislamiento físico, movilidad cromatográfica, olor y sabor. Es por ello, que las CDs se han utilizado en diversos sectores como: en alimentación (Fujishima y col., 2001), farmacia (Bhardwaj y col., 2000), cosmética (Holland y col., 1999), medio ambiente (Bhardwaj y col., 2000), bioconversión (Dufosse y col., 1999), envasado e industria textil (Hedges, 1998).

Existen moléculas de diferente naturaleza que son más susceptibles de formar complejos de inclusión con CDs, entre las que se encuentran: hidrocarburos alifáticos de cadena lineal o ramificada, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos, compuestos aromáticos, gases y compuestos polares tales como halogenados, oxiácidos y aminas (Schmid, 1989).

Cómo podemos ver en la **Figura I.8**, la altura de la cavidad hidrofóbica de los tres tipos de CDs nativas es la misma, mientras que el diámetro de la cavidad hidrofóbica y su volumen varía dependiendo del número de unidades de glucosas que la forman.

Por lo tanto α -CDs complejan perfectamente moléculas de bajo peso molecular o compuestos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos; las β -CDs moléculas aromáticas y heterociclos; y las γ -CDs moléculas más grandes, tales como macrociclos y esteroides (Martín del Valle, 2004).

Al formarse el complejo, el equilibrio inicial suele producirse muy rápido (normalmente en poco tiempo, pero el equilibrio que se produce al final del proceso puede tardar más tiempo. Por lo tanto, la disociación del complejo de inclusión suele ser relativamente rápido, favorecido por un aumento en el número de moléculas de agua en el medio circundante.

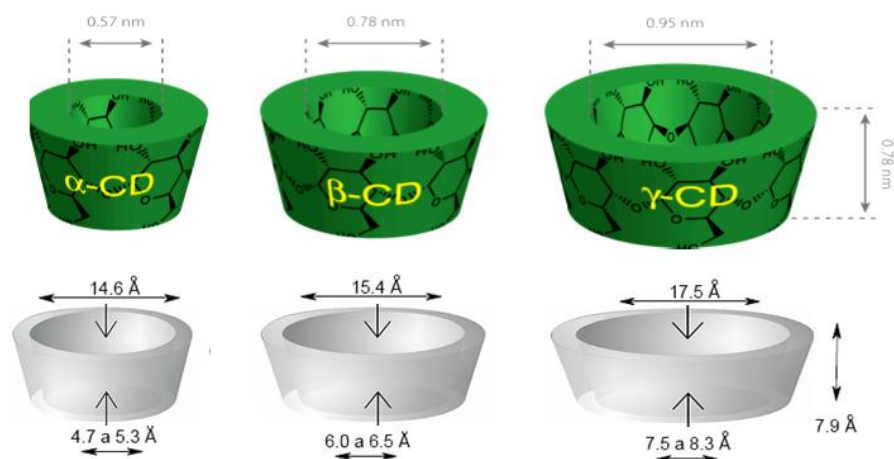
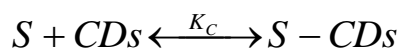


Figura I.8.: Dimensiones de las diferentes CDs activas.

1.3.1. Equilibrio

La estabilidad de los complejos de inclusión está gobernada por una constante de complejación (K_c). Para determinar el valor de K_c se utilizan métodos basados en los cambios físico-químicos de la molécula complejada, su solubilidad acuosa, su actividad molar (Higuchi y Connors, 1965); absorptividad molar UV-VIS (Sigurdardottir y Loftsson, 1995; Hussain y col., 1993); pKa de grupos funcionales; cambios calorimétricos (Uekama, 1979); descenso del punto de congelación (Suzuki y col., 1993); fluorescencia (Muñoz de la Peña y col., 2007); resonancia magnética nuclear (Harabagiu y col., 2004); oxidación enzimática (Núñez-Delicado y col., 1999); reactividad química (Loftsson, 1995; Másson y col., 1998); y cambios en los tiempos de retención cromatográfica (López-Nicolás, y col., 2006).

El equilibrio dinámico de la formación de complejos de inclusión se puede representar como:



Se puede describir cuantitativamente la constante de equilibrio o constante de complejación (K_c) mediante la expresión:

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

donde S-CDs es la concentración de sustrato complejoado en CDs. $[CDs]_L$ y $[S]_L$ es la concentración de CDs y sustrato libre en el equilibrio, respectivamente. Cuanto más elevado sea el valor de K_c , más estable será el complejo formado. Este valor depende de la fuerza iónica del medio, la temperatura, el pH y el solvente en el que se encuentre.

1.4. PROCESOS DE PREPARACIÓN Y TÉCNICAS DE FORMACIÓN DE COMPLEJOS

1.4.1. Solución dinámica

Las moléculas que se van a complejar en disolución acuosa se ve favorecida la complejación, ya que la molécula huésped está más disponible para las CDs, mientras que en estado cristalino sólo está disponible las moléculas que se encuentran en la superficie de las CDs. Además, cuando se aumenta la temperatura del dicolvente aumenta la solubilidad de las CDs y de la molécula huésped aumentando la complejación. Por lo tanto la complejación se produce mejor en disolución (Martín del Valle, 2004).

1.4.1.1. Efecto de la temperatura

La temperatura es un parámetro muy importante en la formación de complejos de encapsulación. Cuando la temperatura aumenta la formación de los complejos también suele ser mayor y aumentar su solubilidad, pero hay que tener en cuenta que a veces con este aumento de la temperatura se pueden desnaturalizar los complejos. La estabilidad térmica de los complejos varía dependiendo de la molécula huésped, siendo la temperatura de entre 50-60 ° C a la que se desnaturalizan muchos analitos. Si la molécula huésped está

fuertemente encapsulado por la CDs suelen aguantar bien las altas temperaturas sin llegar a desnaturalizarse.

1.4.1.2 Uso de disolventes

El disolvente más utilizado para la formación de complejos de inclusión con CDs es el agua. Para que estos complejos se formen de manera rápida y efectiva es necesario que las CDs estén disueltas y, por lo tanto, cuanto mayor es su solubilidad en agua mayor es la formación de los complejos. Para que la molécula huésped sea complejada en la cavidad de las CDs es necesario que desplace a las moléculas de solvente de la cavidad, siendo el agua el disolvente que mejor se desplaza (Martín del Valle, 2004)

En algunas ocasiones los analitos que van a ser encapsulados no son nada solubles en agua impidiendo la encapsulación. En tales casos, el uso de un disolvente orgánico para disolver al huésped puede facilitar el proceso. El etanol y el éter dietílico son buenos ejemplos de tales disolventes (Martín del Valle, 2004).

1.4.1.3. Efecto del agua sobre el complejo

Conforme aumenta la cantidad de agua, aumenta la solubilidad tanto de la CDs como de la molécula huésped, de manera que la formación de complejos se produce más fácilmente. Sin embargo, puede llegar un punto en el que CDs y huésped están tan diluidos que no entran en contacto tan fácilmente como están más concentradas. Por lo tanto, es mejor tener una disolución con baja cantidad de agua para que se produzca la encapsulación a una adecuada velocidad. (Martín del Valle, 2004).

Los aceites, que son compuestos de baja densidad en disolución acuosa se asocian entre ellos y no interaccionan con las CDs.. En tales casos, el uso de más agua junto con un buen proceso de mezclado, permitirá una mejor dispersión y separación de las moléculas de aceite. Cuando las moléculas de aceite entran en contacto facilitan la formación de complejos.

1.4.1.4. Huéspedes volátiles

Los compuestos volátiles pueden perderse durante el proceso de complejación, especialmente si se utiliza calor. Con moléculas altamente volátiles, esto se puede evitar usando un reactor sellado o refluyendo las moléculas evaporadas hacia el recipiente de mezcla (Martín del Valle E.M., 2004).

1.4.2. Co-precipitación

Es uno de los métodos más utilizados a nivel de laboratorio. Consiste en disolver las CDs en agua caliente y adicionar a esta disolución, en constante agitación, la molécula a complejar. La concentración β -CDs puede ser aproximadamente del 20% si la molécula huésped no se degrada con las temperaturas elevadas. Si la concentración de CDs utilizada es muy alta, conforme baja la temperatura y avanza la reacción, la solubilidad del complejo disminuye. Hay casos en los que se debe enfriar la reacción para precipitar los complejos formados. Este rprecipitado se recupera por decantación, filtrado o centrifugación, lavando con pequeñas cantidades de agua u otro disolvente en agua como acetona, metanol o alcohol. (Loftsson y col., 1993; Pitha y col., 1992).

1.4.3. Complejación por método "slurry"

En este método las CDs no tienen que disolverse completamente. Se añaden CDs a la disolución acuosa en un 50-60% de sólidos solubles, los cuales estarán en continua agitación para obtener la disolución saturada en CDs. Posteriormente se añade el analito que será complejado por las CDs y cuando se forme gran cantidad de complejos y se sature la disolución los estos precipitan y se puede recoger al igual que en la co-precipitación.

Esta complejación se hace a temperatura ambiente y el tiempo de complejación varía según el analito. (Martín del Valle, 2004).

1.4.4. Complejación en pasta

Este método de complejación es una variación del método de "slurry". En este método se utiliza muy poca cantidad de agua y mucha concentración de CDs

con el fin de formar una pasta de CDs usando un mortero y un mazo, o a gran escala usando un amasador. El tiempo requerido depende de la molécula huésped.

El complejo que se obtiene primero se lava con una pequeña cantidad de agua y se recoge por centrifugación o filtración o bien directamente se seca. En ocasiones el secado de los complejos dan lugar a una pasta dura en vez de un fino polvo, lo cual depende directamente del tipo de analito encapsulado y del agua utilizada. Cuando esto ocurre se puede moler la masa para conseguir el polvo fino. (Martín del Valle, 2004).

1.4.5. Mezcla húmeda y calefacción

En este método se utiliza entre el 20 y 25 % de agua o bien no usar agua para la encapsulación. LA formación de los complejos se realiza mezclando la molécula huésped y en un recipiente sellado, el cual se calientan aproximadamente a 100°C y posteriormente se secan los complejos. Según el huésped utilizado se emplea una cantidad de agua y un tiempo de calentado. Este método de complejación se puede realizar completamente seco o con un 20 - 25% de agua (Martín del Valle, 2004).

1.4.6. Extrusión

Este método combina dos procesos: mezclado y calentamiento. Para este método se mezcla el agua, las CDs y la molécula huésped y posteriormente se ponen en la extrusora. Según la cantidad de agua que se utilice se pueden secar conforme se enfría o bien secar en una estufa.

Este método es continuo y utiliza poco agua, sin embargo, presenta un problema y es el calor que se genera que puede afectar al huésped.

1.4.7. Mezcla en seco

Algunas moléculas pueden ser complejadas con CDs simplemente poniéndolas en contacto en seco. Las moléculas con las cuales se consigue este tipo de complejación son aceites o moléculas líquidas. El tiempo requerido para la mezcla es variable y depende de la molécula que se quiere complejar y

generalmente, se lleva a cabo a temperatura ambiente. La ventaja principal de éste método es que no se necesita añadir agua, a menos que se use una etapa de lavado. Su principal desventaja es el riesgo de aglomeración al trabajar con gran cantidad de producto, lo que hace que la mezcla no sea lo suficientemente minuciosa, y derive en una complejación incompleta (Martín del Valle E.M., 2004).

1.5. MÉTODOS DE SECADO DE COMPLEJOS

Los complejos de inclusión pueden ser secados por diferentes procesos: lecho fluido, horno, secado por aspersion u otros tipos de secadores. Para relacionar este proceso hay que tener en cuenta las características de las moléculas complejadas ya que algunas de ellas pueden no soportar elevadas temperaturas.

Para secar complejos formados con moléculas cuya temperatura de ebullición es inferior a 100 °C se deben emplear temperaturas bajas en el secado para evitar pérdidas o alteraciones de la molécula huésped. La baja temperatura minimiza la pérdida de moléculas complejadas que son extremadamente volátiles. La liofilización es especialmente útil para huéspedes térmicamente lábiles y complejos solubles como los hidroxipropilados (Martín del Valle, 2004).

1.6. LIBERACIÓN DEL COMPUESTO ENCAPSULADO

Los complejos de inclusión, una vez secados son muy estables, exhibiendo una larga vida útil a temperatura ambiente bajo condiciones de ausencia de humedad.

La disolución de los complejos hace que se produzca la liberación controlada de la molécula complejada, hasta que alcanza el analito su límite de solubilidad acuosa, ocupando las moléculas de agua la cavidad hidrofóbica creando equilibrio entre el compuesto libre y el complejado.

1.7. MÉTODOS PARA DETECTAR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Debido a los diferentes cambios físico-químicos que se producen en las propiedades de las moléculas complejadas, podemos detectar la formación de complejos de inclusión mediante diferentes métodos. Se pueden producir modificaciones en sus propiedades químicas (reactividad, variaciones en el valor de las constantes de ionización ácido-base), o físicas (solubilidad, tensión superficial), o en cuanto a las propiedades espectroscópicas pueden darse modificaciones cuantitativas (variaciones en el coeficiente de extinción molar o en la intensidad de fluorescencia) y cualitativas (posición de los máximos de absorción o fluorescencia) (Martín y col., 1985).

1.7.1. Métodos de detección de complejos sólidos

1.7.1.1. Espectroscopía Raman

Como consecuencia del proceso de inclusión, las bandas características del compuesto huésped se desplazan y modifican. Es posible que este método sea el más utilizado en medio líquido ya que la solución acuosa no es un obstáculo (Rao y col., 2006).

1.7.1.2. Difracción de rayos-x

Este método se utiliza para determinar la estructura cristalina de los complejos formados (Saenger, 1984). Esta técnica requiere una preparación compleja así como una infraestructura bastante específica, por lo que no se usa en la realización de análisis rutinarios. No obstante, los resultados que se obtienen por difracción de rayos X es la confirmación de la formación de los complejos por las diferencias que se obtienen entre los difractogramas de la molécula encapsulada y el de las CDs aisladas y los difractogramas del complejo.

1.7.1.3. Métodos térmicos

Para estudiar los complejos de inclusión en estado sólido es importante atender las diferentes técnicas que se conocen como métodos térmicos. Los más utilizados son: análisis térmico diferencial (DTA),

calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TG) y termogravimetría diferencial (OTGL) (Martín del Valle, 2004).

Al producirse la inclusión del compuesto en la cavidad hidrofóbica de la CD, tanto el punto de ebullición como el de fusión de la molécula complejada va a aumentar, pudiendo quedar enmascarado sobre la temperatura de descomposición de las CDs. Este aumento de la temperatura mejora la estabilidad de muchos principios activos (Uekama, 1979).

1.7.1.4. Espectroscopía de absorción infrarroja

En una vez formado el complejo, el espectro de absorción (IR) puede llegar a mostrar desplazamientos de hasta 40nm en las bandas de absorción del analito. Un ejemplo de ello se observa en las bandas de tensión correspondientes a la absorción del carbonilo y los -OH. Su desplazamiento es debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno de los complejos de tal forma que la molécula quede aislada en el interior de la cavidad. De manera más concreta se puede ver en el ácido benzoico y el ácido salicílico (nakai y col., 1980). Pero la espectroscopía IR no es una prueba determinante de la formación de complejos puesto que quedan muchos cambios espectrales ocultos en el espectro de absorción IR de las CDs.

1.7.2. Métodos de detección de complejos en solución

La estequiometría y el valor de K_c caracteriza el tipo de complejo formado. Se habla de estequiometría 1:1 (**Figura I.7.**) para la mayoría de las moléculas complejadas en CDs. Aunque, para moléculas huésped muy grandes, se pueden asociar dos moléculas de CDs al analito dando lugar a una estequiometría 2:1 (**Figura I.7.**). Por otro lado, cuando la cavidad hidrofóbica es muy grande por lo que alberga dos moléculas huésped, de tal forma que la estequiometría será (1:2) (**Figura I.7.**). La constante de complejación se calcula cuantificando alguno de los cambios que se producen en las propiedades físico-químicas del analito.

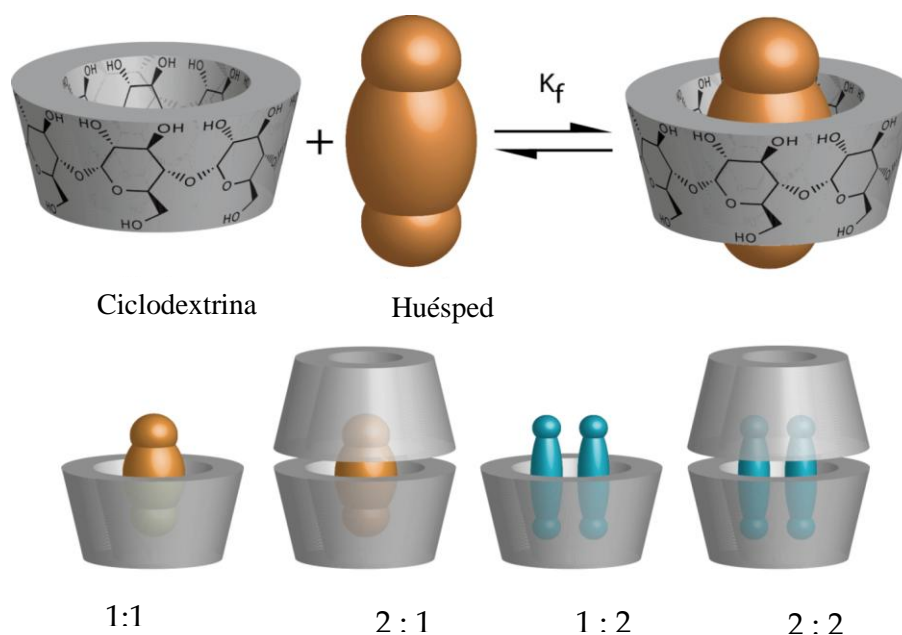


Figura I.7.: Ilustraciones esquemáticas de la formación de complejos.

1.7.2.1. Estudios de solubilidad

Las CDs son moléculas hidrosolubles que envuelven a la molécula huésped que tiene una solubilidad limitada, aumentando notablemente esta propiedad. Normalmente, la CDs suelen ser más hidrosolubles que el complejo formado y, por lo general, la solubilidad del huésped suele aumentar como mínimo un 10%, pudiendo alcanzar valores del 300% en los complejos más solubles en agua (Lath y Chin, 1964).

Los diagramas de fases se utilizan para calcular el valor de K_c , en los cuales se adiciona cantidades saturantes de analito a disoluciones acuosas que contienen concentraciones crecientes de CDs. Posteriormente se mantienen en agitación y a una temperatura adecuada hasta alcanzar el equilibrio. Después son filtradas para quitar el exceso de analito no complejoado y se analiza la cantidad de compuesto que queda en el filtrado de cada muestra para posteriormente ser representada frente a la concentración de CDs. (Higuchi y Connors, 1965) (**Figura I.8**).

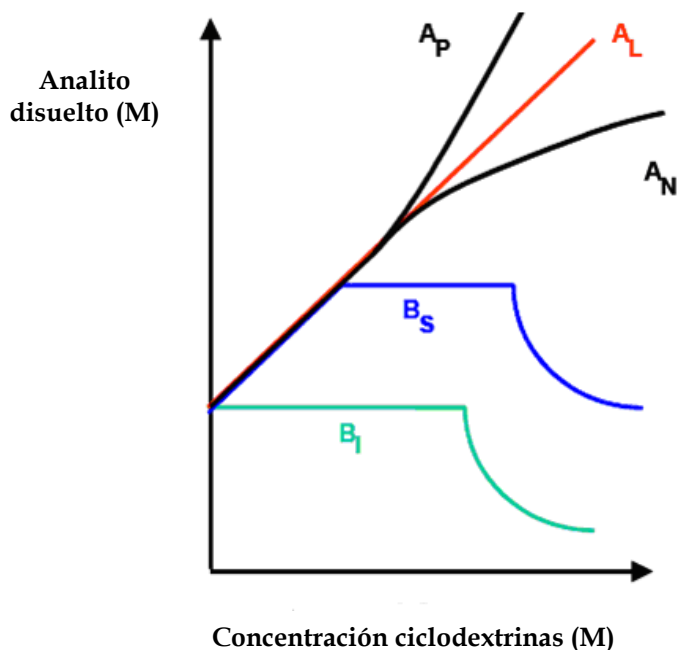


Figura I.8.: Tipos de diagramas de fases con CDs.

Hay varios tipos de diagramas de fases que se dividen en dos grupos: tipo A y tipo B (Higuchi y Connors, 1965). De manera habitual, los diagramas de fases tipo A, suelen presentar un límite de solubilidad muy alto para los complejos de inclusión, sin embargo, los diagramas de tipo B representan la formación de complejos poco solubles que precipitan. Cuando los complejos formados presentan una solubilidad limitada muestran diagramas de fases tipo B_S y cuando los complejos son totalmente insolubles muestran diagramas de fase tipo B_I . Los diagramas tipo A se dividen en: tipo A_P , isoterma de desviación positiva, A_L , conforme aumenta la concentración de CDs, aumenta la solubilidad del complejo de forma lineal, y tipo A_N isoterma de desviación negativa (**Figura I.8.**) (Martín del Valle E.M., 2004).

El tipo de diagrama A_L se consideran de primer orden con respecto a las CDs y de primer orden o superior con respecto a la concentración de sustrato (S); por ejemplo: SCD , S_2CD , S_3CD , ..., S_mCD . Cuando la pendiente de la recta del diagrama de fases es tipo A_L es mayor que uno, indica que los complejos son de orden superior a uno para el analito S_2CD , S_3CD , etc. Una pendiente inferior no significa que no sean complejos de orden superior, sino que, en ausencia de otra

información, se supone que los complejos son 1:1. El tipo A_P indica la formación de complejos de orden superior a uno respecto a las CDs, es decir, $SCD_2, SCD_3, \dots, SCD_n$. La estequiometría del tipo A_P se calculará al ajustar las curvas. Los sistemas más difíciles de interpretar son los diagramas de tipo A_N .

Las CDs nativas, β -CDs, generalmente dan diagramas de fases de tipo B porque forman complejos insolubles en agua, sin embargo, las modificadas suelen dar diagramas de tipo A ya que los complejos son muy solubles en agua.

Estos diagramas de fases permiten calcular la K_C , y realizar una evaluación cualitativa de los complejos de inclusión. La solubilidad de complejos con estequiometría 1:1, puede ser representada como:

$$S_T = S_0 + [S - CD] \quad (2)$$

donde S_0 es la solubilidad acuosa del sustrato en el medio de complejación. En este caso, la K_C puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Pendiente}}{S_0 (1 - \text{Pendiente})} \quad (3)$$

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

La K_C para la formación de complejos $[S_m L_n]$ puede ser representada por:

$$[S]_T = S_0 + m[S_m - CD_n] \quad (4)$$

$$[CD]_T = [CD] + n[Su_m - CD_n] \quad (5)$$

Por otro lado, los valores de $[S_m L_n]$, $[S]$ y $[L]$ se pueden obtener mediante las siguientes ecuaciones:

$$[S] = S_0 \quad (6)$$

$$[S_m CD_n] = \frac{[S]_t - S_0}{m} \quad (7)$$

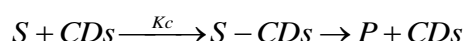
$$[CD] = [CD]_t - n[S_m CD_n] \quad (8)$$

donde S_0 es la solubilidad acuosa del sustrato (en ausencia de CDs), $[S_t]$ es la concentración total de S (complejado y no complejado) y $[CD]_t$ es la concentración total de CDs.

1.7.2.2. Métodos cinéticos

Las CDs, gracias a su efecto catalítico o a la complejación de sustrato o inhibidores, pueden acelerar o retardar la degradación de algunos compuestos (Breslow y col., 1980; Uekama y col., 1983; Núñez-Delicado y col., 1999; Lucas-Abellán y col., 2008^a; Uekama y col., 1978b). Es decir, modifican la velocidad de reacciones enzimáticas.

A continuación se indica el proceso de inclusión y la reacción que se produce:



el cambio de la variación de la velocidad indicará la formación del complejo de inclusión.

1.7.2.3. Métodos instrumentales

En los últimos años, se ha producido un rápido desarrollo en las técnicas instrumentales, siendo estas las más utilizadas para detectar la encapsulación de moléculas en CDs y calcular las constantes formación de pudiendo ser utilizados desde la espectroscopia de absorción UV-VIS, hasta las que son técnicas más sofisticadas como la resonancia magnética nuclear (RMN).

1.7.2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-VIS

Es una de las técnicas más utilizadas. Presenta un manejo muy sencillo, además, es muy versátil y precisa ya que proporciona datos con una alta fiabilidad para el cálculo de K_c . Puede ser aplicada para un gran número de moléculas orgánicas y a que la mayoría absorben en la región UV o visible del espectro, observando cambios en los máximos de extinción (cualitativas) o en el valor del coeficiente de absorción molar (cuantitativas), una vez formado el complejo con CDs. Sin embargo, hay moléculas

orgánicas muy poco solubles en agua que no dan soluciones homogéneas, dificultando su análisis por esta técnica (Basan, 2001).

1.7.2.3.2. Espectroscopía de luminiscencia

La espectroscopía de luminiscencia molecular, son técnicas que se utilizan mucho en los estudios de la formación de complejos ya que son técnicas muy sostenibles, por lo que son muy útiles para estudiar cambios conformacionales de la molécula complejada al pasar de un estado fundamental al exaltado pudiendo profundizar en la geometría del complejo formado.

En este método se observan la formación de los complejos debido a los cambios producidos en el espectro de excitación y emisión, además de los cambios en la intensidad de, el rendimiento cuántico, las variaciones en los tiempos de vida de los estados excitados, el cambio en los procesos de formación de especies excitadas, así como las modificaciones cuantitativas ocurridas en los procesos de amortiguación de fluorescencia y transferencia de energía.

Con el uso de CDs se puede observar fosforescencia a temperatura ambiente, lo que indica un cambio cualitativo o cuantitativo bastante importante (Hurtubise, 1990).

1.7.2.3.3. Dicroísmo circular

Mediante la técnica de dicroísmo circular se pueden detectar complejos de inclusión con CDs en solución acuosa. Hay compuestos que no poseen actividad óptica, pero la formación de complejos puede inducirla debido al propio proceso de inclusión y los cambios que se producen dentro de la CD. El signo de la actividad rotatoria o efecto Cotton inducido, depende de la relación espacial entre el centro de simetría y el cromóforo perturbado. Dependiendo de cómo sea la rigidez del complejo, así será la intensidad (Martín del Valle E.M., 2004)

1.7.2.3.4. Resonancia magnética nuclear

Con la resonancia magnética nuclear (RMN), podemos determinar las relaciones geométricas y la disposición espacial del analito en la cavidad

hidrofóbica de la CD, además de la dinámica de los complejos disueltos en agua debido a las variaciones químicas y constantes de acoplamiento (Harabagiu y col., 2004).

Hay diferentes formas de realizar la RMN, pero las más usadas son de ^{15}N , ^1H y ^{13}C . En La ^1H -RMN se obtienen espectros en solución acuosa deuterada, es la más aplicada debido a que la mayoría de los complejos con CDs son estudiados en agua. Pero, normalmente, los complejos con CDs suelen presentar baja solubilidad en D_2O , al tener que trabajar a bajas concentraciones de CDs, lo que dificulta la obtención de los mismos. Sin embargo, la ^{13}C -RMN permite obtener los espectros en agua donde la solubilidad es mayor, pero es menos sensible, y por ello se necesitan cantidades elevadas de CDs y complejos.

El complejo se puede alterar y descomponer con el empleo de otros disolventes orgánicos deuterados. El DMSO o el dioxano, son los más apropiados por su alta polaridad, y permiten mantener la estabilidad del complejo (Martín del Valle, 2004).

Este método detecta los complejos y las variaciones químicas de los protones (8) y las CDs y analito complejado.

1.7.2.3.5. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico

Es una técnica muy útil para muchos compuestos en disolución, pero estos deben ser paramagnéticos (radicales libres) o estar marcados por marcadores espín. Esta técnica se ha utilizado para detectar radicales libres en la reacción puesto que las CDs tienen una gran actividad de catálisis (Karoui y Tordo, 2004).

1.7.2.3.6. Métodos voltamétricos

La complejación de analitos electroactivas en las CDs pueden ser estudiadas mediante los métodos voltamétricos, debido a que la formación de complejos modifica de los potenciales redox de los analitos complejados (Olea-Azar y col., 2008).

1.7.2.3.7. Conductimetría

La conductimetría estudia la complejación de moléculas ionizables ya que la propiedad de la conductimetría disminuye al ser complejada la molécula debido al aumento del diámetro del anión. Así se han podido estudiar complejos de iones grandes como el dodecil sulfato sódico (SDS) y el bromuro de trimetilcetilamonio con CDs (Trayler, 1988).

1.7.2.3.8. Cromatografía

Cuando se incluyen CDs en la fase móvil en los procesos de separación por cromatografía se ven alterados los tiempos de retención, estos se suelen acortar dependiendo de la constante de complejación, por lo tanto, cuando se determina el tiempo de retención con respecto a la concentración de CDs se puede obtener la K_c de los complejos formados (Hioki, 1977; Barr y Spach, 1978; Uekama y col., 1978b; Lopez-Nicolás; Muñoz de la Peña y col., 1991).

1.8 APLICACIONES DE LAS CDS

La encapsulación en CDs provoca cambios en las propiedades químicas y físicas del compuesto encapsulado, y esto hace que sean adecuadas para su uso en química analítica, agricultura, industria farmacéutica, biotecnología, industria textil, industria alimentaria, cosmética, etc. (Martín del Valle, 2004).

1.8.1. Industria alimentaria

En los últimos años ha aumentado el número de investigaciones sobre compuestos que presentan propiedades saludables y que pueden ser utilizados como fortificantes de productos naturales, y para la elaboración de alimentos funcionales. Uno de los grupos de alimentos funcionales que más se están llevando a cabo son aquellos enriquecidos con compuestos antioxidantes de carácter lipofílico, ya que presentan multitud de propiedades beneficiosas para la salud, pero presentan ciertos inconvenientes, como puede ser su baja solubilidad acuosa, inestabilidad química e incluso baja biodisponibilidad, que dificulta su uso en la elaboración de alimentos funcionales. Estos problemas se pueden solventar usando agentes encapsulantes tales como las CDs (López-Nicolás et al

2014). En la industria alimentaria, se han utilizado las CDs para complejar colorantes alimentarios, aromas y vitaminas (Loftsson y Brewster, 1996; Buschmann y Schollmayer, 2002; Szejtli, 1998). Otra aplicación de las CDs en la industria alimentaria es la encapsulación de sabores para evitar pérdidas durante el procesado y almacenamiento de alimentos. Los sabores, debido a su naturaleza volátil, aceites o líquidos al ser complejados con CDs son protegidos evitando su rápida eliminación (Reineccius y col., 2002, 2003, 2005; Reineccius y Risch, 1986). Las CDs son capaces de retirar compuestos en ciertos procesos industriales, por ello, han sido usadas en la producción de leches, mantequilla o huevos libres de colesterol (Kwak y col., 2004; Jung y col., 2008) (**Figura I.9.**).

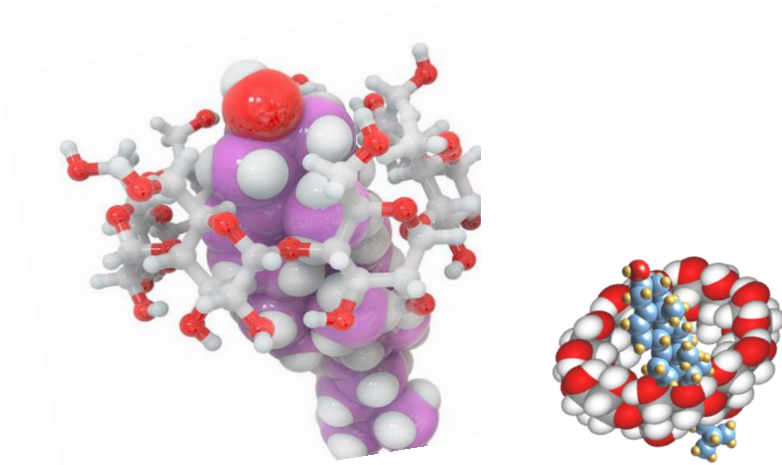


Figura I.9.: Complejo de inclusión colesterol-CDs.

Hay sabores o ingredientes alimentarios como son los ácidos grasos no saturados o los colorantes, entre otros, que son sensibles al oxígeno, pero al formar complejos de inclusión, mejoran su estabilidad química. Szente y Szejtli describieron este efecto en 1987 para lo que se analizó el gato de oxígeno para determinar su efecto en ingredientes libres y complejados. Estos estudios mostraron que al ser complejados con CDs se impide casi en su totalidad la alteración química del sabor por la presencia de oxígeno incluso cuando son almacenados en atmósferas de oxígeno (Szente y Szejtli 1987, 2004).

También existe una gran cantidad de componentes presentes en los alimentos que pueden ser oxidados en presencia de luz, como por ejemplo el

citral (es el compuesto que le confiere el olor a los cítricos). Cuando el compuesto se pone en contacto con la luz UV se transforma en fotocitral A y fotocitral B responsables de sabores y aromas desagradables. Hay estudios que demuestran que cuando el citral es complejado con β -CDs, este compuesto es estable durante las primeras 6 horas de exposición del alimento a la luz, al no producirse los compuestos responsables del mal sabor y olor. (Szente y Szejtli 1987, 2004).

Hay estudios que demuestran que los aceites esenciales al ser complejados con CDs son protegidos frente a la evaporación y por tanto evita que se volatilicen al procesar los alimentos (Szente y Szejtli 1987, 2004).

Se llevó a cabo un estudio en el que se complejaron en β -CDs diferentes sabores sintéticos y naturales y fueron almacenados 14 años a temperatura y humedad relativa no extremas y fueron analizadas las muestras cada año por cromatografía de gases y se observó que al ser complejado aumentaba su estabilidad de forma notable (Szente y Szejtli 1987, 2004; Loftsson, Brewster 2010).

En ciertos alimentos como mayonesa y aderezos de ensaladas, las CDs también han sido utilizadas para estabilizar emulsiones como mayonesas y aderezos de ensaladas. Además se ha observado que el color de la salsa de tomate se puede estabilizar frente a temperaturas superiores a 100°C durante dos horas adicionando 0,2% de β -CDs. Las CDs también mejoran la retención de agua y la textura en productos cárnicos (Ota y Takeda, 1981), y también pueden ser utilizadas para prevenir el pardeamiento en alimentos mínimamente procesados (Núñez-Delicado y col., 2005).

Las harinas y aquellos alimentos que contengan almidón, presentan capacidad de gelatinización, que puede ser modificada con la presencia de β -CDs, especialmente en la harina de trigo (Kim y Hill, 1984). Cuando se adicionan un 1,5% de β -CDs se observa un aumento en el volumen y solubilidad de los gramos de trigo y sobretodo en la lixiviación de la amilosa, siendo el aumento de un factor de 4 la viscosidad de la pasta ya que las CDs estabilizan el complejo lípido-almidón (Loftsson T., Brewster M.E. 2010).

También, hay sabores no deseados que pueden ser enmascarados con el uso de CDs. La liberación de estos compuestos en disolución depende de la temperatura, Kc y concentraciones relativas de ambos componentes. El equilibrio suele desplazarse hacia la complejación en disoluciones concentradas a baja temperatura, pero en disoluciones diluidas a temperaturas elevadas el equilibrio es

desplazado hacia la liberación de los sustratos que están complejados. Debido a esto cuando entran en contacto con las papilas gustativas de la boca los complejos se comportan como una solución diluida a 37°C facilitando la liberación de su sabor y su aroma. Tanto en café como en té, al calentarlos para su elaboración (90°C), aparecen compuestos fenólicos responsables de su sabor amargo. La actuación de β -CDs al 0.1% a dichas bebidas, permite enmascarar dicho sabor (Yu, 1988).

Hay ciertos olores presentes en algunos alimentos como el cordero, el pescado, y las harinas de hueso (que se utiliza como suplemento de calcio en los forrajes de los animales) o de solución de caseinato de sodio, los cuales se pueden eliminar con CDs. También se puede eliminar el olor a grasa y el sabor astringente de aquellos productos derivados de la soja (lecitina de soja), para poder ser usados en alimentación (Hatae y Nakajima, 1986).

La adición de 0.3% de β -CDs a zumos de uva o mandarina antes de ser tratados térmicamente, disminuye sensiblemente su sabor amargo ya que los compuestos naringina y limonina (responsables del sabor amargo) forman complejos estables con β -CDs (Shaw y Wilson, 1983).

En la elaboración de café soluble, se realiza la extracción acuosa del café tostado en presencia de CDs, siendo posteriormente secado por atomización o liofilización, obteniendo un café soluble que conserva mejor sus características como puede ser el aroma. Las CDs también se utilizan para eliminar cafeína pero el rendimiento es bajo ya que solo disminuye entre un 4-26% mientras que el carbón vegetal y los polímeros de β -CDs dan mejor rendimiento eliminando un 70 o 77% respectivamente (Ujhazy y Szejtli, 1989).

Para poder elaborar mantequillas bajas en colesterol, se han utilizado las β -CDs, podemos encontrarlas comercializadas en Bélgica, con el nombre de Balade™, desde 1992 (Comini y Mentink, 1991)., también ha sido aplicada esta técnica, ya que elimina más del 90% de colesterol y el método es muy sencillo consiguiendo elaborar quesos cremosos o huevos bajos en colesterol (Szente y Szejtli 1987, 2004).

El uso de CDs en envases activos para aumentar el tiempo de conservación de los alimentos, es una de sus aplicaciones más atractivas y desafiantes. Se están utilizando tanto CDs vacías como complejando moléculas para que actúen como agentes antioxidantes y antimicrobianos agregándolas a los plásticos de los

envases de alimentos. Además, estas CDs pueden reducir la producción de malos olores de los alimentos y aumentando la vida útil del alimento. Además, se ha visto que al añadir una cantidad de 0.1% de complejos yodo-CDs a pastas de pescado, puede inhibir la descomposición durante dos meses a 20°C (Hara y Hashimoto, 2002). Otra aplicación que se está llevando a cabo en los últimos años es la complejación de fungicidas en CDs que se agregan al film que recubre los quesos, los cuales impiden la rápida proliferación de hongos en la superficie del queso, alargando así la durabilidad del alimento. Este mecanismo puede utilizarse para generar un envase activo de liberación prolongada de agente antimicrobianos para proteger vegetales fresco cortado del ataque de microorganismos (**Figura I.10.**) (Hara, Hashimoto, 2002).

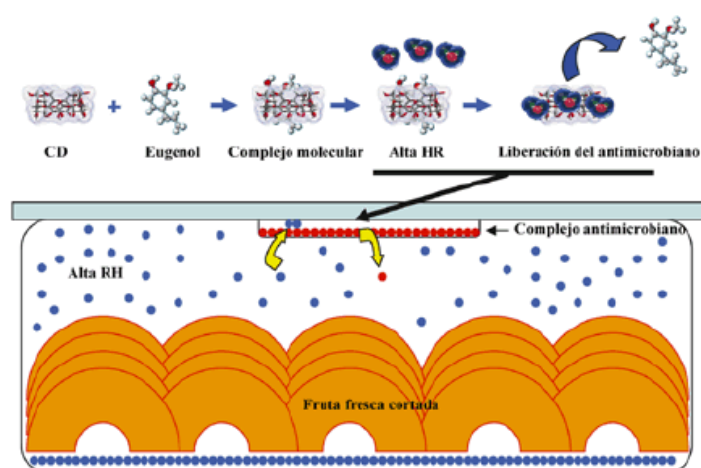


Figura I.10.: Mecanismo de liberación de los compuestos antimicrobianos desde la CDs simulación de un sistema de envase activo para frutas o vegetales frescos cortados

1.8.2. Cosmética y aseo personal

Para las industrias de detergentes, es de gran interés la producción de ambientadores y detergentes cuyos aromas permanezcan en el ambiente un largo periodo de tiempo. Para ello, el uso de CDs juega un papel importante, protegiendo dichos aromas. En esta industria la utilización de CDs está muy difundido, ya que permiten la estabilidad de los compuestos de interés, permiten

controlar aquellos olores que resultan desagradables y facilitan el paso de ingredientes líquidos a sólidos. Podemos verlas aplicadas en productos como suavizantes para la ropa, tejidos, desodorantes, pasta de dientes, cremas sólidas y líquidas para la piel, protección de aromas y sabores en barras de labios (Trinh y col., 1999).

Las CDs pueden prolongar la duración de fragancias mediante la interacción con los compuestos volátiles de las mismas (Prasad y col., 1999). Las CDs se utilizan en la elaboración de productos de aseo personal mejorando la liberación de aromas al complejar estos compuestos y con fosfato de calcio (Tatsuya, 1999). En 1999 Holland y col., fabricaron productos cosméticos que contenían CDs con el fin de alargar la duración de la fragancia en el medio, pudiendo también emplearse las CDs para reducir los olores corporales (Trinh y col., 1999).

Las CDs también se utilizan como estabilizadores de fragancias en la producción de polvos de talco. Esto reduce su oxidación y evaporación del producto mejorando su acción antimicrobiana. (Hedges, 1998).

En el caso de los pañales para bebés, se utiliza el polvo seco de CDs, para controlar olores, así como en compresas, productos para el cuidado capilar y toallitas de papel para ejercer un efecto protector de mercaheptanos volátiles (Woo y col., 1999).

Otro uso de las CDs es la encapsulación de malos olores de los detergentes de ropa y de lavavajillas (Foley y col., 2000; Angell y France, 2001). Además, se están utilizando para mejorar la disponibilidad del triclosan mejorando su acción antimicrobiana en las pastas de dientes con sílice. (Loftsson y col., 1999). También se utilizan para elaborar cremas solares, bronceadores y cremas para estabilizar las emulsiones (Scalia y col., 1999).

1.8.3. Industria farmacéutica

Algo fundamental en los fármacos es el equilibrio entre su solubilidad y penetración en las membranas celulares y que tiene que ser lo suficientemente hidrofóbico para poder entrar.

Las CDs aumenta la solubilidad de muchos fármacos lo cual puede ayudar a transportar dichos fármacos a las superficies celulares mejorando la absorción de los mismos mientras que las CDs como tienen un tamaño relativamente

grande no atraviesan dichas membranas. (Frömming y Szejtli, 1994, Rajewski y Stella, 1996; Challa R y col., 2005). Actuando como vehículos moleculares y potenciando la penetración del fármaco ya que aumenta su disponibilidad en la superficie de la membrana. Su uso en formulaciones acuosas cutáneas ha sido probado con éxito (Irie y col., 1997; Uekama y col., 1992), así como en soluciones acuosas de enjuague bucal (Kristmundsdóttir y col 1996), sistemas de administración nasal (Kublik y col., 1996) y soluciones oculares (Lofsson y Stefánsson, 1997; van Dorne, 1993; Jarho y col., 1996).

Los métodos tradicionales que se utilizan para aumentar la solubilidad del fármaco en muchas ocasiones son muy agresivos a nivel celular por lo que la utilización de las CDs aporta ventajas en este sentido, ya que además pueden estabilizar compuestos activos reducir su volatilidad y enmascarar sus malos sabores y olores (Szejtli, 1998; Hedges, 1998; Irie y Uekama, 1999; Zhao y col., 1995; Loftsson T., Brewster, 2010).

Por lo tanto, las CDs estabilizan los fármacos aumentando su resistencia frente a la oxidación, luz, calor, hidrólisis y metales. Tal y como se describe en diferentes estudios que solamente entre el 2-4% de las CDs son absorbidas por el intestino delgado y lo que queda, es degradado por los microorganismos del colon, obteniéndose glucosas como subproducto de la degradación; demostrando así, su baja toxicidad cuando se administran (Szejtli, 1998).

Otra de las aplicaciones de las CDs en el campo farmacéutico es el aumento de la permeabilidad transdérmica de los fármacos, mientras que las CDs debidos a su tamaño y estructura no son absorbidas (Loftsson y col., 2001; Masson, 2001; Irie y col., 1997)).

1.8.3.1 Ciclodextrinas y Nanotecnología

Actualmente se están utilizando las CDs en la elaboración de nanomateriales novedales con mucho éxito. (Davis F. y col., 2008; Higson S.; 2011; Tejashre y col., 2013; Chilajuvar y col., 2014). Se ha sintetizado un amplio espectro de materiales que contienen CDs con arquitecturas supramoleculares versátiles: nanopartículas, nanosponjas, nanomicelos, nanovesículas, etc. Estos materiales han encontrado sus aplicaciones en formulaciones farmacéuticas (Goyal, y col., 2011, Bilensoy y col., 2009)

Las nanoesponjas basadas en CDs constituyen un enfoque contemporáneo que resalta los avances que se podrían lograr en un sistema de administración de fármacos. Chilajwar y col., 2014, que alrededor del 40% de los fármacos actualmente comercializados y aproximadamente el 90% de los fármacos en su fase de desarrollo encuentran problemas relacionados con la solubilidad (Chilajuvar y col. 2014). Las nanoesponjas basadas en CDs surgen como una alternativa sobre las CDs convencionales superando las desventajas asociadas con estas últimas, (Loftsson T., Brewster, 2010).

1.8.3.2. Aplicaciones Biomédicas

En medicina el ejemplo más conocido del uso de las CDs en el campo de la es el que contiene el compuesto activo sugammadex (Bridion): Se trata de una γ -CD modificada utilizada como antídoto para ciertos relajantes musculares de tipo curare que se ha utilizado en anestesia desde 2008. Después de la administración intravenosa, neutraliza los esteroides rocuronio y vecuronio mediante la formación de un complejo inactivo en plasma, que luego se elimina en la orina.

También se están utilizando en la elaboración de una vacuna llamada Daptacel (Grupo Sanofi, Pasteur) que es utilizada para la protección contra la difteria, el tétanos y la tos ferina en la cual se utilizan dimetil- β -CD. Otra aplicación de las mismas en inyectables que se están llevando a cabo en la industria biomédica es en la elaboración de analgésicos, las cuales mejoran sus propiedades fisicoquímicas (Brandariz y col., 2013). Actualmente, las CDs son percibidas como moléculas con potenciales aplicaciones en biomedicina y nanomedicina (nanovectorización, etc.), como nanopartículas para la administración de fármacos, biosensores innovadores para diagnóstico molecular e imágenes médicas, terapia génica o ingeniería de tejidos. Dispositivos médicos como catéteres, prótesis, injertos vasculares, implantes óseos también pueden beneficiarse de la inserción en superficie o la termofijación de las CDs. (Zhang, Ma, 2013).

Esto explica el importante incremento de publicaciones relacionadas con estos temas. Sin embargo, la mayoría de estos estudios están en fase de prueba de concepto, y sólo algunos nanosistemas terapéuticos han sido investigados exhaustivamente. La transferencia de estas innovaciones desde el laboratorio a la

realidad clínica sigue siendo un desafío. El coste es un factor importante que limita la transferencia de nuevos materiales que contienen CDs. A pesar de algunos inconvenientes, Zhang y Ma ya apuntaron en 2013 que el futuro de los sistemas supramoleculares basados en CDs en la administración de fármacos y genes es muy prometedor (Zhang, Ma, 2013).

1.8.4. Agricultura e industria química

En la industria química se han elaborado complejos formados por CD y diferentes tipos de insecticidas, herbicidas, fungicidas, reguladores del crecimiento, repelentes y feromonas (Lucas-Abellán y col., 2008b).

Las CDs se emplean principalmente, en la separación de isómeros y enantiómeros, catálisis y procesos de descontaminación (Bardi y col., 2000).

Las CDs, son modificadas para llevar a cabo reacciones de hidrólisis selectiva e hidroximetilación de fenoles. Estos cambios químicos las dota de una gran actividad catalítica (Atwood, 1990).

Pueden emplearse para la solubilización de contaminantes orgánicos y metales pesados, con el fin de ser eliminados posteriormente de suelos, agua y atmósfera (Gao y Wang, 1998). Hay compuestos aromáticos presentes en aguas residuales, que son inaceptables desde el punto de vista ecológico, como fenol, *p*-clorofenol y benceno. Cuando se adicionan β -CDs puede reducirse significativamente los niveles de estos hidrocarburos aromáticos en comparación con sus niveles iniciales (Bardi y col., 2000).

También, han sido aplicadas para solubilizar fungicidas como fuberidazol, tiabendazol y carbendazima, para aumentar su disponibilidad en el suelo. Debido al aumento de su solubilidad lo que permite que sean utilizadas en biodegradación y biorremediación. Las β -CDs activan la degradación de hidrocarburos, aumentando la biomasa y la utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. El bajo coste de las β -CDs facilita su utilización para todos estos fines (Bardi y col., 2000).

1.9. DESTINO DE LAS CICLODEXTRINAS DESPUÉS DE LA INGESTIÓN

Las CDs resisten frente a la acción de las amilasas porque no poseen ningún extremo reductor para la acción de la amilosa (Kurkov y Loftsson, 2013). Sin

embargo, la selectividad depende de las amilasas y del tipo de CDs. α y β son estables a las α -amilasas salivales y γ -CDs es susceptible a la acción tanto de las α -amilasas salivares como pancreáticas (Munro y col., 2004; Szejtli, 1987). Además la biodisponibilidad oral de las CDs es muy baja tanto en animales como en humanos (0,1-3%), excepto para RM- β -CD (random metil- β -ciclodextrina), que tiene una biodisponibilidad del 12% en ratas. Esta baja biodisponibilidad se debe a que son moléculas muy voluminosas e hidrofílicas por lo que sólo son absorbidas a nivel de tracto gastrointestinal en cantidades muy bajas de CDs (Stella, He, 2008; Loftsson, Brewster, 2010).

Por lo tanto, las α y β CDs son fermentadas principalmente por la microflora del colon, pero las γ -CDs su degradación empieza en la boca (Harangi y col., 2012) y continúa en el tracto gastrointestinal por las α -amilasas pancreáticas, así como por las bacterias intestinales (Antlsperger y Schmid, 1996, De Bie y col., 1998, Irie y Uekama, 1997, Stella y He, 2008, Van Ommen y otros, 2004). LA digestión de las CDs depende del tamaño de la cavidad hirofóbica, siendo mayor cuanto mayor es su cavidad, y va a disminuir su digestión cuando están complejando alguna molécula (Buedenbender y Schulz, 2009). La **Figura I.11** muestra como es la digestión de cada una de las CDs nativas después de haber sido ingeridas (Kurkov y Loftsson, 2013). Las CDs mejoran la microflora gastrointestinal que apoyan el crecimiento y la actividad de bifidobacterias y lactobacilos y la disminución de patógenos como *Clostridium perfringens* (Pranckute y col., 2014).

	α - CD	β - CD	γ - CD	
Boca	↓	↓	↓	α -amilasa
Estómago	↓	↓	↓	α -amilasa / Digestión bacteriana
Intestino delgado	↓	↓	↓ Oligómeros Lineales, Maltosa y Glucosa	
Ciego	↓	↓	↓	Digestión bacteriana
Colon	↓	↓	↓	Digestión bacteriana
	$\text{CO}_2\text{H}_2\text{CH}_4$	$\text{CO}_2\text{H}_2\text{CH}_4$	$\text{CO}_2\text{H}_2\text{CH}_4$	Gas y heces blandas
CDs no metabolizadas en heces.	0,3%	>4%	0%	

Figura I.11.: Esquema comparativo de la digestión de las CDs nativas (KurKov and Loftsson, 2013).

1.10. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS Y REGULACIÓN DEL USO DE LAS CDS

La regulación del uso de CDs difiere entre los distintos países, siendo Japón su principal productor y consumidor (Mosinger y col., 2001) (**Tabla I.2**).

El uso de α y β CDs en alimentos se autorizó por primera vez en Japón, y después en Hungría y Alemania en 1976, 1983 y 2000, respectivamente. En Francia, Holanda y Bélgica, el uso de CDs en alimentos fue aprobado en 1986 y se utiliza principalmente para encapsular sabores. Las autoridades españolas aprobaron el uso de las CDs en alimentos en 1987. El Comité Mixto de Expertos en Alimentos (JECFA) de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO / OMS) aceptó el uso de α , β y γ CDs en 1995,

2000 y 2002, respectivamente. Debido a su perfil toxicológico favorable, no se definió una ingesta diaria aceptable (ADI) para las CDs α y γ . Sin embargo, la ADI de las β - CDs se calculó en 5 mg Kg⁻¹ de peso corporal en productos alimenticios (esto se asignó sobre el nivel sin efecto (NOEL) de 470 mg Kg⁻¹ de peso corporal por día en la dieta para perros durante un total de un año y un factor de seguridad de 100). Cuando se produce un exceso en la toma de β -CDs unos de los efectos secundarios que podría resultar, sería un aumento en la producción de gases y heces más blandas. Los números E asignados para α , β y γ -CDs son E457 E458 y E459, respectivamente (JECFA 2013, Directiva 2003/95 / EC 2003). Además, se incorporaron a la lista GRAS de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) como aditivos alimentarios en 2000, 2001 y 2004, respectivamente. En Australia y Nueva Zelanda las CDs α y γ se consideran como nuevos alimentos. En Europa, las α -, β - y γ -CDs deben aparecer en la lista de ingredientes alimentarios en los alimentos que lo tienen ya que se consideran ingredientes alimentarios (Diario oficial de la Unión Europea 5.6.2008).

Tabla I.2 Aprobación de las CDs

CDs	Europa		USA	Australia, Nueva Zelanda	Japón
α - CDs	NOVEL (2004)	alimentos	GRAS (2004)	NOVEL alimentos (2004)	Producto natural
β - CDs	Como alimentario (< 1 g Kg ⁻¹)	aditivo	GRAS* (2001)	—	Producto natural
γ - CDs	NOVEL (2001)	alimentos	GRAS (2000)	NOVEL alimentos (2003)	Producto natural

*GRAS como un protector del sabor

2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son moléculas presentes en alimentos de origen vegetal que desempeñan diferentes funciones: actúan como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción celular y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados por las células vegetales como mecanismos de defensa. Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de plantas, con diferentes estructuras químicas y actividades, que engloban más de 8.000 compuestos distintos, desde moléculas simples como los ácidos fenólicos, hasta otras más polimerizadas como los taninos, que tienen en común su metabolización a través de la ruta del ácido shikímico y de los fenilpropanoides (Robards y col., 1999; Tsao, 2010). Estos compuestos, que suelen estar en mayor concentración en las partes externas de la planta (piel y cáscara, por ejemplo) son, en gran parte, responsables de las características organolépticas de los alimentos que los contienen (D'Archivio y cols., 2010). A través de esta ruta se obtiene ácido benzoico y cinámico, además de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina). Una de las principales propiedades asociadas a los compuestos fenólicos es su capacidad para neutralizar radicales libres y su poder antioxidante llega a superar al de vitaminas y carotenoides (Dai y Mumper, 2010). El interés científico y empresarial, de estos compuestos radica en sus propiedades antioxidantes que previene todas aquellas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Scalbert y Williamson, 2000).

Hace años, los polifenoles no se consideraban nutrientes, porque se creía que provocaban la precipitación de macromoléculas por lo que se creía que reducía la digestibilidad de ciertos alimentos. Hacia los años 90, el interés comenzó a incrementarse gracias a las propiedades beneficiosas para la salud, que se les atribuían, entre las que destacaban: efectos positivos en enfermedades cardiovasculares (Renaud y de Lorgeril, 1992) o neurodegenerativas (Sun y col., 2002), prevención y tratamiento de distintos tipos de cáncer (Lambert y col., 2005) y, en general, en enfermedades donde el estrés oxidativo pudiera estar involucrado. Principalmente, los efectos positivos, se asociaban a las propiedades

antioxidantes (Frankel y col., 1995), antiinflamatorias (Haqqi y col., 1999) y anticancerígenas (Yang y col., 2001) de los compuestos fenólicos.

Estructuralmente hablando los polifenoles contienen un elemento común, el anillo benceno hidroxilado, el cual puede tener dieferentes grupos funcionales creando los diferentes tipos de compuestos fenólicos (glicósidos, ésteres, metil ésteres, etc) (Martínez-Valverde y col., 2000; Duthie y Crozier, 2000). Las familias de polifenoles se pueden clasificar según el número de átomos de carbono que están presentes en su esqueleto básico molecular (**Tabla I.3.**).

Tabla I.3.: Clasificación de los polifenoles.

Nº de átomos de Carbono	Esqueleto	Tipo
6	C6	Fenoles Simples Benzoquinonas
7	C6 -C1	Ácidos Fenólicos
8	C6 -C2	Derivados de Tirosina Ácidos Fenilacéticos
9	C6 -C3	Ácidos Cinámicos Fenilpropenos Cumarinas
10	C6-C4	Naftoquinonas
13	C6 -C1-C6	Xantonas
14	C6-C2-C6	Estilbenos Antraquinonas
15	C6-C3-C6	Flavonoides Isoflavonoides
18	(C6-C3) ₂	Lignanós Neolignanós

30	(C6-C3-C6) ₂	Bioflavonoides
n ⁹	(C6-C3) _n	Ligninas
n ⁶	(C6) _n	Melaninas Catecólicas
n ¹⁵	(C6-C3-C6) _n	Taninos Condensados

La cantidad de los compuestos fenólicos pueden variar en una misma especie vegetal y entre variedades ya que dependen de factores genéticos, ambientales, al crecimiento y calidad de cultivo (Bravo, 1998; Scalbert y Williamson, 2000). Los polifenoles presentes en los alimentos, suelen aparecer glicosilados a azúcares como galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, ácido galacturónico, entre otros. También se pueden unir a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos (Duthie y col., 2003).

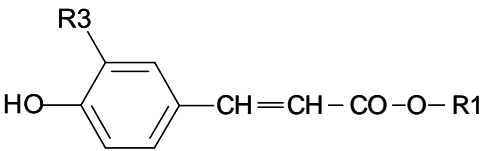
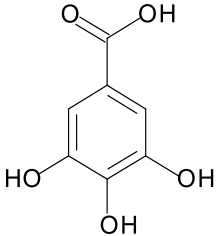
Los polifenoles, son compuestos antioxidantes debido a que ceden fácilmente átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo aromáticos a los radicales libres con los que se encuentre, y esta característica les confiere una gran actividad antioxidante, así como su capacidad para deslocalizar cargas (efecto resonante) en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie y col., 2003). Debido a esta propiedad, los compuestos fenólicos, han despertado un gran interés nutricional, ya que en varios estudios epidemiológicos han demostrado que llevar una dieta rica en polifenoles tiene efectos beneficiosos para la salud protegiendo frente a diversas patologías (Arts y Hollman, 2005; Scalbert y cols., 2005a; Vauzour y cols., 2010), tal como enfermedad cardiovascular (Hertog y cols., 1993; Quiñones y cols., 2013; Tresserra-Rimbau y cols., 2013), cáncer (Tabrez y cols., 2013; Wang y cols., 2013), diabetes (Nicolle y cols., 2011; Liu y cols., 2014; Habtemariam y Varghese, 2014) o enfermedades neurodegenerativas (Wang y cols., 2014), todas ellas relacionadas con procesos inflamatorios producidos por la oxidación de ciertas moléculas.

Estos compuestos influyen en la calidad de algunos alimentos que lo contienen debido a que son los responsables de su olor y sabor (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Por ejemplo los antocianos son considerados pigmentos porque confieren el color azul liláceo característico de algunos vegetales, o los flavonoles, que le confieren un color amarillo crema a las frutas y hortalizas que los contienen.

En cuanto al sabor, la flavanona naringenina aporta un sabor amargo a los cítricos mientras que los taninos hidrolizables dan astringencia a los frutos. Estos taninos derivados del ácido elágico (elagitaninos) que pueden ser fermentados por la microbiota del colon, generando metabolitos como las urolitinas A y B, biodisponibles y con importantes propiedades anticancerígenas (Giménez-Bastida y cols., 2012).

Atendiendo a su estructura, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en dos grandes grupos: flavonoides (flavononas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavan-3-oles, proantocianidinas y antocianos) y no flavonoides (ácidos hidroxicinámicos, taninos hidrolizables, ácidos hidroxibenzoicos y estilbenos) (Waterhouse, 2002) (**Tabla I.4.a. y b.**).

Tabla I.4.a.: Clasificación de polifenoles no flavonoides.

Tipos	Estructura química	Subtipos
<p>Ácidos Hidroxicinámicos</p>		<p>Ácido Cafeoil Tartárico Ácido Feruloil Tartárico</p>
<p>Taninos Hidrolizables</p>		<p>Galotanino Elagitaninos Epigalotanino</p>

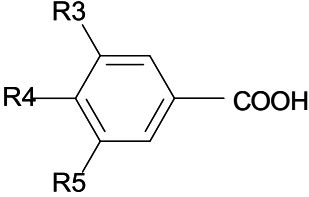
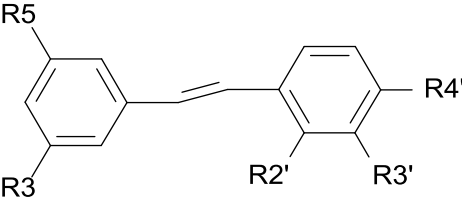
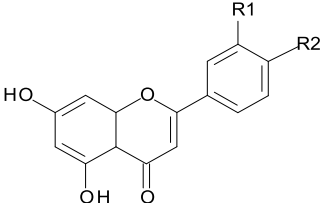
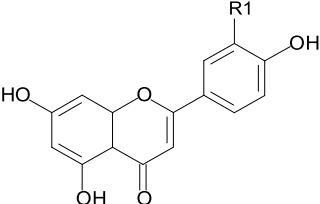
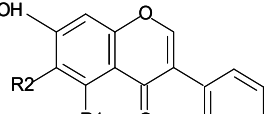
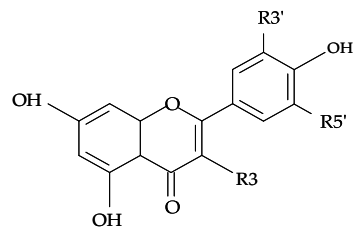
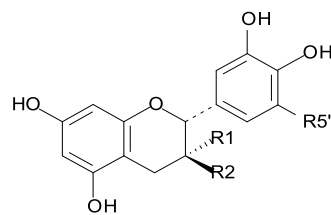
Ácidos Hidroxibenzoicos		Ácido Gálico Ácido Vanílico Ácido siringico
Estilbenos		Resveratrol Piceido Piceatanol δ -viniferina α -viniferina ϵ -viniferina

Tabla I.4.b.: Clasificación de polifenoles flavonoides.

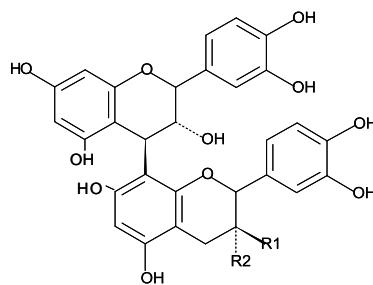
Tipos	Estructura química	Subtipos
Flavanonas		Naringenina Hesperetina Pinocembrina
Flavonas		Apigenina Luteolina
Isoflavonas		Daidzeína Genisteína

Flavonoles

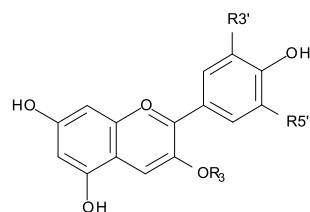
Kaempferol
Quercetina
Miricetina

Flavanoles*Flavan-3-oles*

Catequina
Epicatequina
Galocatequina

Proantocianidinas

Catequina-
Epicatequina
Epicatequina-
Catequina

Antocianos

Cianidina
Delfinidina
Malvidina

2.1 FLAVONOIDES

2.1.1 Propiedades químicas y ruta de biosíntesis de los flavonoides

Los flavonoides son los polifenoles que más abundan en el reino vegetal, son metabolitos secundarios de las plantas responsables del crecimiento y provocan interacciones con otros organismos vivos. Actúan como agentes protectores frente a la luz ultravioleta o del ataque de insectos y patógenos (Yajum, 2005). Son los compuestos que dan color amarillos, rojos y naranjas a algunos pétalos de flores provocando la atracción de agentes polinizadores (Yajum, 2005) y pueden actuar como antibióticos y antioxidantes (Pietta, 2000).

Constan de 2 anillos benceno (A y B), unidos por un anillo pireno que contiene oxígeno (C) (**Figura. I.12.**). Los flavonoides que contienen un grupo hidroxilo en la posición C-3 del anillo C se clasifican como 3-hidroxi flavonoides (flavonoles, antocianidinas, leucoantocianidinas y catequinas) y los que carecen de él se clasifican como 3-desoxiflavonoides (flavanonas y flavonas) (**Tabla 4a y 4b**). La clasificación dentro de las dos familias se basa en si poseen y cómo se han introducido grupos hidroxilo o metilo adicionales en diferentes posiciones de la molécula.

Los flavonoides están presentes en plantas principalmente como glucósidos, siendo menos abundante su estado aglicona (las formas que carecen de restos de azúcar). Al menos 8 monosacáridos diferentes o combinaciones de estos (di- o trisacáridos) pueden unirse a los diferentes grupos hidroxilo del flavonoide aglicona (Williams y col., 1994) dando lugar a un gran número de moléculas diferentes. Los restos de azúcar más comunes incluyen D-glucosa y L-ramnosa. Los glucósidos son normalmente O-glucósidos, con el resto de azúcar unido al grupo hidroxilo en la posición C-3 o C-7.

La ruta biosintética de los flavonoides deriva de un metabolismo primario en el que intervienen diferentes enzimas (Dixon y Steele, 1999; Harborne y Williams, 2000; Winkel-Shirley, 2001; Springob y col., 2003).

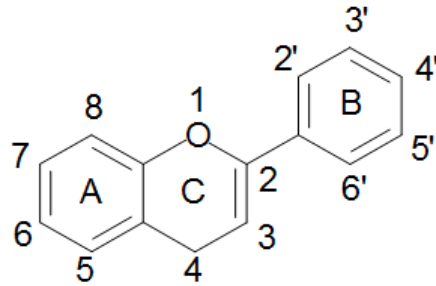


Figura I.12. Estructuras químicas del núcleo del flavonoide.

Los flavonoides provienen de una molécula inicial llamada *p*-cumaril-CoA a la cual se unen tres moléculas de moléculas de malonil-CoA, en una relación molar 1:3 (**Figura I.13**). El *p*-cumaril-CoA se obtiene de la ruta del siquimato-fenilpropanoide, y el malonil-CoA implica a la ruta del acetato-malonato. La vía del siquimato es utilizada en la síntesis de compuestos aromáticos a partir de glúcidos, proporcionando elementos básicos para la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), además de otros muchos compuestos aromáticos de gran importancia para los organismos productores. Esta ruta, inducible por estrés, se lleva a cabo en plantas y microorganismos. La introducción en la vía de los fenilpropanoides se lleva a cabo por la acción de la enzima fenilalanina amino liasa (PAL). Esta enzima, mediante una desaminación oxidativa, actúa sobre la L-fenilalanina (L-Phe) produciendo ácido cinámico. Después, mediante la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), el ácido cinámico pasa ácido *p*-cumárico, el cual es activado en forma de *p*-cumaroil-CoA por la 4-cumaroil-CoA-ligasa (4CL) (Julsing y col., 2006). Al mismo tiempo, la vía del acetato-malonato comienza con la formación de malonil-CoA, a partir de acetil-CoA, por la acetil-CoA-carboxilasa (ACC) (**Figura I.13**).

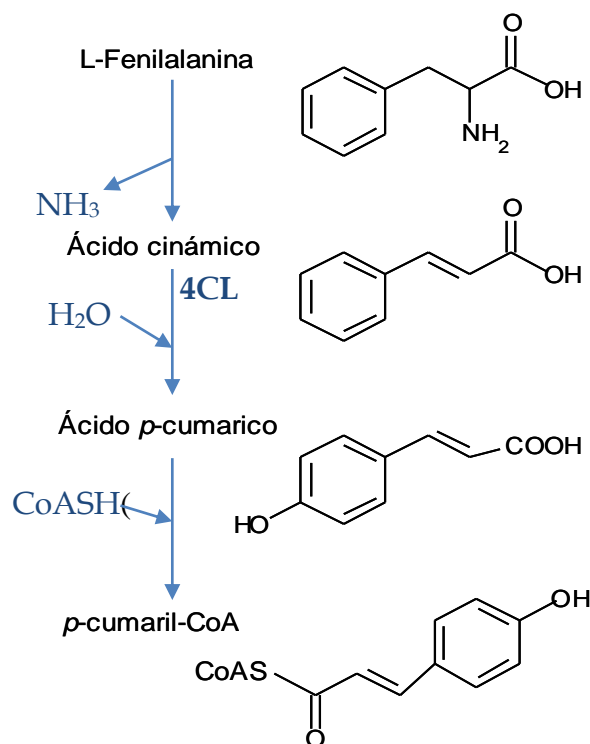


Figura I.13.: Ruta común fenilpropanoide, de fenilalanina a *p*-cumaril-CoA.

Posteriormente actúan dos enzimas claves sobre el *p*-cumaril-CoA que son chalcona-sintasa (CHS) o estilbeno-sintasa (STS) produciendo la ciclación de la tetracetona lineal (**Figura I.14**).

Si la enzima que actúa es la STS, el producto que se obtiene es el *trans*-resveratrol, liberando cuatro moles de CO_2 y forma resveratrol. En el caso de que actúe CHS, se liberan 3 moléculas de CO_2 y forma naringenina-chalcona o pinocembrina-chalcona (de tirosina o fenilalanina respectivamente) (**Figura I.14**).

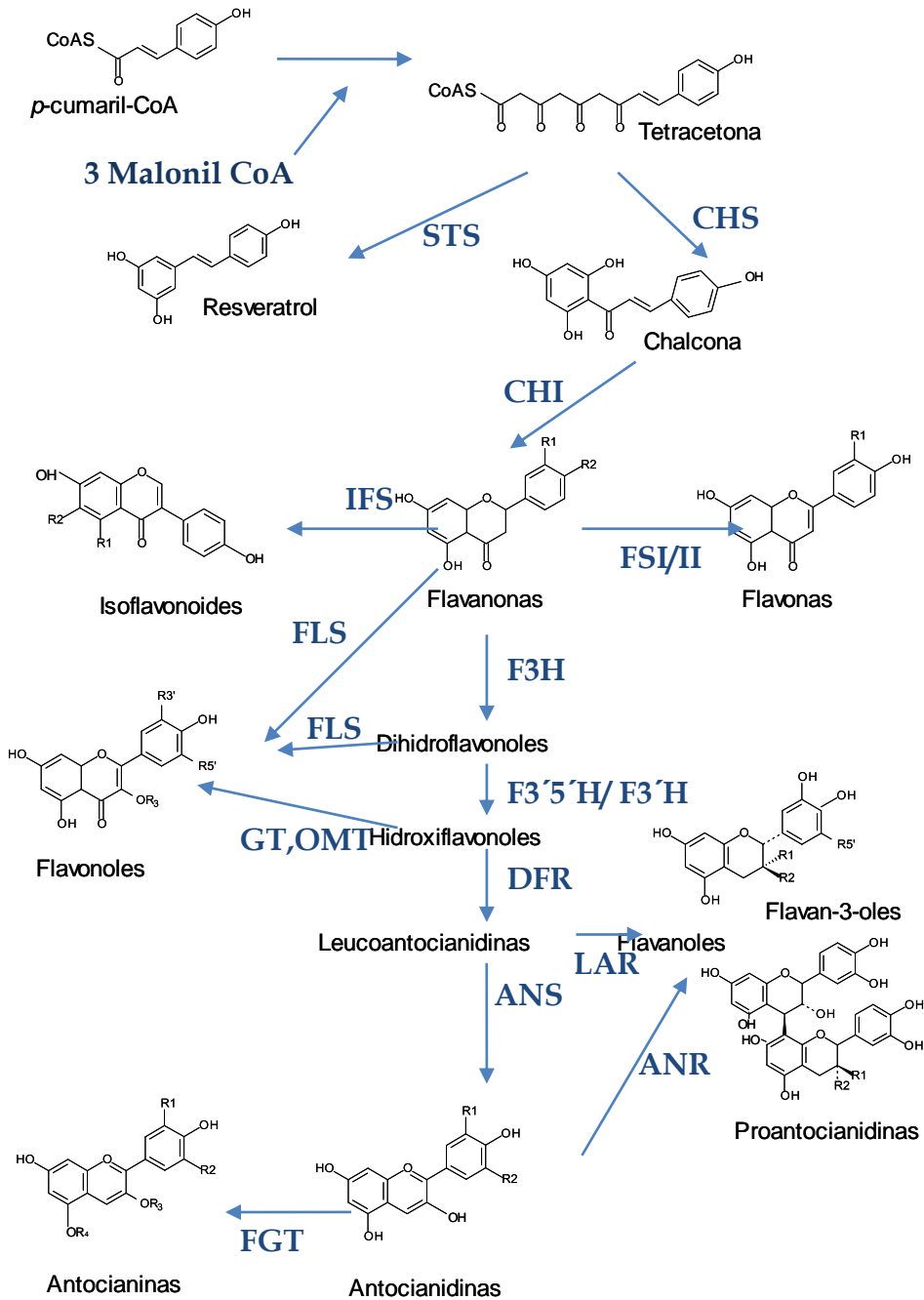


Figura I.14.: Ruta biosintética de flavonoides.

Después de esta reacción, la enzima chalcona isomerasa (CHI) cicla a la naringenina o pinocembrina chalcona a través de una isomerización estereoespecífica para formar las flavanonas naringenina o pinocembrina. Después, las flavanonas son modificadas por enzimas de la ruta de flavonoides para generar una amplia variedad de derivados (Dixon y Steele, 1999; Turnbull y col., 2004).

Se ha observado que con la luz ultravioleta incrementa la biosíntesis de estos compuestos (Antognoni y col., 2007) y que el ataque de microorganismos a las plantas también aumenta la fabricación de compuestos fenólicos (Robards y Antolovich, 1997). Por lo que se cree que los compuestos fenólicos actúan como mecanismos de defensa para las plantas frente a agresiones externas (Clausen y col., 1992).

2.1.2 Presencia en los alimentos e ingesta diaria

Los flavonoides están presentes en distintas cantidades en la mayoría de frutas y hortalizas comestibles. Los principales flavonoides de la dieta y sus fuentes se muestran en la **Figura I.15**. Las estimaciones de consumo de flavonoides a nivel de población sólo están disponibles para algunas subclases de flavonoides, tales como flavonoles, flavanonas e isoflavonas.

En el estudio PREDIMED (prevención con dieta mediterránea), se establece que la ingesta diaria de polifenoles totales en la población adulta española es de $0,8 \pm 0,3$ g, siendo su fuente principal la frutas verdura, infusiones, café y vino tinto (Tresserra-Rimbau y cols., 2013). En este mismo estudio se observó que los tipos de polifenoles consumidos mayoritariamente con flavonoides (54%) y ácidos fenólicos (37%), mientras que el 9% restante está compuesto por una mezcla de fenoles entre los que destacan los estilbenos del vino. Además, definieron que la principal fuente de polifenoles procede de la fruta (naranjas, cerezas y manzanas), aportando principalmente flavonoides (flavanonas, flavonas, antocianos y catequinas). Las bebidas no alcohólicas aportan gran cantidad de ácidos fenólicos en la dieta española, particularmente el café como fuente de ácidos hidroxicinámicos, mientras que la bebida alcohólica rica en polifenoles por excelencia es el vino, como fuente principal de proantocianidinas (flavonoides). La principal fuente de compuestos fenólicos en la dieta es el café, siendo un 18%

de la ingesta total de polifenoles, seguido de las frutas: naranjas (16%) y manzanas (12%). Además, destacan los productos derivados del olivo, aceituna y aceite de oliva, que contribuyen en un 11%, seguido del vino tinto con un 6% (Tresserra-Rimbau y cols., 2013).

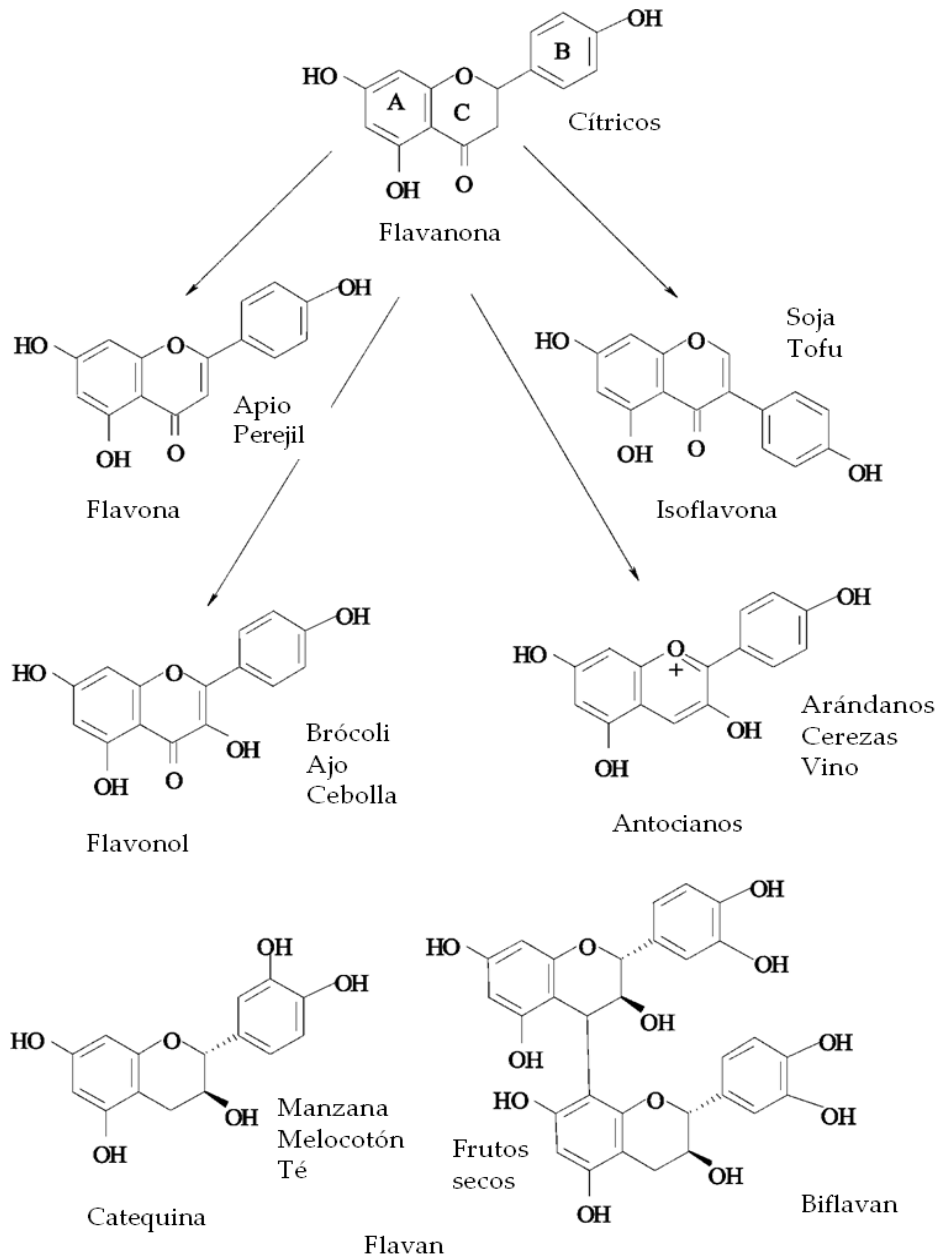


Figura I.15. Estructura y presencia en la dieta de las principales clases de flavonoide.

En otros países como Finlandia, la población ingiere de manera diaria $0,8 \pm 0,4$ g de fenoles totales por persona y día (Ovaskainen y cols., 2008), siendo el grupo de polifenoles mayoritario los ácidos fenólicos (75%) proporcionados a través del café y los cereales, seguidos de proantocianidinas, que contribuyeron con 14% debido a la ingesta de frutos rojos y derivados. En Polonia los valores de ingesta de compuestos fenólicos en adultos de 1,2 g por persona y día para hombres, y 1 g para mujeres gracias al consumo de té, café, patatas, manzanas y pan blanco (Zujko y cols., 2012).

2.1.3. Metabolismo

Los flavonoides se metabolizan principalmente en el lumen gastrointestinal, concretamente en las células de la pared intestinal y el hígado. El metabolismo de los flavonoides es de gran interés porque, sus productos pueden ser los que realizan la actividad biológica. Una característica común de los flavonoides es que se convierten en glucurónido y sulfato conjugados en el torrente circulatorio.

Alrededor del 90-95% de los polifenoles ingeridos no son absorbidos en el intestino delgado y, por lo tanto, alcanzan el colon (Calani y cols., 2012), mientras que los flavonoides, en particular, el 70% alcanzan el intestino grueso (Roowi y cols., 2010, Stalmach y cols., 2010b). Al colon también llegan compuestos excretados a través de la bilis tras su absorción intestinal (circulación enterohepática) o derivados desde el enterocito a través de transportadores MRP2 (mecanismo de reflujo). La microbiota del colón metaboliza los fenoles mediante reacciones de hidrólisis (compuestos glicosilados, glucuronizados, sulfatados y acilados), así como reacciones de reducción, descarboxilación, desmetilación, deshidroxilación y rotura de anillos heterocíclicos para generar compuestos de menor peso molecular (Calani y cols., 2012).

2.1.4. Biodisponibilidad

La biodisponibilidad y el metabolismo de flavonoides, fueron muy estudiados en los años 1960 y 1970 (Griffiths LA, Barrow A., 1972). En la mayoría de estos estudios se administraron dosis altas de flavonoides a animales de laboratorio y se estudió la biodisponibilidad de los productos de degradación producidos por la microflora gastrointestinal. Hoy en día, existen métodos

sensibles que permiten el análisis en suero y orina de muchos flavonoides. Estos métodos permiten estimar la disponibilidad de los flavonoides en los seres humanos a niveles adecuados de ingesta dietética. Es evidente que la biodisponibilidad de los flavonoides varía mucho entre los diferentes subgrupos y compuestos, teniendo en cuenta las diferencias en sus estructuras químicas (D'Archivio y cols., 2010). En un principio la absorción fue asociada a la estructura química del compuesto y no a la concentración ingerida (Scalbert y Williamson, 2000), aunque otros factores de índole genético, ambiental o culinario también determinan la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. Además, los polifenoles más abundantes no son siempre los más activos biológicamente, bien porque tienen una baja actividad intrínseca, o bien porque son pobremente absorbidos, altamente metabolizados o rápidamente excretados (Manach y cols., 2004).

La bioactividad final de los compuestos fenólicos en el organismo va a depender de la biotransformación sufrida durante el proceso digestivo (Del Rio y cols., 2010a, 2013; Selma y cols., 2009; Monagas y cols., 2010).

2.1.5 Actividades o Propiedades biológicas

Las principales propiedades beneficiosas para la salud de los flavonoides son: su capacidad antioxidante, inhibición enzimática, quelación de metales y regulación de la expresión genética (Erlejman y col., 2004). Estos compuestos ejercen su actividad antioxidante en diversos sistemas biológicos y, por otro lado, esta capacidad va a depender de su relativa hidrofiliicidad/y de las interacciones que se establezcan con las macromoléculas (Saija y col., 1995). Esto va a depender de la concentración de flavonoides que hayan permitiendo que actúen de una manera o de otra.

En la **Tabla I.5** se puede observar las actividades biológicas que se les atribuyen a los diferentes compuestos fenólicos y donde se encuentran en la naturaleza.

Tabla I.5.: Propiedades beneficiosas de los flavonoides y presencia en alimentos.

Compuesto	Efecto metabólico	Fruta	Referencias
<i>Flavanonas</i> Naringenina Hesperidina Eriocitrina	Protegen la peroxidación Afectan a la permeabilidad de los lípidos Antitumoral Hormonal Antimicrobiano Antidepresivo	Cítricos Miel Tomates Menta	Espín y Tomás-Barberán, 2005 Tomás-Barberán Chen y cols., 2015 Cowan, 1999 Rodríguez-Ramiro y cols. 2011a P. Singh y col., 2014
<i>Flavonas</i> Luteolina Apigenina	Actividad de fitoestrógenos Antimicrobiano	Pimiento Apio Perejil	Harborne y Williams, 2000 Cowan, 1999
<i>Isoflavonas</i> Daidzeína Genisteína	Antioxidante Actividad estrogénica	Soja Plantas leguminosas	Dijsselbloem y col., 2004 Dixon, 2004
<i>Flavonoles</i> Quercetina Miricetina Kaempferol	Antioxidante Disminuyen la agregación plaquetaria Disminuyen la oxidación de las LDL Antimutagénico Antiinflamatorio Antimicrobiano	Manzana Uva Cereza Granada Cebollas Escarola Té Brócoli	Tomás-Barberán, 2003 Nijveltd y col., 2001 Espín y Tomás-Barberán, 2005 Cowan, 1999 Presez-Sánchez y col. 20014
<i>Flavanoles</i> Catequinas Proantocianidinas	Antioxidante Antimutagénico Antiinflamatorio	Uva Manzana Pera	Kris-Etherton y col., 2002 Poyrazoglu y col., 2002

	Antialérgico	Cerezas	Yokozawa y col., 1998
	Anticancerígeno	Granada	Ahmad y col., 2000
	Antimicrobiana	Té	Fujimura y col., 2002
	Disminuye la oxidación de las LDL	Chocolate	Kundu y col., 2003
	Disminuye la agregación plaquetaria		
<i>Antocianos</i>	Antioxidante	Cereza	Mc Dougall y col., 2005
Cianidina	Antitumoral	Uva	Kong y col., 2003
Pelargonidina	Antiinflamatorio	Fresa	

Flavonoles

Los flavonoles se obtienen a partir de las flavonas al sustituir el hidrógeno del carbono 3 del anillo C por un hidroxilo. (Willits y col., 2004). La enzima responsable de sintetizar flavonoles a partir de flavanonas es la flavonol sintetasa (FLS) (Dixon y Steele, 1999) (**Figura I.14**). Muchos de los flavonoles que encontramos en la naturaleza presentan actividad antiinflamatoria (Nijveltd y col., 2001; Harborne y Williams, 2000), antioxidante (Harborne y Williams, 2000) y antimicrobiana (Cowan, 1999).

Las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides se encuadran en la inhibición de la actividad del ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) y la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) productora de óxido nítrico (NO). La inhibición de estas enzimas por los flavonoides reduce la producción de ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y NO, mediadores cruciales en la inflamación (Sies y cols., 2005). Los flavonoides como kaempferol pueden inhibir otros mediadores del proceso inflamatorio tales como la proteína C reactiva (PCR), cuya elevación en suero se considera un indicador de inflamación crónica y su concentración plasmática un biomarcador predictivo de la enfermedad cardiovascular. Así, se ha descrito una reducción de los niveles plasmáticos de PCR en ratones alimentados con dieta rica en colesterol y enriquecida con epicatequina respecto a aquellos animales alimentados con la misma dieta pero sin este flavanol (Morrison y cols., 2014). También, epicatequín-3-galato y quercetina parecen activar el transportador

ABCA1 (ATP-binding cassette-A1), reducir los niveles de proteínas quimiotácticas, como la MCP-1 (proteína quimioatrayente de macrófagos tipo 1), e inhibir la producción de PCR (González y cols., 2011). Lo que explica, en parte, los efectos antiinflamatorios de este flavonoide. (Y.-L. Lin, J.-K. Lin, 1997).

Hay diferentes compuestos fenólicos que pertenecen al subgrupo de los flavonoles destacando entre ellos kaempferol, quercetina, miricetina y rutina, entre otros (**Figura I.16.**) (Willits y col., 2004).

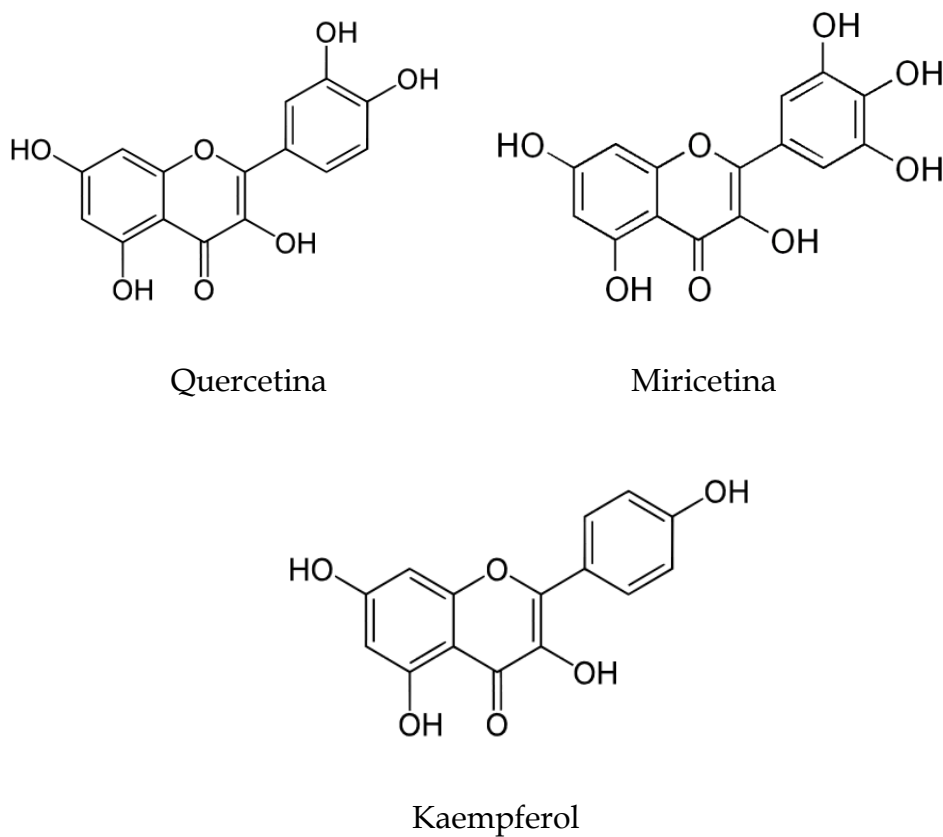


Figura I.16. Quercetin, Miricetina y Kaempferol (flavonoides)

Estos compuestos se pueden obtener también por una ruta alternativa (**Figura I.14.**), que estos también se sintetizan por rutas indirectas (Turnbull y col., 2004) (**Figura I.14.**), en la cual ocurren hidroxilaciones de flavononas en el carbono 3 del

anillo C por la encima flavonona 3- β -hidroxilasa (Dixon y Steele, 1999). A partir de estos compuestos hay encimas que producen metilaciones y glicosilaciones en ellos favoreciendo la diversificación de flavonoles, estas enzimas son: flavonoide glucosil transferasa (GT) y flavonoide O-metiltransferasa (OMTs), (Willits y col., 2004).

Estos flavonoides son de color amarillo siendo los más abundantes en los alimentos como vino tinto, cebolla, te, brócoli y escarola. Suelen estar en forma glicosilada y se encuentran en los tejidos aéreos de las plantas, ya que su síntesis depende del sol (Manach y col., 2004; Macheix y col., 1990). En el alimento en el cual se encuentran en grandes concentraciones es la cebolla que contiene aproximadamente 1200 mg/Kg mientras que en el vino y el té hay unos 45 mg/L. La fruta puede contener entre 5 y 10 flavonoles glicosilados diferentes (Hertog y col., 1995).

El flavonol más común en la dieta es la quercetina (**Figura I.16.**). La importancia de diferentes alimentos como fuentes de quercetina varía de un país a otro (Hertog y col., 1995). El té es la fuente predominante de quercetina en los Países Bajos y Japón, el vino en Italia, mientras que la cebolla y las manzanas son la fuente principal en Estados Unidos, Finlandia, Grecia y la ex Yugoslavia (Häkkinen y col., 1999). Cabe destacar que, aunque la cebolla no se consume en grandes cantidades, es una fuente importante debido a su alto contenido de quercetina. El té y especialmente el vino, por el contrario, contienen cantidades relativamente bajas de quercetina, pero se consumen, al menos en algunos países, en cantidades elevadas (Hertog y col., 1995).

La quercetina está presente en las plantas en muchas formas glucosídicas diferentes (Kühnau, 1976), siendo la quercetina-3-rutinósido, también llamada quercetina-3-rhamnoglucósido o rutina, una de las formas más abundantes. En la cebolla, la quercetina está unida a 1 o 2 moléculas de glucosa (quercetina-4'-glucósido y quercetina-3,4'-glucósido). Ejemplos de otros glucósidos dietéticos de quercetina son galactósidos de la quercetina, que se encuentran en las manzanas, y los arabinosidos de quercetina, que están presentes en bayas. Otros flavonoles de la dieta incluyen kaempferol (brócoli), miricetina (bayas) e isorhamnetina (cebolla).

2.1.5.1. *Propiedades beneficiosas para la salud de Quercetina*

2.1.5.1.1. Propiedades antioxidantes

Quercetina es un flavonoide presente en una gran variedad de fuentes naturales, principalmente en la piel de las manzanas y en cebollas rojas (Vázquez-Flores y col., 2017). Quercetina presenta importantes efectos antioxidantes (Hayek y col., 1997; Chopra y col., 2000), anticarcinógenos (Verma y col. 1988; Deschner EE y col., 1991; Pereira MA y col., 1996), antiinflamatorios (Ferry y col., 1996), antiagregatorios plaquetarios (Pignatelli y col., 2000) y vasodilatadores (Vizcaino F y col., 2002). Su potencial antioxidante, por ejemplo, podría ser el resultado de la quelación de metales (Ferrali y col., 1997), eliminación de radicales libres (Huk y col., 1998; Aherne, O'Brien, 2000), inhibición de enzimas (Nagao y col., 1999), y / o la inducción de la expresión de las enzimas protectoras. En el organismo humano existen varios sistemas de protección contra radicales libres: sistemas endógenos enzimáticos (catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y sistemas no enzimáticos específicos (glutatión), así como fuentes exógenas procedentes de la dieta (como la vitamina C, vitamina E, carotenoides y polifenoles). Cuando estos mecanismos no son suficientes se produce un aumento de la oxidación, que se conoce como estrés oxidativo, que sería parcialmente responsable de las patologías señaladas anteriormente (Halliwell, 2012).

En cuanto al efecto anticarcinogénico de quercetina, cabe señalar que en la década de los 70, se consideró un carcinógeno porque mostró mutagenicidad en la prueba de Ames (Bjeldanes, Chang 1977). Sin embargo, varios estudios a largo plazo en diferentes especies animales han demostrado que esto no es cierto, demostrando que, por el contrario, quercetina inhibe la carcinogénesis en animales de laboratorio (Stavric 1994).

La capacidad antioxidante de los flavonoides es debida a sus propiedades estructurales ya que presentan un grupo catecol (3', 4'-dihidroxi) en el anillo B; un doble enlace insaturado entre C2 y C3 en el anillo C y; un grupo hidroxilo en C3 en el anillo C (Dreosti, 2000).

Quercetina es un flavonoide con una potente actividad antioxidante, la cual es mayor que la que presenta la vitamina C y E además de tener la misma

solubilidad acuosa de la vitamina E. Cuando quercetina y las vitaminas C y E se encuentran juntas actúan sinérgicamente en su capacidad antioxidante ya estas vitaminas protegen de la oxidación a quercetina alargando su propiedad antioxidante durante más tiempo. (Rice-Evans y Packer, 2003).

Por otro lado, quercetina también es capaz de retener metales como cobre y hierro debido a los grupos funcionales que posee (**Figura I.17.**) (Williams y col., 2004).

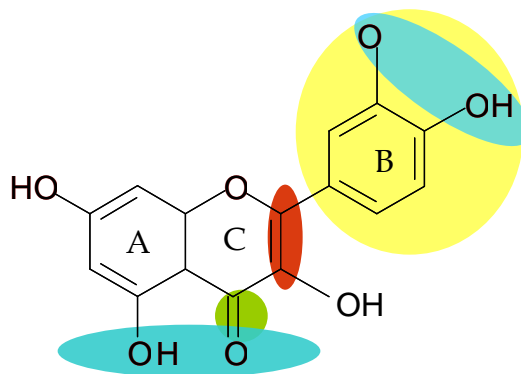


Figura I.17.: Estructura química de la quercetina mostrando los grupos funcionales que le confieren su actividad antioxidante. En amarillo, el grupo catecol del anillo B; en rojo, enlace insaturado del anillo C; en verde, función 4-oxo en el anillo C; en azul, puntos con capacidad de quelación de metales.

2.1.5.1.2. Prevención de la aterosclerosis

Numerosas evidencias epidemiológicas y estudios observacionales en animales y en humanos han asociado el consumo regular de alimentos ricos en polifenoles, principalmente en flavonoides, con un efecto cardioprotector en humanos (Habauzit y Morand, 2012). La aterosclerosis es una enfermedad crónica de la pared arterial y la principal causa de muerte en todo el mundo (Libby y col., 2011). Está generalmente asociada con enfermedades cardiovasculares, tales como enfermedad coronaria, carotídea, arterial periférica, isquemia, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular. Actualmente se ha estudiado que la modificación oxidativa de lipoproteínas de baja densidad (LDL),

la disfunción endotelial y la inflamación están implicadas en la patogénesis de la aterosclerosis (Falk, 2005). Las estatinas se usan como tratamiento clínico para la terapia de la aterosclerosis múltiple debido a su eficacia en la reducción del nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el colesterol plasmático (Ray y Chanton, 2005). Además, las estatinas tienen actividad antiinflamatoria y protección endotelial (Beltowski y col., 2009). Sin embargo, su consumo puede causar varios efectos secundarios como lesión o toxicidad muscular (Maron y col., 2003), miopatía, rabdomiolisis e insuficiencia renal aguda. Actualmente, la atención se centra en el estudio de productos naturales de origen vegetal que posean actividad aterosclerótica. Recientemente, Peterson y cols. (2012) han revisado un total de 12 estudios llevados a cabo en Europa y Estados Unidos, concluyendo que existe una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y la mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV).

Existen estudios que han demostrado que los flavonoides presentan actividades anti-ateroscleróticas y por lo tanto mejoran la salud humana (Grassi y col., 2010). Los flavonoides presentes en las hojas del caqui son principalmente quercetina, kaempferol y sus glucósidos, y esta fruta se ha utilizado en la medicina tradicional china para tratar el síndrome de apoplejía por accidente cerebrovascular, lesión por isquemia/reperfusión (Bei y col., 2004) y enfermedad coronaria. Por otra parte, otros estudios han demostrado que este extracto tiene efectos sobre hemostasia, hipertensión, apoplejía y aterosclerosis (Sakanaka y col., 2005). Sin embargo, la biodisponibilidad de estos flavonoides es muy baja, por lo tanto, su aplicación clínica es muy limitada.

La evidencia experimental demuestra que quercetina posee capacidades antiinflamatorias y antifibróticas, que juntas son beneficiosas para el tratamiento de enfermedades hepáticas (Vázquez-Flores y col., 2017).

2.1.5.2. Propiedades beneficiosas para la salud de Miricetina

Miricetina inhibe eficientemente la oxidación lipídica (Hudson, Mahgoub, 1980; Ramanathan, 1992). Se considera mejor antioxidante que el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT) (Wanasundara, Shahidi, 1994; Wanasundara, Shahidi, 1998). Además, es un inhibidor de la enzima inosina 5'-

monofosfato deshidrogenasa humana implicada en la síntesis de guanosina, por lo tanto, inhibe la síntesis de novo de purinas. (Huilin Pan, y col., 2016).

2.1.5.2.1. Efectos anticancerígenos

El término "cáncer" se refiere a una enfermedad pleiotrópica que es causada por el crecimiento anormal de las células, que potencialmente invaden y/o se diseminan a otros órganos y tejidos (Ruddon,2007). Según los datos de GLOBOCAN, el cáncer afecta a 14,1 millones de personas en todo el mundo cada año (Saranath, Khanna 2014). Estudios fisiopatológicos han demostrado que alrededor del 90-95% de los cánceres son causados por factores epigenéticos como el tabaquismo, la dieta, las infecciones, la radiación y los contaminantes ambientales (Anand y col., 2008; Esteller2008; Taby, Perera 1997; Ames y col., 1995; Boffetta 2006). Existen varios protocolos terapéuticos disponibles actualmente para tratar el cáncer, tales como cirugía, quimioterapia, fototerapia y radioterapia. Sin embargo, las estrategias terapéuticas actuales tienen ciertas limitaciones, tales como resultado deficiente, alto costo, riesgo de recaída, así como aparición de resistencia a fármacos. Por lo tanto, los compuestos dietéticos naturales se están estudiando cada vez más por su importante actividad contra el cáncer y efectos secundarios insignificantes (Curti y col., 2014; Newman, Cragg, 2012; Fulda,2010; Tan y col., 2011; Cragg y col., 2011; Demain, Vaishnav, 2011; Mehta y col., 2010).

Existen pruebas considerables de que los flavonoides poseen potentes efectos anticancerígenos a través de diversas vías moleculares

Miricetina (3,5,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-4-cromenona) es un flavonoide dietético común que se encuentra en una amplia variedad de productos vegetales (Harnly y col., 2006). Hay estudios que demuestran diferentes efectos protectores de miricetina, incluyendo sus actividades antioxidantes citoprotectora, antiviral, antimicrobiana y antiplaquetaria (Ong, H.E. Khoo 1997). Además, miricetina presenta un efecto anticancerígeno contra varios tipos de cánceres actuando sobre diferentes procesos:

- En la proliferación de células cancerosas
- En las vías de señalización del cáncer
- Sobre la muerte de células cancerosas

- Inhibición de la metástasis tumoral y la angiogénesis

En general, los datos recogidos sobre miricetina indican su efecto quimiopreventivo de naturaleza multifuncional. Se dirige a todo tipo de marcas tumorales, incluyendo proliferación celular, mecanismo de señalización, apoptosis, angiogénesis y metástasis tumoral. También es un agente antimitótico potencial en el tratamiento del cáncer de hígado. Se dirige a las mitocondrias para promover el modo apoptótico de muerte celular en varias células cancerosas. En general, los datos de estos estudios señalan la importancia de miricetina como agente quimiopreventivo en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Kasi Pandima Devi, y col., 2015; Haizhi Huang y col., 2015).

Este flavonol es extremadamente hidrófobo y, a pesar de sus amplios beneficios potenciales para la salud, su uso en alimentos funcionales está limitado por su baja solubilidad en agua.

2.1.5.3. *Propiedades beneficiosas para la salud de Kaempferol*

2.1.5.3.2. Propiedades anticancerígenas

Se ha demostrado en numerosos estudios es el efecto anticancerígeno (Dharambir Kashyap y col., 2017; Lv-Ying Tu y col., 2016).

Kaempferol tiene efectos hepatoprotectores. En los países en desarrollo, el 80% de carcinoma hepatocelular (CHC) es debido a la alta exposición a la aflatoxina que desencadena dicha enfermedad. En 2012 se realizó un estudio induciendo cáncer de hígado primario por Aflatoxina B1 (AFB1) en ratas, se le administró a un pequeño grupo de ellas kaempferol (100 mg / kg / pc p.o) disuelto en 1 ml de DMSO, durante un período de 28 días sucesivos. Los efectos sobre la peroxidación lipídica, la disminución de los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y niveles alterados de las enzimas xenobióticas fueron significativamente inferiores ($P < 0,01$), a los normales en los animales enfermos, volviendo a niveles casi normales en aquellas ratas a las que se les administró kaempferol. Estos resultados sin duda demuestran la propiedad moduladora de kaempferol a través de restaurar significativamente todos los análisis bioquímicos alterados, proporcionando una garantía del uso prevalente para el tratamiento del carcinoma hepatocelular (Yu Wang y col., 2015).

Otra de las propiedades que se le atribuyen al kaenferol en numerosos estudios es su potente actividad antioxidante muy relacionada con las propiedades descritas anteriormente (Dharambir Kashyap y col., 2017; Riyaz Dar y col., 2013).

2.1.5.4. Flavanonas hesperetina y naringenina

Las flavanonas son flavonoides presentes casi exclusivamente en cítricos. Las concentraciones más altas se encuentran en los tejidos sólidos de los cítricos, aunque también se encuentran cantidades considerables en los zumos, (Tomas - Barberan, Clifford, 2000). Hesperidin (hesperetin-7-rutinoside) y narirutin (naringenin-7-rutinoside) son los principales flavonoides de naranjas y mandarinas, mientras que los del pomelo son naringina (naringenin-7-neohesperoside) (70%) y narirutin (20%) (Kawaii, 1999). También se encuentran concentraciones bajas de naringenina en tomate, principalmente en la piel donde, también se encuentra naringenina chalcona, que se convierte en naringenina durante el procesamiento de tomate ketchup (Krause, Galensa, 1992). En Finlandia, se ha estimado que la ingesta media de naringenina es de 8,3 mg / día, y en el caso de hesperetina 28,3 mg / día (Kumpulainen y col., 1999). Las estructuras de hesperetina, naringenina y sus glucósidos más importantes se muestran en la Figura I.18.

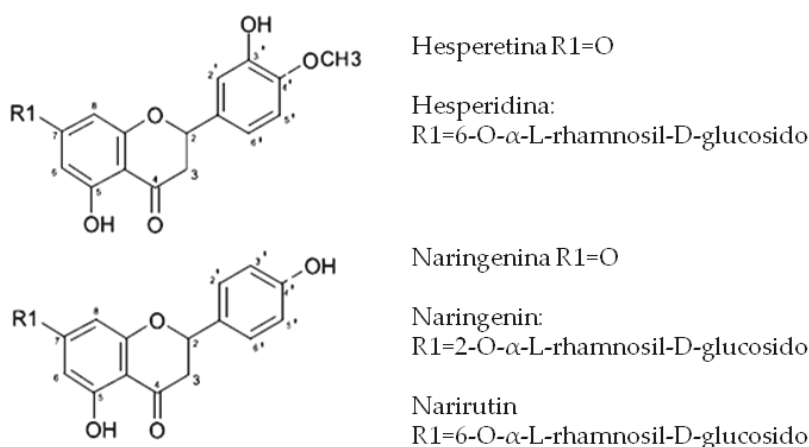


Figura I.18. Estructuras químicas hesperetina (Mw = 302 g / mol) y naringenina (Mw = 272 g / mol) y algunos de sus glucósidos más comunes

2.1.5.4.1. Efecto Anticancerígeno

La principal propiedad de estas dos flavanonas son sus propiedades anticancerígenas. Se ha demostrado que hesperetina inhibe la carcinogénesis mamaria inducida químicamente (So FV y col., 1996), de vejiga urinaria (Yang y col., 1997) y de colon (Miyagi Y y col., 2000), en animales de laboratorio. Hesperetina, también posee actividad antioxidante, aunque más pobre en comparación con otros polifenoles (Jeon y col., 2002).

2.1.5.4.2. *Propiedades reductoras de colesterol*

Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación inversa entre la ingesta de flavonoides en la dieta y la muerte por enfermedad coronaria (Hertog y col., 1992; Hertog y col. 1995). Como tal, existe un interés considerable en investigar la naturaleza hipolipidémica y antiaterogénica de estos compuestos. Entre los flavonoides cítricos naturales, hesperidina, hesperetina, naringina y naringenina ya han sido evaluados como agentes potenciales para mejorar el metabolismo del colesterol in vivo (Monforte y col., 1995; Bok y col., 1999). Algunos efectos de hesperetina y naringenina están relacionados con el metabolismo de lípidos. Se ha comprobado que en ratas regulan la secreción de apolipoproteína B en células HepG2, posiblemente mediante la inhibición de la síntesis de ésteres de colesterol (Chen y col., 2015), para inhibir la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa y la acil coenzima A: colesterol O-aciltransferasa (Lee y col., 1999). Además, se ha observado una disminución en los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en los niveles de colesterol hepático en conejos alimentados con una dieta con alto contenido de colesterol suplementada con hesperetina y naringenina (Kurowska y col., 2000). También se ha visto un aumento de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en humanos hipercolesterolémicos después del consumo de zumo de naranja (Kurowska y col., 2000; Chen y col., 2015).

2.1.5.4.3. Propiedades antidepresivas

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más prevalentes, y se caracteriza por una disminución en la capacidad de un individuo para experimentar placer. La depresión es una enfermedad mental crónica e incapacitante que causa alta morbilidad y mortalidad. (Gaffrey, y col., 2013; Carde

Hatíf 2016; Kaster y col.,2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que unos 350 millones de personas sufren de depresión y predice que para el año 2020 esta será la segunda causa de discapacidad en todo el mundo (World Health Organization 2012). Aunque hay muchos antidepresivos efectivos disponibles, a menudo son inadecuados, con resultados insatisfactorios en alrededor de un tercio de todos los pacientes tratados (Bhattamisra y col., 2008).

Los efectos antidepresivos de los flavonoides, chalconas y flavanonas han sido ampliamente estudiados (Singh y col., 2014, Matos, y col., 2014.).

Actualmente es necesario el descubrimiento de nuevos fármacos antidepresivos con mayor eficacia y menos efectos secundarios. Se ha comprobado que muchos flavonoides extraídos de plantas poseen efecto antidepresivo en estudios realizados en animales (Li-Ping Guan, Bing-Yu Liu, 2016).

2.1.5.4.4. Enfermedades neurodegenerativas

La enfermedad de Alzheimer es el tipo más frecuente de trastorno neurodegenerativo asociado con la demencia en el cerebro de ancianos (Pratico, 2008a), y se caracteriza por una pérdida progresiva y considerable de funciones cognitivas dando como resultado una serie de disfunciones entre las que se incluyen un grave déficit en el sistema colinérgico, que desempeña un importante papel en el aprendizaje y la memoria. Afecta a millones de personas en todo el mundo y se ha convertido en un importante problema médico y social para los países desarrollados y subdesarrollados (Pratico, 2008b). Los enfoques terapéuticos actuales para la enfermedad de alzheimer todavía son discutidos. El estrés oxidativo contribuye a la etiología de algunas afecciones características de los trastornos neurodegenerativos, así como, enfermedad del alzheimer (Butterfield, 2004). El cerebro, en particular, es altamente vulnerable al daño oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno (Shulman y col., 2004).

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen un número de afecciones patológicas que aumentan el progreso de la infiltración, al igual que las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Estudios actuales indican un aumento continuo de estas enfermedades que afectarán al 50% de la población envejecida en el futuro (Noble y Burns, 2010). La enfermedad de Parkinson, en particular, es la más frecuente en el ordenamiento genético neuromuscular (Kakkar y Dahiya,

2015), para la cual todavía no se dispone de terapias eficaces, excepto para mejorar los síntomas.

Se ha demostrado que naringenina y hesperetina presentan un efecto neuroprotector en el modelo inducido por ICV-STZ de la enfermedad de Alzheimer, el modelo 6-OHDA de la enfermedad de Parkinson, amnesia inducida por escopolamina y previenen el daño oxidativo en diversas condiciones fisiopatológicas debido a su capacidad para penetrar en el cerebro (Baluchne jadmojarad y Roghani, 2006, Mercer y col., 2005, Zbarsky y col. 2005, Heo y col., 2004a, b).

2.1.5.4.5. Protección contra microorganismos patógenos.

La alta tasa de resistencia microbiana de los antibióticos convencionales despierta gran interés en el uso de flavonoides como alternativa. Los flavonoides pueden ser considerados como conservantes naturales de alimentos debido a sus actividades antimicrobianas (Rodríguez Vaquero y col., 2010).

Actividad antibacteriana: La actividad antibacteriana y la biodisponibilidad de los flavonoides puede verse afectada por diversos parámetros, tales como la conformación molecular, la hidrofobicidad, la solubilidad, la presencia o ausencia de resto de azúcar y el tipo de azúcar en el esqueleto químico (C. Manach y col., 2004). Se han propuesto como mecanismos antibacterianos de los flavonoides: la interferencia con la síntesis de ADN bacteriano, el movimiento bacteriano, la permeabilidad de la membrana citoplásmica y la inhibición de las metaloenzimas bacterianas, (Cushnie, Mirzoeva y col., 1997). Comprobando la eficacia contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de naringenina y hesperetina.

Los virus son un gran grupo de patógenos humanos que causan enfermedades infecciosas graves. Preocupación de la salud pública sobre la prevalencia de enfermedades infecciosas virales crónicas, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la gripe, y su resistencia a las terapias antivirales convencionales han aumentado la demanda de nuevos medicamentos antivirales (Lou y col., 2014). Tanto hesperetina como naringenina, han demostrado tener efecto antiviral (Mucsi, Garg y col., 2001; Wacker, Eilmes 1978).

Las infecciones por hongos y la resistencia a los antifúngicos actuales han sido temas de investigación en la última década. Es necesario desarrollar nuevas sustancias antifúngicas alternativas. Krolicki y colaboradores han demostrado que hesperetina y naringina poseían actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Trichoderma glaucum* y *A. fumigatus* (Krolicki y col., 1984; Nazrul Islam, Ahsan, 1997). Por otra parte, hesperetina y otros diez flavonoides aislados de especies de cítricos han mostrado de efectos inhibitorios sobre contaminantes fúngicos de alimentos, incluyendo *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium semitectum* y *Penicillium expansum* (Salas y col., 2011).

2.1.5.5. *Propiedades beneficiosas de la flavona apigenina*

Las principales flavonas en la dieta son apigenina y luteolina (**Figura I.19**). Su ingesta dietética es bastante baja porque se producen en concentraciones significativas en pocas plantas comúnmente consumidas. La fuente más importante de estos compuestos son pimienta roja (Hertog y col., 1992a) y apio (Hertog y col., 1992)

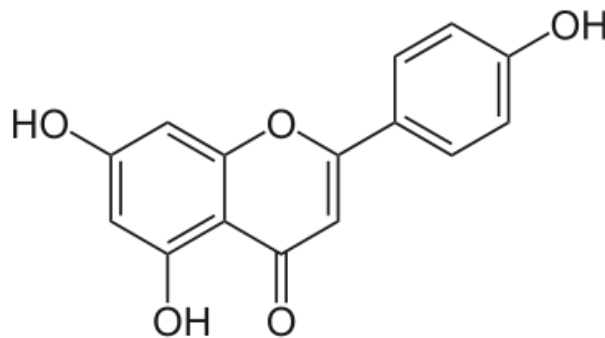


Figura I.19.: Apigenina

Apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) es una flavona natural que se encuentra principalmente en perejil, manzanilla, apio, alcachofas y orégano. Entre ellos, el

perejil seco es la fuente más rica de apigenina, que contiene 45.035 µg/g (Baldasquin-Caceresa y col. 2014).

Numerosos estudios in vivo han demostrado que apigenina puede suprimir el crecimiento tumoral y la metástasis. La administración oral de apigenina (20 y 50 µg) en ratones que presentaban cáncer de próstata, disminuyó el volumen y el peso de los tumores sin ningún efecto secundario indeseable. La ingesta de apigenina también disminuyó la apoptosis y detuvo el ciclo celular del tumor (Shukla y col., 2014; Pandey M y col., 2012; Shukla y col., 2005; Shukla y col., 2015; Shukla y col., 2006; Shukla y col., 2008) Se ha demostrado que apigenina reduce la proliferación celular en el cáncer de mama en ratones. Asimismo, la ingesta de apigenina en la dieta (0,2%) durante seis semanas produjo una actividad antitumoral significativa en ratones con cáncer de páncreas humano (King y col., 2012).

También ha sido estudiada la acción de Apigenina en algunos casos de leucemia, así como su eficacia en el tratamiento con quimioterapia. (Baldasquin-Caceresa y col. 2014).

La actividad farmacológica mejorada de apigenina se ha atribuido a su capacidad para interactuar y posteriormente influir en las propiedades de la membrana (Kacoli Banerjee, y col., 2017).

2.1.6. APLICACIONES DE LOS FLAVONOIDES

2.1.6.1. Preparados farmacéuticos

El té es una bebida que ha sido utilizada por los pueblos asiáticos durante muchos años como remedio medicinal. Los estudios bioquímicos realizados en los últimos años han evidenciado las propiedades saludables de los flavonoides del té avalando su utilización en preparados farmacéuticos. El efecto que se le atribuyó inicialmente fue el de contrarestar la permeabilidad capilar ya que las antocianinas de *vaccinium myrtilloides* (VMA) administrados tanto por vía oral como intraavenosa reduce la permeabilidad y fragilidad capilar. La actividad antiinflamatoria de VMA es la responsable de sus propiedades antiedema y microangiopatía diabética (Mazza, 2000). Los polifenoles del té presentan una amplia gama de usos en el campo de la alimentación, de la medicina y farmacéutico (Jin Liang y col., 2017).

La silibina del cardo (*Silybum marianum*, planta medicinal de Europa central) tiene efectos hepatoprotectores y por lo que se ha utilizado en la preparación de fórmulas farmacéuticas. Igual sucede con la catequina para combatir enfermedades hepáticas, el espino blanco (*Crataegus*) para tratar insuficiencias cardíacas leves y extractos de la Ginkgo biloba para tratar enfermedades cerebrales asociadas a la edad además de otros usos (De Smet, 1993). Hay muchos estudios que demuestran que el consumo de té rojo o negro reduce el colesterol en sangre reduciendo las enfermedades cardiovasculares (Craig, 1999).

Además de la silibina del cardo, kaempferol también presenta efectos hepatoprotectores, por lo que se puede emplear en tratamientos destinados a esta función (Langeswaran Kulanthaivel y col., 2012).

Los flavonoides pueden ser usados como descongestionantes y en lo referente al cuidado personal, como agentes para el tratamiento de piel sensible, fortalecimiento de los capilares sanguíneos y agentes anti envejecimiento. En los tejidos celulares encontramos esterasas (particularmente en la epidermis), las cuales rompen los ésteres y regeneran los flavonoides iniciales, permitiendo así su capacidad antioxidante inicial. Esto los hace especialmente útiles en cosméticos (Plaschke, 2002; Perrier, 2001). Por otra parte, en las últimas dos décadas los productos vegetales no solo se han estudiado por su valor nutricional, sino que también se han desarrollado anti-inflamatorios (Morrison y cols., 2014), anti-alérgicos, protectores del hígado (Langeswaran Kulanthaivel y col., 2012), anti-espasmódicos, diuréticos, antibacterianos (Rodríguez Vaquero y col., 2010) y productos para el colesterol a base de flavonoides (Chen y col., 2015).

2.1.6.2. En el diseño de alimentos funcionales.

En este último periodo de tiempo a avanzado e interés sobre los alimentos funcionales tanto por la industria alimentaria como por los consumidores, ya que los consumidores cada vez se interesan más por los alimentos más saludables y la industria alimentaria ha visto el potencial del mercado en este tipo de alimentos por ello en la actualidad hay una gran actividad investigadora sobre el tema a nivel mundial. Un alimento funcional es aquel que mejora la salud o previene ciertas enfermedades de los individuos que lo consumen debido a los ingredientes que contienen (Rafter, 2002).

Son productos que se aconsejan consumir habitualmente para conseguir los beneficios que aportan para la salud (Roberfroid, 2002). Para que un alimento sea funcional tiene que cumplir alguna de estas estrategias (Roberfroid, 2000; Roberfroid, 2002):

1. Eliminar componentes del alimento que pueden ser perjudiciales para la salud (alergenos).
2. Aumentar la concentración de un determinado componente nutritivo o no para que aporte un beneficio para la salud. (ej. fortificación con micronutrientes)
3. Adicionar un determinado componente que no está presente en la composición del alimento y que no tiene por que ser sólo un macronutriente o un micronutriente, pero aporta beneficios para la salud (ej. compuestos fenólicos).
4. Sustituir un componente del alimento que tiene efectos perjudiciales para la salud (ej. grasas), por otro que aporte beneficios (ej. inulina).
5. Aumentar la biodisponibilidad o estabilidad de un compuesto mejorando así su beneficio.

En todos los casos el efecto beneficioso que se le atribuye a estos alimentos debe estar debidamente demostrado (Roberfroid, 2002).

Donde más se están centrando los estudios en la actualidad es en modular los sistemas redox y antioxidantes del organismo (Roberfroid, 2000). Por ello muchos alimentos funcionales incrementan el aporte de antioxidantes naturales en la dieta. Por ello se adicionan extractos naturales ricos en polifenoles para desarrollar alimentos funcionales (Larrosa y col., 2002). Debido a esto se ha aumentado la producción de extractos vegetales a los cuales se les aíslan los compuestos bioactivos y son concentrados para usarlos como suplementos, alimentos nutracéuticos o como ingredientes alimentarios (Chunying Luo y col., 2011).

Otra de las aplicaciones de los compuestos fenólicos en la elaboración de nuevos alimentos es la utilización de naringina y neohesperidina que pueden ser transformados en sus dihidrochalconas las cuales poseen un elevado poder edulcorante. Por otro lado, un gran número de flavonoides se podrían utilizar

como sustituyentes de algunos aditivos sintético (Martínez-Tomé y col., 2001) y/o para aumentar la elaboración de alimentos (Robards y Antolovich, 1997).

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

II – OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el estudio de diferentes factores químicos y físicos en la complejación de flavonoides por CDs.

Para poder abordar este objetivo general nos marcamos los siguientes objetivos parciales:

- Obtener una mejor comprensión de la influencia de la estructura química de los esqueletos moleculares y la configuración espacial de flavonoides con un grupo C=O en C4 del anillo B, en el proceso de formación de complejos en CDs
- Estudiar la solubilidad acuosa y estabilidad de estos flavonoides a diferentes pHs y temperaturas, así como el efecto de la inclusión en CDs sobre estos dos parámetros.
- Estudiar el efecto de la inclusión flavonoides en CDs sobre su actividad antioxidante.

CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS.

Todos los flavonoides utilizados (**Tabla III.1**) fueron proporcionados por Nutrafur S.A. (Murcia, España) con una pureza > 90%, a excepción de miricetina, que fue obtenido de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). Las CDs (β -CDs y HP- β -CDs) fueron adquiridas de Henan Puertai Animal Medicina Co. (Zheng zhou, China). El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

3.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOIDES.

Para conocer la pureza y cuantificar los principales flavonoides presentes en cada muestra usada en este estudio, se utilizó el método publicado previamente por Benavente-García, y col., 2000 con algunas modificaciones. Para ello, todas las muestras se disolvieron en DMSO 5mg/ml y las disoluciones resultantes se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 μ m antes de ser analizadas por cromatografía. El equipo de HPLC usado fue un Hewlett-Packard serie HP 1100 equipado con un detector de diodos. La fase estacionaria fue una columna analítica C18 de 100 LiChrospher (250 x 4 mm de diámetro interno) con un tamaño de partícula de 5 μ m (Merck, Darmstadt, Alemania) y la temperatura a la que se mantuvo fue a 30 ° C. El flujo fue de 1 ml/min y los cambios de absorbancia se monitorizaron a 280 y 340 nm, de forma simultánea. La fase móvil para el análisis cromatográfico fue: (A) ácido acético: agua (2,5:97,5) y (B) acetonitrilo. Se utilizó un gradiente lineal desde 95% (A) y 5% (B) a 75% (A) y 25% (B) en 20 min; cambiado a 50% (A) y (B) en 20 min (40 min, tiempo total); a 20% (A) y 80% (B) en 10 min (50 min, tiempo total) y volviendo finalmente a la concentración inicial de eluyentes (95% (A) y 5% de (B) en 10 min (tiempo total 60 min). La **Tabla III.1** resume el perfil cromatográfico global de las diferentes muestras utilizadas en este estudio.

Tabla III.1.: Análisis cromatográfico de los flavonoides usados en este estudio.

Compuesto y Grupo Flavonoide	Contenido (%) ¹	Principales	
		flavonoides minoritarios (%) ²	Otros Flavonoides minoritarios
Naringenina (flavanona)	93,8	Naringin (0,9)	Naringenin-7-glucoside
Hesperetina (flavanona)	94,7	Hesperidin (1,2)	Hesperetin-7-glucoside
Apigenina (flavona)	97,2	Rhoifolin (0,7)	Apigenin-7-glucoside
Kaempferol (flavonol)	96,8	Quercetin (0,8)	Kaempferol-3-glucoside
Quercetina (flavonol)	95,7	Rutin (1,5)	Isoquercitrin
Miricetina (flavonol)	94,1	Myricitrin (1,1)	Quercitrin

¹ Valor absoluto.

² El ensayo de referencia en %, se refiere al contenido absoluto del flavonoide principal.

3.3. ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

Se llevaron a cabo estudios de solubilidad de cada uno de los flavonoides en presencia de CDs en medios tamponados a distintos pHs, con el fin de estudiar el efecto del estado de ionización de los grupos hidroxilo de los flavonoides en la solubilidad de los compuestos.

Los estudios de solubilidad en presencia de CDs de los diferentes flavonoides se realizaron de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors en 1965 (Higuchi y Connors, 1965) con algunas modificaciones.

Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de CDs, desde 0 hasta una concentración de 15 mM en el caso de β -CDs, ya que este es su límite de solubilidad acuosa y 100 mM en el caso de HP- β -CDs, en un volumen total de 10 mL de tampón acetato sodico 100 mM (pH 3,5), tampón fosfato sodico 100 mM (pH 6,5) y tampón borato sodico 100 mM (pH 8,5).

A cada una de las disoluciones de CDs se le adicionó una cantidad saturante de flavonoide y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos, a 25 °C, hasta alcanzar el equilibrio. Una vez pasado este tiempo, las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.45 μ m para eliminar el exceso de flavonoide (flavonoide no disuelto) y obtener en el filtrado solamente la cantidad de flavonoide disuelto en el medio acuoso. Para cuantificar la cantidad de flavonoide disuelta en cada eluido, se rompieron los complejos flavonoide-CDs adicionando, etanol hasta una concentración del 80%. Posteriormente, cada una de las disoluciones se se valoró espectrofotométricamente, midiendo su absorbancia en el máximo de absorción de cada compuesto. La concentración de flavonoide en cada disolución se determinó mediante la ley de Lambert-Beer (**ecuación III.1**), calculando los coeficientes de extinción molar en el 80% de etanol, de cada uno de los flavonoles: apigenina ($\epsilon_{268} = 19700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Figura III.1**), naringenina ($\epsilon_{292} = 22870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Figura III.2**), hesperidina ($\epsilon_{290} = 18400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Figura III.3**), kaempferol ($\epsilon_{370} = 22890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Figura III.4**) quercetina ($\epsilon_{372} = 12790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Figura III.5**) y miricetina ($\epsilon_{376} = 22370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Figura III.6**).

$$Abs = \epsilon \times C \times d \text{ [III.1]}$$

Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro modelo UV-1063 Shimadzu (Kyoto, Japón).

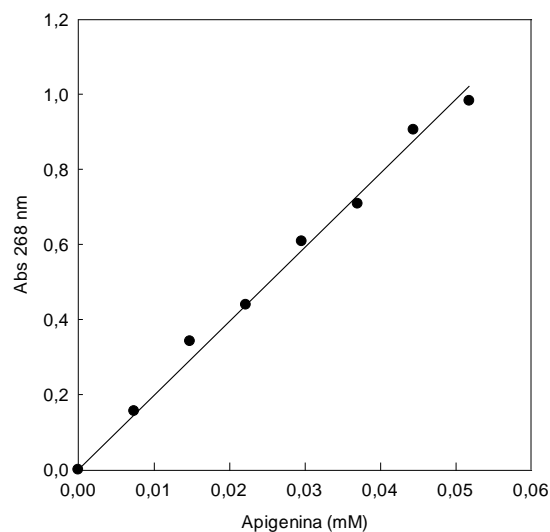


Figura III.1.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Apigenina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 268nm ($19700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

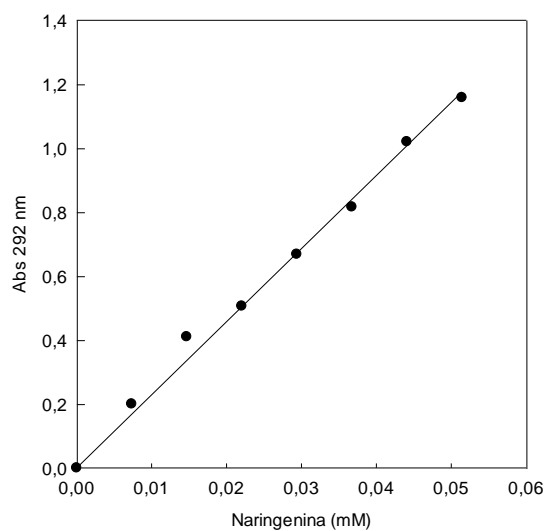


Figura III.2.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Naringenina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 292nm. ($22870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

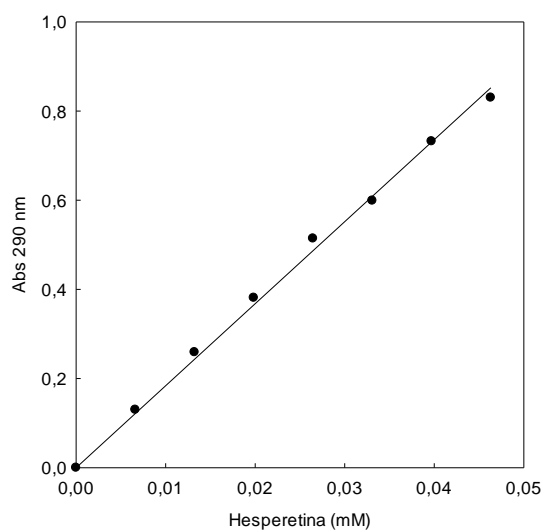


Figura III. 3.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de Hesperetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 290 nm. ($18400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

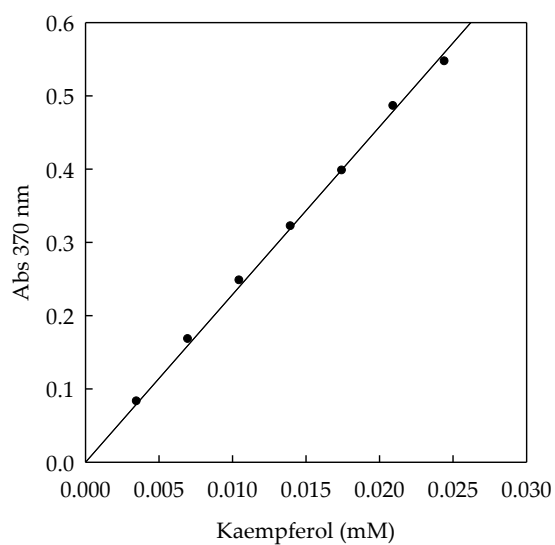


Figura III. 4.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de kaempferol al 80% de etanol en su máximo de absorción, 370 nm. ($22890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

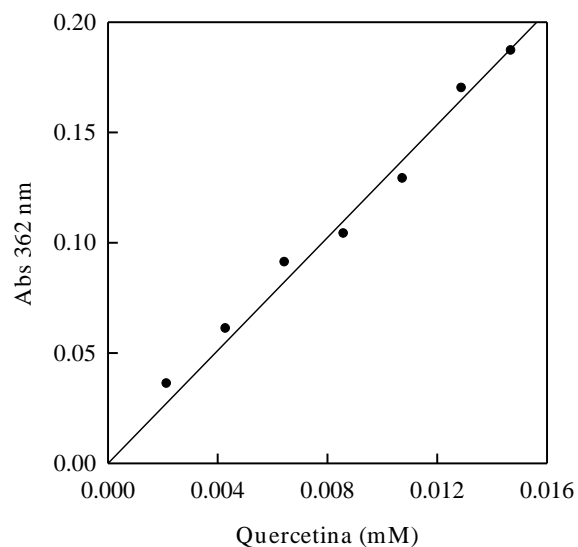


Figura III.5.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de quercetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 362 nm ($12790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

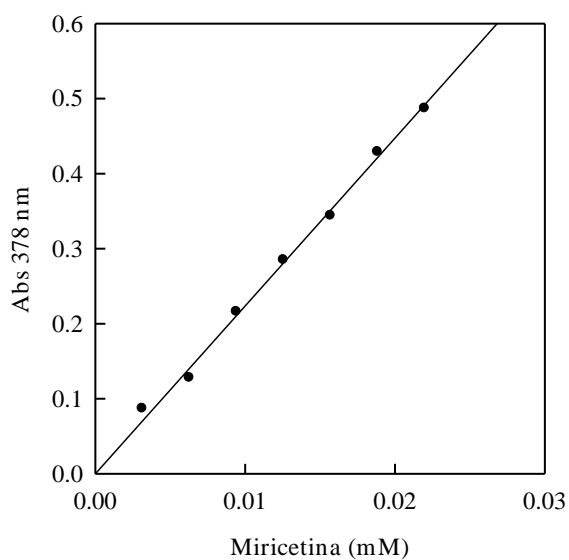


Figura III. 6.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de miricetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 370 nm ($22370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Una vez calculada la concentración de flavonoide disuelta en cada muestra, se representaron frente a la concentración de CDs presente en cada caso (diagrama de fases).

Las constantes de complejación (K_c) entre cada uno de flavonoides y los distintos tipos de CDs se calcularon utilizando la siguiente ecuación [III.2]:

$$K_c = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})} \quad \text{[III.2]}$$

donde, S_0 es el límite de solubilidad acuosa del flavonoide en las condiciones estudiadas en ausencia de CDs, y "slope" es la pendiente del diagrama de de fases.

3.4. CÁLCULO DE COSTANTES MEDIANTE EL MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAND

El medio de reacción contenía una concentración de naringenina y hesperetina soluble en agua (9 y 20 μM , respectivamente) y concentraciones crecientes de diferentes tipos de CDs (β -CDs y HP- β -CDs), preparadas en tampón acetato sódico 100 mM pH 3,5, tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,5 y tampón borato sódico 100 mM pH 8,5, en un volumen final de 1 mL. Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C. El espectro absorbancia de cada flavonoide se registró en el intervalo de 200-500 nm, midiendo la absorbancia en el máximo de absorción de cada uno de ellos. La adición de CDs al medio de reacción, provocó un aumento de la absorbancia en todos los casos.

La absorbancia a cualquier longitud de onda (A) está relacionada con la concentración de CDs mediante la ecuación (Connors, 1987):

$$A = A_0 + \frac{(A_\infty - A_0)K_c [CDs]_t}{1 + K_c [CDs]_t} \quad \text{[III.3.]}$$

donde A_{∞} es la absorbancia cuando todo el flavonoide ha sido complejoado en la cavidad hidrofóbica de las CDs y A_0 es la absorbancia del flavonoide en ausencia de CDs. La ecuación de Benesi-Hildebrand [III.4.] o doble reciproca, permite linealizar la ecuación [III.3], pudiendo obtener el valor de K_c dividiendo el corte con el eje de las Y entre la pendiente de la recta (Benesi y Hildebrand, 1949):

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_{\infty} - A_0} + \frac{1}{(A_{\infty} - A_0)K_c[CDs]} \quad [III.4.]$$

3.5. MODELADO MOLECULAR

Las estructuras de los flavonoides utilizados en los cálculos de modelización molecular fueron construidos usando MOE (Química Computing Group Inc., Montreal, Canadá). La estructura de β -CDs fue extraída de la estructura cristalina de PDB 3CGT, y la de HP- β -CDs fue construida añadiendo grupos hidroxipropilo al modelo β -CD. Las cargas parciales se calcularon con el paquete Gaussian 09 de los programas (Frisch y col., 2009), y la minimización de la energía se aplicó a todas las estructuras. Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron utilizando los parámetros por defecto en Autodock Viña (Trott y Olson, 2010) y las representaciones gráficas de los resultados de acoplamiento se prepararon utilizando PyMOL (Sistema Molecular Graphics, versión 1.3, Schrödinger, LLC).

3.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SOLUBILIDAD ACUOSA DE LOS FLAVONOIDES EN AUSENCIA DE CDS

Se prepararon disoluciones saturantes de flavonoides: 30 mg de flavonoide en 10 mL de agua. La mezcla se mantuvo en un baño de ultrasonidos a diferentes temperaturas (20, 25, 30, 35, 40, 50, 70 y 90°C) durante 60 minutos, y a diferentes intervalos de tiempo (5, 15, 30, 45 y 60 min) se extrajeron alícuotas con el fin de evaluar el flavonoide disuelto. El exceso de flavonoide no disuelto, se eliminó por

filtración a través de filtro de acetato de celulosa 0.45 μm . La concentración de flavonoide se determinó espectrofotométricamente en su máximo de absorción.

3.7 ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACUOSAS DE LOS FLAVONOIDES DISUELTOS

Las medidas de estabilidad de naringenina y hesperetina en disoluciones tamponadas de tampón acetato sodico 100 mM (pH 3,5), tampón fosfato sodico 100 mM (pH 6,5) y tampón borato sodico 100 mM (pH 8,5) se realizaron a 25°C.

El medio de reacción contenía 1 ml de disolución de flavonoide (1 mg/ml en metanol al 50%) con 5 ml de disolución tamponada de CDs (β -CD y HP- β -CD) 6 mM teniendo una concentración final de metanol del 8%.

Las medidas de estabilidad se realizaron a diferentes intervalos de tiempo, y las concentraciones de flavonoide que había en cada muestra se determinaron mediante HPLC. El equipo de HPLC utilizado fue un equipo Hewlett-Packard Series HP 1100 con un detector diode array. La fase estacionaria fue una columna analítica C18 LiChrospher 100 (250 x 4 mm i.d.) con un tamaño de partícula 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany) termostata a 30°C. La fase móvil consistía en acetonitrilo (A) / agua (B) (80/20), con un flujo de 1 ml min y el volumen de inyección fue de 20 μL .

3.8. MEDIDA DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

3.8.1. Reactivos

Fluoresceína (FL), 2, dihidrocloruro 2'-diazobis (2-aminopropano) (AAPH) y 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox C), fueron adquiridos de Sigma (Madrid, España). El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

3.8.2. Método ORAC-FL

Con este ensayo se mide la degradación oxidativa de la FL al ser atacada por el radical AAPH.

La solución stock de FL (4 μM) se realizó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4 y se conservó a -20 °C durante un máximo de 4 semanas. La solución de FL se preparó diariamente en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4, mediante una dilución de la disolución stock, a una concentración final de 6 nM.

La concentración de la disolución stock de Trolox C utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0.25 mM y se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4. La concentración del flavonoide fue de 15 μM , diluido en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4.

El radical AAPH se preparó diariamente a una concentración 127 mM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4.

Las medidas de capacidad antioxidante por el método ORAC-FL se llevaron a cabo en un lector de placas Synergy-HT, Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, EE.UU.), utilizando palcas de 96-pocillos de poliestireno con paredes negras y fondo claro (Nalge Nunc International). La fluorescencia de las muestras se leyó a través del fondo claro de la placa, usando una longitud de onda de excitación de 485/20 nm, y un filtro de emisión de 528/20 nm. El lector de placas fue controlado por el software KC4, versión 3,4.

La capacidad de absorción del radical se determinó por el método descrito por Dávalos y col., en 2004, con ligeras modificaciones. La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4, en un volumen final de 200 μL , compuesto por: 100 μL de solución de FL (concentración final de 3 nM), 0-70 μL de solución de flavonoide en ausencia y presencia de CDs, 30 μL de AAPH (con una concentración final de 19 mM) y el resto, hasta completar los 200 μL , tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7,4.

La mezcla de reactivos en ausencia del radical AAPH, se incubó durante 30 minutos a 37 °C, dispensando inmediatamente después la solución del radical, usando para ello una pipeta multicanal. Seguidamente, la microplaca se colocó en el lector y la fluorescencia fue registrada cada 1' y 14' durante 2 horas. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura. En cada ensayo, se realizó un blanco que contenía FL y AAPH con tampón fosfato sódico y se prepararon ocho disoluciones de calibración, utilizando como antioxidante Trolox C (6,25, 12,5, 15,0, 18,75, 21,25, 25, 27,5 y 31,25 μM).

La capacidad de inhibición de la desaparición de FL, se cuantificó mediante la integración del área bajo la curva de caída de la FL (AUC) (**Figura III.7**). Todas las muestras fueron preparadas por triplicado y al menos, se realizaron tres ensayos independientes para cada muestra. Con el fin de evitar el efecto de la temperatura, sólo se utilizaron los 60 pocillos centrales de la placa, dejando los exteriores con 200 μL de agua destilada.

Los resultados fueron expresados como equivalentes de Trolox en μM , utilizando la curva de calibración de Trolox C ($y = 0,12 + 1,43 x$) (**Figura III.7** y **Figura III.8**)

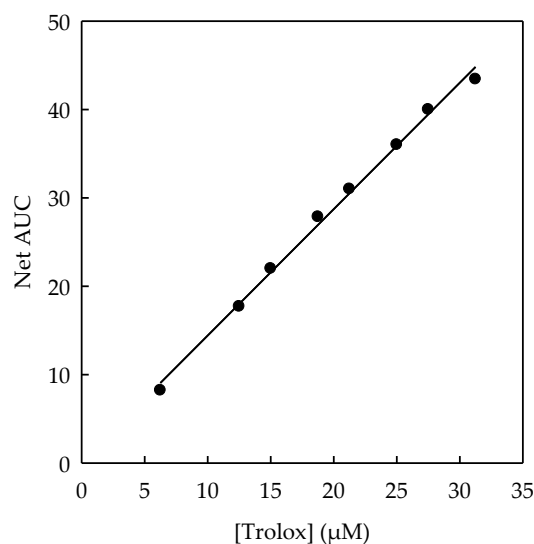


Figura III.7 Regresión lineal de Net AUC con diferentes concentraciones de Trolox C. $\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}$.

El área bajo la curva de caída de FL (AUC) fue calculada mediante la ecuación:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1.14}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad [\text{III.5.}]$$

donde f_0 es la fluorescencia inicial leída a tiempo 0 y f_i es la lectura de fluorescencia a tiempo final. El AUC correspondiente a la muestra (Net AUC), se calculó restando el correspondiente AUC del blanco. Los datos fueron procesados usando el programa SigmaPlot 9.0 (Jandel Científico, Alemania).

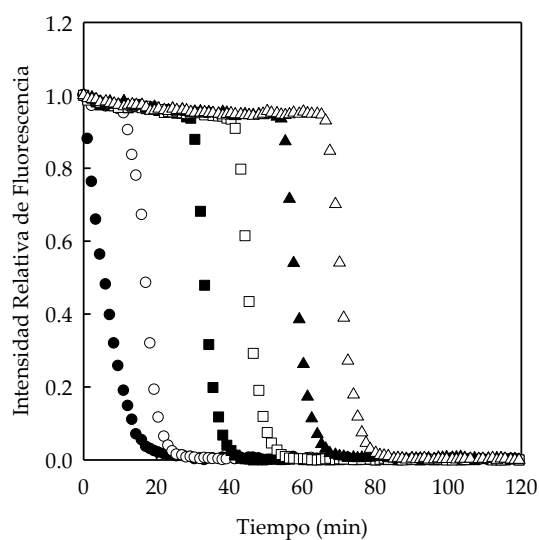


Figura III.8.: Curva de caída de la FL inducida por AAPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox C.

**CAPÍTULO – IV: INVESTIGACIÓN
SISTEMÁTICA Y MODELADO MOLECULAR
DE LA COMPLEJACIÓN ENTRE VARIOS
GRUPOS DE FLAVONOIDES Y HP- β -
CICLODEXTRINAS.**

CAPITULO IV: INVESTIGACIÓN SISTEMÁTICA Y MODELACIÓN MOLECULAR DE LA COMPLEJACIÓN ENTRE VARIOS GRUPOS DE FLAVONOIDES Y HP- β -CICLODEXTRINAS.

4.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los flavonoides han atraído mucho interés debido a su potencial uso en protección cardiovascular. De hecho, muchos estudios epidemiológicos asocian un aumento del consumo de alimentos y bebidas ricos en flavonoides, con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD) (Liu, y col., 2000; Joshipura, y col. 2001; Kris-Etherton). Además, varios flavonoides y sus derivados, como diosmina, rutina y quercetina, son ampliamente utilizados como agentes farmacéuticos por su actividad vasoprotectora (Daflon 500 y Venoruton) (Gohel, Dvies, 2009).

Los factores estructurales más importantes que pueden condicionar la actividad de los flavonoides son: su estado de oxidación (flavanona, flavona, etc...), los sustituyentes de los grupos en los anillos A y B de la estructura flavonoide (posición, número y naturaleza) y la presencia de glicosilaciones (Bravo, 1998; .Yanez y col., 2004; Guerrero y col., 2012; Navarro-Nuñez y col., 2009). Obviamente, en conjunto, todas estas consideraciones estructurales son responsables de las propiedades físicas de estos compuestos y afectan directamente a su biodisponibilidad y, en consecuencia, a su actividad farmacológica y eficacia.

Una de las propiedades derivadas de su estructura es su baja solubilidad acuosa, que reduce significativamente su biodisponibilidad.

En este capítulo se han estudiado los principales flavonoides utilizados en suplementos alimenticios, nutracéuticos y fármacos: naringenina, hesperetina, apigenina, kaempferol, quercetina y miricetina (**Figura IV.1**). La familia de las antocianinas se excluye del estudio, ya que, independientemente de sus propiedades de solubilidad acuosa, la ausencia del grupo carbonilo en el anillo C del esqueleto flavonoide, implica que no sea adecuado para una evaluación

comparativa y cuantitativa correcta de la relación flavonoide-capacidad inclusión en CDs.

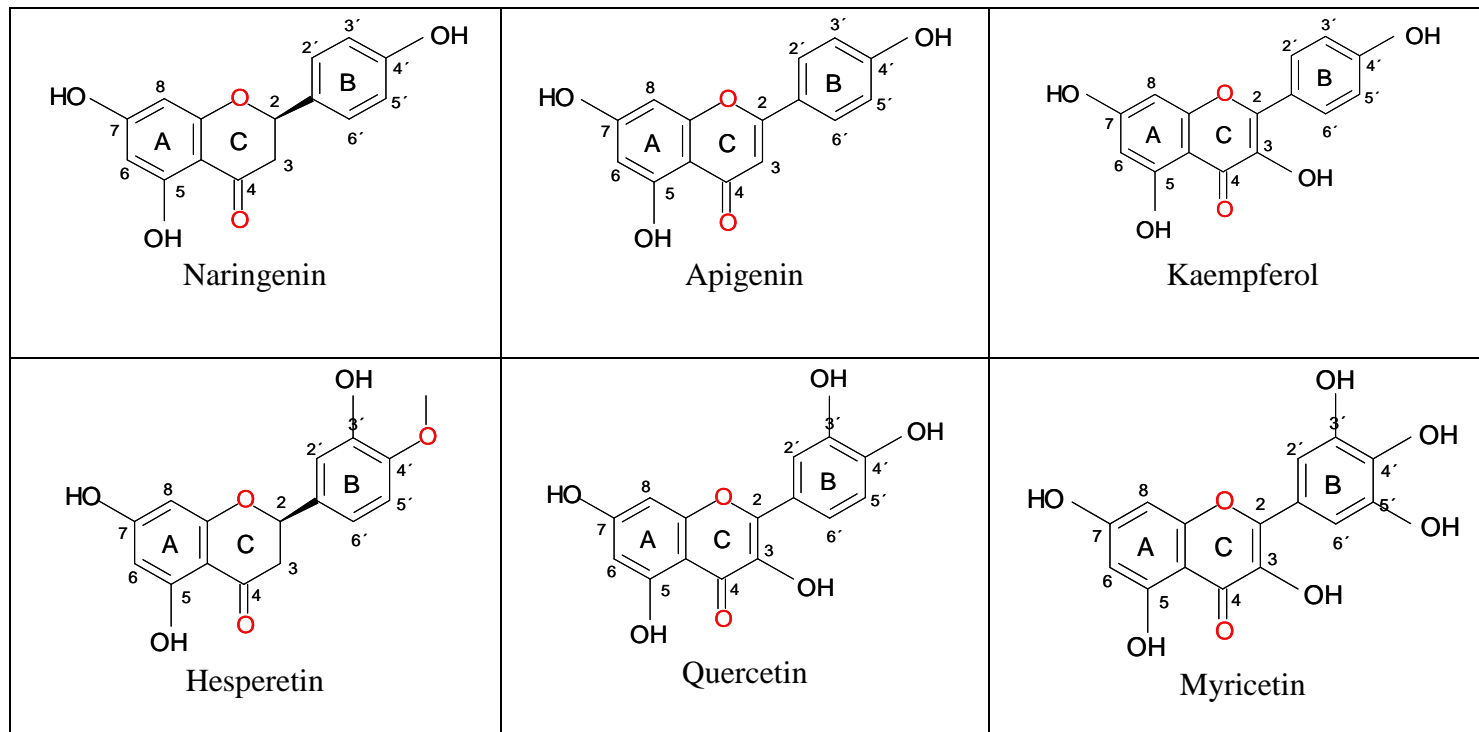


Figura IV.1: estructura de los diferentes flavonoides utilizados en este estudio.

4.2 RESULTADOS Y DISCURSIÓN

4.2.1. Parametros de solubilidad de los flavonoides

Los flavonoides tienen baja solubilidad acuosa (Lucas-Abellán y col., 2008a; Lucas-Abellán y col., 2008b). En primer lugar, en este capítulo se ha estudiado el efecto del pH en dicha propiedad. Los valores de pH elegidos (3,5, 6,5 y 8,5) están relacionados con la fabricación y aplicaciones fisiológicas de estos flavonoides.

Como se observa en la **Tabla IV.I**, todos los flavonoides estudiados presentaron baja solubilidad acuosa a los diferentes valores de pH. A pH 3,5 y 6,5 los valores de solubilidad fueron del orden de μM , mientras que a pH 8,5 se incrementaron hasta el orden de mM. Flavanonas (naringenina, hesperetina) y flavona (apigenina) mostraron la solubilidad más baja a pH 3,5 ($9 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$, $0,02 \pm 0,01$, $2,8 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$, respectivamente); mientras que los flavonoles (miricetina kaempferol y quercetina) mostraron la solubilidad más baja a pH 6,5 ($2,4 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$, $6,7 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-4}$, $0,01 \pm 6 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$, respectivamente)

En el caso de naringenina, el incremento de solubilidad acuosa al pasar de pH 3,5 a 8,5 fue de más de 300 veces, pasando de $9 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$ a 2,83 mM, debido a su cambio estructural a chalcona. En el caso de hesperetina, su solubilidad acuosa aumentó solo 3,5 veces en el mismo rango de pH, pasando de $0,02 \pm 0,01$ a $0,07 \pm 0,02$ mM. En el caso de apigenina, el aumento fue de casi 18 veces, pasando de $2,8 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$ a $0,05 \pm 0,01$ mM. En el caso de los flavonoles, el aumento de solubilidad al pasar de 3,5 a pH 8,5 fue de 13 veces para kaempferol (de $3,3 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$ a $9 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$ mM), 338 veces para quercetina (de $0,01 \pm 4 \cdot 10^{-3}$ a $3,38 \pm 0,21$ mM) y 550 veces para miricetina (de $0,01 \pm 1 \cdot 10^{-3}$ a $1,32 \pm 0,13$ mM).

Tabla IV.1: Solubilidad acuosa de los flavonoides a diferentes pHs en ausencia de CDs. Valores de K_c para cada uno de ellos y HP- β -CDs a diferentes pHs.

Flavonoids	S_0 (mM) pH 3.5	K_c (M^{-1}) pH 3.5	S_0 (mM) pH 6.5	K_c (M^{-1}) pH 6.5	S_0 (mM) pH 8.5	K_c (M^{-1}) pH 8.5
Naringenin	$9 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$	$1,515 \pm 223$	0.14 ± 0.03	$1,786 \pm 368$	2.83 ± 0.18	225 ± 37
Hesperetin	0.02 ± 0.01	$3,546 \pm 216$	0.03 ± 0.01	$4,651 \pm 525$	0.07 ± 0.02	403 ± 29
Apigenin	$2.8 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,867 \pm 206$	$3.7 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$4,116 \pm 297$	0.05 ± 0.01	$1,290 \pm 103$
Myricetin	$0.01 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,392 \pm 235$	$2.4 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$5,380 \pm 361$	1.32 ± 0.13	32 ± 5
Kaempferol	$3.3 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$3,061 \pm 241$	$6.7 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	$13,768 \pm 698$	$9 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$	$9,662 \pm 527$
Quercetin	$0.01 \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$1,806 \pm 128$	$0.01 \pm 6 \cdot 10^{-3}$	$4,172 \pm 256$	3.38 ± 0.21	408 ± 18

Una vez determinado el efecto del pH sobre la solubilidad acuosa de cada uno de los flavonoides, se estudió su solubilidad en presencia de HP- β -CDs y se calcularon los valores de Kc mediante la realización de diagramas de fases para cada flavonoide en las diferentes condiciones de pH, según el método descrito por Higuchi y Connors (Higuchi and Connors, 1965).

La **Figura IV.2** muestra los diagramas de fases de cada flavonoide en presencia de HP- β -CDs. La solubilidad acuosa de todos los flavonoides estudiados aumentó con la concentración de HP- β -CDs dentro del intervalo de concentración estudiado (0 – 100 mM), con una correlación lineal hospedador-huésped, por lo que todos los diagramas de fases pueden ser clasificados como tipo A_L , según Higuchi y Connors (Higuchi and Connors, 1965). El valor de la pendiente de la recta fue menor que 1 en todos los casos, indicando que la estequiometría de los complejos formados era 1:1 (1 CD: 1 flavonoide) (Lucas-Abellán y col., 2008a; Fernandes y col., 2002). La solubilidad de cada flavonoide se incrementó significativamente en presencia de HP- β -CDs en todos los casos, debido a la complejación de cada una de ellas en la cavidad hidrofóbica de las CDs lo que corrobora el potencial solubilizador de HP- β -CDs sobre estos flavonoides (Lucas-Abellán y col., 2008b; Mercader-Ros y col., 2010).

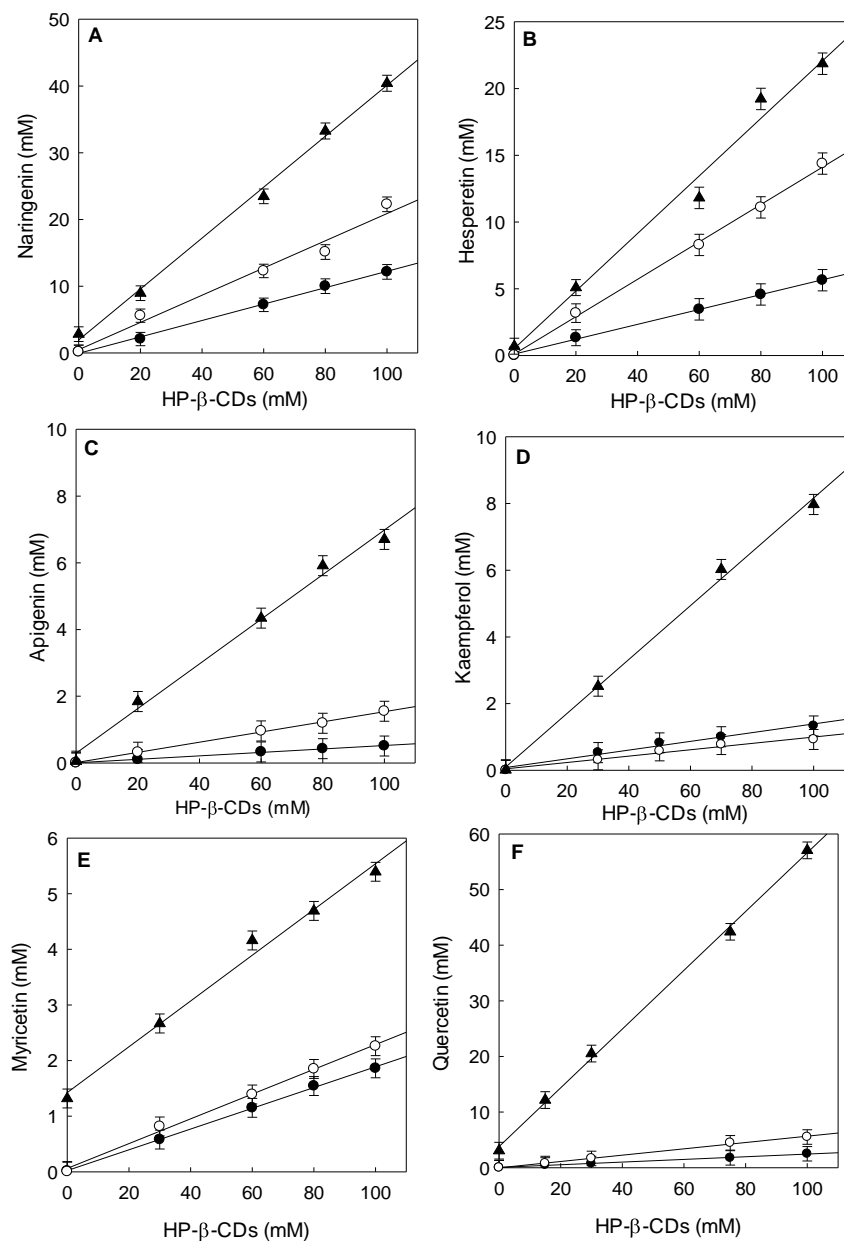


Figura IV.2: Diagrama de fases de naringenina (A), hesperetina (B), apigenina (C), kaempferol (D), miricetina (E), quercetina (F) con HP-β-CDs en tampón acetato sódico 100 mM, pH 3,5 (●), tampón fosfato sódico 100 mM, pH 6,5 (○) o tampón borato sódico 100 mM, pH 8,5 (▲).

Tal y como se observa en la **Figura IV.2**, los valores más altos de pendientes en los diagramas de fases, se obtuvieron a pH 8,5, para todos los flavonoides estudiados. Este resultado indicó que a pH 8,5 y altas concentraciones de HP- β -CDs se puede mantener una mayor cantidad de flavonoides en disolución (libre + complejo). Sin embargo, en el cálculo de K_c , también influye el límite de solubilidad acuosa de cada compuesto en función del pH del medio, lo que hace que no siempre podamos relacionar un mayor valor de pendiente del diagrama de fases con un mayor valor de K_c .

Como se puede observar en la **Tabla IV.1**, los valores de K_c obtenidos para los diferentes flavonoides complejados con HP- β -CD dependieron del pH. En general, los valores de K_c obtenidos aumentaron con el pH de 3,5 a 6,5 y disminuyeron al pasar de pH 6,5 a 8,5. Este hecho refleja la influencia del límite de solubilidad (S_0) en el valor final de K_c , ya que el valor de la pendiente aumentó en todos los casos al pasar de pH 6,5 a 8,5 y sin embargo disminuyó el valor de K_c . El valor más alto de K_c se obtuvo para kaempferol a pH 6,5 ($13.768 \pm 698 \text{ M}^{-1}$) y el valor más bajo para miricetina a pH 8,5 ($32 \pm 5 \text{ M}^{-1}$).

Hay muchos factores involucrados en estos efectos, tanto los cambios de polaridad en el grupo C = O del anillo C, como la protonación – deprotonación de los grupos OH de los anillo A y B y los fenómenos de isomerización estructurales de cada molécula, asociados a los cambios de pH. La influencia de todos estos factores se discutirá en detalle en los siguientes apartados.

4.2.2 Distribución de las cargas sobre los esqueletos de los flavonoides.

La influencia de la distribución de carga en el esqueleto flavonoide a diferentes pHs es un factor clave a tener en cuenta en este estudio. El pKa del compuesto a encapsular es un parámetro importante a la hora de simular el acoplamiento. De hecho, el pH puede influir en el patrón de interacción entre la CD y el flavonol mediante la inducción de equilibrios de protonación (S. Donnini y col., 2001). Los valores de pKa para los diferentes flavonoides estudiados se encuentran entre 7 y 12 (Wang, Huang, 2004). Para determinar el estado de protonación de cada uno de ellos a los valores de pH estudiados, se determinó la acidez de los grupos hidroxilo en agua en el marco densidad teoría funcional

(DFT). Más específicamente, la ++ G (d, p) nivel de la teoría (Y. Zhao, D.G. Truhlar, 2008) M06-2X / 6-31 se combinó con el modelo de solvatación SMD (A.V. Marenich y col., 2009) para estimar todos los equilibrios próticos posibles.

De acuerdo con resultados teóricos recientes (I. Matei, y col., 2012), el grupo hidroxilo la posición 7 es el grupo más ácido en la mayoría de los flavonoides estudiados. Por ejemplo, en el caso de kaempferol (**Figura IV.3**), tiene un pKa asociado de 8,1, lo que indica que las formas tanto neutras como aniónicas están presentes a pH 8,5. Para el resto de flavonoides los resultados fueron similares. También se observó que, a pH ácido, la forma protonada más estable de todos los flavonoides estudiados era en la posición carbonilo. Además, puede formar enlaces de hidrógeno intramoleculares con los grupos hidroxilo de las posiciones 5 (anillo A) y 3 (anillo C) (cuando está presente).

Por último, y para evaluar la fiabilidad del estudio, se llevaron a cabo simulaciones adicionales mediante la inclusión de las cargas DFT-ESP (Singh, Kollman, 1984; Besler y col., 1990), para describir la distribución de cargas en todos los flavonoides estudiados.

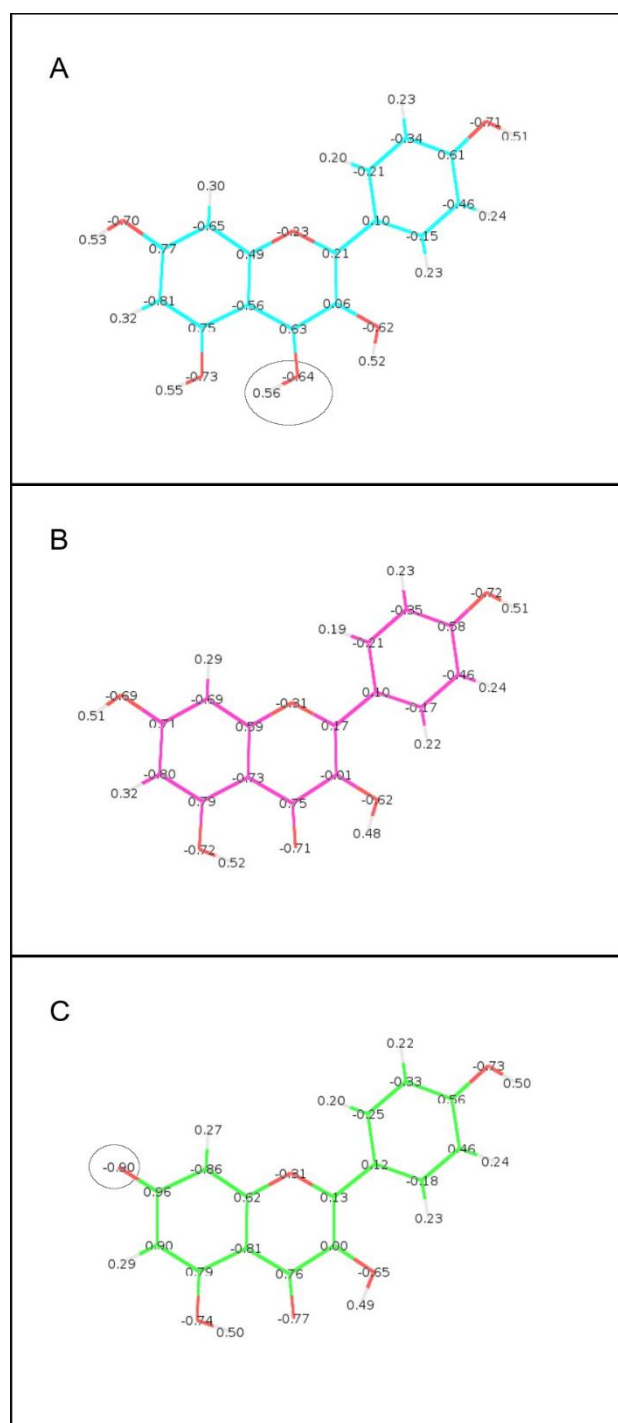


Figura IV.3.: Distribución de las cargas parciales de de kaempferol para diferentes estados de la molécula: A) protonada, B) neutra, C) desprotonada.

4.2.3. Relación entre la estructura de los flavonoides y los valores de pH.

Los factores estructurales de cada molécula están involucrados en los procesos de formación de complejos de los diferentes grupos de flavonoides y, en consecuencia, en los valores de K_c .

En cuanto a la influencia del pH del medio en el proceso de complejación, los valores más altos para las constantes de formación de complejos de los flavonoides estudiados se obtuvieron a pH 6,5, siendo siempre inferiores estos valores a pH ácido (3,5) o básico (8,5) (**Tabla IV.1**). Es importante tener en cuenta que, en el caso de los flavonoles (kaempferol, quercetina y miricetina) y flavona (apigenina), la disminución de K_c fue muy significativa tanto a pH 3,5 como 8,5. Sin embargo, en el caso de las flavanonas (naringenina y hesperetina) los valores de K_c fueron bastante similares a pH 6,5 y 3,5, pero disminuyeron sustancialmente a pH 8,5 (**Tabla IV.1**).

A pH ácido, el grupo carbonilo en la posición 4 está protonado en el caso de kaempferol (**Figura IV.3. A**), de manera que se pierde un enlace de hidrógeno, provocando un aumento en la densidad de carga positiva que perjudica a la estabilización hidrófoba. La acidez afecta al sistema conjugado formado por el doble enlace C2=C3 (ausente en flavanonas) y grupo C=O de C4. Esta "deslocalización electrónica" ayuda a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre C=O de la posición 4 y el -OH del carbono 5, disminuyendo la capacidad de unión de los dos grupos con la cavidad hidrofóbica de HP- β -CDs. La disminución de K_c a pH ácido es mayor en el caso de flavonoles (kaempferol $3.061 \pm 241 \text{ M}^{-1}$, miricetina $1.392 \pm 235 \text{ M}^{-1}$ y quercetina $1.806 \pm 128 \text{ M}^{-1}$), probablemente debido a que el C=O genera otros enlaces de hidrogeno intramoleculares con el grupo OH del carbono 5 (característico de flavonoles). Por otro lado, en el caso de flavanonas, la ausencia de un doble enlace C2=C3 no favorece la ionización del C = O de la posición 4 ni permite la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular con el -OH del carbono 5, explicando la menor disminución de los valores de K_c al bajar el pH de 6,5 a 3,5 en el caso de flavanonas.

A pH básico (8,5), todos los flavonoides desprotonan en la posición 7 (**Figura IV.3. C**), por lo que la capacidad de crear enlaces de hidrógeno en esta posición se pierde. En su lugar, esta parte de la molécula tendrá una tendencia a

evitar la cavidad hidrofóbica de las CDs, disminuyendo así el valor de K_c a pH básico. Por otra parte, existen otros factores estructurales que participan en la fuerte disminución en el valor de K_c . En el caso de flavanonas de pH 7,5 a 8,0, el equilibrio entre flavanona y chalcona está desplazando hacia la forma chalcona, estructura química con alta solubilidad acuosa. Por lo tanto, a pH 8,5, debido a la alta solubilidad acuosa de la chalcona, el valor de K_c disminuye drásticamente. En el caso de flavonas y flavonoles, la presencia de doble enlace $C2 = C3$ evita la formación de chalcona y este hecho conduce a una disminución de la K_c menos acusada en los 4 'OH flavonoides apigenina y kaempferol. En el caso de quercetina y miricetina el mayor número de grupos OH del anillo B, provoca una serie de impedimentos estéricos que hacen que este anillo tire de la molécula hacia fuera, por lo que su K_c también se redujo drásticamente.

4.2.4. Relación entre el docking molecular y los valores de K_c (pH 6,5)

La mayoría de las figuras de complejos de flavonoides con HP- β -CDs obtenidas por docking molecular se representan en las **Figuras IV.4, 5 y 6**. El complejo más estable es el formado entre kaempferol y HP- β -CDs a pH 6,5 (**Tabla IV.1**) y la principal estructura resultante se muestra en la **Figura IV.5A**. Su estabilidad se debe, principalmente, a la red de enlaces de hidrógeno establecidos entre los oxígenos de las posiciones 3, 4', 5 y 7 y a la estabilización hidrofóbica de su anillo aromático dentro de la cavidad interna de HP- β -CDs.

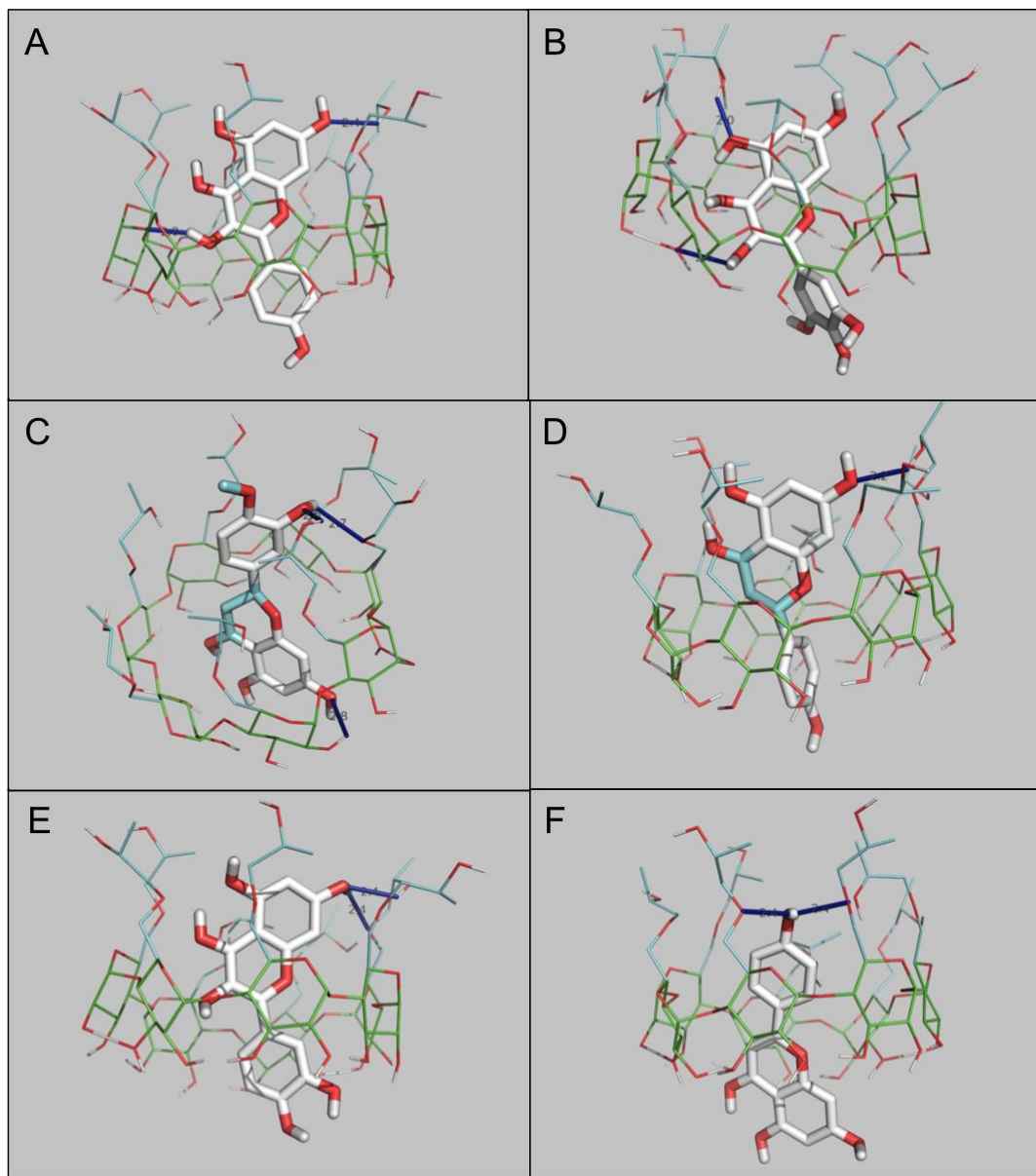


Figure IV.4.: Resultados obtenidos de acoplamiento entre HP- β -CD con A) kaempferol, B) miricetina, C) hesperetina y D) naringenina E) quercetina F) apigenina a pH 3.5. Los enlaces de hidrógeno son de color azul oscuro. El anillo aromático de flavonoides en blanco, y los carbonos de la parte flexible de HP- β -CD en azul claro.

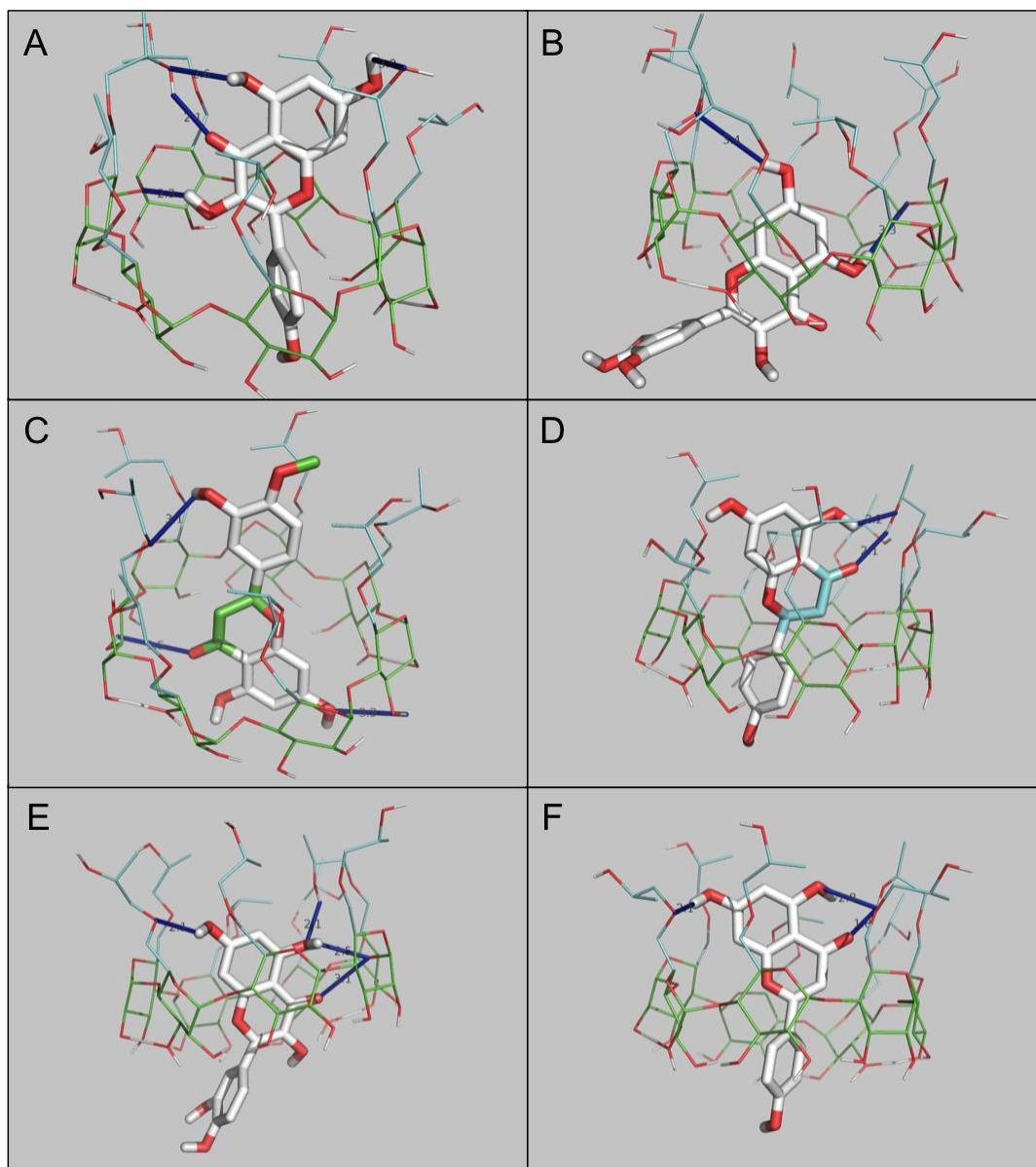


Figure IV.5.: Resultados obtenidos de acoplamiento entre HP- β -CD con A) kaempferol, B) miricetina, C) hesperetina y D) naringenina E) quercetina F) apigenina a pH 6.5. Los enlaces de hidrógeno son de color azul oscuro. El anillo aromático de flavonoides en blanco, y los carbonos de la parte flexible de HP- β -CD en azul claro.

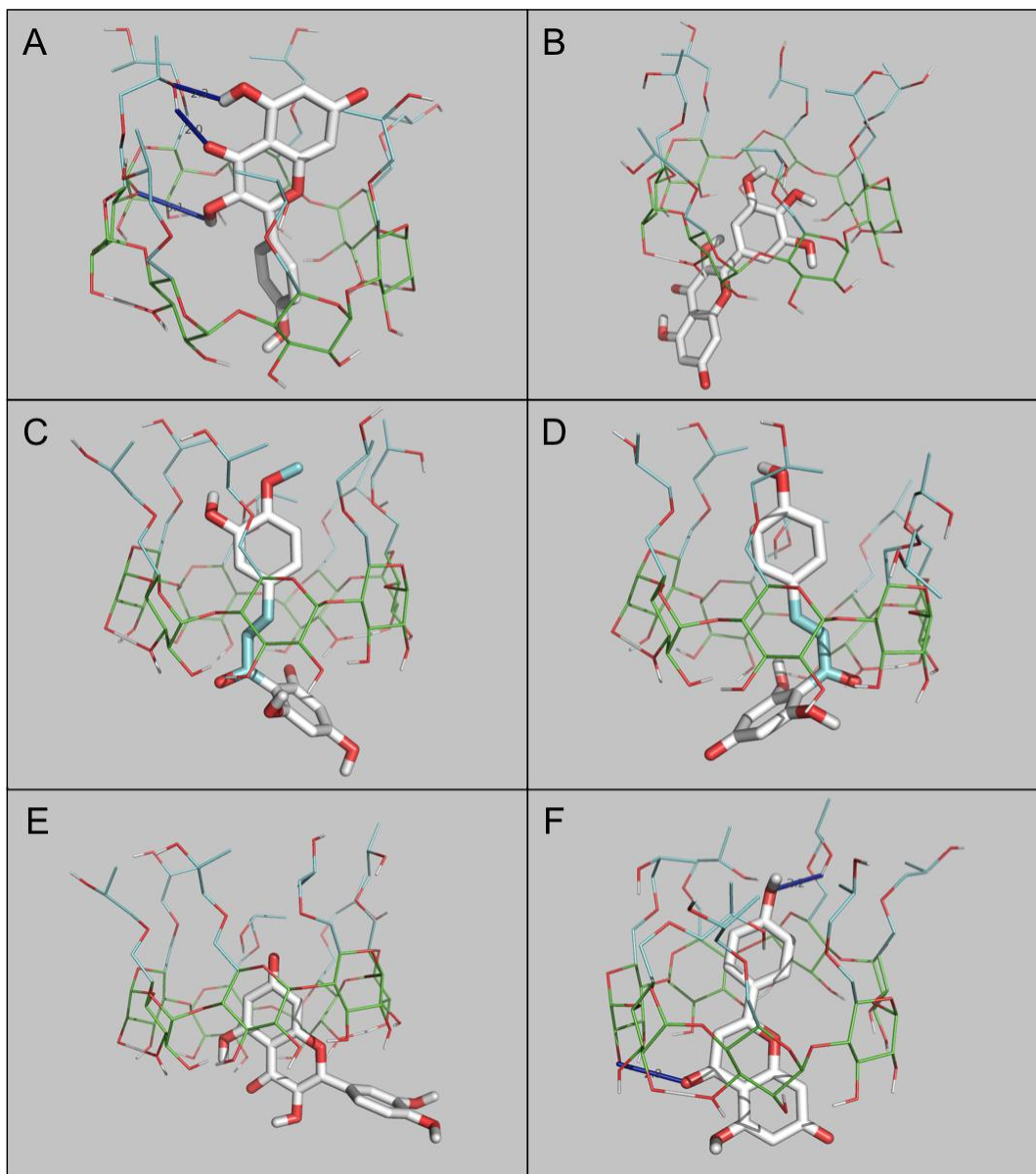


Figure IV.6.: Resultados obtenidos de acoplamiento entre HP-β-CD con A) kaempferol, B) miricetina, C) hesperetina-chalcona y D) naringenina-chalcona E) quercetina F) apigenina a pH 8.5. Los enlaces de hidrógeno son de color azul oscuro. El anillo aromático de flavonoides en blanco, y los carbonos de la parte flexible de HP-β-CD en azul claro.

4.2.5. Resultados comparativos para 4'-OH flavonoides (pH 6,5)

La comparación de los valores de K_c entre HP- β -CDs y los compuestos que contienen una estructura 4',5,7-trihidroxi-flavonoide: naringenina (4', 5,7 tri-OH-flavanona), apigenina (4', 5, 7 tri-OH-flavona) y kaempferol (4', 5,7 tri-OH-flavonol); nos permitió obtener una serie de conclusiones. Apigenina forma complejos menos estables que kaempferol, ($K_c = 4.116 \pm 297 \text{ M}^{-1}$ para apigenina vs $13.768 \pm 698 \text{ M}^{-1}$ para kaempferol), debido a la pérdida del grupo hidroxilo en la posición 3 que disminuye su capacidad para crear un enlace de hidrógeno fuerte. La presencia de C2=C3 y ausencia de 3-OH da lugar a una redistribución de la carga que aumenta la fuerza de la unión con HP- β -CDs. En el caso de apigenina, la presencia de C2=C3 y 3-OH hace que la molécula sea plana en la configuración de máxima energía, lo que facilita el acceso del flavonoide a la cavidad hidrofóbica de HP- β -CDs. En el caso de naringenina, este efecto no es posible debido a la ausencia de C2=C3 y 3-OH, lo que reduce el carácter plano de la estructura del flavonoide reduciendo, así el valor K_c ($1786 \pm 185 \text{ M}^{-1}$) (Tabla V.1).

4.2.6. Resultados comparativos de flavonoles (pH 6,5)

La comparación de los resultados obtenidos para los compuestos con 4',5,7-trihidroxi-flavonol: kaempferol (4', 5,7 tri-OH-flavonol), quercetina (3', 4', 5,7 tetra-OH -flavonol) y miricetina (3', 4', 5', 5,7 penta-OH-flavonol); mostró que la adición de uno o dos OH en el anillo B reduce la K_c (Tabla IV.1), ya que el anillo B tiende a evitar la cavidad hidrofóbica de las CDs, perdiendo esta contribución a la estabilización, tal y como se muestra en la Figura IV.5.B (miricetina) y la Figura IV.5.A (kaempferol).

Como se observa en la Tabla IV.1, los valores de K_c son: kaempferol (1 grupo OH en el anillo B) \gg miricetina (3 grupos OH en el anillo B) \approx quercetina (2 grupos 2-OH en el anillo B). En general, el análisis del acoplamiento mostró que la presencia de cualquier grupo OH adicional en el anillo B no favorece el proceso de inclusión, lo que lleva a un alejamiento del grupo C=O con respecto a HP- β -

CDs, disminuyendo así el valor de K_c . Más específicamente, la presencia de un grupo OH en la posición 3' o dos OH en las posiciones 3' y 5' provoca una disminución de K_c debido a que el volumen del anillo B supone un impedimento estérico para introducirse en la cavidad de las CDs. Por ello el anillo B tira del resto de la molécula hacia afuera y debilita la unión con las CDs, provocando una disminución de la K_c .

4.2.7. Resultados comparativos de flavanonas (pH 6,5)

En el caso de las flavanonas naringenina (4', 5,7 tri-OH) y hesperetina (3', 5,7 tri-OH-4' metoxi), el grupo metoxi en la posición 4' estabiliza el proceso de formación de complejos a través de interacciones hidrofóbicas con la parte flexible de HP- β -CDs (**Figura IV.5.C**). La presencia del grupo -CH₃ en posición 4' hace al flavonoide más hidrófobo, aumentando el valor de K_c (**Tabla IV.1**). Sin embargo, la metilación de cualquier grupo OH no implica automáticamente un aumento en el valor de K_c . En el caso de flavanonas di- o tri-metiladas en el anillo B, se produjo una disminución significativa de K_c (datos no mostrados), probablemente debido a impedimentos estéricos. Por otra parte, la ausencia de la estructura C2 = C3 fuerza a las moléculas a un solo plano, y se pierde parte de la estabilización hidrofóbica (ver **Figura IV.5.C**). La **Figura IV.3.D** muestra la estructura espacial de la forma chalcona generada a pH básico. Ambos elementos son responsables de la pérdida de valor de K_c de flavanonas en comparación con los flavonoles al complejarse con HP- β -CDs.

Como conclusión podemos decir que los resultados mostraron que kaempferol presenta la mayor capacidad de complejación de todos los flavonoides estudiados y, de acuerdo con los datos, la importancia relativa de cada elemento es debida a su estructura química: 3-hidroxilación (la ausencia de 3-OH implica una disminución del 70% en el valor de K_c al comparar apigenina con kaempferol); 3'-hidroxilación (la presencia de 3'-OH implica una disminución del 70% en el valor de K_c mediante la comparación de quercetina con kaempferol); doble enlace C2=C3 (la ausencia de C2=C3 implica una disminución del 56% en el valor de K_c mediante la comparación de la naringenina con apigenina). Además, la presencia de un grupo metoxilo en la posición 4'(anillo B) implica un aumento, relativamente más alto de la capacidad de inclusión (mediante la comparación de hesperetina con naringenina). Sin embargo, son

necesarios estudios más específicos para aclarar la influencia global del grado de esterificación del hidroxilo (principalmente la metilación) en los anillos A y B de la estructura de flavonoide.

**CAPÍTULO – V: EFECTO DE β -CDS Y
HP- β -CDS EN LA SOLUBILIDAD Y
ESTABILIDAD DE NARINGENINA Y
HESPERETINA**

CAPÍTULO V: EFECTO DE β -CDS Y HP- β -CDS EN LA SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD DE NARINGENINA Y HESPERETINA

5.1. INTRODUCCIÓN

Las flavanonas son un tipo de flavanoide presente mayoritariamente en cítricos, miel, menta y tomate. Entre las flavanonas más abundantes en estos alimentos se encuentran naringenina (4', 5, 7-trihydroxyflavanone) y hesperetina (3', 5, 7 trihidroxi-4-metoxiflavanona) (Gil-Izquierdo y col., 2004). En los últimos años ha habido un creciente interés por estas flavanonas debido a los efectos beneficiosos para la salud que se les atribuye, entre los cuales cabe destacar su efecto protector contra la peroxidación lipídica de las membranas biológicas que participan en varios desórdenes fisiológicos y patológicos, como envejecimiento, inflamación, aterosclerosis e isquemia (Harborne, 1994; Hollman, Katan, 1998).

Debido a estas propiedades beneficiosas para la salud que se les atribuyen a las flavanonas, en los últimos años ha crecido el interés en la elaboración de productos que las contengan, tanto alimentos funcionales, como nutracéuticos y productos farmacéuticos. Sin embargo, la baja solubilidad en agua de estos compuestos impone limitaciones considerables para su elaboración.

Para solucionar este problema se está utilizando cada vez más la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (CDs), provocando una mejora considerable en la solubilidad acuosa, la estabilidad química y biodisponibilidad de un gran número de compuestos entre los que se incluyen algunos flavonoides (Baluchne jadmojarad, T., Roghani, M., 2006; Mercer, L.D. y col., 2005; Tien-An N. y col., 2013).

En este capítulo se estudió el efecto de la complejación de naringenina y hesperetina (**Figura V.1**) sobre su solubilidad y estabilidad.

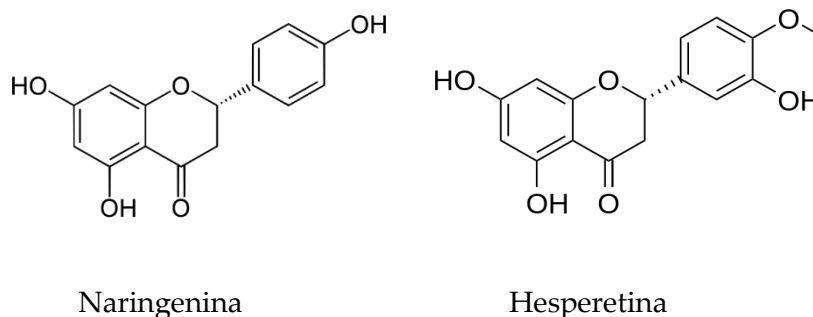


Figura V.1: Estructura química de naringenina y hesperetina

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. Efecto de la temperatura en la solubilidad

Naringenina y hesperetina, son flavanonas poco solubles en agua. En primer lugar, se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre su solubilidad acuosa. Las temperaturas ensayadas fueron: 20, 25, 30, 35, 40, 50, 70 y 90 °C en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,5.

Como se puede observar en la **Figura V.2**, la solubilidad de naringenina y hesperetina a 25 °C fue $0,14 \pm 0,03$ mM y $0,03 \pm 0,01$ mM, respectivamente, lo que muestra su baja solubilidad en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,5. La solubilidad de ambas flavanonas aumentó exponencialmente con la temperatura, lo que sugirió que el proceso es termodinámicamente favorable, en ambos casos. La solubilidad a pH 6,5 aumentó de forma exponencial desde 20 hasta 90 °C, alcanzando a esta temperatura una concentración de 1,4 mM en el caso de naringenina (10 veces mayor que la alcanzada a 25 °C) y 0,6 mM en el caso de hesperetina (20 veces mayor que la alcanzada a 25 °C).

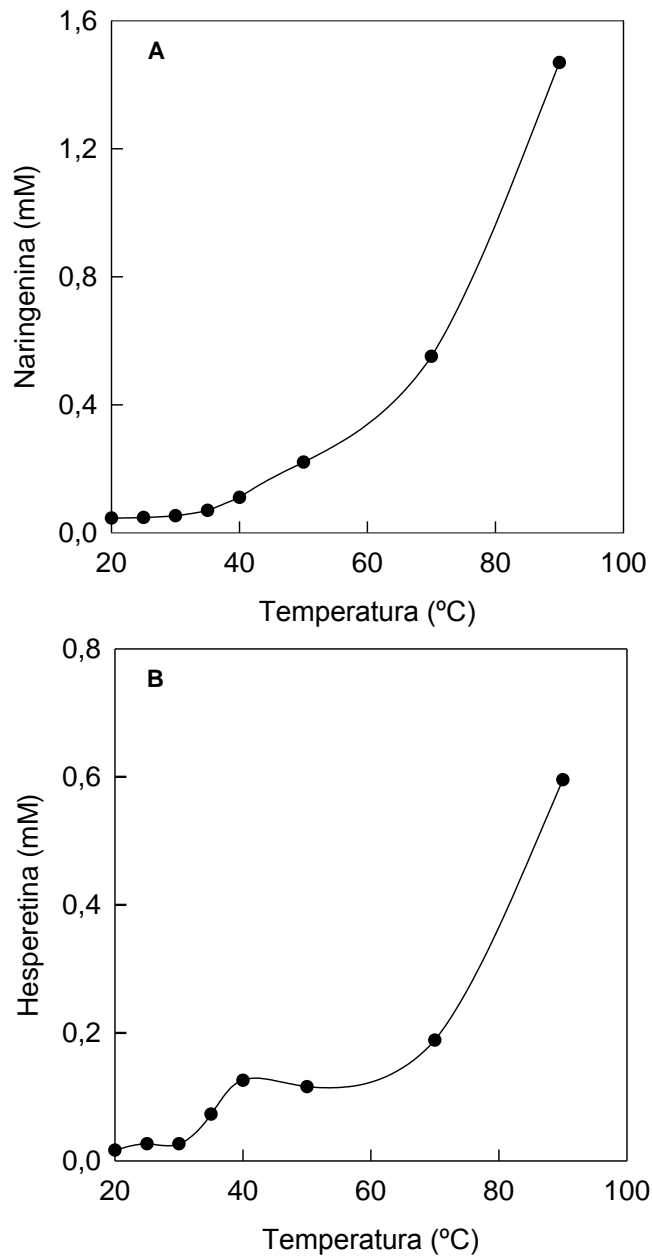


Figura V. 2: Efecto de la temperatura en la solubilidad de naringenina (A) y hesperetina (B)

5.2.2. Efecto de la complejación en CDs

5.2.2.1. Diagramas de fases

Una vez estudiado el efecto de la temperatura sobre la solubilidad de naringenina y hesperetina a pH 6,5, se estudió el efecto de β - o sus modificadas HP- β -CDs a 25 °C sobre su solubilidad.

Como se observa en las **Figuras V.3A y V.3B**, en ambos casos la concentración de flavanona aumentó linealmente con la concentración de β - o HP- β -CDs en el medio de reacción. En el caso de β -CDs, debido a su baja solubilidad acuosa, la concentración máxima de CDs utilizada fue de 13 mM y la solubilidad de naringenina aumentó de $0,14 \pm 0,03$ mM (S_0) a 1,3 mM con β -CD 13 mM (9,3 veces) (**Figuras V.3A**). En el caso de hesperetina, aumentó de $0,03 \pm 0,01$ mM en ausencia de CDs (S_0) a 0,9 mM con β -CD 13 mM (30 veces) (**Figuras V.3A**). En el caso de HP- β -CDs, debido a su alta solubilidad acuosa, la concentración de CDs utilizada pudo llegar hasta 100 mM. La solubilidad de naringenina aumentó de $0,14 \pm 0,03$ mM en ausencia de CDs (S_0) a $20 \pm 0,1$ mM con HP- β -CDs 100 mM (143 veces) y en el caso de hesperetina de $0,03 \pm 0,01$ mM en ausencia de CDs (S_0) a $14 \pm 0,05$ mM con HP β -CDs 100 mM (467 veces) (**Figuras V.3B**).

Si comparamos el incremento de solubilidad de las dos flavononas a la misma concentración de CDs (13 mM) para β - y HP- β -CDs, observamos que en el caso de naringenina, con β -CDs aumenta su solubilidad hasta 1.3 mM (9.3 veces) y con HP- β -CDs 3.5 mM (25 veces). En el caso de hesperetina, con β -CDs aumentó su solubilidad hasta 0.9 mM (30 veces) y con HP- β -CDs hasta 2 mM (67 veces). Este resultado indica que HP- β -CDs son más eficaces en la complejación de estas dos flavononas que β -CDs.

El aumento de la solubilidad de ambas flavononas, utilizando HP- β -CDs 100mM fue mucho mayor que el obtenido incrementando la temperatura de 20 a 90 °C (143 frente a 10 veces para naringenina y 467 frente a 20 veces para hesperetina). En el caso de β -CDs 13mM, el aumento de solubilidad fue similar al obtenido al aumentar la temperatura de 20 a 90 °C para ambos tipos de flavononas (9,3 frente a 10 veces para naringenina y 30 frente a 20 veces para hesperetina).

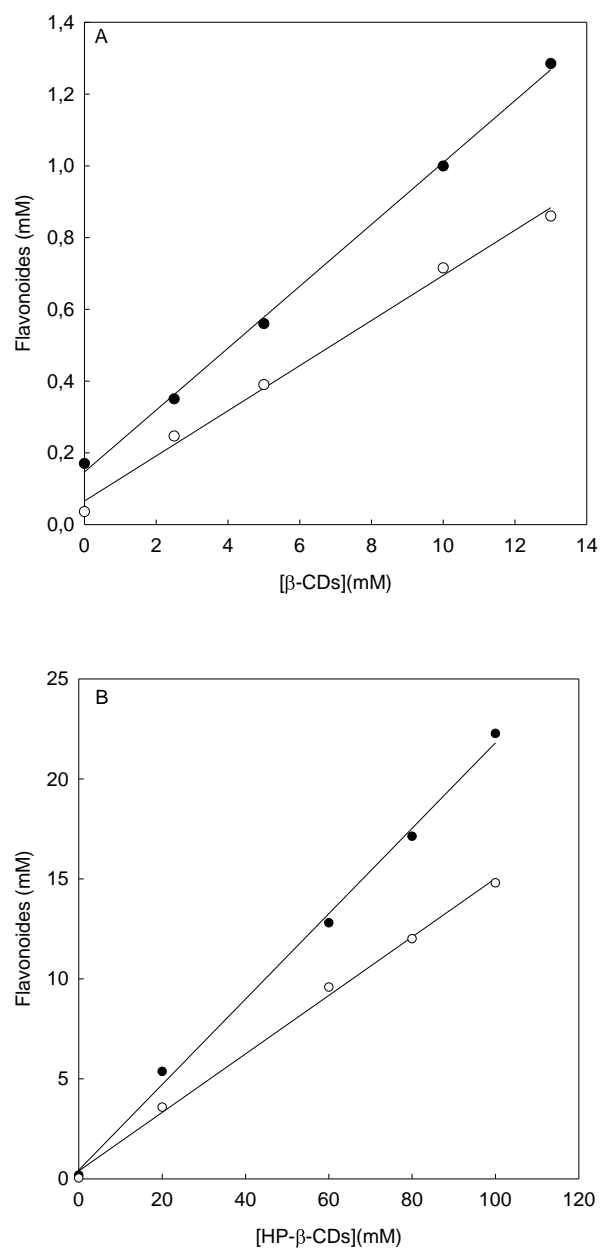


Figura V.3: Diagrama de fases de naringenina (●) y hesperetina (○) en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 6,5) con β -CDs (A) y HP- β -CDs (B).

Como se observa en las **Figuras V.3.A** y **V.3.B**, los diagramas de fases obtenidos para los dos tipos de CDs estudiados (β - y HP- β -CDs), fueron de tipo A_L , mostrando una relación lineal entre la concentración de flavanona en disolución y la concentración de CDs en el medio. Además, el valor de las pendientes de las rectas fueron menor que 1 en todos los casos, indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados era 1:1.

Los valores de K_c obtenidos tanto para naringenina como para hesperetina fueron mayores en el caso de HP- β -CDs ($1.786 \pm 385 \text{ M}^{-1}$ para naringenina y $4.651 \pm 525 \text{ M}^{-1}$ para hesperetina) que en el caso de β -CDs ($681 \pm 77 \text{ M}^{-1}$ para naringenina y $1.123 \pm 101 \text{ M}^{-1}$ para hesperetina) (**Tabla V.1**). Estos resultados indicaron que los complejos formados entre naringenina o hesperetina y HP- β -CDs eran mucho más estables que los formados con β -CDs.

Tabla V.1 Constantes de complejación (K_c) para los complejos formados entre las flavanonas (naringenina y hesperetina) y los dos tipos de CDs (β - y HP- β -CDs) a diferentes pHs, usando diferentes métodos para su determinación.

	Flavanonas	K_c (M^{-1})					
		β -CDs			HP- β -CDs		
		pH 3,5	pH 6,5	pH 8,5	pH 3,5	pH 6,5	pH 8,5
Estudio de solubilidad	Naringenina	1.085 ± 108	681 ± 77	184 ± 44	1.515 ± 223	1.786 ± 385	225 ± 37
	Hesperetina	932 ± 189	1.123 ± 101	410 ± 41	3.546 ± 216	4.651 ± 525	403 ± 29
Estudio de absorbancia	Naringenina	1.538 ± 268	605 ± 54	286 ± 50	962 ± 183	1.154 ± 285	287 ± 40
	Hesperetina	1.253 ± 145	1.071 ± 91	333 ± 37	3.286 ± 221	3.800 ± 369	428 ± 32

Estos resultados indicaron que la adición de grupos hidroxipropilo a β -CDs favorece el atrapamiento de naringenina y hesperetina en la cavidad hidrofóbica de las CDs. Este resultado fue similar al obtenido para otros flavonoides como resveratrol (Lucas-Abellán y col., 2008 a Lucas-Abellán y col., 2008 b; Mercader-Ros y col., 2010) en cuyo caso las CDs modificadas de β - también mostraron valores de K_c más altos que las nativas.

Los valores de K_c muestran la fortaleza de la interacción entre naringenina o hesperetina y β - o HP- β -CDs, permitiendo comparar la afinidad de cada flavanona por las CDs nativas o sus modificadas. Sin embargo, con el fin de estudiar con mayor precisión el efecto de los dos tipos de CDs (β - o HP- β -CDs) sobre la solubilidad de naringenina y hesperetina, se calculó su eficacia de complejación (CE).

CE representa la relación molar entre la concentración de CDs libres y complejadas (Loftsson y col., 2007), teniendo en cuenta para su cálculo tanto la solubilidad acuosa de la flavanona como la K_c . Para los complejos que presentan una estequiometría 1:1, CE se puede calcular a partir de la pendiente del diagrama de fases mediante la siguiente ecuación:

$$CE = S_0 * K_c = \frac{\text{pendiente}}{1-\text{pendiente}} = \frac{[F-CDs]}{[CDs]} \quad [V.1]$$

siendo [F-CDs] la concentración de complejo soluble, [CDs] la concentración de CDs libres disueltas y pendiente es la pendiente del diagrama de fases.

Los valores de CE obtenidos para naringenina y hesperetina con β - o HP- β -CDs se muestran en la **Tabla V.2**. La comparación de los valores de CE obtenidos para cada flavanona, en lugar de los valores de K_c , es más significativa cuando se comparan diferentes tipos de CDs y condiciones experimentales. Como se observa en la **Tabla V.2**, los valores de CE obtenidos a pH 6,5 para naringenina y hesperetina, fueron mayores en el caso de HP- β -CDs que en el caso de β -CDs. Para naringenina, los valores de CE obtenidos fueron 9,53 % con β -CDs y 25 % con HP- β -CDs (2,6 veces mayor en el caso de HP- β -CDs). Para hesperetina, los valores de CE obtenidos fueron 3,37 % con β -CD y 13,9 % con HP- β -CDs (4,12 veces mayor en el caso de HP- β -CDs).

Los valores de CE también se utilizaron para calcular la relación molar en solución de naringenina: CDs o hesperetina: CDs, lo que puede correlacionarse con el aumento esperado de la solubilidad de naringenina o de hesperetina con diferentes tipos de CDs (**Ecuación V.2**) (Loftson y col., 2007):

$$\text{Flavanona: CDs} = 1: \left(1 + \frac{1}{CD}\right) \quad [\text{V.2}]$$

Los valores obtenidos para naringenina y hesperetina con β - o HP- β -CDs se muestran en la **Tabla V.2**. Comparando el efecto de β - o HP- β -CDs en la complejación de naringenina, a pH 6,5 HP- β -CDs fueron las más eficaces porque, mientras que en el caso de β -CDs, la relación molar fue 1:11, es decir, que por cada 11 moléculas de CDs en disolución 1 de ellas forma complejos solubles en agua con naringenina, en el caso de HP- β -CDs la relación molar fue 1:5, es decir, cada 5 moléculas de CDs en disolución una de ellas forma complejos solubles con naringenina (**Tabla V.2**). En el caso de hesperetina, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos para naringenina, siendo HP- β -CDs más efectivas que β -CDs (1:31 para β -CDs y 1:8 para HP- β -CDs) (**Tabla V.2**).

En resumen, HP- β -CDs fueron más eficaces que β -CDs a pH 6,5, en la complejación de naringenina y hesperetina como indicaron los valores CE y la relación molar (**Tabla V.2**). Además, los complejos formados por HP- β -CDs fueron más estables tal y como indicaron los valores de Kc obtenidos (**Tabla V.1**). Comparando los resultados obtenidos para ambas flavanonas, hesperetina formó compuestos más estables con β - y HP- β -CDs que naringenina ($Kc \text{ hesperetina} > Kc \text{ naringenina}$) (**Table V.1**). Sin embargo, naringenina fue más eficientemente complejada con ambos tipos de CDs que hesperetina ($CE \text{ naringenina} > CE \text{ hesperetina}$), ya que estos parámetros representan la relación entre CDs libres y complejadas. Esto puede ser debido a que la presencia del grupo -CH en posición 4 hace que hesperetina sea más hidrofóbica, lo que aumenta los valores de Kc para ambos tipos de CDs (**Tabla V.1**).

Table V.2 Solubilidad acuosa de las flavanonas a diferentes pHs y CE con diferentes tipos de CDs

Flavonoides		S ₀ (mM) pH 3,5	CE % pH 3,5	Molar Ratio	S ₀ (mM) pH 6,5	CE % pH 6,5	Molar Ratio	S ₀ (mM) pH 8,5	CE % pH 8,5	Molar ratio
β-CDs	Naringenina	9 · 10 ⁻³ ± 2 · 10 ⁻³	0,9	1:103	0,14 ± 0,03	9,53	1:11	2,83 ± 0,18	52	1:3
	Hesperetina	0,02 ± 0,01	1,86	1:55	0,03 ± 0,01	3,37	1:31	0,07 ± 0,02	22,87	1:36
HP-β- CDs	Naringenina	9 · 10 ⁻³ ± 2 · 10 ⁻³	1,36	1:74	0,14 ± 0,03	25	1:5	2,83 ± 0,18	63,7	1:3
	Hesperetina	0,02 ± 0,01	7,09	1:15	0,03 ± 0,01	13,9	1:8	0,07 ± 0,02	2,8	1:36

5.2.2.2 Cálculo de K_c mediante el método de Absorción

Con el fin de corroborar la validez de los valores de K_c obtenidos mediante los ensayos de solubilidad, los valores de K_c también se calcularon mediante el estudio de los cambios espectroscópicos de cada molécula tras su complejación.

Este método consiste en estudiar los cambios en el espectro de absorción de un compuesto una vez complejado. Como se muestra en las **Figuras V.4A y 4B**, el espectro UV-vis de naringenina y hesperetina presentó un máximo de absorción a 292 y 290 nm, respectivamente, cuyo valor de absorbancia se incrementó con la presencia de CDs en el medio de reacción.

En este tipo de ensayos, se trabajó con concentraciones de flavanonas por debajo de S_0 y se analizaron los cambios de absorbancia en su λ máxima tras su complejación con CDs. Estos estudios espectroscópicos se utilizaron para calcular los valores de K_c que gobiernan la formación de complejos entre las flavanonas y β - o HP- β -CDs.

Cuando se adicionaron concentraciones crecientes de CDs al medio de reacción, la absorbancia de las flavanonas aumentó, principalmente en su λ máxima (**Figuras V.4A y V.4B**). Este incremento se debió a la formación de complejos de inclusión entre cada flavanona y las CDs. Este efecto ha sido descrito previamente por nuestro grupo de investigación para otros compuestos fenólicos como resveratrol (Lucas-Abellán y col., 2008).

La representación de $1 / (A - A_0)$ frente a $1 / [CD]$ (gráfica doble recíproca), conocida como gráfica de Benesi-Hildebrand (**Figura V.4A insertada y V.4B insertada**), muestra una línea recta para ambos tipos de CDs (β - y HP- β -CDs), indicando una estequiometría 1:1 de los complejos formados. Esta relación lineal está de acuerdo con la descrita por la ecuación Benesi-Hildebrand [III.3] (**Capítulo materiales y métodos**). Los gráficos lineales de las **figuras insertadas V.4A y V.4B** se pueden usar para determinar los valores de K_c , simplemente dividiendo la intersección con el eje y por la pendiente, en cada una de ellas (**Tabla V.1**).

Como se muestra en la **Tabla V.1**, los valores obtenidos para K_c mediante estudios de solubilidad fueron similares a los obtenidos por el método de Benesi-Hildebrand, lo que indicó la validez de ambos métodos para el cálculo de los valores de K_c entre naringenina o hesperetina y β - o HP- β -CDs.

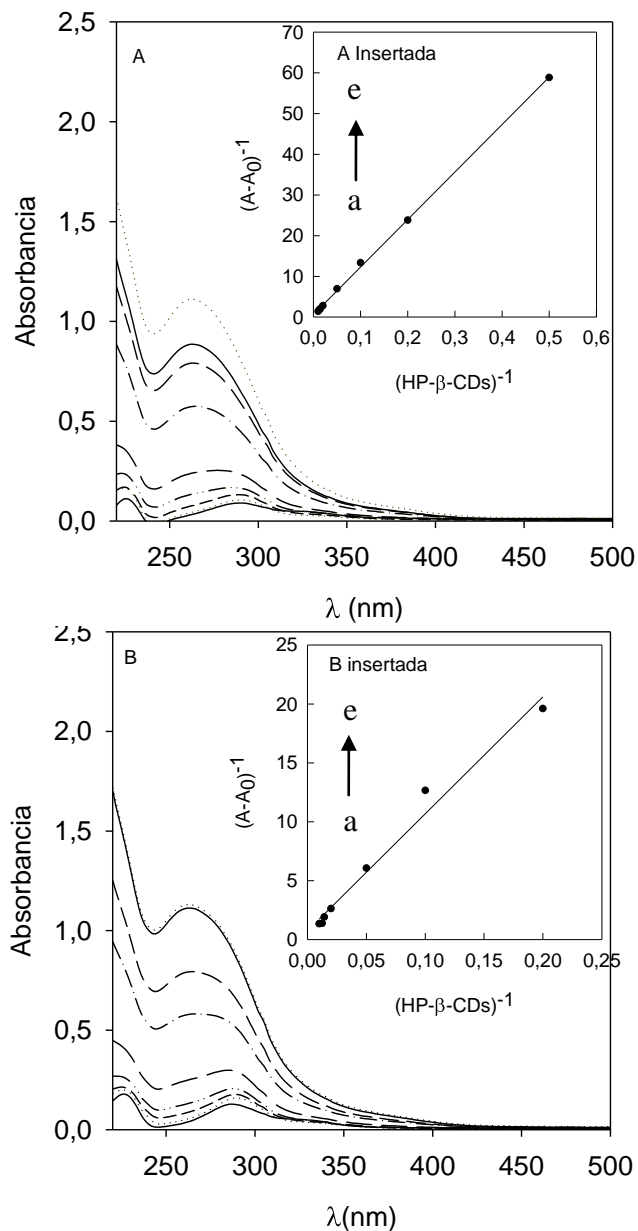


Figura V.4: (A) Espectro de absorción de naringenina con concentraciones crecientes de HP- β -CDs: (a) 0, (b) 0,1 (c) 0,25, (d) 0,5, (e) 0,75, (f) 1, (g) 2, (h) 3, and (i) 5 mM HP- β -CDs. (A insertada) Representación de Benesi-Hildebrand para naringenina. (B) Espectro de absorción hesperetina con concentraciones crecientes de HP- β -CDs: (a) 0, (b) 0,1 (c) 0,25, (d) 0,5, (e) 0,75, (f) 1, (g) 2, (h) 3, and (i) 5 mM. (B insertada) Representación de Benesi-Hildebrand para hesperetina.

5.2.2.3. Efecto del pH en el proceso de complejación

En este capítulo también se estudió el efecto del pH, ácido (3,5) o básico (8,5) en la complejación de naringenina y hesperetina con β - o HP- β -CDs.

Los valores de pH del medio determinan la presencia de flavanonas protonadas o no en la disolución, influyendo en su solubilidad acuosa y, consecuentemente, en el proceso de complejación. En todos los pHs estudiados (3,5, 6,5 y 8,5), los diagramas de fases obtenidos fueron tipo A_L , con pendientes menor que 1, indicando una estequiometría 1:1 entre naringenina y hesperetina con β - o HP- β -CDs (**Figura V.5**). Los valores de K_c obtenidos utilizando la ecuación de Higuchi y Connors tanto para naringenina como para hesperetina fueron mayores a pH ácido (3,5) que a pH básico (8,5) (**Tabla V.1**). Los resultados indicaron que la forma protonada de ambas flavanonas formó complejos más estables con β - o HP- β -CDs que su forma desprotonada. La disminución significativa en los valores de K_c a pH básico (8,5), también se debe a que el balance característico existente para estos compuestos entre las formas de flavanona (anillo C cerrado) y chalcona (anillo C abierto) comienza a moverse significativamente hacia la forma de chalcona a pH básico, presentando una mayor solubilidad acuosa (de $9,10^{-3} \pm 2,10^{-3}$ mM a pH 3,5 pasa a $2,83 \pm 0,18$ mM a pH 8,5 en el caso de naringenina y de $0,02 \pm 0,02$ mM a pH 3,5 pasa a $0,07 \pm 0,02$ mM a pH 8,5 en el caso de hesperetina) (**Tabla V.2**). La diferencia entre la solubilidad acuosa de naringenina y hesperetina a pH 3,5 y 8,5 indujo una disminución drástica de los valores de K_c con β -CDs (de 1.085 ± 108 M⁻¹ a pH 3,5 a 184 ± 44 M⁻¹ a pH 8,5) y HP- β -CDs (de 1.515 ± 223 M⁻¹ a pH 3,5 a 225 ± 37 M⁻¹ a pH 8,5) (**Tabla V.1**).

Como se puede observar en la **Tabla V.1**, también es importante resaltar que a pHs 3,5 y 6,5 los valores de K_c obtenidos entre naringenina o hesperetina fueran mayores para HP- β - que para β -CDs, indicando la formación de complejos más estables con HP- β -CDs. Sin embargo, a pH básico (8,5), debido al aumento de la solubilidad de las flavanonas debido a su transformación en chalconas, los valores de K_c no fueron tan superiores para HP- β -CDs, como podría esperarse.

Como la solubilidad acuosa de las flavanonas y los valores de K_c variaron con el pH del medio, los parámetros CE y relación molar también se vieron afectados. En el caso de naringenina, la CE aumentó notablemente con el pH tanto para β -CDs (de 0,9 % a pH 3,5 a 52 % a pH 8,5), como para HP- β -CDs (de 1,36 % a

pH 3,5 a 63,7 % a pH 8,5). En el caso de hesperetina, los valores de CE variaron ligeramente con el pH (Tabla V.2). Los valores más altos de CE obtenidos a pH 8,5 fueron 63,7 % y 52 % para naringenina con HP- β - y β -CDs, respectivamente, indicando que a este pH una de cada 3 moléculas en solución de β - o HP- β -CDs está formando complejos solubles en agua con naringenina (relación molar 1:3) (Tabla V.2).

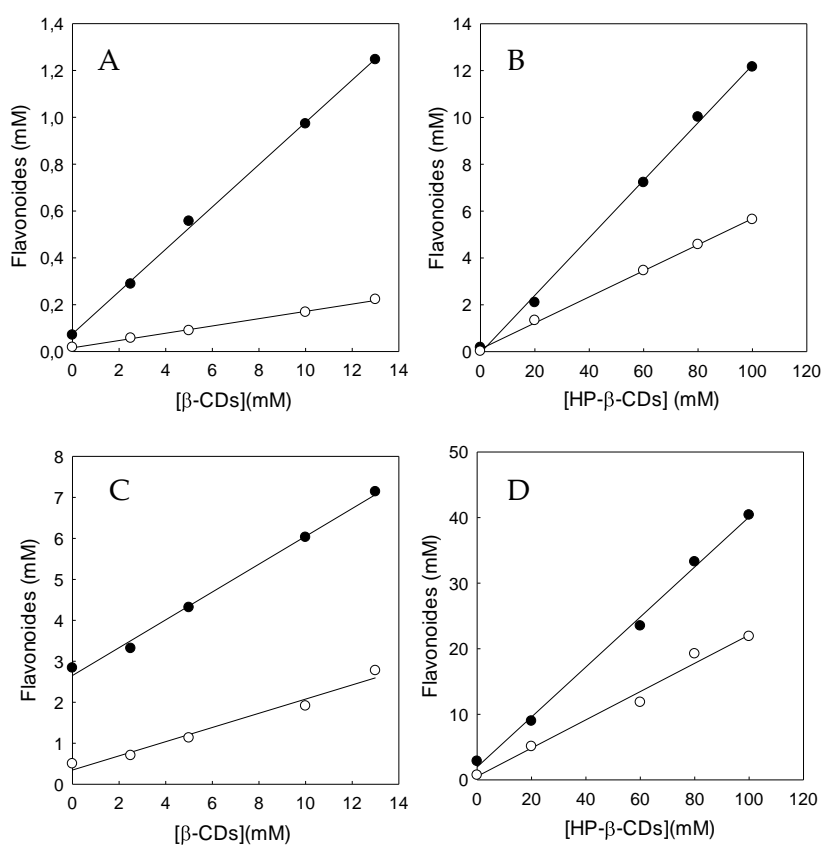


Figura V.5: Diagrama de fases de naringenina (●) y hesperetina (○) en tampón acetato de sodio 100 mM (pH 3,5) con β - (A) o HP- β -CDs (B) y tampón borato de sodio 100 mM (pH 8,5) con β - (C) o HP- β -CDs (D).

5.2.3. Estabilidad de naringenina y hesperetina en solución acuosa

Otro parámetro estudiado fue la estabilidad en disolución acuosa de naringenina y hesperetina a diferentes pHs (3,5, 6,5 y 8,5) en ausencia y presencia de β - y HP- β -CDs.

Como se puede observar en la **Figura V.6A**, la concentración de naringenina permaneció estable durante 48 horas a todos los pHs estudiados (3,5, 6,5 y 8,5). En el caso de hesperetina, su estabilidad se vio afectada con el tiempo a pH 3,5 (●) y 6,5 (◊), manteniendo su estabilidad a pH 8,5 (◻).

Para determinar si la pérdida de hesperetina con el tiempo a pH 3,5 y 6,5 se debió a su transformación en otro compuesto o a la precipitación de la propia flavanona, se analizó el perfil cromatográfico de la solución. Como se observa en la **Figura V.7** el cromatograma de la disolución no cambió con el tiempo, lo que indicaba que naringenina no se estaba transformando en otro compuesto, sino que precipitaba debido a su baja solubilidad acuosa a ambos pHs. A pH básico (8,5) la solubilidad de hesperetina aumenta significativamente debido a un cambio en la estructura de chalcona-flavanona con mayor estabilidad.

También se estudió la estabilidad de naringenina y hesperetina disueltas en medios tamponados a diferentes pHs (3,5, 6,5 y 8,5) en presencia de β - o HP- β -CDs. En el caso de naringenina, en presencia de CDs, fue estable durante 48 h al igual que ocurría en ausencia de CDs (**Figura V. 6C y V. 6E**). Con respecto a hesperetina, la presencia de β - o HP- β -CDs permitió su estabilización a pH 3,5 y 6,5 (**Figuras V. 6D y V. 6F**). Este proceso de estabilización se debió a la complejación de hesperetina en la cavidad hidrofóbica de CDs tanto nativas como modificadas de β -CDs.

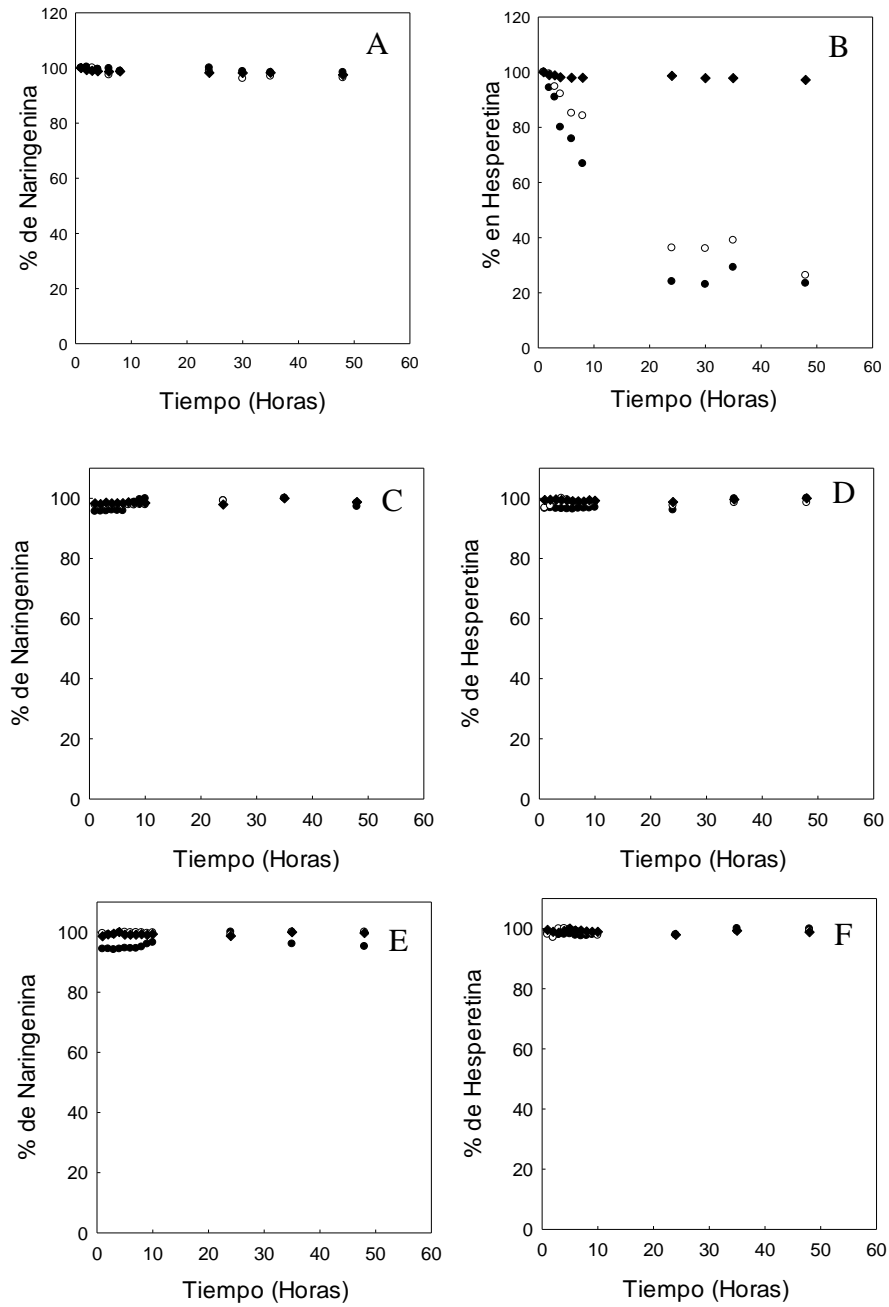


Figure V.6: Tiempo de pérdida de naringenina (A) y hesperetina (B), naringenina con β -CDS (C), hesperetina con β -CDS (D), naringenina con HP- β -CDs (E) y hesperetina con HP- β -CDs (F) en diferentes soluciones acuosas de tampón acetato de sódico 100 mM (pH 3,5) (●) tampón fosfato sódico 100 mM (pH 6,5) (○) y tampón borato sódico 100 mM (pH 8,5) (◆).

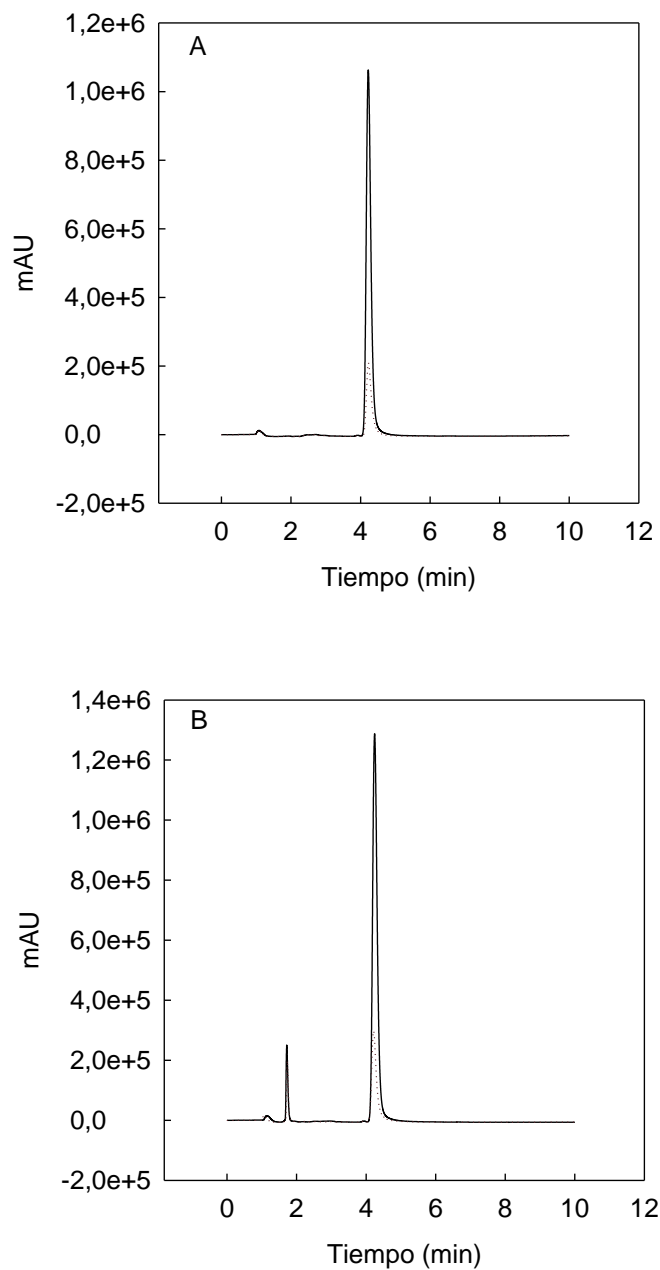


Figure V. 7: (A) Cromatograma de naringenina en disolución en tampón acetato sódico 100 mM (pH 3,5) a 1h (-) y 48h (...). (B) Cromatograma de hesperetina en disolución acuosa tampón acetato sódico 100 mM (pH 3,5) a 1h (-) y 48h (...).

Por lo tanto, en el caso de naringenina y hesperetina, la forma desprotonada de naringenina a pH 8,5 fue la más eficientemente encapsulada por β - y HP- β -CDs mientras que la forma desprotonada de hesperetina a pH 8,5 formó los complejos más estables con HP- β -CDs, mostrando el valor K_c más alto.

Por otra parte, la complejación de hesperetina con β - y HP- β -CDs estabiliza a la flavonona en disolución a pH 3,5 Y 6,5.

**CAPÍTULO – VI: EFECTO DE LA
COMPLEJACIÓN DE APIGENINA,
NARINGENINA Y HESPERETINA
EN β - Y HP- β -CDS SOBRE SU
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

CAPITULO VI: EFECTO DE LA COMPLEJACIÓN DE APIGENINA, NARINGENINA Y HESPERETINA EN B- Y HP-B-CDS SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.1 INTRODUCCIÓN

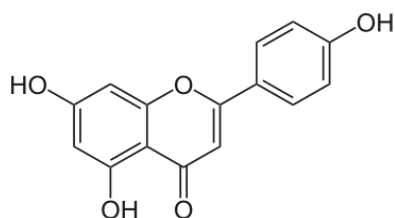
Los flavonoides son un grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por el premio Nobel en Bioquímica Albert Szent-Gyorgi en 1937, quien les denominó como “vitamina P”.

En las últimas dos décadas, las actividades biológicas de los flavonoides ha sido objeto de estudio de muchas investigaciones, lo que ha demostrado que poseen una serie de propiedades beneficiosas para la salud, incluyendo las actividades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Galati y O'Brien, 2004; Hertog, Feskens y Kromhout, 1997). Estudios epidemiológicos indican que la ingesta de alimentos ricos en flavonoides en cantidad suficiente, puede mejorar la salud cardiaca, reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer y ralentizar el proceso de envejecimiento (Erlund, 2004).

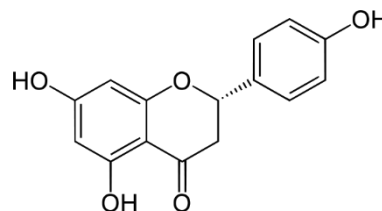
En este capítulo, se estudió el efecto de la formación de complejos de inclusión de apigenina, naringenina y hesperetina (**Figura VI.1.**) con CDs sobre su actividad antioxidante, por el método ORAC-FL descrito por Lucas-Abellán y col. en 2008. Estas tres flavanonas fueron seleccionadas para el estudio de la actividad antioxidante debido a sus propiedades químicas biológicas y su disponibilidad ciertos vegetales y en cítricos.

Las 3 flavanonas presentan diferencias estructurales, tal y como se muestra en la **Figura VI.1.** Tomando como referencia estructural a naringenina, apigenina se diferencia de esta en el doble enlace que presenta en el anillo C; y hesperetina se diferencia de naringenina en el grupo metilo y OH que presenta en posición C4 y y OH en posición C5 del anillo B. Debido a las diferencias estuturales que

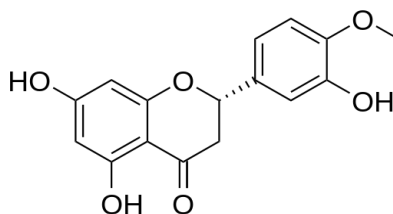
presentan su capacidad antioxidante también va a ser diferente por la capacidad que tienen para deslocalizar electrones.



Apigenina



Naringenina



Hesperetina

Figura VI.1: Estructura química de apigenina, naringenina y hesperetina

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 Medida de actividad antioxidante

El estudio se comenzó mediante el análisis de la capacidad antioxidante de los tres flavonoides: apigenina, naringenina y hesperetina por el método ORAC-FL descrito por Lucas-Abellán y col., 2008, en ausencia de CDs. Este estudio se realizó en un medio tamponado a pH 7.4 y cuyo volumen final de las muestras era 200 μ L. La capacidad antioxidante de los compuestos fue expresada como equivalentes de trolox (μ M) por la inhibición que provocan en la oxidación de la FL y fue cuantificada al integrar el área bajo la curva de caída de FL (AUC) que se obtuvo en cada caso, como se puede observar en la **Figura VI.2** que muestra la curva de caída de hesperetina, utilizando la **Ecuación III.5.**, tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos (Capítulo III) (las curvas de caída de la

fluoresceína de apigenina y naringenina son similares a las de hesperetina y por ello no se muestran en este capítulo).

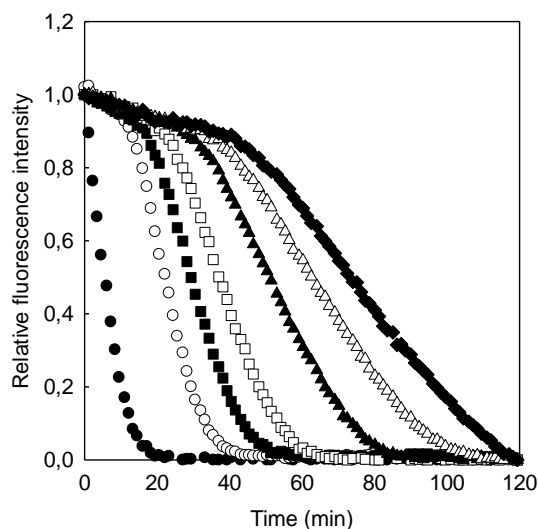


Figura VI.2.: Área bajo la curva de caída de la FL inducida por el radical AAPH de hesperetina a diferentes concentraciones: blanco (●), 0,750 mM (○), 1,125 μ M, (■), 1,875 mM (□), 2,25 mM (▲) y 2,625 mM (Δ).

Como se puede observar en la **FiguraVI. 3** todos los flavonoides mostraron una relación lineal entre su concentración y su actividad antioxidante. Además se puede observar que la pendiente de los tres flavonoides es mayor de 1 μ M indicando que su capacidad antioxidante es mayor que la del trolox, ya que la pendiente del trolox es 1 μ M mientras que la de apigenina es de 8,69 μ M, la de hesperetina es de 9,16 μ M y la de naringenina es de 11,92 μ M, por lo que presentaron una actividad antioxidante de 8 a 12 veces mayor que la de Trolox C.

Naringenina (**FiguraVI. 3**, (○)) presentó una capacidad antioxidante superior a hesperetina (**FiguraVI. 3**, (■)) (que presenta un grupo metilo en posición C4' del anillo B) y a apigenina (**FiguraVI. 3**, (●)) (que posee doble enlace en el anillo C y ausencia de grupo metilo en el anillo B). Los resultados obtenidos para cada una de las flavanonas (naringenina > hesperetina > apigenina), nos indicaron que la ausencia del grupo metilo en el anillo B, junto con la ausencia del doble enlace del anillo C, favorece la capacidad antioxidante en estos compuestos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Mercader-Ros y

col., 2012 para el estudio de capacidad antioxidante de kampferol, quercetina y miricetina, ya que el que presentó una mayor capacidad antioxidante fue kaempferol que posee un único -OH en el anillo B, al igual que naringenina.

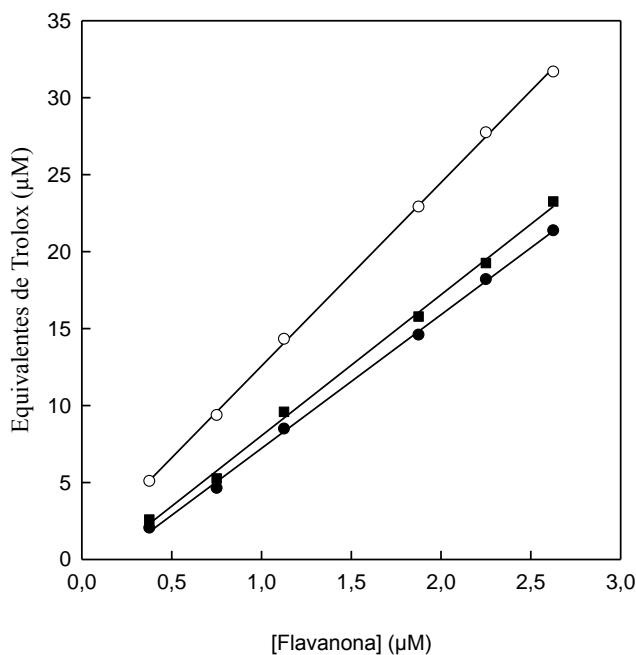


Figura VI. 3.: Actividad antioxidante de apigenina (●), naringenina (○) y hesperetina (■) a diferentes concentraciones, expresados en equivalentes de Trolox (mM).

Una vez estudiada la capacidad antioxidante de cada una de las flavanonas en ausencia de CDs, se procedió al estudio de dicho parámetro de cada una de ellas en presencia de β -CDs y HP- β -CDs.

El resultado obtenido fue que en presencia de CDs aumentó en el área bajo la curva de caída de FL en todos los casos estudiados. La **Figura VI.4** muestra el resultado obtenido en el caso de hesperetina. En ella se puede observar como en ausencia de CDs, la curva de la caída de la FL describe un área inferior (**Figura VI.4**, ○) a la obtenida en presencia de β -CDs (**Figura VI.4**, ●) o HP- β -CDs (**Figura VI.4**, □). Tal y como se observa en esta figura, en presencia de CDs se alarga el

tiempo de presencia de la FL en el medio, ya que disminuye la pendiente de caída desde el inicio.

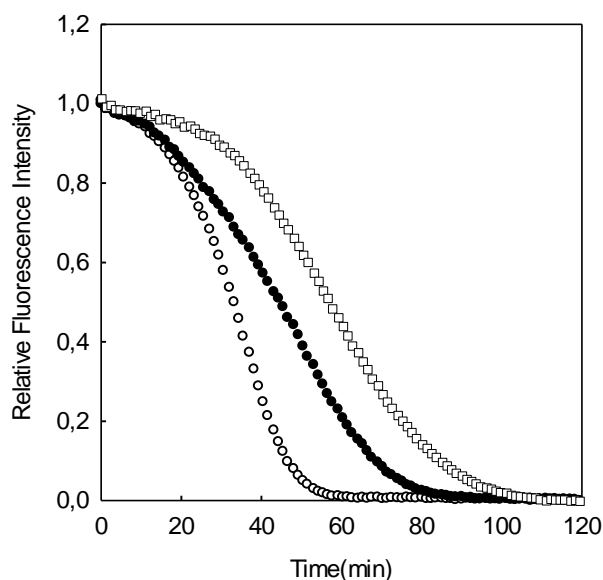


Figura VI.4.: Área bajo la curva de caída de la FL, en presencia de hesperetina (0,5mM (○) con 1,75 mM de β -CDs (●) 1,75 mM de HP- β -CDs (□).

El área bajo la curva obtenida mediante el método ORAC-FL, combina el grado de inhibición de la curva de la fluoresceína con el tiempo en un sólo dato.

Para determinar si este aumento en el área bajo la curva era producido por la complejación del flavonoide en la cavidad hidrofóbica de las CDs, se añadieron concentraciones crecientes de CDs al medio de reacción y se estudiaron los resultados obtenidos.

Cuando se adicionaron concentraciones crecientes de β -CDs o HP- β -CDs al medio de reacción, conteniendo cada uno de los flavonoides estudiados, y se calculó el Net AUC, en cada caso, usando la **Ecuación III.16.**, se observó que conforme aumentaba la concentración de CDs aumentaba la capacidad antioxidante hasta que las CDs complejaron completamente el flavonoide en cuyo

momento la capacidad antioxidante permaneció constante, por lo que había llegado a saturación. (**Figuras VI.5-VI.10**). Estos resultados apuntaban hacia el efecto protector de las CDs sobre cada flavonoide tras su complejación.

Como se puede observare en la **Figuras VI.5-VI.10** con una concentración de β - o HP- β -CDs aproximadamente 1 mM se alcanza una meseta en la capacidad antioxidante, lo que indica que toda la flavanona ha sido complejada por las CDs, por lo que deja de estar disponible para el radical AAPH y a partir de ahí la actividad antioxidante es independiente de la concentración de CDs en el medio.

En el nivel de saturación, se observó que cada flavanona presentaba una capacidad antioxidante entre dos y cuatro veces mayor en presencia de CDs que en su ausencia (**Figuras VI.5-VI.10**). Este aumento en la actividad antioxidante estaba provocado por la protección de las CDs al complejar las flavanonas frente al ataque por los radicales libres.

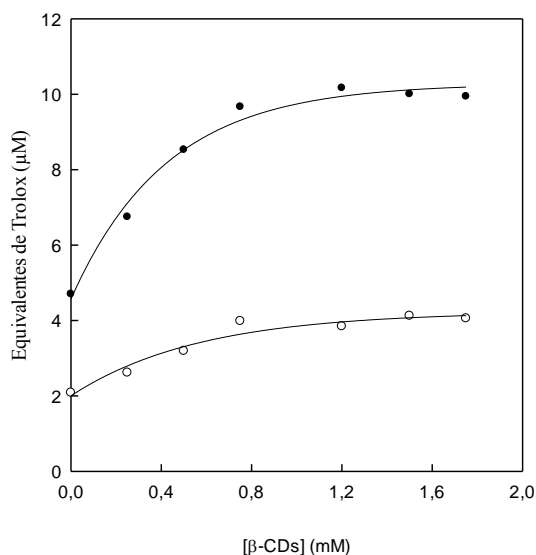


Figura VI.5.: Efecto de la concentración de β -CDs en la capacidad antioxidante de apigenina. (○) 0,375 μ M y (●) 0,75 μ M de apigenina.

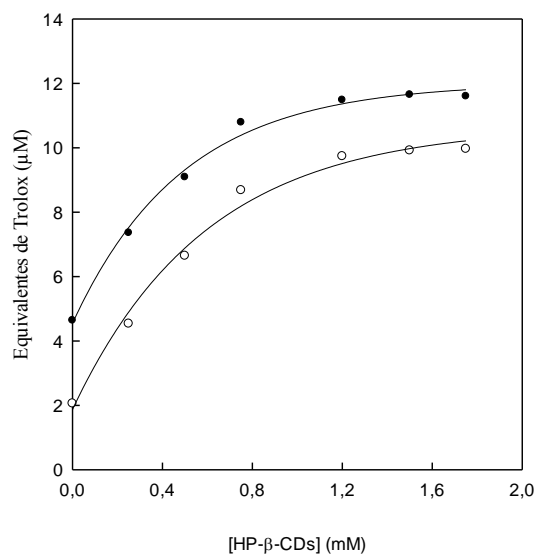


Figura VI.6.: Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la capacidad antioxidante de apigenina. (○) 0,375 μM y (●) 0,75 μM de apigenina.

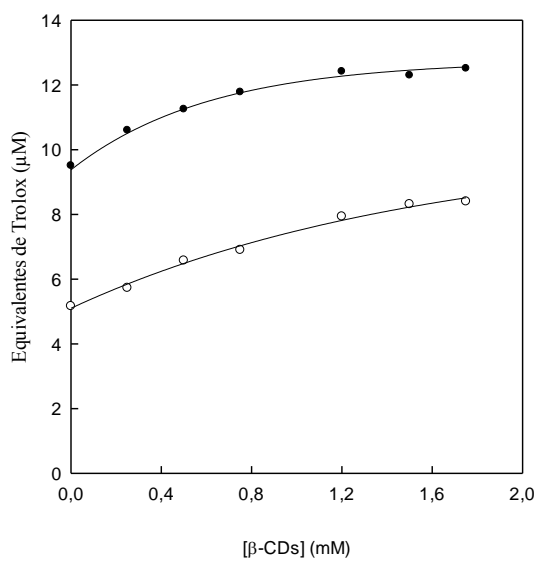


Figura VI.7.: Efecto de la concentración de β-CDs en la capacidad antioxidante de naringenina. (○) 0,375 μM y (●) 0,75 μM de naringenina.

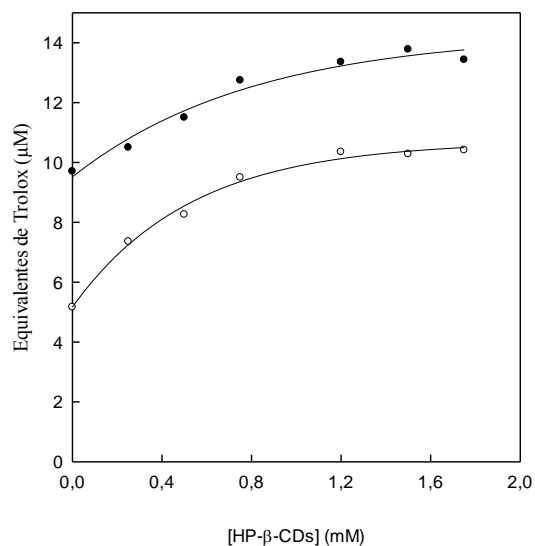


Figura VI.8.: Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la capacidad antioxidante de naringenina. (○) 0,375 μM y (●) 0,75 μM de naringenina.

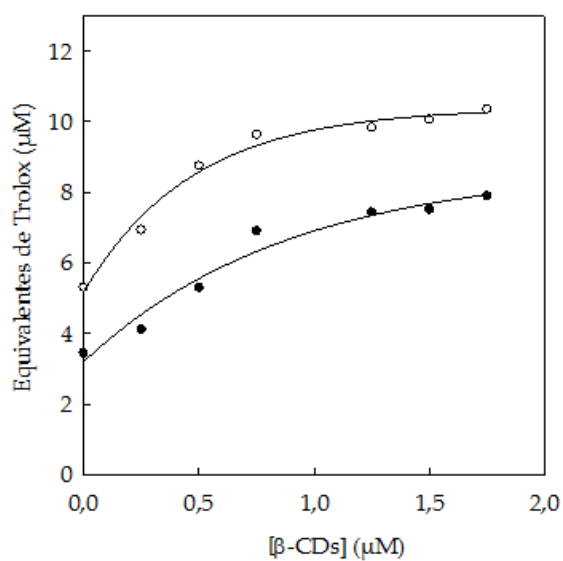


Figura VI.9.: Efecto de la concentración de β-CDs en la capacidad antioxidante de hesperetina. (●) 0,375 μM y (○) 0,75 μM de hesperetina.

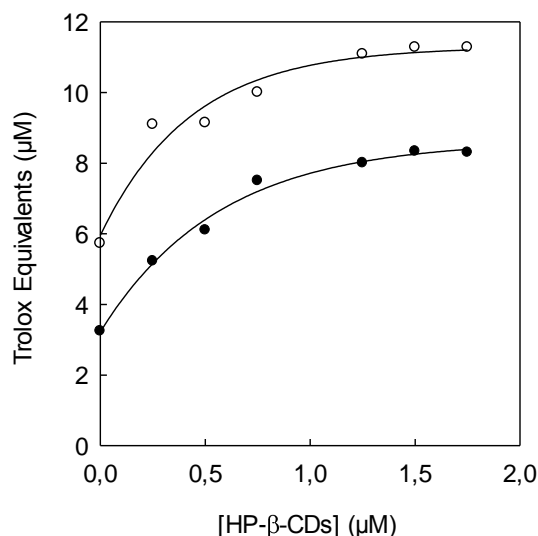


Figura VI.10.: Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la capacidad antioxidante de hesperetina. (●) 0,375 μM y (○) 0,75 μM de hesperetina.

Este estudio (**Figuras VI.5-VI.10**) siempre se realizó a concentraciones de flavonoide por debajo de su límite de solubilidad, por lo que el aumento de la capacidad antioxidante no se debe al aumento de la solubilidad del flavonoide al ser complejoado por las CDs, como se ha descrito en otro estudio para el licopeno (Bangalore y col., 2005) y α -tocoferol (Huang y col., 200).

Como se puede observar en las **Figuras VI.5-VI.10**, comparando el incremento la capacidad antioxidante de las tres flavanonas (apigenina, naringenina y hesperetina) en presencia de CDs, se observó una diferencia importante, entre el efecto provocado por β -CDs y HP- β -CDs, siendo la capacidad antioxidante mayor en presencia de HP- β -CDs para todas las flavanonas estudiadas. En el caso de apigenina en presencia de β -CDs aumentó su capacidad antioxidante 2 veces frente a 4 veces que lo hizo con HP- β -CDs (**Figuras VI.5 y VI.6**, respectivamente). En el caso de naringenina en presencia de β -CDs aumentó su capacidad antioxidante 2 veces frente a 3 veces que lo hizo con HP- β -CDs (**Figuras VI.7 y VI.8**, respectivamente). Y en el caso de hesperetina, en presencia de β -CDs aumentó su capacidad antioxidante 2 veces frente a 4 veces que lo hizo con HP- β -CDs (**Figuras VI.9 y VI.10**, respectivamente).

El incremento de la actividad antioxidante en los tres flavonoides estudiados, está íntimamente relacionado con los valores de K_c ($4.116 \pm 297 \text{ M}^{-1}$ para apigenina, $1.786 \pm 385 \text{ M}^{-1}$ para naringenina y $4.651 \pm 525 \text{ M}^{-1}$ para hesperetina). Ya que naringenina presentó la mayor actividad antioxidante en ausencia y en presencia de CDs, siendo apigenina la que presentó valores mas bajos en los dos casos pero con poca diferencia con hesperetina.

En resumen, la capacidad antioxidante de los tres compuestos fenólicos aumenta cuando son complejados en los dos tipos de CDs, presentando una mayor capacidad antioxidante cuando son complejados con HP- β -CDs. De los tres compuestos fenólicos estudiados, el que presentó una mayor capacidad antioxidante fue naringenina.

CAPÍTULO VII – CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los estudios realizados en la presente tesis doctoral han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Cambios en los sustituyentes y, en general, en la estructura de los flavonoides afectan a su capacidad para formar complejos de inclusión con ciclodextrinas. El efecto relativo más intenso de estos cambios está relacionado con 3 elementos del anillo C de la estructura del flavonoide: presencia del grupo carbonilo en la posición 4, presencia/ausencia de un doble enlace en la posición C2=C3 y presencia de un grupo OH en la posición 3. Por otra parte, los sustituyentes presentes en el anillo B, también tienen un efecto sobre la complejación.
2. Tanto β -, como HP- β -CDs forman complejos estables, con estequiometría 1:1 con naringenina y hesperetina. Además, no siempre los valores más altos de constante de complejación, implican una mayor eficacia de complejación (CE), debido a la influencia de la solubilidad acuosa del compuesto sobre el valor de la constante. Por ello, es más preciso utilizar el valor de CE para estudiar el efecto del pH en la complejación de flavanonas.
3. La complejación de flavanonas en ciclodextrinas aumenta su capacidad antioxidante debido al efecto protector de las CDs sobre el ataque por radicales libres. Este efecto es de máximo interés para la industria alimentaria, ya que el efecto beneficioso para la salud de estas flavanonas, se puede ver incrementado en determinados alimentos, sin necesidad de incrementar la cantidad de compuesto, ya que las ciclodextrinas actúan como un reservorio de liberación controlada de compuesto.

CAPÍTULO VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aherne, S.A. and O'Brien, N.M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*. **2002**, 18, 75-81.
- Ames, L.S. Gold, W.C. Willett, The causes and prevention of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**. 92, 5258–5265 an Ommen. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arenas. *Nutrition*. **2004**, 20(1), 4-8.
- Anand, A.B. Kunnumakara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, S.T. Tharakan, O.S. Lai, B. Sung, B.B. Aggarwal, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharm. Res.* **2008**. 58, 2097–2116.
- Angell, W. F., France, P. A. Detergent composition having granular cyclodextrin. *PCT Int Appl WO 01 18,163*. **2001**.
- Antlsperger, G., Schmid, G., Toxicological comparison of cyclodextrins. In: Szente, I. (Eds.), *Proceeding of the Eight International Symposium on cyclodextrinsspinger*. The Netherlands, **1996**. P.P. 149 – 155.
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., Biondi, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*. **2007**, 78, 345-352.
- Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. **2005**, 81, 317S-325S
- Atwood, J. L. Inclusion phenomenon and molecular recognition. New York: Plenum. **1990**.
- Baldasquin-Caceresa, F.J. Gomez-Garciaa, P. López-Jornetb, , , J. Castillo-Sanchezc, V. Vicente-Ortegaa. Chemopreventive potential of phenolic compounds in oral carcinogenesis archives of Oral Biology. **2014**. 59, 1101–1107
- Baluchne jadmoharad, T., Roghani, M., Effect of naringenin on intra cerebro ventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rat: a be havi oral analysis. *Pharmacology* **2006**. 78, 193–197.
- Bangalore, D. V., McGlynn, W., Scott, D. D. Effect of β -cyclodextrin in improving the correlation between lycopene concentration and ORAC values. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1878-1883.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., Marzona, M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with beta-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 27, 709–713.

- Barr, R. C., Spach, M. S. Inverse calculation of QRS-T epicardial potentials from body surface potential distributions for normal and ectopic beats in the intact Dog. *Circ. Res.* **1978**, 42, 661-675.
- Basan, C. Quantitative determination of piroxicam in a new formulation (piroxicam - β - cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *J. Pharm. Medical Anal.* **2001**, 26, 171-178.
- Beltowski. synthetic lxr agonist, increases plasma paraoxonase 1 activity in rats with experimental hyperleptinemia through the antiinflammatory mechanism. *Atherosclerosis Supplements.* **2009**, 10, 2, 1176
- Benavente-García and J. Castillo J, Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity, *J. Agri. Food Chem.* **2008**. 56, 6185-6205.
- Benavente-García, J, Castillo, J. Lorente, A. Ortuño, J.A. Del Rio, Antioxidant activity of phenolics from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chem.* 68 **2000** 457–462.
- Benavente-García, J. Castillo, F.R. Marín, A. Ortuño, J.A. Del Rio, Uses and Properties of Citrus Flavonoids, *J. Agri. Food Chem.* 45 **1997**. 4505-4515.
- Benesi, H. A., Hildebrand, J. H. A spectrophotometric investigation on the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703–2707.
- Besler, K.M. Merz, P.A. Kollman, Atomic charges derived from semiempirical methods, *J. Comput. Chem.* **1990** 11, 431-439.
- Bhardwaj, R., Dorr, R. T., Blanchard, J. Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclo-dextrins. *J Pharm Sci Technol.* **2000**, 54, 233–239.
- Bhattamisra Subrat Kumar, Ganesh Patro and Bijay Kumar Mohanty. Effects of *Mimosa pudica* L. leaves extract on anxiety, depression and memory. *Avicenna J Phytomed.* **2016**, 6(6), 696–710
- Bilensoy, E.; Hincal, A. A. Expert Opin. Drug Delivery **2009**. 6, 1161.
- Bjeldanes LF, Chang GW. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science.* **1977**, 5, 577-8.
- Boffetta, Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence, *Mutat. Res.* **2006**. 608, 157–162.

- Bok SH, Lee SH, Choi MS, y col., Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* **1999**, 5, 129-1182.
- Brandariz, Isabel; Iglesias, Emilia. Local Anesthetics: Acid-base Behaviour and Inclusion with Cyclodextrins *Current Organic Chemistry*. **2013**,17, 24. 3050-3063(14)
- Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. **1998**, 56, 317-333.
- Breslow, R., Hammond, M., Lauer, M. Selective Transamination and optical Induction by a Beta-cyclodextrin-pyridoxamine artificial enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 421-425.
- Buendenbender, S., Schulz, G. E., Sstructural base for enzymatic cyclodextrins hydrolysis *J. Mol. Biol* **2009**. 385 (2), 606 – 617.
- Buschmann, H. J., Schollmayer, E. Application of ciclodextrins in cosmetic products: a review. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, 53, 185-191.
- Butterfield, D.A., Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* **2004**, 1000, 1–7.
- Caesar, G. V. The Schardinger dextrans. In *Starch and its Derivatives*, 4th ed.; Radley, J. A., Ed.; Chapman and Hall Ltd.: London,; Chapter X, **1968**.p 290.
- Calani, L., Dall'Asta, M., Derlindati, E., Scazzina, F., Bruni, R., Del Rio, D. Colonic metabolism of polyphenols from coffee, green tea, and hazelnut skins. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **2012**, 46, 95–99.
- Challa R, Ahuja A, Ali J and Khar RK Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech* **2005**. 6 (2): 329-357.
- Chen, Y.C. Chen, A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human
- Chilajwar, S. V.; Pednekar, P. P.; Jadhav, K. R.; Gupta, G. J. C.; Kadam, V. J. *Expert Opin. DrugDelivery* **2014**. 11, 111.
- Chopra, M., Fitzsimons, P. E. E., Strain, J. J., Thurnham, D. I., Howard, A. N. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clinical Chem.* **2000**, 46, 1162-1170.
- Chunying Luo, Xiaoli Zou, Yuanqian Li, Chengjun Sun, Yan Jiang, Zhiyun Wu. Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed

- phase high performance liquid chromatography with diode array detection Original Research Article Food Chemistry, **2011**. 127, 314-320
- Clausen, T. P., Reichardt, P. B., Bryant, J. P., Provenza, F. Condensed tannins in plant defense: a perspective on classical theories. In: Plant Polyphenols. Synthesis, properties, significance. Hemingway, R.W., Lanks, P.E., Eds.; Plenum Press: *New York*, **1992**, 639-652.
- Clere, S. Faure, M. Carmen Martinez, R. Andriantsitohaina, Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis, Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. **2011**. 9, 62-77.
- Comini, S., Mentink, L. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat. Appl. EP 440539*. **1991**.
- Connors, K. A. Binding Constants. Wiley: New York, **1987**, 103-108.
- Constantin RP, do Nascimento GS, Constantin RP, Salgueiro CL, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Yamamoto NS, Constantin J. Citrus flavanones affect hepatic Fatty Acid oxidation in rats by acting as prooxidant agents. *Biomed Res Int*. **2013**. 342-973.
- Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 4, 564-582.
- Cragg, D.G. Kingston, D.J. Newman, Anticancer agents from natural products, CRC Press, **2011**.
- Craig, W. J. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, 70, 491-499.
- Cramer, F. Einschlussverbindungen. Berlin: Springer-Verlag, **1954**.
- Crini, G. Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Curr. Nutr. Food Sci Review: a history of cyclodextrins. Chem. Rev.* **2014**, 114, 10940-10975
- Curti, E. Capelli, F. Boschi, S.F. Nabavi, A.I. Bongiorno, S. Habtemariam, S.M. Nabavi, M. Daglia, Modulation of human miR-17-3p expression by methyl 3-O-methyl gallate as explanation of its in vivo protective activities, *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**. 58, 1776-1784
- Cushnie, A.J. Lamb, Antimicrobial activity of flavonoids, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**. 26, 343-356.
- Cvetnic, S. Vladimir-Knezevic, Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract, *Acta Pharma.* **2004**. 54, 243-250.

- Dai, J. mumper, R.J., Plnt phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. **2012**, 15, 7313-7352.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, **2010**, 11(4), 1321–1342.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 48-54.
- Davis, F.; Higson, S. Cyclodextrins. In *Macrocycles. Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications*; Davis, F., Higson, S., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: United Kingdom, **2011**. Chapter 6.
- Davis, J. M., Murphy, E. A., McClellan, J. L., Carmichael, M. D., Gangemi, J. D. Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, 295, 505-509.
- De Bie, A.T.H.J., Van Owen, B., Bär, A., Disposition of [14C] γ -cyclodextrin in germ.free and conventional rats. *Regul. Toxicol. Pharm.* **1998**. 27 (2), 150 – 158.
- De Smett, P. A. G. M. An introduction to herbal pharmacoepidemiology. *J. Ethnopharmacol.* **1993**, 38, 197-208.
- Del Río, M.C. Arcas, O. Benavente-García, A. Ortuño, Citruspolymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum* and *Geotrichum* species, *J. Agri. Food Chem.* **1998**. 46, 4423-4428.
- Del Río, M.D. Fuster, P. Gómez, I. Porras, A. García-Lidón, A. Ortuño, Citrus limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest, *Food Chem.* **2004**. 84, 457-461.
- Demain, P. Vaishnav, Natural products for cancer chemotherapy, *Microb. Biotechnol.* **2011**. 4, 687–699.
- Deschner EE1, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*. **1991**, 7, 1193-6.
- Deschner EE1, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*. **1991**, 7, 1193-6.

- Dharambir Kashyap, Ajay Sharma, Hardeep Singh Tuli, Katrin Sak, Sandeep Punia, Tapan K. Mukherjee. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. **2017**. 203-219
- Dixon, R. A. Phytoestrogens. *Annu Rev. Plant Biol.* **2004**, 55, 225–261.
- Dixon, R., Steele, C. "Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering". *Trends Plant Sci.* **1999**, 4, 394-400.
- Donnini, F. Tegeler, G. Groenhof, H. Grubmuller, Constant pH molecular dynamics in explicit solvent with λ -dynamics, *J. Chem. Theory Comput.* **2001** 7, 1962-1978.
- Dreosti IE1Nutrition. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **2000**, 16 (7-8), 692-4.
- Dufosse, L., Souchon, I., Feron, G., Latrassé, A., Spinnler, H. E. In situ detoxification of the fermentation medium during gamma-decalactone production with the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol. Prog.* **1999**, 15, 135–139.
- Duthie, G. G., Gardner, P.T., Kyle, J. A. M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, 62, 599-603.
- Duthie, G., Crozier, A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Lipidol.* **2000**, 11, 43-47.
- Eastburn, S. D., Tao, B. Y. Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* **1994**, 12, 325-339.
- Erlejan, A. G., Verstraeten, S. V., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.* **2004**, 38, 1311-1320.
- Erlund, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, **2004**. 24, 851–874.
- Esteller, Epigenetics in cancer, *N. Engl. J. Med.* **2008**. 358, 1148–1159.
- Falk Erling MD. Pathogenesis of Atherosclerosis. **2005**,09,068
- Ferrali M1, Signorini C, Sugherini L, Pompella A, Lodovici M, Caciotti B, Ciccoli L, Comporti M. Release of free, redox-active iron in the liver and DNA oxidative damage following phenylhydrazine intoxication. *Biochem Pharmacol.* **1997**, 53(11), 1743-51.

- Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res.* **1996**, 2(4), 659-68.
- Foley, P. R., Kaiser, C. E., Sadler, J. D., Burckhardt, E. E., Liu, Z. Detergent composition with cyclodextrin perfume complexes to mask malodours. *PCT Int Appl WO 01 23,516.* **2000**.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 519-525.
- French, D. The Schardinger dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, 12, 189-260.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani G., y col. "Gaussian 09c, Revision A. 02, Gaussian." Inc., Wallingford, CT 200 .**2009**.
- Frömming, K. H., Szejtli, J. Cyclodextrins in pharmacy. Topics in inclusion science. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. **1994**.
- Fujishima, N., Kusaka, K., Umino, T., Urushinata, T., Terumi, K. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. *Japanese Patent JP 136,898.* **2001**.
- Fulda, Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy, *Planta Med.* **2010**. 76, 1075–1079.
- Galati EM, Trovato A, Kirjavainen S. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note III). Antihypertensive and diuretic activity in rat. *Farmaco* **1996**. 51, 219–21.
- Galati, G., & O'Brien, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, **2004**. 37, 287–303.
- Gao, S., Wang, L. Application of cyclodextrin in environmental science. *Huanjing. Kexue. Jinzhan.* **1998**, 6, 80–86.
- Garg, S. Garg, L.J. Zaneveld, A.K. Singla, Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin, *Phytother. Res.* **2001**. 15 655–669.

- Gil izquierdo, A. Riquelme, M. T., Porras I. Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (citus limón (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *Journal of agricultural food chemistry*, **2004**. 52(2), 324-331.
- Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J Agric Food Chem* **2001**. 49, 1035-41.
- Giménez-Bastida, J.A., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C.,García-Conesa, M.T. Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60(36), 8866–8876.
- Gohel, A.H. Davies, Pharmacological agents in the treatment of venous disease: an update of the available evidence, *Curr Vas Pharm*. **3** **2009** 303-308.
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez- Augustin, O., Medina, F.S.D. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2011**, 51(4), 331–362.
- Goyal, A. K.; Johal, E. S.; Rath, G. *Curr. Nanosci*. **2011**. 7, 640.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A., Ferri, C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Current Pharmaceutical Design*. **2009**, 15(10), 1072–1084.
- Griffiths LA, Barrow A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J*. **1972**, 130(4), 1161-2.
- Guerrero, J. Castillo, M Quiñones, S. Garcia-Vallve, L. Arola, G. Pujadas, B. Muguertz, Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies, *Plos One*. **7** **2012** 1-11.
- Habauzit, V., Morand, C. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. **2012**. 3(2), 87–106.
- Habtemariam, S., Varghese, G.K. The antidiabetic therapeutic potential of dietary polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. **2014**, 15(4), 391–400.
- Haizhi Huang, Allen Y. Chen, Yon Rojanasakul, Xingqian Ye, Gary O. Rankin, and Yi Charlie Chen. Dietary compounds galangin and myricetin suppress ovarian cancer cell angiogenesis *J Funct Foods*. **2015**, 1; 15, 464–475

- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* **1999**. 47, 2274-9.
- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*. **2012**, 70(5), 257–265.
- Haqqi, T. M., Anthony, D. D., Gupta, S., Ahmad, N., Lee, M. S., Kumar, G. K., Mukhta, H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1999**, 96, 4524-4529.
- Hara, H. Hashimoto. Antimicrobial and insect-repellent cyclodextrin films. *Previous Journal Japanese Kokai* **2002**. 02
- Harabagiu, V., Simionescu, B. C., Pinteala, M., Merrienne, C., Mahuteau, J., Guégan, P., Cheradame, H. Synthesis and characterization of persilylated cyclodextrins. *Carbo. Polym.* **2004**, 56, 301-311.
- Harangi, J., Béke, G., Hangi, M. Mótyán, J.A., The digestible parent cyclodextrin: . *Ind. Phenom. Macro* **2012**. 73 (1-4), 335 – 339.
- Harborne, C.A. Williams, *Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry* **2000**. 55 481–504.
- Harborne, J. B. y Baxter, H. *The Handbook of Natural Flavonoids*. **1999**. Vol. 1 and 2 (Chichester: John Wiley and Sons).
- Harborne, J. B., Williams, C. A. *Advances in flavonoid research since 1992. Phytochem.* **2000**, 55, 481–504.
- Harborne, *The flavonoids__ Advances in research since 1986, first ed., Chapman and Hall, London, 1994.*
- Harnly, R.F. Doherty, G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S. Bhagwat, S. Gebhardt, *Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts, J. Agric. Food Chem.* **2006**. 54, 9966–9977.
- Hatae, S., Nakajima, K. Skin whitening cosmetics. *Jpn Kokai JP* 86109 705. **1986**.
- Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice after consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, 17, 2744-2752.
- Health, Fruit juice could affect drug; BBC NEWS, 20 de agosto de **2008**.

- Hedges, R. A. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev*, **1998**, 98, 2035–2044.
- Heo, H.J., Kim, M.J., Lee, J.M., Choi, S.J., Cho, H.Y., Hong, B., Kim, H.K., Kim, E., Shin, D.H., Naringenin from Citrus junos has an inhibitory effect on acetylcholinesterase and a mitigating effect on amnesia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2004b**, 17, 151–157.
- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* **1995**, 155, 381-6.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., & Kromhout, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, **1997**, 349, 699–699.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*. **1993**, 20, 21–29.
- Higson Séamus. *Macrocycles: Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications*. **2011**, 10,1002-978
- Higuchi and K.A. Connors, Phase-solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instr.* **1965**, 4, 117-122.
- Hioki, Z. Constraints on the Mixing Angle between Ordinary and Heavy Leptons in a ($V - A$) Model. *Prog. Theor. Phys.* **1977**, 58, 706-708.
- Hirose, T., Yamamoto, Y. Hinokitol containing cyclo-olefin polymer compositions and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties. *Japanese Patent JP 55480*. **2001**.
- Holland, L., Rizzi, G., Malton, P. Cosmetic compositions comprising cyclic oligosaccharides and fragrance. *PCT Int Appl WO 67,716*. **1998**.
- Hollman P. C. H., Arts, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1081–93.
- Hollman, M.B. Katan, in: C.A. Rice-Evans, L. Packer (Eds.), *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker Inc., New York, **1998**, pp. 483-522.
- Hollman, P. C., Katan, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* **1997**, 51, 305–310.
- Hudson B.J.F. Mahgoub S.E.O. Dep. of Food Sci., Reading Univ., Reading RG1 5AQ (UK) Naturally-occurring antioxidants in leaf lipids. Colorado State University (USA). **1980**.

- Hurtubise, E. U. Phosphorimetry. Theory, instrumentation and Applications. U.O.H. Nueva York, **1990**.
- Hussain, M. A., Diluccio, R. C., Maurin, M. B. Complexation of moricizine with nicotinamide and evaluation of the complexation constants by various methods. *J. Pharm. Sci.* **1993**, 82, 77–79.
- Irie, T., Uekama, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1999**, 36, 101–123.
- Irie, T., Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* **1997**, 86, 147–162.
- Jarho, P., Urtti, A., Pate, D. W., Suhonen, P., Järvinen, T. Increase in aqueous solubility. *Int. J. Pharm.* **1996**, 137, 209–217.
- JECFA (Joint FAO / WHO Expert committee on Food Additives). 78 th JECFA November **2013**.
- Jeon, S. M., Kim, H. K., Kim, H. J., Do, G. M., Jeong, T. S., Park, Y. B. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Translation Research*, **2007**. 149(1), 15–21.
- Jing Liang and Richard W Olsen Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABAA receptors *Acta Pharmacologica Sinica*. **2014**, 35, 981–993
- Joshiyura, F.B. Hu, J.E. Manson, M.J. Stampfer, E.B. Rimm, F.E. Speizer, G. Colditz, A. Ascherio, B. Rosner, D. Spiegelman, W.C. Willett, The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease, *Annals Intern. Med.* 134 **2001** 1106-1114.
- Julsing, M. K., Koulman, A., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J., Kayser, O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomol. Eng.* **2006**, 23, 265–279.
- Jung, C. H., Lee, J. Y., Cho, C. H., Kim, C. J. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, 30, 1599-1607.

- Jung, T. H., Ha, H. J., Kwak, H. S. Development of cholesterol-reduced mayonnaise with crosslinked β -cyclodextrin and added phytosterol. *Korean J. Food Sci. animal Res.* **2008**, 28, 211-217.
- Kacoli Banerjee, Mahitosh Mandal. Oxidativestresstriggeredbynaturallyoccurring flavones apigenin esultsin senescence and chemotherapeuticeffectin human colorectal cancer cell. *Redox Biology.* **2015**. 721302)
- Kakkar, A.K.,Dahiya,N. Management of Parkinson's disease: current and future pharmacotherapy. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**. 750, 74–81.
- Karoui, H., Tordo, P. ESR-spin trapping in the presence of cyclodextrins Detection of PBN-superoxide spin adduct. *Tetra. Lett.* **2004**, 45, 1043-1045.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3565–3571.
- Kim, H., Kim, H. W., & Jung, S. Aqueous solubility enhancement of some flavones by complexation with cyclodextrins. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2008**. 29, 590–594.
- King JC, Lu QY, Li G, Moro A, Takahashi H, Chen M, et al. Evidence for activation of mutated p53 by apigenin in human pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* **2012**. 1823, 593–604.
- Krause Martin, Galensa Rudolf. Bestimmung von Naringenin und Naringenin-Chalkon in Tomatenschalen mit RP-HPLC nach Festphasenextraktion. *January.* **1992**, 194, 1,29–32
- Kris-Etherton, C. Keen, Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 **2002** 41-49.
- Kristmundsdóttir, T., Loftsson, T., Holbrook, W. P. Formulation and clinical evaluation of a hydrocortisone solution for treatment of oral disease. *Int. J. Pharm.* **1996**, 139, 63–68.
- Krolicki, E. Lamer-Zarawska, Investigation of antifungal effect of flavonoids. 1[hesperidin, naringin, phellodendroside, luteolin-7-glucoside, hipotethin-7-glucoside, quecetin, celastroside, amentoflavone; Botrytis cinerea, Trichoderma glaucum, Aspergillus fumigatus], *Herba Polonica.* **1984**. 3053–57.
- Kublik, H., Bock, T. K., Schreier, H., Müller, B. W. Nasal absorption of 17 β -estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1996**, 42, 320–324.

- Kühnau J. The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: Their Role in Human Nutrition . **1976**, 24, 117-191.
- Kumpulainen, J T Salonen. Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease. **1999**.
- Kurkov SV and Loftsson T. Cyclodextrins. International Journal of Pharmaceutics. **2013**. 453: 167-180.
- Kurowska EM1, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piché LA, Serratore P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia Am J Clin Nutr. **2000**, 72(5),1095-100.
- Kwak, H. S., Kim, J. H., Choi, H. J., Kang, J. Immobilized β -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk. *Arch. Pharmacol. Res.* **2004**, 27, 873-877.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G., Liao, J., Yang, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 284-291.
- Lambert, J. D., Sang, S., Yang, C. S. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 20, 583-585.
- Larrosa, M., Llorach, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable by product extracts. *Lebens Wiss Technol.* **2002**, 35, 532-542.
- Lath, J. L., Chin, T. F. Schardinger dextrin interaction IV. Inhibition of hydrolysis by means of molecular complex formation. *J. Pharm. Sci.* **1964**, 53, 924-927.
- Li, J. J.; Zhao, F.; Li, J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **2011**. 90, 427-443.
- Libby P1, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **2011**, 19;473(7347), 317-25.
- Lin YL, Lin JK. Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol.* **1997**, 52(3), 465-72.
- Li-Ping Guan, Bing-Yu Liu. Antidepressant-Like Effects and Mechanisms of Flavonoids and Related Analogues. **2016**, 21.
- Liu, J. Zhao, Y. Liu, X. Zhu, Z Jie, Physicochemical Properties of the Inclusion Complex of Puerarin and Glucosyl- β -Cyclodextrin, *J. Agric. Food Chem.* 60 **2012** 12501-12507.

- Liu, L., Xu, D. M., & Cheng, Y. Y. Distinct effects of naringenin and hesperetin on nitric oxide production **2008**.
- Liu, L.P. Ma, B. Zhou, L. Yang and Z.L. Liu, Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein, *Chem. Phys. Lipids*. 106 **2000** 53-63.
- Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm*. **2001**, 28, 225(1-2),15-30.
- Loftsson T. and Stefansson E. Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. **2002**, 80 (2), 144-150.
- Loftsson T., Brewster M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J. Pharmacy and Pharmacology*. **2010**, 62, 1607-1621.
- Loftsson, D. Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm*. 329 **2007** 1-11.
- Loftsson, T. Effects of cyclodextrins on chemical stability of drugs in aqueous solutions. *Drug Stabil*. **1995**, 1, 22-33.
- Loftsson, T., Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci*. **1996**, 85, 1017-1025.
- Loftsson, T., Leeves, N., Bjornsdottir, B., Duffy, L., Masson, M. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *J. Pharm. Sci*. **1999**, 88, 1254-1258.
- Loftsson, T., Ólafsdóttir, B. J., Fridriksdóttir, H., Jónsdóttir, S. Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. *Eur. J. Pharm. Sci*. **1993**, 1, 95-101.
- Loftsson, T., Stefansson, E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug. Devel. Ind. Pharm*. **1997**, 23, 473-481.
- López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Pérez-López, A. J., Carbonell-Barrachina, A., Cuadra-Crespo, P. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β -cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chrom*. **2006**, 1135, 158-165.
- Lou, Y. Sun, Z. Rao, Current progress in antiviral strategies, *Trends Pharmacol. Sci*. **2014**. 35, 86-102.

- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E. Complexation of resveratrol by native modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food Chem.* **2008a**, 111, 262-267.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón-Hernández, J. A., Núñez-Delicado, E. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *J. Agric. Food Chem.* **2008d**, 56, 255-259.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., López-Nicolás, J. M., Nuñez-Delicado, E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chem.* **2007**, 104, 39-44.
- Lucas-Abellán, C., Gabaldón-Hernández, J. A., Penalva, J., Fortea, M. I., Núñez-Delicado, E. Preparation and Characterization of the inclusion complex of chlorpyrifos in cyclodextrins to improve insecticide formulations. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, 56, 8081-8085.
- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E. ORAC-Fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* **2008c**, 56, 2254-2259.
- Lv-Ying Tu, The mechanism of kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: From macro to nano. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou, P. R. China **2016**. 38, 6644-653.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. Fruit Phenolics. Boca Raton, USA: CRC Press. **1990**.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. Polyphenols. Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727-47.
- Manach, C., Texier, O., Morand, C., Crespy, V., Régéat, F., Demigné, C., Rémésy, C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 27, 1259-1266.
- Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, et al., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**. 81, 230S-242S.
- Manuel Lopez-Nicolas, J.; Rodriguez-Bonilla, P.; Garcia- Carmona, F. Crit. Rev. FoodSci. Nutr. **2014**. 54, 251.
- Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the

- bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *J. Phys. Chem, B*. **2009** 113, 6378–6396.
- Marín, C. Soler-Rivas, O. Benavente-García, J. Castillo, J.A. Pérez-Alvarez, By-products from different citrus processes as source of customized functional fibres, *Food Chem*. **2007**. 100, 736-741.
- Martín del Valle, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*. **2004**, 39, 1033-1046.
- Martín, M. A., Ballesteros, M., del Castillo, E. The influence of solvent polarity and viscosity on fluorescence of quinolizinium salts. *Anal. Chim. Acta*. **1985**, 170, 95-100.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Arch. Latinoam. Nutr*. **2000**, 50, 5-18
- Másson, M., Loftsson, T., Jónsdóttir, S., Fridriksdóttir, H., Petersen, D.S. Stabilisation of drugs through complexation with non-ionic and ionic cyclodextrins. *Int. J. Pharm*. **1998**, 164, 45–55.
- Mazza, G. Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesados, Ed. Acribia, **2000**.
- Mehta, G. Murillo, R. Naithani, X. Peng, Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharm. Res*. **2010**. 27, 950–961.
- Mercader-Ros, C. Lucas-Abellán, J.A. Gabaldón, M.I. Fortea, A. Martínez-Cachá, E. Núñez-Delicado, Kaempferol Complexation in Cyclodextrins at Basic pH, *J. Agri. Food Chem*. **2010** 58, 4675–4680.
- Mercer, L.D., Kelly, B.L., Horne, M.K., Beart, P.M., Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem. Pharmacol*. **2005**. 69, 339–345.
- Mirzoeva, R.N. Grishanin, P.C. Calder, Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria, *Microbiol. Res*. **1997**. 152, 239–246.
- MJ Matos Potential Pharmacological Uses of Chalcones: A Patent Review .*Expert Opin Ther Pat*. **2014**, 25 (3), 351-366..
- Monagas, M., Urpí-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Andrés-Lacueva, C., Bartolomé, B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*. **2010**, 1(3), 233–253.

- Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, LoCurto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rats. *Farmaco* 1995, 9, 50-595.
- Monsinger, J., Tománková, V., Nemcová, I. Zyka J. Cyclodextrins in analytical Chemistry. *Anal. Lell.* 2001. 34 (2) 1979 – 2004
- Morrison, M., Van der Heijden, R., Heeringa, P., Kaijzel, E., Verschuren, L., Blomhoff, R., Kooistra, T., Kleemann, R. Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NF- κ B in vivo. *Atherosclerosis* **2014**, 233(1), 149–156.
- Mucsi, B.M. Pragai, Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids, *Experientia* **1985**. 41, 930–931.
- Muñoz de la Peña, A., Mora-Diez, N., Mahedero-García, M. C., Bohoyo-Gil, D., Cañada-Cañada, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidin residues in Money simples. *Talanta*. **2007**, 73, 304–313.
- Muñoz de la Peña, A., Ndou, T. T., Anigbogu, V. C. Warner, I. M. Solution studies of beta-cyclodextrin-pyrene complexes under reversed-phase liquid chromatographic conditions: effect of alcohols as mobile-phase comodifiers. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1018–1023.
- Munro, I.C. Newberne, P M. Young, V. R., Bär, A, Safety assessment of γ Cyclodextrins: *Regul. Toxicol. Pharm.* **2004**. 39, S3 - S13
- Nagao A1, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem.* **1999**, 63(10), 1787-90.
- Nakai, Y., Nakajima, S., Yamamoto, K., Terada, K., Kanno, T. Effects of grinding on the physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose V: Comparison with Tri-O-methyl- β -cyclodextrin Ground Mixtures. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 28, 1552-1558.
- Navarro-Nuñez, J. Castillo, M. Lozano, C. Martínez, O. Benavente-García, V. Vicente, J. Rivera, Tromboxane A2 receptor antagonist by flavonoids: structure-activity relationships, *J. Agri. Food Chem.* 57 **2009** 1589-1594.

- Nazrul Islam, M. Ahsan, Biological activities of the secondary metabolites isolated from *Zieria smithii* and *Zanthoxylum elephantiasis* on microorganisms and brine shrimps, *Physiol. Res.* **1997**, 11 64–66.
- Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311–335.
- Nicolle, E., Souard, F., Faure, P., Boumendjel, A. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. *Current Medicinal Chemistry*, **2011**, 18(17), 2661–2672.
- Nijveldt, J. R., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 74, 418–425.
- Noble, W., Burns, M.P. Challenges in neurodegeneration research. *Front. Psychiatry.* **2010**, 1, 1–2.
- Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2830–2835.
- Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A. J., López-Nicolás, J. M. Polyphenol oxidase from dominga table grape. *J. Agri. Food Chem.* **2005**, 53, 6087–6093.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. Cyclodextrins as Diethylstilbestrol carrier system: Characterization of Diethylstilbestrol-Cyclodextrins complexes. *Pharma. Res.* **1999a**, 16, 854–858.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. Hydroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999b**, 367, 274–280.
- Olea-Azar, C, Abarca, B., Norambuena, E., Opazo, L., Jullian, C., Valencia, S., Ballesteros, R., Chadlaoui, M. ESR, electrochemical and cyclodextrin-inclusion studies of triazolopyridyl pyridyl ketones and dipyridyl ketones derivatives. *Mol. Biomol. Spe.* **2008**, 71, 703–709.
- Ong, H.E. Khoo, Biological effects of myricetin, *Gen. Pharmacol.* **1997**, 29, 121–126.
- Orhan, M. Daglia, S.F. Nabavi, M. Loizzo, E. Sobarzo-Sanchez, S.M. Nabavi, Flavonoids and dementia: an update, *Curr. Med. Chem.* **2015**, 22, 1004–1015.

- Ota, T., Takeda, F. Cyclodextrins as cheese additives. *Jpn. Kokai JP* 8175060. **1981**.
- Ovaskainen, M.L., Torronen, R., Koponen, J.M., Sinkko, H., Hellstrom, J., Reinivuo, H., Mattila, P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *The Journal of Nutrition*, **2008**, 138(3), 562–566.
- Pandey M, Kaur P, Shukla S, Abbas A, Fu P, Gupta S. Plant flavone apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo study. *Mol Carcinog*. **2012**. 51, 952–62.
- Pereira MA1, Grubbs CJ, Barnes LH, Li H, Olson GR, Eto I, Juliana M, Whitaker LM, Kelloff GJ, Steele VE, Lubet RA Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz anthracene-induced mammary cancer in rats. **1996**, 17(6), 1305-11.
- Perera, Environment and cancer: who are susceptible. *Science* **1997**. 278, 1068–1073.
- Perrier, E., Mariotte, A., Boumendjel, A., Bresson-Rival, D. Flavonoid esters and their use notably in cosmetics. United States Patent, **2001**. 6, 235, 294, May 22,
- Peterson, J.J., Dwyer, J.T., Jacques, P.F., McCullough, M.L. Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutrition Reviews*, **2012**. 70(9), 491–508.
- Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035-1042.
- Pignatelli P1, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr.* **2000**, 72(5),1150-5.
- Pitha, J., Hoshino, T. Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl organe. *Int. J. Pharm.* **1992**, 80, 243–251.
- Plaschke, K. Composition comprising one or more flavonoids, method of obtaining such composition and use thereof as UV-absorbing agent. United States Patent, **2002**. 6, 409, 996,

- Pranckute, R. Keuniets, A., Kuisene, N., Citavicius, D. Development of synbiotics with inulin, palatinose, α -cyclodextrin and probiotic bacteria. *Pol. J. Microbiol.* **2014**, 63 (1), 33-41.
- Prasad, N., Strauss, D., Reichart, G. Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals. *European Patent*. 1,084,625. **1999**.
- Praticò D1. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci.* **2008b**, 29(12), 609-15
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research.* **2013**, 68(1), 125-131.
- Rafter, J. J. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br. J. Nutr.* **2002**, 88, 219-224.
- Rajewski, R. A., Stella, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 1142-1168.
- Rao, B. P., Zurréis, S., Balasangameshwer, C. N. Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- β -ciclodextrina y β -ciclodextrina de rifampicina. *Ars Pharm*, **2006**, 47, 37-59.
- Reineccius Gary. Flavor Chemistry and Technology, Second Edition. **2005**, 520, 122
- Reineccius, G. A. Reineccius. Encapsulation of flavors using cyclodextrins: Comparison of flavor retention in alpha, beta, and gamma types. *Journal of Food Science.* **2002**, 67, 9.
- Reineccius, G. A., & Risch, S. J. The encapsulation of flavors by β -cyclodextrin. *Perfumer and Flavorist.* **1986**, 11, 1-6.
- Reineccius, G.A. Reineccius, T.L. Peppard. Flavor Release from Cyclodextrin Complexes: Comparison of Alpha, Beta, and Gamma Types. **2003**, 68, 4, 1234-1239
- Renaud, S., de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* **1992**, 339, 1523-1526.
- Rice-Evans and Lester Packer Flavonoids in Health and Disease, American Society for Clinical Nutrition. **2003**, 458.
- Robards, K., Antolovich, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *A review, Analyst.* **1997**, 122, 11-34.

- Robards, K., Prentzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**, 66, 401-436
- Roberfroid, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71, 1660-1664.
- Roberfroid, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. *Br. J. Nutr.* **2002**, 88, 133-138.
- Rodriguez Vaquero, P.A. Aredes Fernandez, M.C. Manca de Nadra, A.M. Strasser de Saad, Phenolic compound combinations on Escherichia coli viability in a meat system, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 6048–6052
- Roowi S1, Stalmach A, Mullen W, Lean ME, Edwards CA, Crozier A. Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans. *J Agric Food Chem.* **2010**, 27, 58(2),1296-304.
- Saenger, W. 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, **1984**, 2, 231-259.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, 19, 481-486.
- Sakanaka S1, Tachibana Y, Ishihara N, Juneja LR Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. *J Agric Food Chem.* **2005**, 26;53(2),464-8.
- Salas, G. Céliz, H. Geronazzo, M. Daz, et al., Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species, *Food Chem.* **2011**, 124 1411–1415.
- Saranath, A. Khanna, Current status of cancer burden: global and Indian scenario, *Biomed. Res. J.* **2014**, 1, 1–5
- Scalbert, A., Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of phenols. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2073-2085.
- Scalia, S., Villani, S., Casolari, A. Inclusion complexation of the sunscreen agent 2-ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: effect on photostability. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, 51, 1367–1374.
- Schmid, G. Cyclodextrin glucanotransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends. Biotechnol.* **1989**, 7, 244–148.

- Schneiderman, E., Stalcup, A. M. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B.* **2000**, 745, 83–102.
- Scholz EP, Zitron E, Kiesecker C, Thomas D, Kathofer S, Kreuzer J, et al. Orange flavonoid HTN modulates cardiac Herg potassium channel via binding to amino acids F656. *Nut Metab Cardiovasc Dis* **2006**. 17, 666–75.
- Selma, M.V, Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57(15), 6485–6501.
- Shaw, P. E., Wilson, C. W. Debittering of citrus juices with cyclodextrin polymer. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 646–647.
- Shukla S, Fu P, Gupta S. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis*. **2014**. 19, 883–94.
- Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med*. **2008**. 44, 1833–45.
- Shukla S, Gupta S. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther*. **2006**. 5, 843–52.
- Shukla S, Kanwal R, Shankar E, Datt M, Chance MR, Fu P, et al. Apigenin blocks IKK α activation and suppresses prostate cancer progression. *Oncotarget*. **2015**. 6, 31216.
- Shukla S, Mishra A, Fu P, MacLennan GT, Resnick MI, Gupta S. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *FASEB J*. **2005**. 19, 2042–4.
- Shulman, R.G., Rothman, D.L., Behar, K.L., Hyder, F. Energetic basis of brain 983 activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci*. **2004**, 27, 489–495.
- Sigurdardottir, A. M., Loftsson, T. The effect of polyvinylpyrrolidone on cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin. *Int J Pharm*. **1995**, 126, 73–78.
- So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F., Carroll, K.K. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids

- in 986 the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett.* **1997**, 112, 127–133.
- Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., Saito, K. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 288–303.
- Stalmach, A., Mullen, W., Steiling, H., Williamson, G., Lean, M.E.J., Crozier, A. Absorption, metabolism and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2010b**, 54(3), 323–334.
- Stavric B1. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chem Toxicol.* **1994** Jan, 32(1), 79–90.
- Stella V.J. and He, Q. Cyclodextrins *Toxicol Pathol.* **2008**, 36, 30–42.
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7449–7454.
- Suzuki, M., Ito, K., Fushimi, C., Kondo, T. The freezing point depression method for the determination of binding parameters of drugs by polyvinylpyrrolidone and polyoxyethylene *n*-dodecylether. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41, 1616–1620.
- Szejtli, J. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Akadémiai Kiadó, Budapest. **1982**, 213–214
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743–1753.
- Szejtli, J., Szente, L., Banky-Elod, E. Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable flavor substances by cyclodextrins. *Acta Chimica Sci. Hung.* **1979**, 101, 27–46.
- Szente, L., Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Food Sci. Technol.* **2004**, 15, 137–142.
- Szente, L., Szejtli, J. Stabilization of flavors by cyclodextrins. Eds., Flavor Encapsulation Am. Chem. Soc. Symp. S. Risch, S., Reineccius, G. New Orleans: ACS. **1987**, Series 370, 148–158.
- Szente, L., Szejtli, J., Kis, G. L. Spontaneous opalescence of aqueous γ -cyclodextrin solutions: complex formation or self-aggregation. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 778–781.
- Tabrez, S., Priyadarshini, M., Urooj, M., Shakil, S., Ashraf, G.M., Khan, M.S., Kamal, M.A., Alam, Q., Jabir, N.R., Abuzenadah, A.M., Chaudhary, A.G.,

- Damanhour, G.A. Cancer chemoprevention by polyphenols and their potential application as nanomedicine. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*. **2013**, 31(1), 67–98.
- Taby, J.P.J. Issa, Cancer epigenetics, *CA Cancer J. Clin.* **2010**. 60, 376–392.
- Tan, J. Lu, M. Huang, Y. Li, M. Chen, G. Wu, J. Gong, Z. Zhong, Z. Xu, Y. Dang, Anti-cancer natural products isolated from Chinese medicinal herbs, *Chin. Med.* **2011**. 6, 27.
- Tatsuya, S. Stabilisation of fragrance in bathing preparations. *Japanese Patent* **1999**, 11,209,787.
- Tejashri, G.; Amrita, B.; Darshana, J. *Acta Pharm.* **2013**, 63, 335.
- The EFSA Journal. **2007**, 537, 1-21.
- The World Health Organization Study on global AGEing and adult health (SAGE). **2012**, 41, 6.
- Tien-An, N.; Benguo, L.; Jian Z.; Donald S. T.: James M. H. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chem.* **2013**. 136, 186-192.
- Tomás-Barberán, F. A., Clifford, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1073-1080.
- Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C. Phenolic compounds and related enzyme as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 81, 853-876.
- Trayler, R. J. Nucleosynthesis and the origin of the elements. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1988**, 325, 391-403.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M.A., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Saez, G.T., Ruiz- Gutiérrez, V., Warnberg, J., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M. Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*. **2013**,23(10), 953–959.
- Trinh, J., Dodd, T. M., Bartolo, R., Lucas, J. M. Cyclodextrin based compositions for reducing body odour. *US Patent* 5,897,855. **1999**.

- Trott, O., & Olson, A.J. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comp. Chem.*, **2010**, 31, 455–461.
- Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. **2010**, 2(12), 1231–1246.
- Turnbull, J., Nakajima, J., Welford, R. W., Yamazaki, D., Saito, M., Schofield, K. Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3beta-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 1206–1216.
- Uekama, K, Adachi, H., Irie, T., Yano, T., Saita, M. Improved transdermal delivery of prostaglandin E 1 through hairless mouse skin: combined use of carboxymethyl-ethyl- β -cyclodextrin and penetration enhancers. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, 44, 119–121.
- Uekama, K. Inclusion complexes of cyclodextrins with organic drug molecules. *Jpn. J. Antibiot.* **1979**, 32, 103–111.
- Uekama, K., Hirayama, F., Nasu, S., Matsuo, N., Irie, T. Determination of the stability constants for inclusion complexes of cyclodextrins with various drug molecules by high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **1978b**, 26, 3477–3484.
- Uekama, K., Irie, T., Hirayama, P. Participation of cyclodextrins inclusion catalysis in photolysis of chlorpromazine to give promazine in aqueous solution. *Chem. Lett.* **1978a**, 7, 1109–1112.
- Uekama, K., Narisawa, S., Hirayama, F., Otagiri, M., Kawano, K., Ohtani, T., Ogino, H. Improvement of thermal and photochemical stability of benzaldehyde by cyclodextrin complexation. *Inter. J. Pharm.* **1983**, 13, 253–261.
- Ujhazy, A., Szejtli, J. Removal of naringin from aqueous solutions with cyclodextrin bead polymer. *Gordian*. **1989**, 89, 43–45.
- Vaishnav P., Demain AL. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol.* **2011**, 4(6):687-99.
- Vaishnav P., Demain AL. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol.* **2011**, 4(6):687-99.
- Van Dorne, H. Interaction between cyclodextrins and ophthalmic drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, 39, 133–139.

- Van Ommen. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arenas. *Nutrition*. **2004**, 20(1), 4-8.
- Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J., Spencer, J.P. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*. **2010**, 2(11), 1106–1131.
- Vázquez-Flores, S. Casas-Grajales, E. Hernández-Aquino, E.E. Vargas-Pozada, P. Muriel. Antioxidant, Antiinflammatory, and Antifibrotic Properties of Quercetin in the Liver Liver Pathophysiology, **2017**. 47, 653-674
- Verma AK1, Johnson JA, Gould MN, Tanner MA. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. **1988**, 15;48(20),5754-8.
- Villiers A. Sur la fermentation de la féculé par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1891**, 112, 536-538.
- Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, López-López G, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**, 302(1),66-72.
- Voncina, B.; Vivod, V. Cyclodextrins in textile finishing. In *Textile Dyeing*; Guñay, M., Ed.; InTech: Tijek, Croatia, **2013**. Chapter 3, p 53.
- Wacker, H.G. Eilmes, Antiviral activity of plant components. 1st communication: flavonoids, *Arzneimittelforschung* **1978**. 28, 347–350.
- Wanasundara, Shahidi Canola extract as an alternative natural antioxidant for canola oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **1994**, 71, 817–822
- Wanasundara, shahidi, r. Amarowicz. effect of processing on constituents and oxidative stability of marine oils. **1998**, 1745-4522..
- Wang, J., Varghese, M., Ono, K., Yamada, M., Levine, S., Tzavaras, N., Gong, B., Hurst, W.J., Blitzer, R.D., Pasinetti, G.M. Cocoa extracts reduce oligomerization of amyloid- β : implications for cognitive improvement in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* **2014**, 41(2), 643–650.
- Wang, K.J. Huang, Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chrom. A.* **2004**, 273–279.
- Wang, Z.J., Ohnaka, K., Morita, M., Toyomura, K., Kono, S., Ueki, T., Tanaka, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., Okamura, T., Ikejiri, K., Futami, K., Maekawa, T., Yasunami, Y., Takenaka, K., Ichimiya, H., Terasaka, R. Dietary polyphenols

- and colorectal cancer risk: the Fukuoka colorectal cancer study. *World Journal of Gastroenterology*. **2013**, 19(17), 2683–2690.
- Waterhouse, A. L. Wine Phenolics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2002**, 95, 21-36.
- Williams, C. A., Harborne, J. B. Flavone and flavonol glycosides. In: J.B. Harborne, Editor. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London. **1994**, 337–385.
- Willits, M. G., Giovanni, M., Prata, R. T. N., Kramer, C. M., Luca, V. D., Steffens, J. C., Grase, G. Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites. *Phytochem.* **2004**, 65, 31-41.
- Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, 126, 485–493.
- Wissem bhouri Flavonoids Products From Nitraria Retusa Leaves Promote Lymphoblastoid Cells Apoptosis *Nutr Cancer Mol Pharmacol.* **2012**, 64 (7), 1095-1102.
- 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. Uncomplexed cyclodextrin compositions for odour control. *US Patent 5,942,217*. **1999**.
- Yajum, Y., Abhijeet, K., Mattheos, A. G. Koffas. Biosynthesis of Natural Flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 5610–5613
- Yanez, V. Vicente, M. Alcaraz, J. Castillo, O. Benavente-Garcia, M. Canteras, J.A. Teruel, Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity, *Nutr. Cancer.* **49** **2004** 191-199.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M-T., Newmark, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, 21, 381-406.
- Yu, E. K. Novel decaffeination process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, 28, 546-552.
- Zbarsky, V., Datla, K.P., Parkar, S., Rai, D.K., Aruoma, O.I., Dexter, D.T., Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic. Res.* **2005**. 39, 1119–1125.
- Zhang, J.; Ma, P. X. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**. 65, 1215.

- Zhao, D.G. Truhlar, Density functionals with broad applicability in chemistry, *Acc. Chem. Res.* **2008** 41, 157-167.
- Zhao, T., Temsamani, J., Agarwal, S. Use of cyclodextrin and its derivatives as carriers for oligonucleotide delivery. *Antisense. Res.* **1995**, 5, 185–192.
- Zujko, M.E., Witkowska, A.M., Wańkiewicz, A., Sygnowska, E. Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population. *Advances in Medical Sciences.* **2012**, 57(2), 375–384.

