



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA
ACTIVIDAD FÍSICA Y DEL DEPORTE

**Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para
su Aplicación en la Industria Alimentaria**

Para optar al grado de Doctor Internacional por el
Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición

Pilar Hernández Sánchez

Directores

Dra. Estrella Núñez Delicado

Dr. Santiago López-Miranda González

Murcia, Julio de 2011



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado y el Dr. D. Santiago López-Miranda González como Directores de la Tesis Doctoral titulada “**Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria**” realizada por D^a. Pilar Hernández Sánchez 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 a los Reales Decretos 56/2005 y 778/98, en Murcia a 15 de Julio de 2011.

Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado

Dr. D. Santiago López-Miranda González

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: tercerciclo@pdi.ucam.edu

A mis padres, la luz de mi vida

A mis hermanos, Jose y Alba

Os quiero

Agradecimientos

Durante meses he soñado con escribir este capítulo. En estas palabras culmina una dura etapa de mi vida que no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas que he tenido la suerte de conocer y trabajar durante estos años, que han ayudado a dar luz y apoyo moral al desarrollo de un sueño conseguido, esta Tesis Doctoral. Por todo ello, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones.

A mis directores de Tesis, la Dra. Estrella Núñez Delicado y el Dr. Santiago López-Miranda González.

Mi más emotivo agradecimiento a ti, Estrella, este trabajo no habría sido posible sin tus directrices, tu apoyo, sabiduría e insaciable capacidad de trabajo. Te agradezco toda tu dedicación incluso hasta altas horas de la madrugada. Desde el cariño que te tengo, gracias por confiar en mí. Tu entusiasmo ante el trabajo ha sido un constante estímulo de superación para mí durante estos años.

Muy especialmente a mi codirector, Santi, este trabajo habría sido inviable sin tu apoyo. Has batallado mi día a día, codo a codo y sin flojear ni tan sólo uno durante cuatro años. Mis agobios, mis nefastos días de laboratorio, mis buenos y malos resultados, has aguantado skipes a las mil y cientos de emails para resolver todas mis preocupaciones profesionales y personales durante mis estancias. Sólo espero poder haber aprendido a afrontar el trabajo con un algo de la perfección y rigurosidad que te define. Por el placer de trabajar a tu lado, y por considerarte un gran amigo, GRACIAS.

Cómo olvidar a mis compañeros que en el algún momento algunos éramos becarios de departamento, y que vivíamos la etapa experimental de la tesis en el laboratorio:

Muy especialmente a Patricia, por ser una gran amiga desde que compartíamos pupitre y apuntes para posteriormente la misma FPI, los mismos trámites burocráticos y siempre los mismos pasos durante cuatro años. Gracias por

los momentos memorables que me has hecho vivir dentro y fuera y que nunca olvidaré. Por dar vida a mi día a día, y dar todo sin esperar nada a cambio.

A Maite, por todos los buenos momentos que hemos vivido juntas y lo que has hecho por mí a lo largo de estos años que ha sido mucho, siempre te lo agradeceré.

A Carmen, por ser ese apoyo que nunca falla, por tu disponibilidad insaciable, y por todo lo aprendido de ti, mil gracias Carmela.

A Ana, por la alegría de trabajar a tu lado y que cada día echo de menos, vuelve pronto.

A Eva, por ser un cielo, una gran compañera y amiga, gracias por tu paciencia y comprensión al compartir nuestro equipo, aún cuando perdía helio o cuando la jeringa no inyectaba, o la columna...

A Fernando, por nuestras conversaciones de mortero y nueces en el laboratorio y por hacerme reír cada día. A Paco, por ser un tío grande, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado y sobretodo en las traducciones de términos microbiológicos.

A Antonio Soler, porque siempre serás mi tutor académico, por el especial cariño que te tengo y por la alegría de trabajar a tu lado, no cambies. A Antonio José, por su alegría, y por esos cafés extradulces que al final siempre preparo yo, pero que nos saben a gloria.

A Adela, por soportar mis bolsos y mis maletas llenas de papers, gracias por sufrirme de cerca en estos meses. A Juana Morillas, gracias por esa sonrisa y ese aliento de madre en estos últimos meses. A Julia, por la serenidad y tranquilidad que aporta al departamento

A Lucía, te agradezco enormemente tu absoluta disposición, capacidad de adaptación al cambio y el apoyo que me has mostrado en estos últimos meses, muchas gracias.

A Isabel Fortea por su alegría y por todo lo que aporta al departamento. A Mavi por su simpatía, disponibilidad y dedicación al departamento. A Pilar Zafrilla, por el cariño que le tengo y que me demuestra cada día.

A Alfonso, no me puedo olvidar de ti, mil gracias por tu ayuda con el GCMS, las temperaturas, las pérdidas de Helio, el autoinyector y el sinfín de problemas que

siempre me has solventado con éxito. Agradecer también a Gabi, por tu disponibilidad y ayuda en mis momentos de agobio. A Carmen por su eficacia y su dedicación al departamento.

A Ginés y a Mariano, que aunque ya no os tenga cerca os echo de menos.

Gracias al apoyo recibido en las estancias realizadas en Food Science Department en la Universidad de Davis, California (EEUU). Especialmente al Dr. Moshe Rosenberg por acogerme en su laboratorio y tener la suerte de poder trabajar en su equipo de investigación. Gracias a Yael, a Jing, a Laura. A Keren, quien me sirvió de gran ayuda. A Thelma, por su apoyo y amistad. A Mecit, por su inteligencia y el placer de trabajar a su lado.

Gracias a Sureyya Ozcan, por su amistad y por ser el mejor apoyo que una necesita cuando está fuera de casa. A mis chicas honey moon, Sisse y Nuria, por hacer mi estancia más feliz. A Alex, porque siempre estuviste ahí, por aguantar mis slides... y por un millón de cosas más, mil gracias.

Por supuesto, es imposible olvidar a mi familia:

A ti Papá, Gracias por tu apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi carrera profesional, por tu valentía en la vida y por hacer de mi lo que soy.

A ti Mamá, gracias por ser y estar, por ser quien mejor me conoce y por ser la persona que más ha sufrido las consecuencias directas esta batalla, por escucharme, por ayudarme a luchar y no desfallecer, por tus dosis diarias amor sin medida y por tantas cosas más... Te quiero.

A mi hermano, Jose por crecer de mi mano, gracias porque hacerme saber que estás ahí cada día.

Albita, Pichu, gracias por tu inmensa paciencia, por soportar mis insufribles últimos meses, gracias por tu ánimo y auxilio en mis momentos naufragio. Te agradezco tu complicidad de hermanas que espero que nunca desaparezca a pesar de la distancia. Lucha por lo que sueñas y no lo dejes escapar.

A mis abuelos, a mi abuela, porque me ha seguido muy de cerca y por la especial devoción que me tiene desde que nací. A mi abuelo, allí donde esté, porque para él fui doctora desde el primer día que usé una bata blanca.

A mis amigos, a los que de algún modo ha salpicado este embrollo. Gracias a Alicia, artífice de la portada, por tu tiempo y por las horas de playa que te he robado durante el mes de agosto. A Jose, que también le tocó alguna corrección que otra. A mi mejor amiga Soria, a quien en los últimos meses echo mucho de menos. A Sarita, porque esté donde esté siempre está.

A mis zapatillas y a mi mp3, porque siempre me han servido para desprenderme de algo más que sudor.

A todo el equipo directivo del Departamento de Tecnología y Nutrición y especialmente a Jose María Cayuela y Gabaldón por su capacidad de liderazgo y la labor que está llevando a cabo en estos últimos años para el continuo crecimiento del departamento, Gracias.

Agradecer a la Región de Murcia y a la Fundación Séneca por otorgarme esta beca FPI.

Gracias a la Universidad Católica San Antonio de Murcia, por brindarme la oportunidad de hacer realidad este sueño.

*“Sólo aquellos que arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden llegar a ir”.*

T.S. Elliot

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LOS RESULTADOS DE LA TESIS DOCTORAL:

- Hernández-Sánchez Pilar, López-Miranda Santiago, Lucas-Abellán Carmen, Núñez-Delicado Estrella. "Complexation of eugenol (EG), as main component of Clove Oil and as pure compound, with β - and HP- β -CDs.", Food Nutrition and Sciences. En prensa.
- Hernández-Sánchez, Pilar, López-Miranda Santiago, Lucas-Abellán Carmen, Núñez-Delicado Estrella. "Study of Eugenol (EG) complexation with β -CDs and HP- β -CDs using GC-MS and UV-vis spectrophotometric analysis". En proceso de revision.
- Hernández-Sánchez Pilar, López-Miranda Santiago, Mercader-Ros María Teresa, and Núñez-Delicado Estrella. "Essential Clove Oil (CO) complexation with β -CDs and HP- β -CDs". En proceso de revisión.
- Hernández-Sánchez Pilar, López-Miranda Santiago, Núñez-Delicado Estrella. "The influence of drying methods on essential CO-CDs solid complexes". En proceso de revisión.
- Hernández-Sánchez Pilar, López-Miranda Santiago. Núñez-Delicado Estrella. "Estudio de la Complejación de eugenol (EG) con CDs". VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 8-10 de junio de 2011. ISBN: 978-84-694-3141-2.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	27
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	33
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	39
1. Aceites Esenciales	41
1.1. INTRODUCCIÓN	41
1.2. HISTORIA DE LOS AE.....	42
1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA	44
1.3.1. Terpenos.....	44
1.3.2. Otros componentes aromáticos.....	48
1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS AE	48
1.4.1. Obtención y preparación del material vegetal.....	48
1.4.2. Destilación	49
1.4.2.1. Hidrodestilación	49
1.4.2.2. Destilación con agua-vapor	50
1.4.2.3. Destilación por arrastre de vapor	50
1.4.3. Otros métodos de extracción de los AE.....	52
1.4.3.1. <i>Enfleurage</i>	52
1.4.3.2. <i>Extracción con solventes</i>	52
1.4.3.3. <i>Extracción por prensado</i>	52
1.4.3.4. <i>Extracción con fluidos supercríticos</i>	53
1.5. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS AE.....	53
1.5.1. Citotoxicidad y Fototoxicidad	53
1.5.2. Mutagenicidad nuclear	56
1.5.3. Mutagenicidad citoplasmática	56
1.5.4. Carcinogenicidad de los AE	57

1.5.5. Propiedades antimutagénicas de los AE.....	57
1.6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AE.....	58
1.7. SUSCEPTIBILIDAD DE ORGANISMOS GRAM (-) Y GRAM (+).....	59
1.8. SINERGISMO Y ANTAGONISMO ENTRE LOS AE	60
1.9. APLICACIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES	61
1.10. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS AE EN SISTEMAS ALIMENTARIOS	62
1.10.1. Carne y productos Cárnicos	64
1.10.2. Pescados	64
1.10.3 Productos Lácteos	65
1.10.4. Verduras y Hortalizas.....	66
1.10.5. Arroz	66
1.10.6. Frutas	66
1.11. SINERGISMO ENTRE LOS COMPONENTES DE LOS AE Y LOS CONSERVANTES DE LOS ALIMENTOS O LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN	66
2. Clavo (<i>Eugenia caryophyllata</i>, <i>Syzygium aromaticum</i>)	69
2.1. TAXONOMÍA Y PRODUCCIÓN	69
2.2. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL CLAVO	72
2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AEC	74
2.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL AEC	76
2.4.1. Actividad Antibacteriana.....	76
2.4.2. Actividad antifúngica	78
2.4.3. Actividad antivírica	78
2.4.4. Actividad antioxidante.....	79
2.4.5. Actividad antitumoral.....	79
2.4.6. Actividad anestésica	80
2.4.7. Actividad insecticida	80
2.4.8. Actividad hepatoprotectora	81
2.4.9. Actividad antidiabética	81
2.4.10. Actividad antiinflamatoria.....	81
2.4.11. Actividad antiplaquetaria	82

2.4.12. Actividad antiestrés	82
2.4.13. Actividad antipirética	82
2.5. APLICACIONES DEL AEC	82
2.5.1. Industria Alimentaria.....	82
2.5.2. Cosmética y cuidado Personal	84
2.5.3. Odontología.....	84
2.6. TOXICIDAD.....	84
3. Encapsulación de aromas y AE	87
3.1. MATERIALES USADOS EN LA ENCAPSULACIÓN	88
3.1.1. Hidratos de Carbono.....	88
3.1.1.1. <i>Almidón</i>	88
3.1.1.2. <i>Maltodextrinas (MD)</i>	89
3.1.1.3. <i>Gomas</i>	90
3.1.2. Proteínas	90
3.1.2.1. <i>Proteínas de Suero Lácteas</i>	91
3.1.2.2. <i>Otras proteínas</i>	91
3.2. TÉCNICAS DE ENCAPSULACIÓN	92
3.2.1. Procesos Químicos	93
3.2.1.1. <i>Coacervación</i>	93
3.2.1.2. <i>Cocrystalización</i>	94
3.2.2. Procesos Mecánicos	95
3.2.2.1. <i>Secado por atomización</i>	95
3.2.2.2. <i>Liofilización</i>	96
3.2.2.3. <i>Atomización por enfriamiento/congelación</i>	97
3.2.2.4. <i>Extrusión</i>	98
4. Inclusión molecular: CDs	99
4.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN	99
4.2. PROPIEDADES	101
4.3. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS	104
4.3.1. α -CDs	104

4.3.2. β -CDs	105
4.3.3. γ -CDs.....	105
4.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	105
4.4.1. Equilibrio de los complejos de inclusión	109
4.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS.....	110
4.5.1. Solución Dinámica	110
4.5.1.1. <i>Efecto de la temperatura</i>	111
4.5.1.2. <i>Empleo de disolventes</i>	111
4.5.1.3. <i>Efecto del agua</i>	111
4.5.1.4. <i>Analitos volátiles</i>	112
4.5.2. Co-precipitación	113
4.5.3. Complejación por método “slurry”	113
4.5.4. Complejación por pasta.....	113
4.5.5. Mezcla húmeda y calefacción.....	114
4.5.6. Método de extrusión.....	114
4.5.7. Mezcla en seco	114
4.6. MÉTODO DE SECADO DE LOS COMPLEJOS FORMADOS	115
4.6.1. Analitos altamente volátiles	115
4.6.2. Secado por atomización	115
4.6.3. Secado a baja temperatura	116
4.7. LIBERACIÓN	116
4.8. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CDs.....	116
4.8.1. Métodos de detección de complejos sólidos.....	116
4.8.1.1. <i>Difracción de rayos-X</i>	116
4.8.1.2. <i>Espectroscopía de resonancia magnética nuclear</i>	117
4.8.1.3. <i>Espectroscopía de absorción infrarroja</i>	117
4.8.1.4. <i>Espectroscopía Raman</i>	117
4.8.1.5. <i>Métodos térmicos</i>	117
4.8.2. Métodos de detección de complejos en solución.....	118

4.8.2.1. Métodos de variación de la solubilidad.....	118
4.8.2.2. Métodos cinéticos	121
4.8.2.3. Métodos instrumentales	122
4.8.2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-VIS.....	122
4.8.2.3.2. Espectroscopía de luminiscencia	123
4.8.2.3.3. Dicroísmo circular.....	123
4.8.2.3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	124
4.8.2.3.5. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico	124
4.8.2.3.6. Métodos voltamétricos	125
4.8.2.3.7. Conductimetría.....	125
4.8.2.3.8. Cromatografía.....	126
4.9. APLICACIONES DE LA CDs.....	126
4.9.1. Cosmética y aseo personal.....	126
4.9.2. Industria alimentaria	127
4.9.2.1. CDs como agentes atrapadores de sabores	128
4.9.2.2. CDs como agentes protectores frente a la oxidación por oxígeno	128
4.9.2.3. CDs como agentes protectores frente a la luz	129
4.9.2.4. CDs como agentes protectores frente a la temperatura.....	129
4.9.2.5. CDs para mejorar la vida útil de los alimentos.....	129
4.9.2.6. Aplicaciones de las CDs vacías	130
4.9.2.7. Aplicaciones especiales de las CDs en alimentos	132
4.9.3. Industria farmacéutica	132
4.9.4. Agricultura e industria química	134
4.10. REGULACIÓN DE LAS CDs.....	135
5.CDs y AE.....	137
5.1. APLICACIONES DE LAS CDs-AE	137
5.1.1. Industria de alimentos y bebidas	138
5.1.1.1. Ventajas tecnológicas y de procesado.....	138
5.1.1.2. Transformación de componentes líquidos.....	139
5.1.1.3. Modificación de sabores y olores.....	139

5.1.1.4. Mejora de la estabilidad química.....	140
5.1.1.5. Estabilidad térmica y protección frente a la volatilidad de componentes aromáticos	140
5.1.1.6. Protección frente a la oxidación de componentes aromáticos	141
5.1.1.7. Complejación selectiva en ciclodextrinas vacías	141
5.1.1.8. Aromas y envasado inteligente	142
5.1.2. Industria de alimentos y bebidas	142
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	143
1. Objetivos.....	145
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	147
1. Materiales y métodos.....	149
1.1. MATERIALES	149
1.2. MÉTODOS.....	149
1.2.1. Estudio de solubilidad.....	149
1.2.2. Análisis por GC-MS.....	150
1.2.3. Análisis espectrofotométrico	151
1.2.4. Preparación de complejos sólidos de inclusión AEC- β -CDs.....	152
1.2.5. Encapsulación por gelificación externa/interna y secado por atomización.....	153
1.2.5.1. Preparación de las emulsiones para gelificación externa/interna	153
1.2.5.2. Preparación de las emulsiones para secado por atomización.....	154
1.2.5.3. Preparación de las microcápsulas	155
1.25.3.1. Gelificación externa mediada por cloruro cálcico	155
1.25.3.2. Gelificación interna mediada por carbonato cálcico.....	155
1.25.3.3. Microencapsulación del AEC mediante secado por atomización	157
1.2.5.4. Extracción del AEC de las microcápsulas	158

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
1. Complejación de EG en CDs	161
1.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE EG	161
1.1.1. Linealidad	162
1.1.2. Límite de detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ).....	164
1.1.3. Precisión	165
1.1.4. Robustez	165
1.2. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE EG EN β -CDs.....	166
1.3. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE EG EN HP- β -CDs.....	173
2. Complejación de AEC en CDs	175
2.1. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE AEC EN β -CDs.....	178
2.3. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE AEC EN HP- β -CDs.....	186
3. Optimización del método de producción de complejos sólidos AEC-CDs	189
3.1. OBTENCIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS DE INCLUSIÓN AEC-CDs.....	191
3.1.1. Optimización del método de preparación de complejos sólidos de AEC con β -CDs.....	191
3.1.2. Influencia del método de secado de los complejos sólidos de AEC-CDs en el contenido final de AEC.....	197
4. Estabilidad del AEC microencapsulado con proteínas de suero lácteo y maltodextrinas	203
4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE AEC DE LAS MICROCÁPSULAS.....	204
4.2. EFICACIA DE LA ENCAPSULACIÓN	209
4.3. ESTABILIDAD DE LAS MICROCÁPSULAS CON EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA.....	212
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	217
1. Conclusiones.....	219
CHAPTER VI. GLOBAL RESULTS BRIEFING	221
1. Introduction	223

2. Materials and methods.....	226
3. Results and Discussion	227
4. Conclusions.....	232
 CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA	235
1. Bibliografía.....	237

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Absorbancia
ABTS: Ácido-2, 2-azino-bis (3 etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AE: Aceite esencial
AEC: Aceite esencial de clavo
ALP: alanino aminotransferasa.
ALP: Fosfatasa alcalina.
AST: aspartato aminotransferasa.
ATP: Adenosin trifosfato
BHT: Hidroxitolueno butilado
CDs: Ciclodextrinas.
CGTasa: Ciclodextrina glucanotransferasa
CPS: Concentrado de proteína de suero
CV: Coeficiente de variación
DC: Dicroísmo circular
DE: Equivalente de dextrosa.
DIME- β -CDs: 2, 6 dimetil- β -ciclodextrinas.
DMAPP: Dimetilalil pirofosfato
DPPH: 2, 2-difenil-picril-hidracil
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
DTA: Análisis Térmico Diferencial
EE: Eficacia de la encapsulación
EEUU: Estados Unidos
EG: Eugenol.
EPA: American Enviromental Proteccion Agency.
Essential CO: Essential clove oil (Aceite esencial de clavo)
EWG: Environmetnal Working group.
FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas.
FDA: American Food and Drug Administration.

FSANZ: Food Standards Australia New Zealand
FSC: Fluido supercrítico
GC-MS: Cromatografía de masas
GE: Gelificación externa
GE: Gelificación externa
GGPP: Geranilgeranil pirofosfato
GI: Gelificación interna
GI: Gelificación interna
GRAS: Sustancia reconocida como segura.
HP- β -CDs: Hidroxipropil- β -ciclodextrinas.
HPE- β -CDs: Hidroxietil- β -CDs.
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
IDA: Ingesta Diaria Admisible.
IPP: Isopentil pirofosfato
IR: Infrarrojo
JECFA: Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios.
K_c: Constante de Complejación
Líneas celulares PC-3 y Hep G2
LOD: Límite de detección
LOQ: Límite de Cuantificación
MAP: Envasado en atmósfera modificada.
MD: Maltodextrinas.
MEP: Metileritritol fosfato
MVA: Ácido mevalónico
MWI: Irradiación por microondas
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OTGL: Termogravimetría Diferencial
PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxilasa.
pH: Potencial de hidrógeno
PLA-PCL: polimeros buscar
PS: Proteína de suero láctea
PSDN: Proteína de suero desnaturalizada
PSN: Proteína de suero nativa
RBD: Refinada, blanqueada, desodorizada

RMN: Resonancia magnética nuclear.
ROS: Especie reactiva de oxígeno.
S: Sustrato
S₀: Solubilidad del sustrato.
SA: Secado por atomización
SD: Desviación estándar.
SEM: Microscopía de transmisión electrónica
TG: Termogravimetría
TIME- β -CDs: 2, 3, 6 trimetil- β -ciclodextrinas.
UV: Ultravioleta.
UV-Vis: Ultravioleta visible
VHS: Virus del Herpes Simple
WPI: Whey protein isolated

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Tabla I.1.1. <i>Monoterpenos más frecuentes de los AE</i>	45
Tabla I.1.2. <i>Sesquiterpenos más frecuentes de los AE</i>	46
Tabla I.1.3. <i>Otros componentes aromáticos presentes en los AE</i>	48
Tabla I.1.4. <i>Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de obtención de AE</i>	51
Tabla I.1.5. <i>Principales aplicaciones de los AE</i>	62
Tabla I.2.1. <i>Composición nutricional de las semillas de clavo</i>	73
Tabla I.2.2. <i>Composición del AEC determinada por GC-MS</i>	75
Tabla I.2.3. <i>Zonas de crecimiento inhibitorio (mm) mostrando la actividad antibacteriana del AEC (<i>Syzygium aromaticum</i>) y de su componente mayoritario EG</i>	77
Tabla I.3.1. <i>Ventajas e inconvenientes del uso de secado por atomización</i>	96
Tabla I.4.1. <i>Propiedades de las CDs</i>	102
Tabla I.4.2. <i>Aprobación legal de las CDs para uso alimentario</i>	136
Tabla I.5.1. <i>Ventajas de encapsulación de aromas con CDs</i>	138
Figura I.1.1. <i>Síntesis de terpenos y clasificación según la unidad de isopreno que contienen</i>	47
Figura I.2.1. <i>Botón floral de la semilla de clavo</i>	69
Figura I.2.2. <i>Semillas de clavo</i>	70
Figura I.2.3. <i>Estructura química de los principales componentes del AEC</i>	74
Figura I.3.1. <i>Proceso de microencapsulación de aromas y AE</i>	92
Figura I.4.1. <i>Estructura de α-, β y γ-CDs</i>	99
Figura I.4.2. <i>Estructura de β-CDs</i>	101

Figura I.4.3. Tipos de CDs modificadas.....	103
Figura I.4.4. Hilos supramoleculares.....	104
Figura I.4.5. Formación del complejo huésped ciclodextrina.....	108
Figura I.4.6. Diámetro externo e interno de las diferentes CDs	109
Figura I.4.7. Tipos de diagramas de fases con CDs.....	120
Figura I.4.8. Complejo de inclusión colesterol-CDs	128

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura III.1.1. Comparación de los espectros de máxima absorción de EG y AEC. (a) Espectro de absorción de EG (0,035 mg/mL). (b) Espectro de absorción de AEC (0,05 mg/mL).....	151
Figura III.1.2. Proceso de preparación de las microcápsulas formadas por AEC y PSL utilizando gelificación externa y gelificación interna.....	156
Figura III.1.3. Proceso de preparación de las diferentes microcápsulas mediante secado por atomización.....	157
Figura III.1.4. Resumen de las microcápsulas obtenidas mediante la aplicación de los distintos métodos: gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización.	158

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IV.1.1. Eficacia de encapsulación para las diferentes microcápsulas.....	164
Tabla IV.1.2. Constantes de complejación (K_c) entre EG y β -CDs calculadas por distintos tratamientos de los datos obtenidos por espectrofotometría UV-Vis (282 nm).....	170
Figura IV.1.1. Estructura química de EG	161

Figura IV.1.2. Espectro de absorción de EG. Soluciones etanólicas de concentraciones crecientes de EG: (a) 0,005, (b) 0,01, (c) 0,0175, (d) 0,025, (e) 0,03, (f) 0,045 mg/mL	162
Figura IV.1.3. Recta de calibrado de EG determinada por GC-MS. Soluciones etanólicas de concentraciones crecientes de EG ($5 \cdot 10^{-3}$ -20 mg/mL).....	163
Figura IV.1.4. Recta de calibrado de EG determinada por espectrofotometría UV-vis a 282 nm. Soluciones etanólicas de concentraciones crecientes de EG ($5 \cdot 10^{-3}$ -0,06 mg/mL).....	163
Figura IV.1.5. Diagrama de fases tipo Bs.....	166
Figura IV.1.6. Diagrama de fases EG- β -CDs. La línea discontinua representa el ajuste lineal de los datos experimentales de la porción lineal creciente.....	167
Figura IV.1.7. Evolución del espectro de absorción de EG con concentraciones crecientes de β -CDs: (a) 0, (b) 0,075, (c) 0,1 (d) 0,5, (e) 0,75, (f) 1, (g) 2 y (h) 3 mM.	168
Figura IV.1.8. Absorbancia de EG a 282 nm en presencia de concentraciones crecientes de β -CDs (0-3 mM). (■) EG 0,04 mM, (○) EG 0,05 mM y (●) EG 0,07 mM	169
Figura IV.1.9. Representación de Benesi-Hildebrand para EG con β -CDs (0-3 mM). (■) EG 0,04 mM, (○) EG 0,05 mM y (●) EG 0,07 mM.	171
Figura IV.1.10. Representación de Scatchard para EG con β -CDs (0-3 mM). (■) EG 0,04 mM, (○) EG 0,05 mM y (●) EG 0,07 mM	172
Figura IV.1.11. Estudio de solubilidad acuosa de EG con HP- β -CDs	173
 Tabla IV.2.1. Constantes de complejación (K_1) entre AEC y β -CDs calculadas por distintos tratamientos mediante estudios espectrofotométricos UV-Vis (282 nm).....	182
Figura IV.2.1. Cromatograma de AEC analizado por GC-MS	175
Figura IV.2.2. Espectro de masas del componente mayoritario del AEC (EG).	176
Figura IV.2.3. Recta de calibrado de AEC determinada por GC-MS (en base a su componente mayoritario (EG). Soluciones etanólicas de AEC (0-14 mg/mL)	176

- Figura IV.2.4.** Comparación de los espectros de máxima absorción de EG y AEC. (a, b) espectro de absorción de EG (0,035-0,045 mg/mL) (c, d) espectro de AEC (0,04-0,05 mg/mL). 177
- Figura IV.2.5.** Recta de calibrado del AEC determinada por espectrofotometría UV-vis a 282 nm. Soluciones etanólicas de concentraciones crecientes de AEC ($5 \cdot 10^{-3}$ -0,06 mg/mL). 178
- Figura IV.2.6.** Diagrama de fases AEC- β -CDs: (●) AEC soluble (○) AEC en complejos de inclusión insolubles (en base a su componente mayoritario EG). La línea discontinua representa el ajuste lineal de los datos experimentales de la porción lineal creciente. 179
- Figura IV.2.7.** Evolución del espectro de absorción de AEC con concentraciones crecientes de CDs: (a) 0,025 (b) 0,05, (c) 0,1, (d) 0,2, (e) 0,5 y (f) 1 mM. 180
- Figura IV.2.8.** Absorbancia de AEC a 282 nm en presencia de concentraciones crecientes de β -CDs (0-3mM). (■) AEC 0,04 mg/mL (○) AEC 0,05 mg/mL y (●) AEC 0,07 mg/mL 181
- Figura IV.2.9.** Representación de Benesi-Hildebrand para AEC con β -CDs (0-3mM). (■) AEC 0,04 mg/mL, (○) AEC 0,05 mg/mL y (●) AEC 0,07 mg/mL 183
- Figura IV.2.10.** Representación de Scatchard para AEC con β -CDs (0-3mM). (■) AEC 0,04 mg/mL, (○) AEC 0,05 mg/mL y (●) AEC 0,07 mg/mL. 184
- Figura IV.2.11.** Comparación de los diagrama de fases de (□) EG con β -CDs (●) y AEC con β -CDs (en base a su componente mayoritario EG) 185
- Figura IV.2.12.** Estudio de solubilidad acuosa de AEC con HP- β -CDs (en base a su componente mayoritario EG). **Figura IV.2.13.** Diagrama de fases de (●) AEC (en base a su componente mayoritario EG) y (□) EG con HP- β -CDs 186
- Figura IV.2.13.** Diagrama de fases de (●) EG y (□) AEC (en base a su componente mayoritario EG) con HP- β -CDs.
- Figura IV.3.1.** Proceso de preparación de complejos sólidos de inclusión de AEC- β -CDs para la optimización del método de preparación de complejos sólidos AEC- β -CDs. 187

Figura IV.3.2. Influencia del método de preparación (MWI o ultrasonidos) en la formación de complejos solubles AEC- β -CDs con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) (en base a su componente mayoritario EG). (□) Complejos solubles AEC- β -CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (1T). (■) Complejos solubles AEC- β -CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (2T). (○) Complejos solubles AEC- β -CDs realizados mediante MWI (1T). (●) Complejos solubles AEC- β -CDs realizados mediante MWI (2T)192

Figura IV.3.3. Influencia del método de preparación (MWI o ultrasonidos) en la formación de complejos sólidos AEC- β -CDs con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) (en base a su componente mayoritario EG). (□) Complejos sólidos AEC- β -CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (1T). (■) Complejos sólidos AEC- β -CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (2T). (○) Complejos sólidos AEC- β -CDs realizados mediante MWI (1T). (●) Complejos sólidos AEC- β -CDs realizados mediante MWI (2T).193

Figura IV.3.4. Contenido de AEC de complejos sólidos AEC- β -CDs. (en base a su componente mayoritario EG) con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) usando MWI. Efecto del secado en estufa a 40 °C en la concentración final de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs196

Figura IV.3.5. Contenido de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs (en base a su componente mayoritario EG) con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) usando MWI. Efecto del secado por atomización en la concentración final de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs197

Figura IV.3.6. Contenido de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs (en base a su componente mayoritario EG) con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) usando MWI. Efecto de la liofilización en la concentración final de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs198

Figura IV.3.7. Concentración máxima de AEC retenida tras la aplicación de diferentes métodos de secado de los complejos AEC- β -CDs (en base a su componente mayoritario EG). (Barras negras) Liofilización, (Barras gris claro) secado por atomización y (Barras gris oscuras) secado por estufa.....199

Tabla IV.4.1. <i>Concentración de AEC de las muestras a tiempo 0</i>	200
Tabla IV.4.2. <i>Muestras seleccionadas para estudio de estabilidad</i>	210
Tabla IV.4.3. <i>Estabilidad del AEC encapsulado con el tiempo y la temperatura</i>	212
Figura IV.4.1. <i>Extracción del AEC mediante la utilización de Hexano: Isopropanol (1:1) Efecto del tiempo de sonificado y la temperatura (barras negras: 5 min barras grises claro: 15 min; barras grises oscuro: 30 min). La Figura IV.4.1.A representa las microcápsulas realizadas por gelificación externa La Figura IV.4.1.B representa las microcápsulas realizadas por gelificación interna y la Figura IV.4.1.C refleja las microcápsulas realizadas mediante secado por atomización</i>	213
Figura IV.4.2. <i>Extracción de AEC mediante la utilización de Acetona:Agua (4:1) Efecto del tiempo de sonificado y la temperatura (barras negro: 5 min; barras grises claro: 15 min; barras grises oscuras: 30 min). La Figura IV.4.2.A representa las microcápsulas realizadas por gelificación externa La Figura IV.4.2.B representa las microcápsulas realizadas por gelificación interna y la Figura IV.4.2.C muestra las microcápsulas obtenidas mediante secado por atomización.</i>	208
Figura IV.4.3. <i>Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AEC de las microcápsulas preparadas por gelificación externa (25% AEC-GE) tras el almacenamiento a diferentes temperaturas: (●) 4 °C, (o) 25 °C y (▼) 40°C</i>	213
Figura IV.4.4. <i>Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AEC de las muestras preparadas mediante secado por atomización (10% PSN + 10% MD DE 25) tras el almacenamiento a diferentes temperaturas: (●) 4 °C, (o) 25 °C y (▼) 40 °C</i>	214
Figura IV.4.5. <i>Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AEC de las muestras preparadas mediante secado por atomización (10% PSN + 10% MD DE 4) tras el almacenamiento a diferentes temperaturas: (●) 4 °C, (o) 25 °C y (▼) 40 °C.</i>	215

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. ACEITES ESENCIALES

1.1. INTRODUCCIÓN

El término aceite esencial (AE) es utilizado para referirse a sustancias líquidas, volátiles, de carácter lipofílico y con fuertes propiedades aromáticas. Estas sustancias son sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios y pueden ser extraídas mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación. Los AE tienen un papel muy importante en la protección de las plantas actuando como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas. Poseen una composición química compleja que consiste en una mezcla de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente (Bauer et al., 2001).

Los AE son conocidos desde la Edad Media por sus propiedades antisépticas, terapéuticas y por su intenso aroma, despertando un gran interés para la conservación de alimentos. Debido a sus propiedades antimicrobianas, actualmente se está potenciando el uso de estos compuestos en la industria farmacéutica y alimentaria reduciendo así el uso de productos químicos de síntesis y protegiendo el equilibrio ecológico.

La mayoría de los AE son extractos de plantas aromáticas localizadas en zonas templadas y cálidas como áreas mediterráneas y tropicales. Son líquidos, volátiles, cristalinos, raramente coloreados, solubles en disolventes orgánicos y generalmente con menor densidad que el agua. Son sintetizados por los distintos órganos de las plantas: semillas, flores, hojas, tallos, raíces y ramas, y se almacenan en canales, células epidérmicas o en tricomas glandulares para su posterior secreción.

La extracción del AE de la planta consiste, principalmente, en una destilación a baja o alta presión mediante el uso de agua (hidrodestilación), corrientes de vapor o mediante el uso de dióxido de carbono líquido. Teniendo en cuenta que el producto de la extracción puede variar en calidad, cantidad y composición dependiendo de factores como las características de la tierra de

cultivo, el órgano de la planta del cual se hace la extracción, edad y estado del ciclo vegetativo, es necesario controlar el material y las condiciones de extracción para obtener un AE de características homogéneas (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006). La composición química de los AE suele ser caracterizada por cromatografía de gases masas (GC-MS).

En la actualidad se conocen alrededor de 3000 AE, 300 de los cuales son comercialmente importantes para la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética y alimentaria. Los AE y/o muchos de sus componentes son ampliamente usados en perfumería, cosmética, en industria farmacéutica, odontología, agricultura, como aditivos en la industria alimentaria y como remedios naturales. Por ejemplo, *α*-limoneno, geranyl acetato o *α*-carvona, se utilizan en perfumes, cremas, jabones, como aroma en productos químicos de limpieza y como aditivos en alimentación. Además, en la actualidad el uso de mezclas de AE se está ampliando a fines terapéuticos y en aromaterapia (Hajhasshemi et al., 2003; Perry et al., 2003; Silva et al., 2003).

1.2. HISTORIA DE LOS AE

La aparición de las primeras civilizaciones y la preocupación por la imagen y apariencia física puede considerarse como detonante indirecto para la búsqueda, el estudio y el conocimiento de los AE. Los primeros testimonios escritos sobre AE proceden de Egipto, China, India, Arabia, Persia y Grecia, en los que se demostraban los sofisticados conocimientos y tradiciones que imperaban en el cultivo y los usos de hierbas y especias (Loewenfeld y Back, 1980).

El Antiguo Testamento recoge numerosos testimonios sobre el conocimiento y uso de los AE. Los primeros procesos de destilación de AE se realizaron en Oriente (Egipto, Persia e India), sin embargo, y al igual que en muchos otros campos, estas rudimentarias destilaciones consiguieron su máximo desarrollo en Occidente. Los legados sobre los métodos, objetivos y resultados de estas primeras destilaciones son escasos y ambiguos. Sólo en los escritos de grandes historiadores como Herodoto (484-425 a.C), Plinio (23-79) y su contemporáneo Dioscórides (¿?-65), empieza a haber reseñas sobre AE, siendo el aceite de

trementina el primer AE mencionado por los historiadores griegos y romanos (Guenther, 1948).

En la Antigua Grecia, Roma y, sobre todo, a partir de la Edad Media, se elaboraban AE cuya obtención distaba mucho del método utilizado en la actualidad. Los aceites se embotellaban con flores, raíces u otras partes aromáticas de las plantas y después de un tiempo de maceración se conseguían “aceites olorosos”.

El primer manuscrito que define la destilación como método de obtención de un AE fue escrito por Arnald de Villanova (1235-1311), quien especificó detalladamente el proceso de destilación del AE de trementina.

En el s. XIII, los AE se producían en farmacias y sus aplicaciones ya eran descritas en farmacopeias (Bauer et al., 2001), pero su uso en Europa no parece extenderse hasta el s. XVI, época en la que comenzaron a comercializarse en Londres. Cabe destacar la obra de “New Gross Destillirbuch”, de Water Reiff (1556), que contiene la primera referencia sobre la industria y comercialización de AE. De acuerdo con el físico francés Du Chesne, en el s. XVII la preparación de AE era muy común, y las farmacias comercializaban de 15 a 20 tipos de AE diferentes (Guenther, 1948). Todos estos avances en la obtención de AE se desarrollaron paralelamente a técnicas de fraccionamiento y caracterización de los mismos. En el s. XVIII comenzó la revolución química con el planteamiento de la hipótesis sobre la naturaleza de las sustancias que componen estas mezclas y la forma de separarlas para conseguir su identificación. Houton (1887) fue el primero en detectar la relación carbono/hidrógeno, aunque no fue hasta 1918 cuando Wallach sentó las bases de los terpenos y su clasificación (Guenther, 1972). Como consecuencia de los avances en la caracterización y propiedades de los AE, el uso de los mismos se ha ampliado a lo largo de la historia. Los primeros experimentos sobre las propiedades bactericidas de los vapores de los AE fueron descritas por De la Croix en 1881 (Boyle, 1955). Sin embargo, en el transcurso de los siglos XIX y XX, el uso de los AE con fines médicos pasó a un segundo plano, dando mayor importancia a su uso como aromatizantes (Guenther, 1948).

1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS AE

Los AE son mezclas complejas que pueden contener entre 20 y 60 compuestos de diferentes estructuras químicas en concentraciones muy diferentes. Normalmente, sus propiedades son atribuidas a dos o tres componentes mayoritarios (20-70%), que son los que determinan la actividad biológica de los mismos (Croteau et al.; 2001; Bowles, 2003; Pichersky et al., 2006). Entre los componentes mayoritarios de los AE se encuentran terpenos y otros componentes aromáticos.

1.3.1. Terpenos

Los terpenos son lípidos insaponificables formados por dos o más unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Pueden ser moléculas lineales o cíclicas, y algunos de ellos contienen estructuras de ambos tipos. Son sustancias sintetizadas por las plantas a partir de metabolitos primarios a través de dos rutas: la ruta del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico (MVA), que reacciona hasta formar isopentenil pirofosfato (IPP); o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y también genera IPP (Ávalos y Pérez, 2009).

El IPP y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) son los precursores biosintéticos de los terpenos, dando lugar mediante reacciones de condensación a: E-geranil pirofosfato, precursor de monoterpenos, farnesil pirofosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos, y geranilgeranil pirofosfato (GGPP), que es precursor de diterpenos. La hidrólisis de todos estos ésteres, junto con sucesivas isomerizaciones y reacciones intramoleculares, origina toda la gama de estructuras terpénicas (**Figura I.1.1**).

Dentro del grupo de los compuestos que contienen terpenos destacan: hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos) y AE, proporcionando el aroma y el sabor característico de las plantas. Otros compuestos como las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, pero contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial.

Los AE están formados en su mayoría por monoterpenos (C_{10}), constituyendo hasta un 90% de los AE. Los **monoterpenos** (C_{10}) son frecuentes en familias de angiospermas como *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myristaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* y *Rubiaceae* (Guenther, 1982). Se habla de monoterpenos regulares cuando se originan por la fusión “cabeza-cola” de dos unidades de isopreno, enlazando el carbono 1 (C_1) de la primera unidad de IPP y el carbono 4 (C_4) de la segunda. Los monoterpenos irregulares se forman cuando la fusión es del tipo “cabeza-mitad”, es decir, la fusión se produce entre el carbono 1 (C_1) de la primera unidad de isopreno y el carbono 2 ó 3 (C_2 , C_3) de la segunda molécula. A partir de esta primera diferenciación se pueden subdividir atendiendo al número de ciclos que presentan: acíclicos, monocíclicos y bicíclicos. Entre las moléculas más representativas destacan (Tabla I.1.1):

Tabla I.1.1. Monoterpenos más frecuentes de los AE.

Carburos Acíclicos: mirceno, Ocimeno. Monocíclicos: terpinenos, <i>p</i> -cimeno, felandreno Bicíclicos: pinenos, 3-careno, camfeno, sabineno
Alcoholes Acíclicos: geraniol, linalol, citronelol, lavandulol, nerol Monocíclicos: α -terpineol, carveol Bicíclicos: borneol, fenchol, crisantenol.
Cetonas Acíclicos: tegetona Monocíclicos: Mentonas, carvona, pulegona, piperitona Bicíclico: alcanfor, fenchona, tujona, ombelulona, pinocamfona, pinocarvona
Ésteres Acíclicos: linalil acetato, propionato, acetato de citronelilo Monocíclicos: mentol, -terpinil acetato
Éteres Acíclicos: 1,8- cineol, mentofurano
Fenoles Timol, carvacrol

Los **sesquiterpenos (C₁₅)** están formados por la unión de tres unidades de isopreno. La extensión de la cadena aumenta el número de ciclaciones permitiendo una gran variedad de estructuras. Su estructura y función es muy similar a la de los monoterpenos. Por regla general, la mayoría de ellos presenta una unión regular “cabeza-cola”. Al igual que los monoterpenos, se pueden encontrar en los AE, pero están presentes con mayor frecuencia, en hongos, plantas no vasculares e incluso en bacterias como *Streptomyces*.

Al contar con una unidad de isopreno más que los monoterpenos, presentan una mayor plasticidad en su construcción que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional. Las estructuras más importantes se detallan en la **Tabla I.1.2.**

Tabla I.1.2. *Sesquiterpenos más frecuentes de los AE.*

Carburos
azuleno, β -bisaboleno, camines, β -caryophileno, longifoleno, curcumenos, β -farnesenes, zingibireno
Cetonas
β -Nootkatona, ventinona

Entre las plantas que contienen estos compuestos se encuentran bergamota, alcaravea, apio, eucalipto, lavanda, menta, naranja, mandarina, pimienta, pino, romero, lavanda, limón y tomillo.

Los **diterpenos (C₂₀)** son compuestos formados por 4 unidades de isopreno. Presentan mayor peso molecular y menor volatilidad que monoterpenos y sesquiterpenos. Sus características moleculares y estructurales dificultan la extracción por corrientes de vapor (Torres et al., 1997).

La mayoría de los diterpenos han sido extraídos de plantas vasculares y de algunos talófitos, como algas y hongos. Pueden actuar como sustancias repelentes, como feromonas atrayentes de insectos, e incluso como compuestos citotóxicos frente a células tumorales (Porter y Spurgeon, 1981; Schiest et al., 2000; Iguchi et al., 2002).

Los **tetraterpenos (C₄₀)** difieren del resto de grupos de compuestos isoprenoides en que no presentan ciclación del esqueleto carbonado principal salvo

excepciones, como es caso de β -caroteno (Duan y Moeller, 2001; Sirisoma et al., 2001).

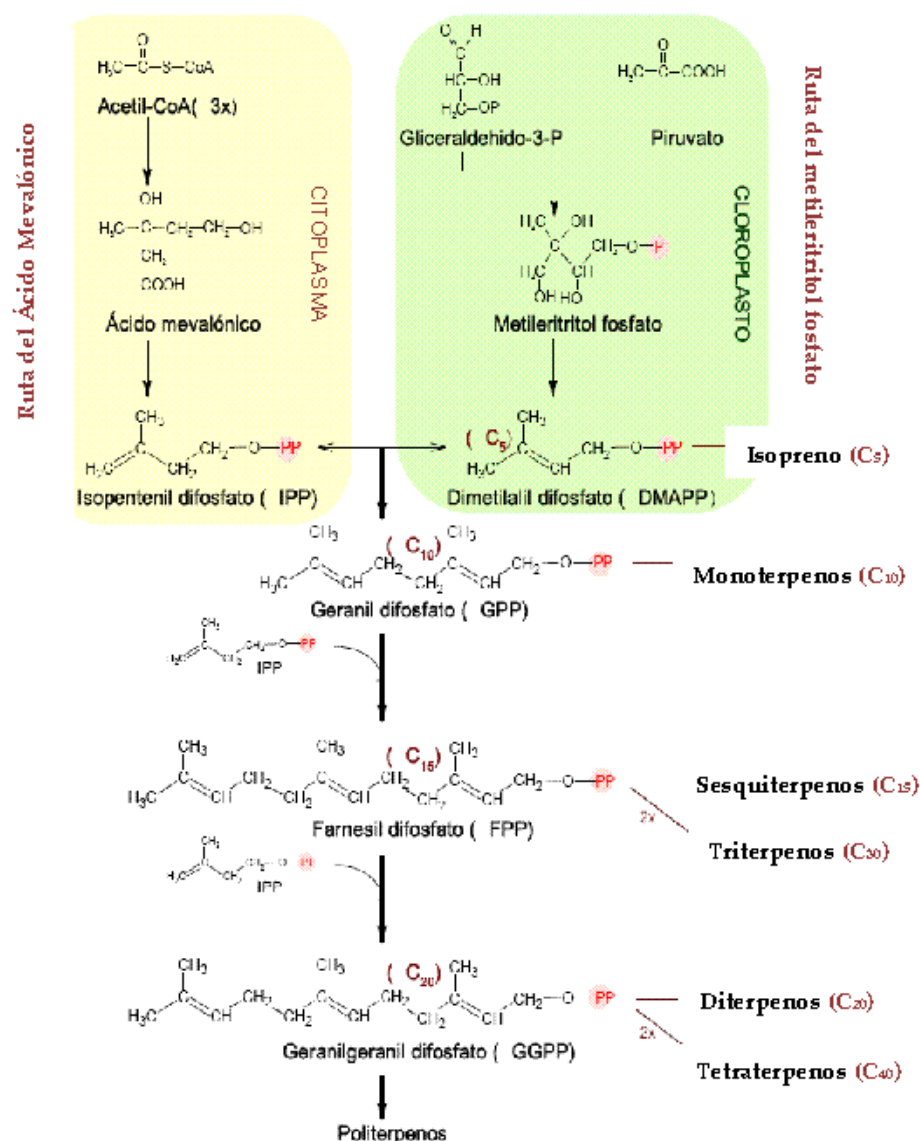


Figura I.1.1: Síntesis de terpenos y clasificación según las unidades de isopreno que contienen. Ávalos y Pérez (2009).

1.3.2. Otros componentes aromáticos

Son derivados de los fenilpropanoides, y se encuentran en menor proporción que los monoterpenos. Entre ellos destacan (**Tabla I.1.3**):

Tabla I.1.3. *Otros componentes aromáticos presentes en los AE.*

Aldehídos Cinamaldehído
Alcoholes Alcohol cinámico
Fenoles Chavicol, eugenol
Metoxi-derivados Anetol, elemicina, estragol, metileugenol

Las principales fuentes de estos compuestos son plantas de anís, canela, clavo, apio, nuez moscada, perejil, anís estrellado, estragón y algunas familias botánicas como *Apiaceae*, *Laminaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*.

También pertenecen a este grupo componentes nitrogenados o sulfurados como glucosinolatos o derivados de isoticianatos que son característicos del metabolismo secundario de distintas especies de la familia *Brassicaceae* o crucíferas (brécol, coles de Bruselas, coliflor, col lombarda, col rizada, colinabo, hojas de mostaza, rutabaga, nabo, berro) y aceites de mostaza (Bakkali et al., 2008).

1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS AE

1.4.1. Obtención y preparación del material vegetal

El material vegetal se recolecta antes, durante o tras la floración. En el caso de que interese estudiar algún principio activo de ellas, se obtiene una muestra completa de hojas, flores, tallos y raíces y se deja secar al aire hasta peso constante. Cuando la finalidad del material vegetal es su uso farmacológico, el control de calidad es muy importante en el muestreo, ya que hay que seguir las normas

establecidas por la Farmacopea o las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998).

Los AE constituyen la fracción volátil de los principios activos contenidos en una planta, y se obtienen mediante diferentes técnicas de extracción.

1.4.2. Destilación

La destilación es uno de los procedimientos más empleados para la extracción del AE. Industrialmente son varios los métodos utilizados: destilación con agua o hidrodestilación, destilación con agua y vapor, y destilación con vapor directo (Vargas y Bottia, 2008). El equipo básico para la obtención de AE consta de:

- **Tanque extractor o alambique:** Es el componente principal del equipo de destilación. Es el lugar donde se coloca el material vegetal y se lleva a cabo el proceso de destilación. Factores como la presión, temperatura, flujo de vapor y altura del lecho del material vegetal son determinantes en la extracción de los AE.
- **Cuello de Cisne:** Comunica el alambique con el condensador. Es importante considerar sus formas y dimensiones ya que deben reducirse al mínimo las posibilidades de re-condensación de vapores dentro del alambique y permitir su rápida transferencia al condensador del sistema.
- **Separador o Florentino:** La mezcla líquida que fluye del condensador se recolecta en un recipiente conocido como Florentino. El diseño de este recipiente depende de la densidad del AE a destilar.

1.4.2.1. Hidrodestilación

La hidrodestilación (HD) es un proceso en el que el material vegetal se sumerge en agua en estado de ebullición. El agua penetra en los tejidos de la planta, disuelve parte del AE presente en los distintos órganos de la planta y pasa a ser posteriormente recolectado por condensación. Este método requiere tiempos largos de calentamiento y la utilización de grandes cantidades de agua, lo cual incrementa el coste y el tiempo de la destilación.

1.4.2.2. Destilación con agua-vapor

Es un método en el que el material vegetal se coloca sobre una malla y no permite el contacto directo con el agua que se sitúa por debajo. Una vez iniciado el proceso, el agua se lleva a ebullición y el vapor que se genera pasa a través del material vegetal. De este modo se evita que el material vegetal se queme. Es importante que el vapor generado pase uniformemente a través de la carga para garantizar la completa extracción del AE.

1.4.2.3. Destilación por arrastre de vapor

Es el método más usado a nivel industrial. Consiste en obtener el AE de una planta aromática mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica. A diferencia del método de destilación con vapor de agua, el generador de vapor no forma parte del recipiente donde se almacena la materia prima sino que es externo y suministra un flujo constante de vapor. La materia prima forma un lecho compacto y se desprecia el reflujo interno de agua debido a la condensación del vapor circundante.

De manera general, el proceso se describe de la siguiente manera: la materia prima vegetal es cargada en un hidrodestilador de manera que forme un lecho fijo compactado. Su estado puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno, próximo a su base, y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. La generación del vapor puede ser local (hervidor), remota (caldera).

Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el AE contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante es “arrastrado” corriente arriba, hacia el tope del hidrodestilador. La mezcla vapor saturado-AE fluye hacia un condensador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada hasta temperatura ambiente, obteniéndose una emulsión líquida inestable que es separada en un decantador dinámico o florentino. El proceso termina cuando la cantidad de AE presente en el florentino no varía con el tiempo. También se obtiene “agua floral” que es el vapor condensado que acompaña al AE y que posee una pequeña concentración de los compuestos químicos solubles del AE, lo cual le

otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido. La **Tabla I.1.4** muestra las ventajas y desventajas asociadas a las diferentes técnicas de obtención de los AE.

Tabla I.1.4. *Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de obtención de AE.*

Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Hidrodestilación	<ul style="list-style-type: none"> • Simple y económico 	<ul style="list-style-type: none"> • Calentamiento difícil de controlar • Sobre calentamiento que puede quemar el material vegetal • Mayor coste energético • Períodos de extracción más largos • Solubilización parcial de compuestos polares
Destilación agua-vapor	<ul style="list-style-type: none"> • La muestra no se calienta directamente • Tiempos de extracción medios • Configuración simple y económica 	<ul style="list-style-type: none"> • Riesgo de extracción incompleta • El tiempo de extracción está limitado al volumen de agua utilizado
Destilación por arrastre de vapor	<ul style="list-style-type: none"> • La muestra no se calienta directamente • Tiempos de extracción más cortos 	<ul style="list-style-type: none"> • Las temperaturas altas pueden causar la hidrólisis de los ésteres y la polimerización y resinificación de los terpenos presentes en los AE • Necesita infraestructura más costosa

1.4.3. Otros métodos de extracción de AE

1.4.3.1. *Enfleurage*

Este método utiliza grasas naturales con temperaturas de ablandamiento alrededor de 40 °C, normalmente manteca de cerdo RBD (Refinada, Blanqueada, Desodorizada). La grasa se extiende en bandejas de profundidad no mayor a 0,5 cm y sobre ellas se coloca el material vegetal de donde se van a extraer los componentes aromáticos. El contacto puede durar de 3 a 5 días. Pasado ese tiempo, el material vegetal es retirado y reemplazado por material fresco, repitiendo la operación hasta la saturación de la grasa. Posteriormente, la grasa impregnada del principio activo se lava con etanol. El etanol se filtra y se destila a vacío hasta recuperar un 80 % del volumen de etanol, separándolo así de lo que se conoce como aceite absoluto.

1.4.3.2. *Extracción con solventes*

El material vegetal debe de ser molido previamente, para conseguir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente durante la maceración. Durante el proceso, el sólido, el líquido, o ambos, deben estar en continuo movimiento para lograr mayor eficiencia de la operación. El proceso suele realizarse a temperatura ambiente y presión atmosférica y de forma continua o discontinua (percolación, lixiviación, extracción tipo soxhlet). Los solventes más empleados son etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona y cloroformo. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados.

1.4.3.3. *Extracción por prensado*

El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas discontinuas (tipo batch) o continuas. Para los cítricos, antiguamente se empleaba el método manual de la esponja, que consiste en exprimir manualmente las cáscaras con una esponja hasta que se empapa de aceite. Posteriormente se exprime la esponja y se libera el AE.

1.4.3.4. Extracción con fluidos supercríticos (FSC)

El punto crítico corresponde a las condiciones de temperatura y presión por encima de las cuales una sustancia ya no puede ser condensada por incremento de presión. Adicionalmente, las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir, no hay diferenciación visible ni medible entre gas y líquido.

El FSC más utilizado es el CO₂. Es conocido comúnmente como el disolvente ecológico. No es tóxico, no contamina, no es inflamable, es económico, fácil de reciclar, y por tanto no plantea problemas medioambientales de gestión de residuos. En condiciones supercríticas presenta baja viscosidad, baja tensión superficial y alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), lo que conlleva un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar en los pequeños poros, lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto periodo de tiempo. Tiene la ventaja de poder separarse totalmente y de forma sencilla de los extractos con tan sólo la modificación de la presión o la temperatura.

1.5 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS AE

1.5.1. Citotoxicidad y fototoxicidad

Estudios sobre la composición química de los AE han revelado que las propiedades de los mismos son el resultado de la unión de sus múltiples componentes (Carson et al., 2002).

Sus características les confieren la capacidad de atravesar la pared celular y las membranas citoplasmáticas, alterando la estructura química de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y permeabilizando las membranas.

En bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada a una pérdida de iones, reducción del potencial de membrana, colapso en el bombeo de protones y una disminución de la reserva de ATP (Knobloch et al., 1989; Sikkema et al., 1994; Helander et al., 1998; Ultee et al., 2000, 2002; Di Pascua et al., 2006; Turina et al., 2006). Los AE pueden penetrar en el citoplasma (Gustafson et al., 1998) y provocar daños intracelulares al entrar en contacto con lípidos y proteínas (Ultee et al., 2002; Oussalah et al., 2006). Los daños en la pared celular y en la membrana citoplasmática pueden dar lugar a la lisis celular y a la fuga de macromoléculas

(Gustafson et al., 1998; Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001; Juven et al., 1994; Oussalah et al., 2006).

En células eucariotas, los AE pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales, produciendo una disminución del potencial de membrana, afectando a los canales de Ca^{2+} (Richter y Schlegel, 1993; Novgorodov y Gudz, 1996; Vercesi et al., 1997) y otros canales iónicos, reduciendo así el gradiente de pH y afectando el bombeo de protones y las reservas de ATP. Estos cambios en la fluidez de membrana hacen que se vuelvan permeables, provocando la fuga de radicales, Citocromo C, iones de Ca^{2+} y proteínas. Estos efectos sobre la membrana mitocondrial externa e interna pueden dar lugar a la muerte celular por apoptosis y necrosis (Yoon et al., 2000).

El uso de microscopía de transmisión electrónica (SEM) ha revelado la aparición de alteraciones celulares ultraestructurales en membranas celulares, citoplasma y núcleo de células tratadas con AE (Santoro et al., 2007a, b). Di Pascua y colaboradores (2007) describieron el análisis del perfil lipídico (por GC-MS) y la estructura celular por SEM de bacterias tratadas con AE, mostrando un aumento de ácidos grasos saturados en detrimento de la concentración de ácidos grasos insaturados, así como alteraciones de la estructura celular.

Los efectos citotóxicos de los AE han sido observados (*in vitro*) sobre la mayoría de bacterias patógenas gram (+) y gram (-) (William et al., 1998; Kalemba y Kunicka, 2003; Arnal-Schnebel et al., 2004; Burt, 2004; Hong et al., 2004; Rota et al., 2004; Si et al., 2006; Sonboli et al., 2005, 2006 a, b), en ADN y virus (Hayashi et al., 1995; De Logu et al., 2000; Jasmin y Naji, 2003; Reichling et al., 2005), hongos (Manohar et al., 2001; Pitarokili et al., 2002; Hammer et al., 2002; Kosalec et al., 2005) y levaduras (Harris, 2002; Hammer et al., 2004; Wang et al., 2005; Duarte et al., 2005; Pauli, 2006; Carson et al., 2006).

La citotoxicidad de los AE depende tanto de su composición química como del estado de crecimiento celular y puede ser atribuida principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes presentes en los aceites (Bruni et al., 2003; Sachetti et al., 2005). Generalmente, las células en división son más sensibles a los AE que las células en estado latente.

La citotoxicidad de compuestos como eugenol, isoeugenol, metileugenol y safrol también ha sido demostrada en células hepáticas de ratas y ratones (Burkey et al., 2000).

Los mecanismos de esta acción citotóxica de los AE han sido ampliamente descritos, sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales pueden aparecer resistencia o adaptación microbiana. Varios autores han descrito la resistencia en cepas de *Bacillus* sometidas al tratamiento con concentraciones subletales de carvacrol, provocando una disminución de la fluidez de la membrana y cambios en la composición de ácidos grasos (Ultee et al., 2000; Di Pasqua et al., 2006). También ha sido descrita una reducción de la efectividad de antibióticos sobre células humanas tratadas con concentraciones subletales de AE del árbol del té. Probablemente, este efecto es debido a cambios en las membranas celulares que inhiben la penetración del antibiótico (Mc Mahon et al., 2007). Sin embargo, Raffi y Shaahverdi (2007) demostraron que un uso combinado de AE y antibiótico provoca un aumento de la actividad de éste último frente a enterobacterias.

En relación con la fototoxicidad, muchos AE contienen moléculas fototóxicas como las furocumarinas. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas con actividad tóxica en presencia de luz, que se activan en presencia de luz UV-A. Al ser activadas, sus electrones alcanzan un estado de energía que les permite insertarse en la doble hélice del ADN, bloqueando su transcripción y reparación e incluso a veces provocando la muerte celular. Dijoux et al. (2006) mostraron que el AE de sándalo, *Fusanus spicatus*, no era fototóxico pero sí citotóxico. La citotoxicidad parece ser antagonista de la fototoxicidad. En el caso de la citotoxicidad, los AE dañan las membranas celulares y de orgánulos actuando como prooxidantes en proteínas y ADN, produciendo especies reactivas de O_2 (ERO). Una exposición a la luz no añade mucho más efecto sobre la reacción global. En el caso de la fototoxicidad, los AE penetran en la célula sin causar daños en las membranas celulares, proteínas o ADN. Las reacciones de radicales se producen en presencia de luz por excitación de ciertas moléculas dando lugar a oxígeno singlete. Esto puede causar daños en orgánulos celulares y, en algunos casos, provocando la formación de aductos de ADN, de proteínas y de lípidos de membrana.

Obviamente, la citotoxicidad o fototoxicidad depende del tipo de moléculas presentes en los AE y de su compartimentación en las células, produciendo diferentes tipos de radicales dependiendo de si han sido expuestas a

la luz o no. Sin embargo, el antagonismo no es una regla estricta. Dijoux et al. (2006) mostraron que *Citrus aurantium dulcis* y el AE de *Cymbopogon citratos* eran citotóxicos y fototóxicos.

1.5.2. Mutagenicidad nuclear

Diferentes trabajos han demostrado el efecto mutagénico nuclear de los AE, por ejemplo, el AE de *Artemisia dracunculus* tiene este efecto sobre *Bacillus subtilis* (Zani et al., 1991). El AE de hierbabuena (*Mentha spicata*) y el de *Anethum graveolens* también mostraron genotoxicidad en *Drosophila melanogaster* (Franzios et al., 1997; Karpouhtsis et al., 1998). Los AE extraídos de *Pinus sylvestris* y *Mentha piperita*, provocaron daños en linfocitos (Lazutka et al., 2001).

También se ha estudiado la actividad individual de varios constituyentes aislados de los AE. Eugenol (EG), componente principal del AE clavo (AEC), ha mostrado genotoxicidad en células V79 (Maralhas et al., 2006). Sin embargo, otros componentes como cinamaldehído, carvacrol, timol, y carvona demostraron un débil efecto mutagénico (Stanmati et al., 1999).

1.5.3. Mutagenicidad citoplasmática

La mayoría de los estudios mutagénicos y de anti-mutagenicidad de AE han sido llevados a cabo en bacterias, células hepáticas, linfocitos, insectos y levaduras, dando lugar a distintos resultados.

Las levaduras, como organismos anaerobios facultativos, pueden sobrevivir con daños mitocondriales e incluso sin mitocondrias. Esto contrasta con lo observado en bacterias y en células de mamíferos, donde la inducción de defectos en la cadena respiratoria está asociada directamente a la muerte celular. Teniendo en cuenta las ventajas del sistema de las levaduras, se ha demostrado que las mitocondrias son el objetivo diana de muchos AE. Schmolzt et al. (1999) demostraron una relación directa entre el deterioro de la mitocondria y los cambios inmediatos del metabolismo respiratorio de levaduras *Sacharomyces cerevisiae* tratadas con AE del árbol del té. Por otro lado, el tratamiento con AE de canela, clavo, ajo, cebolla y orégano sobre células de *Sacharomyces cerevisiae* mostró un retraso en la producción de etanol (Conner et al., 1984).

15.4. Carcinogenicidad de los AE

Muchos AE, o algunos de sus componentes, pueden ser considerados como carcinógenos secundarios después de su activación metabólica. Por ejemplo, los AE de *Salvia sclarea* y *Melaleuca quinquenervia* provocan la secreción de estrógenos, los cuales pueden inducir la aparición de cáncer estrógeno dependiente (Guba, 2001).

Otros AE contienen moléculas fotosensibles como flavinas, cianinas, porfirinas e hidrocarburos, y han mostrado efectividad contra eritemas o cáncer. Psoralen es una molécula fotosensible que se encuentra en el AE de *Citrus bergamia* y puede inducir la formación de cáncer de piel por la formación de aductos de ADN bajo la acción de luz UV-A o luz solar (Averbeck y Averbeck, 1998). La pulegona es un componente esencial en muchas especies de menta, que puede inducir la carcinogénesis generando una disminución de glutatión y una disminución de la protección celular frente a especies como radicales libres y peróxidos (Zhou et al., 2004). Safrol es el constituyente mayoritario de los AE *Sassafras albidum* y *Ocotea pretiosa* y ha demostrado inducir el metabolismo carcinogénico en roedores (Miller et al., 1983; Burkey et al., 2000; Liu et al., 2000). Metileugenol, como componente de los AE de *Laurus nobilis* y *Melaleuca leucadendron*, ha demostrado actividad carcinogénica en roedores (Burkey et al., 2000). α -limoneno, como componente del AE de *Citrus*, y estragol, como componente de los AE de *Ocimum basilicum* y *Artemisia dracunculus*, han dejado evidente las propiedades carcinogénicas en ratas y ratones (Antonhy et al., 1987; Miller et al., 1983).

15.5. Propiedades antimutagénicas de los AE

Los estudios llevados a cabo con AE han indicado que su actividad antimutagénica puede deberse a la inactivación de agentes mutagénicos por atrapamiento directo, evitando así la penetración de los mismos en el interior de la célula (Hartman y Shankel, 1990; Sharma et al., 2001; Ipek, 2005); la inhibición de la conversión de promutágenos en mutágenos o la activación de la detoxificación enzimática de mutágenos en extractos de plantas (Ramel et al., 1986; De Flora y Ramel, 1988; Kuo et al., 1992; Waters et al., 1996; Gomes-Carneiro et al., 2005).

El estudio bioquímico de sustancias antimutagénicas es relativamente nuevo. Gomes-Carneiro et al. (2005) demostraron la capacidad de α -bisabolol para

inhibir componentes que inducen la mutagenénesis, como la aflatoxina B1, 2-aminoantraceno, benzo- α -pireno y 2-aminofluoreno. Sin embargo, α -bisabolol demostró menor eficacia en otros compuestos que también inducen mutagénesis, como 4-nitroquinolina-N-óxido y 2-nitrofluoreno y ningún efecto sobre el ácido sódico (NaN₃) y nitro-o-fenilenediamina.

Evandri et al. (2005) han demostrado que el AE de *Lavandula angustifolia* inhibe la actividad mutagénica de 2-nitrofluoreno sobre *Escherichia coli*. De-Oliveira et al. (1997, 1999), han demostrado que (-)- α -mentol, (-)- α -pineno, (+)- α -pineno, α -terpineno, α -terpinol, 1,8-cineol, *d*-limoneno, alcanfor, citronelal y citral pueden ser utilizados para modular la acción de enzimas hepáticas que intervienen en la activación de promutagénicos y procarcinógenos.

1.6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AE

A pesar de que las propiedades antibacterianas de los AE y de sus componentes han sido ampliamente estudiadas (Shelef, 1983; Nychas, 1995; Koedam, 1997a), el mecanismo de acción no ha sido estudiado en detalle (Lambert et al., 2001). Esta actividad antibacteriana no se le atribuye a un solo mecanismo específico si no que su acción se ha atribuido a la acción multifactorial que los distintos componentes del AE tienen sobre la célula (Skandamis et al., 2001; Carson et al., 2002).

Una de las características más importante de los AE es su hidrofobicidad. Esto hace que sean capaces de penetrar a través de las membranas celulares, alterando sus estructuras y haciéndolas más permeables (Carson et al., 2002). La fuga de estos compuestos a bajas concentraciones puede ser tolerada por la célula sin la pérdida de la viabilidad de la misma. Sin embargo, la pérdida excesiva o salida de moléculas críticas pueden llevar a la muerte celular (Denyer y Hugo, 1991a). Existen evidencias con estudios del AE del árbol del té y *Escherichia coli* en los que la muerte celular puede ocurrir antes de la lisis celular (Gustafson et al., 1998).

Generalmente, los AE que poseen elevada actividad antibacteriana frente a patógenos resistentes contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como carvacrol, eugenol y timol (Farag et al., 1989). Los mecanismos de acción de estos

compuestos son muy similares al de otros compuestos fenólicos provocando la interrupción de la cadena respiratoria, la alteración de canales iónicos de membrana, las alteraciones del flujo de electrones y el transporte activo (Denyer y Hugo, 1991b).

El estudio de la actividad antibacteriana del AE de tomillo y de su componente mayoritario (carvacrol) mostró distintos niveles de inhibición del crecimiento cuando se utilizaron por separado frente a especies gram (+) y gram (-) (Dorman y Deans, 2000).

En un estudio con geraniol, se demostró que la adición de acetato a la molécula parecía aumentar la actividad antibacteriana, siendo el acetato de geraniol más efectivo frente a un gran rango de gram (+) y gram (-) que el geraniol por sí sólo (Dorman y Deans, 2000).

También parece evidente la interacción de los componentes de los AE con las proteínas integrales de membrana (Knobloch et al., 1989). Las moléculas hidrocarbonadas presentes en los AE pueden acumularse en la bicapa lipídica y destruir la interacción lipoproteica (Juven et al., 1994; Sikkema et al., 1994), provocando modificaciones de la estructura celular y como consecuencia alteraciones de la funcionalidad celular.

El AE de canela y sus componentes han demostrado inhibir enzimas como aminoacil descarboxilasas en *Enterobacter aerogenes*. El mecanismo de acción parece ser la unión de los componentes del AE de canela a proteínas (Wendakoon y Sakaguchi, 1995). Las evidencias que demuestran que los componentes de los AE pueden interactuar con las proteínas también han sido descritas por Pol et al. (2001) en estudios llevados a cabo en leche con distintas concentraciones de proteína.

Aparentemente, los componentes de los AE interaccionan con las ATPasas presentes en la membrana citoplasmática (Burt, 2004). Gill et al. (2002) llevaron a cabo un estudio con eugenol, carvacrol y cinamaldehído como componentes principales de AE y demostraron su efecto inhibitorio sobre ATPasa de membrana de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

1.7. SUSCEPTIBILIDAD DE ORGANISMOS GRAM(-) Y GRAM(+)

La mayoría de los estudios sobre la acción de AE frente al deterioro de los alimentos por patógenos coinciden con que, los AE son más activos frente a

microorganismos gram (+) que frente a gram (-) (Shelef, 1983; Farag et al., 1989; Uttara et al., 1997; Smith- Palmer et al., 1998; Delaquis et al., 2002; Harpaz et al., 2003). El hecho de que las bacterias gram (-) sean menos susceptibles a la acción de los AE quizás sea debido a que la membrana externa que poseen y que rodea la pared celular (Ratledge y Wilkinson, 1988) restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de la membrana (Vaara, 1992). Sin embargo, no todos los estudios de los AE concluyen con que gram (+) sean más susceptibles a la acción de los AE (Wilkinson et al., 2003). De hecho, *Aeromonas hydrophyla* (gram (-)), parece ser una de las especies más sensibles a la acción de los AE (Deans y Ritchie, 1987; Stecchini et al., 1993; Wan et al., 1998).

La compleja composición de los AE puede variar en función de las condiciones de crecimiento de cultivo de la planta, del modo de extracción del mismo, y de otros factores que hacen que éstos tengan diferente grado de actividad antibacteriana (Dorman y Deans, 2000).

1.8. SINERGISMO Y ANTAGONISMO ENTRE LOS AE

La actividad antimicrobiana combinada de varios AE parece estar relacionada con su composición química, la proporción en la que se encuentren sus componentes y la interacción entre ellos (Dorman y Deans, 2000; Marino et al., 2001; Delaquis et al., 2002). Varios estudios han demostrado una mayor eficacia antimicrobiana del AE natural que cuando se utiliza una mezcla sus componentes mayoritarios (Mourey y Canillac, 2002). Esto sugiere que los componentes minoritarios que contienen son muy importantes en su actividad y que además pueden tener un efecto sinérgico potenciando sus efectos.

Los dos componentes mayoritarios del AE de orégano, carvacrol y timol, han mostrado una potenciación de su efecto antimicrobiano cuando se usan combinados frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert et al., 2001).

En un estudio llevado a cabo con mezclas de AE de cilantro, eneldo y eucalipto se demostraron efectos sinérgicos o antagónicos, dependiendo de la proporción de cada uno de ellos en la mezcla (Delaquis et al., 2002).

Moleyar y Narasimham (1992) realizaron un estudio en el que se utilizó una mezcla de cinnamaldehído y eugenol a 250 y 500 µg/mL respectivamente, mostrando una inhibición del crecimiento de *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.* y *Enterobacter sp.* durante un periodo de más de 30 días, mientras que los compuestos utilizados individualmente no inhibieron el crecimiento.

1.9. APLICACIONES DE LOS AE

En la Unión Europea (UE), los principales usos de los AE se dan en la industria agroalimentaria (saborizantes y aromatizantes), la industria farmacéutica (principios activos y saborizantes), y cosmética (perfumes y aromatizantes) (Bauer y Garbe, 1985; Van Wellie, 1997; Van de Braak y Leiten, 1999).

Las propiedades antibacterianas que poseen los AE y sus componentes son aprovechadas en odontología (Manabe et al., 1987), como antisépticos (Bauer y Garbe, 1985; Cox et al., 2000) y como suplementos alimentarios para lechones y cerdos recién destetados (Van Krimpen y Binnendijk, 2001; Ilsley et al., 2002). El uso de mezclas de AE como conservantes se está ampliando cada vez más en la industria alimentaria. “DMC Base Natural” es un conservante utilizado en alimentación producido por DOMCA S.A. (Granada, España). Este conservante está constituido en un 50% por AE y 50% por glicerol (Mendoza-Yepes et al., 1997). “Protecta One” y “Protecta Two” son extractos de hierbas producidos por Bavaria Corp. (Apopka, Florida, EEUU). Estos productos son reconocidos como sustancias GRAS, y por tanto, pueden ser usados en la industria agroalimentaria.

Hay mezclas de distintos AE disueltos en soluciones de citrato sódico o cloruro sódico (Cutter, 2000), que son utilizados como supresores del crecimiento de tallos en patata (Harmants et al., 1995) y como repelentes de insectos (Carson y Riley, 1993).

Las aplicaciones industriales y terapéuticas de los AE dependen, principalmente, de su composición química, calidad, propiedades organolépticas, así como del grado de refinamiento de la esencia. Por tal motivo, resulta de vital importancia el control de calidad de los mismos, así como el estudio de su composición en función de las condiciones de cultivo de la especie. La **Tabla I.1.5.**

resume algunas de las aplicaciones más importantes de los AE en diferentes áreas de la industria de aroma y sabores, cuidado personal, farmacéutica y química.

Tabla I.1.5. Principales aplicaciones de los AE.

Industria de aromas y sabores	Cuidado Personal	Industria Farmacéutica	Productos Industriales
Alimentos y bebidas	Cosméticos	Medicamentos	Pesticidas
Aromatizantes	Aseo personal	Fármacos de	Papeles y Tintas
para fármacos	Productos dentales	uso veterinario	Cauchos/ Plásticos
Tabaco	Productos para hogar		Textiles

1.10. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS AE EN SISTEMAS ALIMENTARIOS

Hasta principios de los 90 eran muy pocos los estudios en los que se mencionaba la actividad de los AE en alimentos (Board y Gould, 1991). Desde entonces un gran número de ensayos han sido llevados a cabo en modelos alimentarios.

Los estudios llevados a cabo para demostrar la eficacia antibacteriana de los AE anteriormente probados *in vitro*, han demostrado la necesidad de mayores cantidades de los mismos para obtener los mismos efectos en los alimentos. Un estudio con leche semidesnatada demostró con un AE que la proporción necesaria para obtener el mismo efecto antibacteriano era dos veces mayor que la cantidad utilizada en estudios *in vitro* (Karatzas et al., 2001), 10 veces más en salchichas de cerdo (Pandit y Shelef, 1994), 50 veces en sopa (Ultee y Smid, 2001) y de 25-100 veces más en queso tierno. Sin embargo, una excepción a este fenómeno se observó en la inhibición de *Aeromonas hydrophila* en cerdo cocinado y lechuga, para la cual no se necesitó una mayor cantidad de AE que en los estudios realizados *in vitro* (Stecchini et al., 1993; Wan et al., 1998).

Muchos estudios han mostrado los efectos de los AE sobre varios alimentos en cuanto a la resistencia microbiana, pero no parecen cuantificar o explicar el mecanismo de actuación. No sólo las propiedades intrínsecas de los alimentos como

contenido en grasa, proteína, agua, antioxidantes, conservantes, pH, sal y otros aditivos son importantes a la hora de definir la sensibilidad microbiana de un alimento, también lo son factores extrínsecos como la temperatura, tipo de envasado y características del microorganismo (Shelef, 1983). Generalmente, la susceptibilidad bacteriana a los efectos de los AE parece aumentar con la disminución de pH de los alimentos, el aumento del tiempo de almacenamiento, la disminución de la temperatura y la cantidad de O₂ dentro del envase (Skadamis y Nychas, 2001; Tsigarida et al., 2000). A pH ácido, la hidrofobicidad de los AE aumenta, haciendo que éstos se disuelvan más fácilmente en los lípidos de membrana aumentando así su efectividad (Juven et al., 1994).

Varios autores han descrito la acción de altos niveles de grasa y/o proteína en un alimento para proteger a las bacterias de la acción de los AE (Pandit y Shelef, 1994). La hidrofobicidad de los AE hace que éstos se disuelvan en la fase lipídica de los alimentos y que se encuentren en menor proporción para interactuar con las bacterias que se encuentran en la fase acuosa (Mejlholm y Dalgaard, 2002). También se ha sugerido que el bajo contenido en agua de los alimentos, comparado con los estudios realizados *in vitro*, puede interrumpir el proceso de los agentes antibacterianos (Smith-Palmer et al., 2001). Estudios llevados a cabo con AE de menta en productos de alto contenido en grasa como paté y ensalada de pescado, mostraron un pequeño efecto antibacteriano contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, mientras que en ensaladas de bajo contenido en grasa de pepino y yogur, el AE fue mucho más efectivo (Tassou et al., 1995), indicando que el porcentaje de grasa ejerce una gran influencia en los efectos antibacterianos del AE.

La reacción entre carvacrol y proteínas de leche ha sido descrita como factor limitante de la actividad antibacteriana de este componente a *Bacillus cereus* en leche (Pol et al., 2001). El contenido en proteínas también ha sido citado como factor inhibidor de la acción del AE de clavo sobre *Salmonella enteritidis* en queso bajo en grasa (Smith-Palmer et al., 2001). Sin embargo, los hidratos de carbono en los alimentos no parecen proteger a las bacterias de la acción de los AE tanto como la grasa y las proteínas.

La estructura física de los alimentos también puede limitar la actividad antibacteriana de los AE. Un estudio sobre rendimiento del AE de orégano frente a *S. typhimurium* en medio sólido y líquido respectivamente, reveló que la matriz del

gel sólido redujo enormemente el efecto inhibitorio del AE. Se supone que el efecto fue debido a la limitación de la difusión del AE debido a la estructura de gel de la matriz (Skandamis et al., 2000). Se ha demostrado que la concentración mínima inhibitoria de un AE para una bacteria en particular es menor en caldos que en agar (Hammer et al., 2004).

1.10.1. Carne y productos cárnicos

Estudios llevados a cabo sobre distintos productos cárnicos han mostrado las diferencias existentes en el uso de los distintos AE.

Eugenol, cilantro, clavo, orégano y tomillo han mostrado su efectividad a niveles de 5-20 $\mu\text{L/g}$ inhibiendo *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y la flora autóctona que produce el deterioro de productos cárnicos (Stecchini et al., 1993; Hao et al., 1998a; Tsigarida et al., 2000; Skandamis y Nychas, 2001). Por el contrario, los AE de mostaza, menta y salvia fueron menos efectivos (Tassou et al., 1995; Gill et al., 2002; Lemay et al., 2002). El AE de cilantro también ha mostrado un aumento de la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* en jamón (Gill et al., 2002).

El AE de romero encapsulado mostró una mayor efectividad que el mismo sin encapsular cuando se utilizó frente a *Listeria monocytogenes* en salchichas de hígado de cerdo (Pandit y Shelef, 1994).

La actividad del AE de orégano frente a esporas de *Clostridium botulinum* ha sido estudiada en carne de cerdo picada y envasada al vacío. Concentraciones por encima de 0,4 $\mu\text{L/g}$ de AE de orégano no mostraron una influencia significativa en la reducción del crecimiento o del número de esporas.

1.10.2. Pescados

En pescado, al igual que ocurre en productos cárnicos, su alto contenido en grasa parece reducir la efectividad de la actividad antimicrobiana de los AE. Por ejemplo, el AE de orégano a una concentración de 0,5 $\mu\text{L/g}$ es más efectivo frente al deterioro del microorganismo *Photobacterium phosphoreum* en filetes de bacalao que en salmón, que es un pescado más graso (Mejlholm y Dalgaard, 2002).

El tipo de AE también es determinante. El AE de orégano es más efectivo en pescado que el AE de menta, incluso en platos más grasos (5-20 $\mu\text{L/g}$) (Tassou et al., 1995).

1.10.3. Productos Lácteos

Un estudio llevado a cabo con AE de menta (5-20 $\mu\text{L/g}$) demostró ser efectivo contra *Salmonella enteritidis* en ensalada de pepino con yogur bajo en grasa (Tassou et al., 1995). El AE de menta inhibió el crecimiento del cultivo starter a concentraciones de 0,05-5 $\mu\text{L/g}$. Los AE de cardamomo, canela y clavo fueron incluso más efectivos que el AE de menta (Bayourni, 1992).

Los AE de clavo, canela, laurel y tomillo fueron probados frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* en queso. Las especies formadoras de colonias se inhibieron más fácilmente en queso bajo en grasa que en el mismo queso con su porcentaje de grasa normal. Parece ser que el nivel de grasa del queso protegió a las células bacterianas en diferente medida, dependiendo del aceite utilizado. Sin embargo, el AE de clavo, fue más efectivo frente a *Salmonella enteritidis* en el queso con su porcentaje normal grasa que en el queso con bajo contenido en grasa (Smith-Palmer, 2001).

1.10.4. Verduras y Hortalizas

Los estudios llevados a cabo en productos vegetales, al igual que en productos cárnicos, demostraron que la actividad antimicrobiana de los AE se ve favorecida por el descenso de la temperatura de almacenamiento y/o un descenso del pH del alimento (Skandamis y Nychas, 2000). Los vegetales contienen un contenido muy bajo en grasa, lo cual puede explicar los buenos resultados obtenidos con los AE.

Todos los AE y componentes mayoritarios de los mismos que han sido probados en vegetales parecen ser efectivos contra el deterioro de la flora natural y patógenos resistentes. Cinamaldehído y timol son efectivos frente a 6 serotipos de *Salmonella* en semillas de alfalfa, cuando éste se aplicó como una corriente de aire caliente a 50 °C como método de fumigación. Sin embargo, el aumento de la

temperatura a 70 °C disminuyó la efectividad del tratamiento (Weissinger et al., 2001). Esto puede ser debido a la volatilidad de los compuestos antibacterianos.

El AE de orégano fue efectivo a concentraciones de 7-21 µg/mL inhibiendo *Escherichia coli* O157:H7 y reduciendo la población final de la especie en ensalada de berenjena comparada con el control (Skandamis y Nychas, 2000).

1.10.5. Arroz

El crecimiento de *Bacillus cereus* en arroz es uno de los problemas microbiológicos más frecuentes a los que se enfrentan productores y consumidores de este producto. El AE de salvia demostró ser efectivo a concentraciones de 0,15-0,75 µL/g extendiendo la fase lag o de letargo del crecimiento microbiano y reduciendo la población final.

1.10.6. Frutas

Mediante la utilización de AE se ha conseguido la reducción de la carga microbiana de frutas. Carvacrol y el cinamaldehído se han utilizado para controlar la carga microbiana en kiwi y melón. Para ello, la fruta se sumergió en soluciones de 0,15-0,75 µL/mL de ambos compuestos, siendo el tratamiento menos efectivo en melón, posiblemente debido a la diferencia de pH entre ambas frutas más ácido en el kiwi que en el melón. (Roller y Seedhar, 2002). En general, cuanto más bajo era el pH, más efectivos eran los AE y sus componentes.

1.11. SINERGISMO ENTRE LOS COMPONENTES DE LOS AE Y LOS CONSERVANTES DE LOS ALIMENTOS O LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Se han descrito en la literatura numerosos factores que potencian la actividad de los AE: bajo pH, baja actividad de agua, tratamiento térmico suave y altas presiones (Gould, 1996).

El cloruro sódico (NaCl) actúa como agente sinérgico o antagónico dependiendo de las circunstancias los componentes de los AE. El sinergismo entre el NaCl y el AE de menta frente a *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* ha sido encontrado en taramosalata (plato típico turco) (Tassou et al., 1995). El uso combinado de 2-3% de NaCl y 0,5% de clavo molido en extractos de músculo de

caballa produjeron la inhibición del crecimiento de *Enterobacter aerogenes*. El mecanismo que sugirieron para esto fue que eugenol aumentaba la permeabilidad de las células, y como consecuencia de ello, el NaCl inhibía su crecimiento por su acción sobre las enzimas intracelulares (Wendakoon y Sakaguchi, 1993). Los efectos antagónicos de la sal fueron encontrados con carvacrol y *p*-cimeno contra *Bacillus cereus* en arroz. Carvacrol y *p*-cimeno actuaron sinérgicamente, pero su efecto se disminuyó cuando se le añadió NaCl (1,25 g/L) (Ultee et al., 2000b). En el mismo estudio, la salsa de soja mostró sinergismo con carvacrol. Sin embargo, este sinergismo fue anulado por la presencia de la NaCl.

También se ha estudiado el efecto de la combinación de AE de orégano con nitrito sódico (NaNO₂) ha sido examinado sobre en el crecimiento y la producción de toxina botulínica por parte de *Clostridium botulinum*. El AE de orégano actuó sinérgicamente con el nitrito para inhibir el crecimiento, mientras que por sí solo, hasta concentraciones de 400 ppm, no tuvo efectos significativos en la inhibición del crecimiento bacteriano.

La aplicación simultánea de nisina (0,15 µg/mL) y carvacrol o timol (0,3 mmol/L) causó una mayor disminución del crecimiento de cepas de *Bacillus cereus* que cuando los antimicrobianos fueron aplicados individualmente. La máxima reducción de la viabilidad se consiguió en células que habían experimentado un tratamiento térmico previo a 45 °C (Periago et al., 2001). A pH 7, la acción sinérgica de nisina y carvacrol fue mayor a 30 °C que a 8 °C, lo cual pareció indicar que la temperatura induce cambios en la permeabilidad de la membrana. Hay varias hipótesis que demuestran que el carvacrol puede incrementar el número, tamaño o la duración de la existencia de poros creados por nisina en la membrana celular (Periago y Moezelar, 2001).

2. CLAVO

(*Eugenia caryophyllata*, *Syzygium aromaticum*)

2.1. TAXONOMIA Y PRODUCCIÓN

La semilla de clavo es el botón floral del árbol tropical *Eugenia caryophyllata* o *Syzygium aromaticum* perteneciente a la familia *Myrtaceae*.

Originariamente se trata de un árbol procedente de las Islas Molucas (Indonesia). De acuerdo con la FAO (2008), el 70% de la producción mundial de la semilla de clavo tiene lugar en Indonesia, aunque en la actualidad el cultivo también se ha extendido a Madagascar, Zanzíbar, India y Sri Lanka.

El árbol del clavo es un árbol perenne de la familia *Myrtaceae*, de hasta 20 m de altura, aunque habitualmente, cuando el cultivo se destina a la producción no supera los 10 m. Su tallo es erecto y de corteza gris. Destacan sus hojas puntiagudas, oval lanceoladas, muy aromáticas y de color verde intenso. Las hojas contienen numerosas glándulas que le dan aspecto pegajoso. Sus flores se encuentran en inflorescencias en forma de panículas al final de las ramas jóvenes. Poseen cuatro pétalos rosas y varios pistilos amarillos. Los frutos son de color rojo oscuro, pequeños y alargados (**Figura I.2.1**) (Kim et al., 1998).



Figura I.2.1 Botón floral de la semilla de clavo.

El fruto se recolecta cuando la yema floral todavía no se ha abierto, ya que cuando éstas se desarrollan por completo pierden su aroma. Al principio, las yemas florales tienen una tonalidad rosa, pero a medida que van creciendo adquieren una tonalidad rojo fuerte que indica la fecha de recolección del fruto.

Los principales productos obtenidos del fruto del clavo son las propias semillas de clavo, clavo molido, oleorresinas y aceite esencial obtenido de los tallos, hojas y semillas de clavo.

Las **semillas de clavo** (**Figura I.2.2**) son recolectadas cuando han alcanzado su talla adecuada y se tornan de color rojizo. Después de la recolección, las semillas se separan del tallo a mano o mediante la utilización de una trilladora. Inmediatamente después de la separación, las semillas son secadas al sol o usando secado artificial. El color y contenido en aceite de los clavos secados artificialmente no difiere enormemente de los mismos cuando son secados a la sombra (Hidayat y Nurdjannah, 1992). El almacenamiento de las semillas suele hacerse en un ambiente seco y con buena ventilación. Si no se realiza adecuadamente puede causar pérdidas de aceite por evaporación. La tasa de evaporación durante el almacenamiento depende de las condiciones físicas de los frutos, temperatura y humedad relativa (Purseglove et al., 1981). Condiciones ambientales desfavorables pueden causar pérdidas de volátiles, crecimiento de hongos y desarrollo de aromas rancios (Reineccius, 1994).



Figura I.2.2. *Semillas de clavo.*

El **clavo molido** se obtiene por aplicación de fuerzas mecánicas a las semillas secas. El proceso se realiza a 20-25 °C para prevenir la pérdida de volátiles durante el proceso. Para evitar el calentamiento durante el proceso, el equipo de molienda dispone de un sistema de refrigeración. La reducción de tamaño de la semilla da como resultado partículas muy pequeñas de tamaño variable.

Las **oleorresinas** son extractos de las semillas deshidratadas obtenidas por tratamientos con solventes volátiles. Los solventes empleados son eliminados casi completamente por procesos de destilación a vacío. La oleorresina de clavo se obtiene por extracción con éter de petróleo, hexano, diclorometano o etanol, siendo éste último el más adecuado (Somaatmaja, 1981). Después de la extracción, el solvente es eliminado mediante vacío dando como resultado la oleorresina. La oleorresina de clavo es un líquido muy viscoso que contiene de 40-60% de eugenol (EG). Se utiliza en la industria farmacéutica para elaborar productos anestésicos, en la industria alimentaria como saborizante para condimentos y repostería, y en la industria cosmética para formular perfumes y cremas terapéuticas.

Para la extracción del **aceite esencial de clavo (AEC)** se puede usar un gran número de técnicas, con diferentes costes y nivel de complejidad. La extracción del producto varía en cantidad, calidad y composición dependiendo del clima, composición del suelo, órgano, edad, y estado del ciclo vegetativo de la planta.

También son importantes los tratamientos pre y post destilación, así como el método de destilación utilizado. La destilación a vapor y la hidrodestilación son las técnicas más comunes para la obtención del aceite. Con el fin de obtener un AE con composición constante, el proceso de extracción debe realizarse bajo las mismas condiciones y a partir del mismo órgano de la planta (Bakkali et al., 2008).

Para facilitar la liberación del aceite de las células vegetales, las semillas de clavo y los tallos son triturados antes de la destilación. Posteriormente el material vegetal es sometido a destilación a vapor o hidrodestilación durante un período de 8 a 24 horas.

La destilación de las semillas enteras da lugar a un AE con mayor contenido en EG mientras que el uso de semillas trituradas produce una disminución del contenido de EG en el producto final debido a la evaporación del mismo durante el proceso de molienda (Guenther, 1948).

Otros autores han señalado que el contenido de EG del AE depende del tiempo utilizado en la destilación del mismo. Destilaciones rápidas producen AE con un contenido en EG mucho más alto que utilizando una destilación normal (Bauer, 1985).

La extracción también se puede llevar a cabo mediante la utilización de fluidos en condiciones supercríticas. El compuesto más utilizado es el CO₂, a presión y temperatura superior a su punto crítico. En estas condiciones, se obtienen buenos rendimientos y se evitan alteraciones de los compuestos volátiles. Este tipo extracción conlleva infraestructuras más caras, pero tiene grandes ventajas como fácil y rápida eliminación del gas extractor por descompresión, y ausencia de residuos de disolventes procedentes de la extracción.

2.2. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL CLAVO

La composición nutricional del clavo varía en función con las condiciones agroclimáticas bajo las cuales el fruto ha sido cultivado, procesado y almacenado. El fruto de clavo seco contiene carbohidratos, proteínas, aceite, resinas, taninos, celulosas, pentosas y elementos minerales. La **Tabla I.2.1** representa la composición nutricional de las semillas de clavo.

Tabla I.2.1. Composición nutricional de las semillas de
clavo.

<i>Nutriente</i>	<i>Valor / 100g</i>
Agua (mg)	6,86
Energía (Kcal/KJ)	323/1350
Proteínas (g)	5,98
Grasa Total (g)	20,12
Carbohidratos (g)	61,21
Fibra (g)	34,2
Cenizas (g)	5,88
Calcio, Ca (mg)	646
Hierro, Fe (mg)	8,68
Magnesio, Mg (mg)	264
Fósforo, P (mg)	105
Potasio, K (mg)	112
Sodio, Na (mg)	243
Zinc, Zn (mg)	1,09
Cobre, Cu (mg)	0,35
Manganeso, Mn (mg)	30,00
Selenio, Se (mg)	6,00
Vit C (mg)	80,80
Vit B ₁ (mg)	0,12
Vit B ₂ (mg)	0,27
Vit B ₃ (mg)	1,45
Vit B ₆ (mg)	0,590
Folatos (µg)	93,0
Vit E, α-tocoferol (mg)	8,52
Vit K (µg)	141,8
AG Saturados totales (g)	5,44
AG Monoinsaturados (g)	1,47
AG Poliinsaturados totales (g)	7,08
Fitosteroles (mg)	256

2.3.COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AEC

El AEC está formado por una gran variedad de compuestos (Chaieb et al., 2007). Su composición varía dependiendo de su procedencia. Entre sus componentes destaca eugenol (49-98%) como compuesto mayoritario, β -cariofileno (4-21%) y eugenil acetato (0,5-21%). Además también se pueden encontrar pequeñas cantidades de α -humuleno y trazas (< 1%) de otros 25 a 35 constituyentes. La estructura química de los principales componentes del AEC quedan respresentados en la **Figura I.2.3**. La **Tabla I.2.2** resume la composición del química del aceite esencial de clavo.

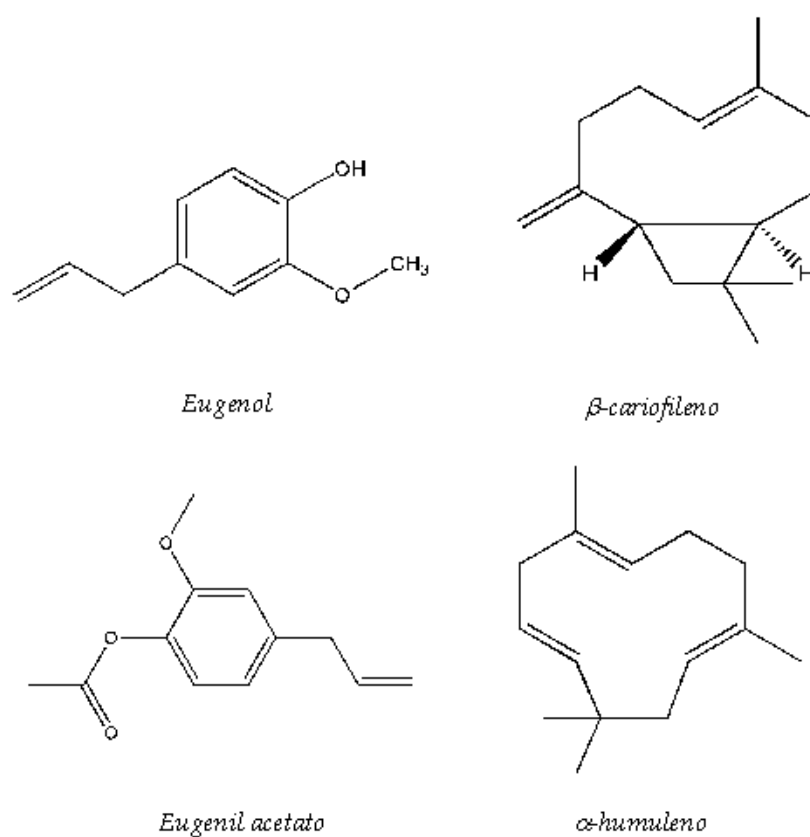


Figura I.2.3. Estructura química de los principales componentes del AEC.

Tabla I.2.2. Composición del AEC determinada por GC-MS (Chaieb et al., 2007).

N ^a	Componente ^{a,b}	Índice	Porcentaje
		Kovats ^c	(%)
1	2 Heptanona	1172	0,93232
2	Etil hexanoato	1232	0,66098
3	2 heptanol	1304	tr
4	Mentil octanoato	1384	tr
5	2 nonanona	1392	tr
6	Etil octanoato	1428	tr
7	α cubebeno	1459	tr
8	Copaeno	1491	tr
9	2 nonanol	1491	tr
10	Linalol	1499	tr
11	2 undecanona	1548	tr
12	β cariofileno	1588	1,38830
13	Mentil benzoato	1595	Tr
14	Etil benzoato	1619	Tr
15	α Humuleno	1647	0,19985
16	Mentil chavicol	1668	Tr
17	α -anroceno	1669	Tr
18	α terpinil acetato	1675	Tr
19	α muroleno	1695	Tr
20	Benzil acetato	1711	Tr
21	Carvona	1714	Tr
22	γ Cadineno	1731	Tr
23	2 ferulil acetato	1756	Tr
24	(E) anetol	1826	Tr
25	Calameneo	1827	0,10538
26	Alcohol benzílico	1828	Tr
27	Calacoreno	1861	0,11437
28	Canofileno óxido	1918	Tr
29	Mentil eugenol	1976	Tr
30	Humuleno óxido	1985	tr
31	Aldehído canámico	1986	tr
32	Etil acramato	2018	tr
33	Benzil ugato	2072	tr
34	Eugenol	2151	88,88535
35	Eugenil acetato	2263	5,62086
36	Humuleno	2265	0,27527
Total identificado		98,2769	98,2769

Orden de elución de la columna capilar HP-20M

^a Identificación por comparación del espectro de masas y los datos del índice de Kovats o índice de retención.^c Índice de Kovats en la columna capilar HP-20M, tr: trazas (< 0.1%)

24. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL AEC

2.4.1. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de diferentes extractos de *Eugenia caryophyllata* ha sido demostrada frente a bacterias patogénicas, incluyendo *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Larshini et al., 2001; Friedman et al., 2002; Burt y Reinders, 2003; Cressy et al., 2003; Feres et al., 2005). Mytle y colaboradores (2006) observaron una reducción en la tasa de crecimiento de cepas de *Lysteria monocytogenes* a temperaturas de 15 y 5 °C con un tratamiento de AEC a concentraciones de 1-2%. Otros autores han descrito diferencias en la acción antibacteriana de los AE dependiendo de la procedencia del mismo. Cuando se ha estudiado el efecto de AEC frente a un grupo de bacterias el AEC extraído de la semilla ha mostrado una mayor actividad frente *Staphylococcus aureus*, mientras que el aceite procedente de las hojas inhibe con mayor intensidad el crecimiento de *Bacillus cereus* (Ogunwande et al., 2005).

Numerosos estudios han revelado la acción inhibidora de AEC frente a bacterias intrahospitalarias que pueden dar lugar a graves infecciones. *Staphylococcus* (coagulasa negativo) es un patógeno gram (+) intrahospitalario que tiene la habilidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en catéteres de diálisis y material instrumental. Neely y Maley (2000) aislaron 32 cepas multi-resistentes de *Staphylococcus epidermidis* mediante la difusión en discos de agar. Cada cepa bacteriana demostró un grado de sensibilidad diferente al AEC. La mayor efectividad del AEC se ha demostrado frente a cinco cepas de *Staphylococcus epidermidis* (CIP 106510, E13, S27, S23, y S38). Además también el AEC también ha sido efectivo contra 26 cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas de fluidos de diálisis. Estos resultados coinciden con los expuestos por Enzo y Susan (2002), en los que el AEC mostró actividad antibacteriana frente a un gran número de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina. Dorman y Deans (2000) llevaron a cabo un estudio en el que se comparó la actividad antibacteriana de distintos AE y de sus componentes mayoritarios. La **Tabla I.2.3** muestra la eficacia antimicrobiana de los distintos microorganismos cuando se utiliza AEC y cuando se utiliza su componente mayoritario, EG. A la luz de los resultados, aunque no hay una tendencia claramente marcada, en el 64% de

los casos estudiados la actividad antibacteriana, representada por la zona de crecimiento inhibitorio, es mayor para el AEC en comparación con el compuesto puro EG.

Tabla I.2.3 Zonas de crecimiento inhibitorio (mm) mostrando la actividad antibacteriana del AEC (*Syzygium aromaticum*) y de su componente mayoritario EG. Adaptada de Dorman y Deans (2000).

Cepas Bacterianas	Fuente	AEC	Eugenol
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NCIB 8250	10,3 ± 0,2	15,4 ± 0,3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	NCTC 8049	11,7 ± 1,1	17,0 ± 0,4
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NCIB 8156	23,1 ± 0,6	12,3 ± 0,5
<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610	21,1 ± 0,1	21,8 ± 0,4
<i>Beneckea natrie gens</i>	ATCC14048	15,8 ± 0,7	20,8 ± 1,8
<i>Brevibacterium linens</i>	NCIB8456	29,8 ± 0,1	12,7 ± 0,1
<i>Brocothrix thermospacta</i>	Meat	11,1 ± 0,1	14,1 ± 0,2
<i>Citrobacter freundii</i>	NCIB 11490	14,1 ± 2,6	9,1 ± 0,3
<i>Clostridium sporogenes</i>	NCIB 10696	13,4 ± 0,5	9,7 ± 0,1
<i>Enterobacter faecalis</i>	NCTC 775	15,5 ± 0,6	10,0 ± 0,1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NCTC1006	7,8 ± 1,1	9,9 ± 0,2
<i>Erwinia carotovora</i>	NCPPB 312	11,7 ± 0,6	10,0 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i>	NCIB 8879	13,6 ± 1,1	13,3 ± 0,3
<i>Flavobacterium suaveolens</i>	NCDO 343	14,4 ± 0,4	10,9 ± 0,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCIB 418	9,1 ± 0,3	21,5 ± 0,6
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCDO 343	28,5 ± 0,2	11,7 ± 0,7
<i>Leuconostoc cremoris</i>	NCDO 543	18,7 ± 0,1	No inhibición
<i>Micrococcus luteus</i>	NCIB 8165	14,8 ± 1,0	11,7 ± 0,7
<i>Moraxella sp.</i>	NCIB 10762	15,8 ± 0,6	10,1 ± 0,6
<i>Proteus vulgaris</i>	NCIB 4175	9,1 ± 0,8	8,3 ± 0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCIB 950	14,0 ± 0,8	15,5 ± 0,6
<i>Salmonella pullorum</i>	NCIB 10704	14,0 ± 0,6	12,9 ± 0,1
<i>Serratia marcescens</i>	NCIB 1377	21,6 ± 0,8	22,9 ± 0,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCIB 6571	14,9 ± 0,9	11,5 ± 0,5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NCIB 10460	13,7 ± 0,9	11,6 ± 0,4

2.4.2. Actividad antifúngica

Las propiedades antifúngicas del AEC se deben principalmente a su componente mayoritario EG (Manohar et al., 2001). Cox y colaboradores, en 2001 demostraron que la actividad antifúngica es debida a su acción sobre la membrana celular, provocando la desestabilización de la misma e induciendo la muerte celular. La efectividad del AEC ha sido demostrada en *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* (Tampieri et al., 2005) y *Aspergillus niger* (Pawar y Thaker, 2006). Núñez y colaboradores en 2001, estudiaron el efecto de la temperatura, el tiempo de contacto y la concentración (0,2%-0,8%) (v/v) de oleorresina de clavo dispersada en una solución saturada de azúcar sobre *Candida albicans*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los resultados demostraron un aumento del efecto fungicida a una temperatura de 37 °C. El efecto fungicida de la solución de clavo-azúcar sobre *Candida albicans* fue muy similar a los desinfectantes utilizados normalmente en centros hospitalarios, como povidona yodada y cloroxilenol. A pesar de que la oleorresina demostró un importante efecto letal, *Penicillium citrinum* y *Aspergillus niger* fueron más resistentes al tratamiento. Por otro lado, el uso de la oleorresina de clavo (0,4%) (v/v) disuelta en soluciones acuosas causó un 99,6% de reducción de la población inicial de *Trichophyton mentagrophytes*.

2.4.3. Actividad antivírica

La actividad antivírica de *Syzygium aromaticum* también ha sido descrita por Hussein y colaboradores (2000). El AEC se ha utilizado para demostrar la fuerte actividad de éste en la inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C (inhibición > 90% con 100 µg/mL). También se ha demostrado la eficacia del AEC sobre el virus del herpes simple (VHS) por inhibición de la actividad de la enzima VHS-1-DNA polimerasa (Kurokawa et al., 1998).

2.4.4. Actividad antioxidante

La mayoría de antioxidantes naturales son compuestos fenólicos que se encuentran en plantas (Kim et al., 1997). Las propiedades antioxidantes del AEC también se le atribuyen a su componente mayoritario EG (Ogata et al., 2000).

La capacidad antioxidante de AEC ha quedado evidente mediante la utilización de varios métodos de medida de la inhibición de la actividad radicalaria: DPPH, ABTS, medida de la actividad antioxidante por el método de tiocionato férrico, el método FRAP que mide la capacidad de transformación de Fe^{3+} - Fe^{2+} , y el método de atrapamiento del ión superóxido por el sistema riblofavina/metionina. El AEC mostró una actividad inhibitoria del 97,3% en la peroxidación lipídica de una emulsión de ácido linoleico a una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados son muy similares a los obtenidos con la utilización de antioxidantes estándar como butilhidroxianisol (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), α -tocoferol y trolox demostraron una inhibición de 95,4, 99,7, 84,6 y 95,6% de la peroxidación lipídica en la misma emulsión de ácido linoleico. La actividad el AEC se ha demostrado debido a la capacidad de atrapamiento de DPPH, $\text{ABTS}^{\bullet+}$, anión superóxido y actividad quelante (Gulçin et al., 2010).

Otros estudios también han demostrado una mayor capacidad antioxidante del AEC frente al radical DPPH que su componente mayoritario eugenol, o un antioxidante estándar de origen sintético como el hidroxitolueno butilado (BHT) (Jirovetz et al., 2006).

Basándose en estos resultados, el AEC puede ser usado para minimizar la oxidación lipídica en alimentos y productos farmacéuticos, retrasando la formación de productos de oxidación que pueden alterar la calidad nutricional y una disminución de la vida útil de alimentos y productos de la industria farmacéutica (Gulçin et al., 2004).

2.4.5. Actividad antitumoral

La actividad anticancerígena y antimutagénica del AEC ha sido demostrada por algunos autores (Miyazawa y Hisama, 2001). El AEC presenta acción citotóxica sobre líneas celulares tumorales PC-3 y Hep G2 (Ogunwande et

al., 2005; Yoo et al., 2005). Por otra parte, la actividad antimutagénica del AEC para inducir apoptosis en células cancerígenas humanas (Namiki, 1994).

2.4.6. Actividad anestésica

EG es utilizado como anestésico en un gran número de aplicaciones. Puede ser usado como anestésico local en odontología y también como ingrediente de cementos dentales para empastes (Markowitz et al., 1998) a concentraciones más bajas que otros anestésicos locales (Keene et al., 1998), además es rápidamente metabolizado y excretado (Wagner et al., 2002).

En la actualidad, los anestésicos naturales son ampliamente utilizados en investigaciones con animales con el fin de reducir el estrés, la mortalidad y el dolor. También se usan para la inmovilización animal en un gran número de procedimientos como cirugía, biopsias y transporte sin necesidad de provocarles daños (Summerfeld y Smith, 1990; Soto y Burhanuddin, 1995; Wagner et al., 2003).

La actividad anestésica del AEC ha sido probada en pescados como la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Anderson et al., 1997; Keene et al., 1998) y el bagre (Waterstrat, 1999). Venarsky y Wilhelm en 2006 desarrollaron un protocolo de actuación utilizando AEC como anestésico en anfípodos (*Gammarus minus*) con el fin de obtener información biológica básica (sexo y longitud) sin provocar daño a los mismos.

De este modo, el AEC ha sido definido como una alternativa al uso de anestésicos como Tricaine o MS-222.

2.4.7. Actividad insecticida

El uso de insecticidas de origen químico para el control de artrópodos y parásitos, presenta numerosos inconvenientes, incluyendo la resistencia y daños ambientales (O'Brien, 1999). La actividad biológica del AEC ha sido probada frente a muchos parásitos. El Hag y colaboradores en 1999 demostraron su efecto inhibitorio en el crecimiento de larvas de *Culex pipiens*. También ha sido descrita su actividad insecticida frente a mosquitos *Pediculus capitis* (Yang et al., 2003) y *Anopheles dirus* (Trongtokit et al., 2005), y su uso con fines acaricidas en especies

Dermatophagoides farinae y *Dermatophagoides pteronyssinus*. Otros estudios han descrito su uso como fumigante frente a termitas japonesas (Park y Shin, 2005).

2.4.8. Actividad hepatoprotectora

La bibliografía recoge estudios que muestran la capacidad del AEC en la reparación de daños hepáticos provocados por paracetamol, evaluado por el incremento sanguíneo de enzimas hepáticas como aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP) (Sallie et al., 1991). Los resultados del estudio han mostrado la capacidad del AEC para restablecer los niveles sanguíneos de estas enzimas. Estudios *in vivo* sobre la capacidad de semillas de clavo revelaron una recuperación de tejido hepático dañado de ratas (Shukri et al., 2010).

2.4.9. Actividad antidiabética

Prasad y colaboradores en 2005, estudiaron el efecto de extractos de clavo sobre insulina y células hepáticas. Los resultados indicaron una reducción de la expresión de enzimas como fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa, ambas implicadas en la síntesis de glucosa. En otros estudios de ADN realizados con microarrays dieron como resultado que la insulina y el AEC regulan la expresión de genes de manera similar.

2.4.10. Actividad antiinflamatoria

La adición de extractos de clavo en dietas ricas en ácidos grasos ω -3 ha mostrado el efecto sinérgico entre el AEC, y los ácidos grasos ω -3 sobre la actividad antiinflamatoria. Algunos componentes minoritarios del AEC como kaempferol, rhamnetina y β -cariofileno contribuyen a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de este AE (Srivastva, 1993).

2.4.11. Actividad antiplaquetaria

La actividad antiplaquetaria de *Eugenia caryophyllata* ha sido probada usando EG y metil eugenol en la inhibición de araquidonato, dando como resultados un efecto más potente que el ácido acetil salicílico y adrenalina en el mantenimiento de la hemostasia (Srivastva, 1993).

2.4.12. Actividad antiestrés

Singh y Damanhigi (2009) describieron la capacidad de extractos de AEC en la reducción de úlceras gástricas y en la prevención de los cambios bioquímicos de enzimas asociados al estrés mediante el uso de AEC (100 mg/Kg) y permitiendo una reducción en los niveles aminotransferasa, fosfatasa alcalina, glucosa, cortisol y corticoesterona.

2.4.13. Actividad antipirética

El EG ha demostrado una marcada actividad antipirética en ratones a los que previamente se les indujo un estado febril mediante la utilización de interleukinas-1. Eugenol fue más efectivo en la reducción de la fiebre que el paracetamol, además parece ser que el mecanismo de acción de ambos es muy similar (Singh y Damahigi, 2009).

2.5 APLICACIONES DEL AEC

2.5.1. Industria alimentaria

El clavo en forma de semilla o en forma molida se destina, principalmente, a usos culinarios y domésticos y también como aditivo. Sin embargo, cuando se usa con fines antimicrobianos en la industria alimentaria se emplea en forma de AE ya que de este modo se ven favorecidos sus efectos.

Vrinda y Garg (2001) describieron el uso de AEC como agente conservante, ya que su uso permite la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en carne y queso. La adición de AEC a concentraciones entre 0,5 y 1% ha permitido la

reducción de la tasa de crecimiento bacteriano a temperaturas de 30 °C y 7 °C en ambos alimentos.

Con el fin de optimizar la eficacia del uso de productos naturales, y evitar el uso de fungicidas de origen sintético, actualmente se está potenciando la combinación de AE con técnicas de envasado activo. El uso de mezclas de EG, mentol y timol, junto con la utilización de envases activos han servido para inducir el aumento de la vida útil de uva de mesa de la variedad Crimson Seedless (Valverde et al., 2005). Posteriormente, y en línea con estos resultados, Valero et al. (2006) utilizaron mezclas de EG, timol y carvacrol en combinación con técnicas de envasado activo (MAP) en uva de mesa de la variedad Aledo. Los resultados mostraron que la adición del AEC en el envase conduce a una evolución con menor pérdida de firmeza y de acidez, menor acumulación de °Brix y menores cambios de color. Además, tanto el recuento de aerobios mesófilos como de mohos y levaduras fueron inferiores en las uvas tratadas.

Los antibióticos para piensos animales han sido ampliamente empleados por la industria como factores de crecimiento para mejorar la productividad y disminuir la incidencia de enfermedades. Sin embargo, en la actualidad existe una creciente preocupación de los consumidores sobre los efectos negativos de esta práctica debido a la posibilidad de desarrollo de resistencias microbianas, las cuales pueden ser transmitidas a humanos. Todo ello ha conducido a la Unión Europea a la prohibición de su uso en alimentación animal. Esto ha implicado el desarrollo de alternativas a estos antibióticos, entre las que destacan los extractos vegetales y AE. El uso combinado de AEC, orégano y anís adicionado a piensos animales a una concentración de 200 ppm ha mejorado la ganancia de peso diaria de aves durante un período de crecimiento de 5 semanas. Recientemente ha sido publicada una patente en la que se describe el uso de EG en combinación con cinamaldehído para aumentar el rendimiento de animales rumiantes destinados a la producción de leche y carne (Gautier et al., 2001). Esta combinación también ha sido usada por otros autores con el fin de mejorar el sabor de la carne de ave. Otros documentos evidencian el uso combinado de ambos compuestos en la industria alimentaria como agentes aromáticos imitando el flavor de la cola.

2.5.2. Cosmética y cuidado personal

AEC y EG son ampliamente utilizados en la producción de jabones y detergentes a concentraciones de 0,05-1% (v/v). De acuerdo con la base de datos de productos de cosmética EWG (Environmental Working Group), actualmente se encuentran en el mercado alrededor de 500 productos con EG destinados a la cosmética y al cuidado personal. Entre ellos, cabe destacar tintes para cabello, perfumes y fragancias, tratamientos de cosmética corporal, cremas hidratantes faciales y maquillaje de labios.

2.5.3. Odontología

Debido a sus propiedades antibacterianas, el clavo se usa en dentríficos, soluciones orales y sprays bucales. También se utiliza EG, en combinación con óxido de zinc, para la elaboración de cementos dentales.

La efectividad del AEC ha sido probada contra un gran número de patógenos orales (114 cepas de *Streptococcus* y 46 cepas de levaduras). El AEC es muy efectivo a bajas concentraciones contra un gran número de bacterias orales y levaduras asociadas a caries dentales. De manera general, el AEC ha demostrado una mayor eficacia de inhibición que la eritromicina, mostrando el nivel más alto de actividad sobre *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mitis*.

La mayoría de los autores coinciden en que la actividad anticariogénica del AEC es debida a su alto contenido en EG (Zheng et al., 1992).

26. TOXICIDAD

El uso de AEC ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) como aromatizante en alimentación, anestésico y en cementos dentales en odontología y en fragancias o aromaterapia. Se considera como seguro cuando es utilizado como aditivo en cantidades menores a 1500 ppm y ha sido definido por la EPA (Environmental Protection Agency (EEUU)) como pesticida de mínimo riesgo. Sin embargo, la ingestión o inyección de cierta dosis de AEC puede causar daños respiratorios, fallos hepáticos, y depresión del sistema nervioso central. La dosis letal descrita es de 3,75 g/Kg de peso corporal.

A pesar de que no existen estudios epidemiológicos en humanos que muestren los efectos relacionados con la exposición a AEC o EG, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado como ingesta diaria aceptable (IDA) de un valor de 25 mg/Kg-día. Estos datos se han basado en un estudio llevado a cabo en ratas.

3. ENCAPSULACIÓN DE AROMAS Y AE

La encapsulación es una técnica en la que un material o mezcla de materiales es cubierta o atrapada con otro material. El componente que se recubre se denomina material activo, y la cubierta externa se conoce con el nombre de agente encapsulante o cubierta. Esta técnica se empezó a desarrollar en 1950, en la industria del papel para la elaboración de tintas con menor contenido en carbón (Augustin et al., 2001; Heinzen, 2002). En la actualidad, la tecnología de la encapsulación ha extendido su uso a la industria farmacéutica, química, cosmética y alimentaria. En el campo de la alimentación, la encapsulación se ha desarrollado en grasas y aceites, en componentes aromáticos, oleorresinas, vitaminas, minerales, colorantes y enzimas (Dziedzic, 1988; Jackson y Lee, 1991; Shahidi y Han, 1993). La encapsulación evita la formación de aromas indeseables producidos por interacciones entre componentes de los alimentos, otorga protección frente a la oxidación como consecuencia de la radiación UV, minimiza la interacción entre componentes aromáticos, aumenta la vida útil de los aromas y controla la liberación de los mismos dentro de un producto (Reineccius, 1991; Tari y Singhal, 2002).

La incorporación de pequeñas cantidades de aroma en los alimentos puede influenciar a la calidad del producto, coste, y satisfacción del consumidor. La industria alimentaria se encuentra en continuo desarrollo de ingredientes, métodos de procesado y materiales de envasado, con el objetivo de conseguir una mejora de la conservación de alimentos (Zeler y Salleb, 1996). La estabilidad de la cubierta es una condición importante para la conservación de las propiedades aromáticas de un alimento. Por ello, hay muchos factores que deben tenerse en cuenta a la hora de encapsular aromas: la cubierta o material encapsulante (Imagi et al., 1992), la proporción entre material activo y material encapsulante (Minemoto et al., 1999), método de encapsulación elegido (Minemoto et al., 1997) y las condiciones de almacenamiento (Minemoto et al., 1997; Yoshii et al., 1998a).

3.1. MATERIALES USADOS EN LA ENCAPSULACIÓN

La encapsulación de componentes aromáticos implica la protección de los mismos frente al medio externo. El tamaño de la microcápsula formada puede variar desde unos cuantos milímetros a menos una micra (Crouzet, 1998). La cápsula más simple consiste en una molécula huésped rodeada de una cubierta. El material encapsulado puede estar formado por un sólo compuesto o por una mezcla de varios compuestos.

Los métodos de encapsulación son limitados, sin embargo existe una extensa variedad de materiales que pueden ser utilizados como agentes encapsulantes. Entre ellos destacan proteínas, carbohidratos, lípidos y gomas (Brazel, 1999). Todos ellos presentan ventajas e inconvenientes y su elección depende del objetivo del producto, del proceso de encapsulación utilizado y de aspectos legales relacionados con la aprobación del agente encapsulante por la European Food Safety Authority, en la Unión Europea, o la Food and Drug Administration, en EEUU (Amrita et al., 1999).

3.1.1. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono como agentes encapsulantes son ampliamente usados en la encapsulación mediante secado por atomización (Kenyon, 1995; McNamee et al, 1998). La capacidad de los hidratos de carbono, como almidones, maltodextrinas (MD), siropes de maíz y gomas para encapsular aromas, unido al bajo coste y la variedad de los mismos, hacen de ellos la elección más adecuada para su encapsulación (Dziezak, 1988; Mutka y Nelson, 1988). Además, estos materiales presentan baja viscosidad en un medio con alto contenido en sólidos y alta solubilidad como condición muy deseable en un agente encapsulante.

3.1.1.1. Almidón

El almidón y los productos de almidones modificados (almidones modificados, maltodextrinas (MD), ciclodextrinas (CDs)) son ampliamente utilizados en la industria alimentaria para la protección de compuestos volátiles. Pueden ser usados tanto en la encapsulación de aromas y como estabilizantes de una emulsión. Muchas investigaciones se han centrado en la creación de nuevos materiales derivados del almidón con el objetivo de mejorar la retención de aromas

(Golovnya et al, 1998; Glenn y Stern, 1999; Tomas y Atwell, 1999). La capacidad de la amilosa en la formación de complejos de inclusión ha sido descrita para un amplio número de compuestos aromáticos (Kuge y Takeo, 1968; Solms, 1986; Escher et al., 2000).

3.1.1.2 Maltodextrinas (MD)

Las MD se forman por hidrolización parcial de la harina de maíz con ácidos o enzimas y se clasifican de acuerdo con el valor DE (equivalente de dextrosa). Este parámetro mide el grado de hidrólisis del almidón. Las MD tienen la habilidad de formar matrices encapsulantes (Kenyon y Anderson, 1988; Shahidi y Han 1993) y además presentan una buena relación entre coste y efectividad. Se caracterizan por tener baja viscosidad cuando se encuentran en emulsiones con alto porcentaje de sólidos (Apintanapong y Noomhorm, 2003). Como inconvenientes se ha discutido sobre la falta de capacidad emulsificante y la baja retención de volátiles (Reineccius, 1991).

Bangs y Reineccius (1981) estudiaron la retención de 12 compuestos aromáticos encapsulados con MD de diferente grado de hidrólisis (DE 10, 15, 20, 25 y 36.5) concluyeron que la retención de volátiles dependía del valor de DE siendo las que poseen un valor DE de 10 las que mostraron una mayor retención. De este modo, se observó que a medida que el valor DE aumentaba, la retención del flavor disminuía. Si bien es cierto que la retención de componentes aromáticos durante el almacenamiento aumentó con el valor DE (Yoshii et al., 2001).

Sin embargo, otros autores han descrito resultados opuestos. Anandaraman y Reineccius (1986) describieron las MD con un valor DE alto como más efectivas en la encapsulación del AE de naranja. Los resultados dejaron patente la efectividad frente a la oxidación, ilustrando la influencia del valor DE en la funcionalidad como agente encapsulante. Desobry y colaboradores (1997) confirmaron estos resultados cuando se examinó la oxidación de β -caroteno encapsulado con MD como agente encapsulante.

3.1.1.3. Gomas

Las gomas y los espesantes son generalmente blandos e insípidos pero pueden potenciar el efecto del sabor y aroma de los alimentos.

La goma arábica es la goma que más se usa como material encapsulante. Su alta solubilidad, baja viscosidad, propiedades emulsificantes y su buena retención de compuestos volátiles hace de ella un producto muy versátil para la mayoría de métodos de encapsulación. Además este material se adapta muy bien en la encapsulación de gotas de lípidos ya que presenta propiedades de superficie activa, y evita la pérdida de volátiles en contacto con la atmósfera. Sin embargo, su aplicación dentro de la industria alimentaria es limitada, debido a su alto coste frente a las MD (Kenyon, 1995; Shiga et al., 2001).

También se ha probado su aplicación en combinación con MD. Los resultados han dado lugar a emulsiones con viscosidad adecuada para encapsular AE de cardamomo, utilizando como método de encapsulación el secado por atomización. La encapsulación de una mezcla combinada: etil propionato, etil butirato, AE de naranja, aldehído cinámico y benzaldehído, utilizando como materiales encapsulantes una mezcla de goma arábica y MD, dieron lugar a un aumento de la retención de volátiles al mismo tiempo que lo hacía la fracción de goma arábica (Reinneccius, 1991). Según la literatura, La retención de aroma depende de un gran número de variables incluyendo la temperatura interna del atomizador, la concentración de la emulsión, la viscosidad y la proporción de goma arábica y MD y el grado de hidrólisis de las mismas (William y Philip, 2000).

3.1.2. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas con estructuras químicas muy diversas, propiedades anfipáticas y con habilidad para asociarse entre ellas e interactuar con una gran variedad de sustancias. Estas características hacen que tengan excelentes propiedades funcionales como solubilidad, viscosidad, propiedades emulsificantes y propiedades para formar films, lo que da gran aplicabilidad en encapsulación. Durante la formación de una emulsión, las proteínas son rápidamente ordenadas en la interfase aceite-agua. Esta nueva capa formada protege las gotas de aceite de la recoalescencia y a partir de ahí provee de estabilidad física a la emulsión durante el procesado y almacenamiento (Dalglish, 1997; Dickinson, 2001).

3.1.2.1. *Proteínas aisladas de suero lácteo (PS)*

Las PS presentan todas las propiedades funcionales deseadas para un agente encapsulante (Amrita et al., 1999) y de hecho, son muchas las publicaciones que abalan este uso (Moreau y Rosenberg, 1993, 1996, 1998, 1999; Rosenberg y Young, 1993, Young et al., 1993a, b; Sheu y Rosenberg, 1998; Rosenberg y Sheu, 1996; Rosenberg, 1997). En el mercado, la proteína se puede encontrar como proteína aislada de suero (PS) (95-96% proteína) o concentrado de proteína de suero (CPS).

Las PS han mostrado ser una buena barrera frente a la oxidación de AE de naranja encapsulado (Kim y Morr, 1996). El CPS ofrece las propiedades requeridas para estabilizar emulsiones. Sin embargo, Faldt y Bergenstahl (1996), mostraron que el poder encapsulante del CPS es bajo comparado con el caseinato sódico para encapsular aceite de soja.

Las PS también se han utilizado en combinación con hidratos de carbono como agentes encapsulantes de compuestos volátiles (Young et al, 1993b; Sheu y Rosenberg, 1998). En estos sistemas, las PS sirvieron como agentes emulsificantes, mientras que los carbohidratos (MD, sirope de maíz solido) actúan como matriz (Sheu y Rosenberg, 1998). La proteína de suero más usada en la industria alimentaria es la beta-lactoglobulina debido a sus propiedades emulsificantes (Jouene y Crouzet, 2000).

3.1.2.2. *Otras proteínas*

Proteínas como las polipeptonas, proteína de soja o derivados de gelatina, también son capaces de formar emulsiones estables con numerosos compuestos volátiles. Sin embargo su solubilidad en agua fría, el potencial para reaccionar con grupos carbonilos y su alto coste limita su potencial de aplicación (Bangs y Reineciuss, 1981).

La gelatina es un producto de hidrólisis del colágeno que se usa en el proceso de coacervación (Ducel et al., 2004). Es un material hidrosoluble que tiene la habilidad de actuar como agente encapsulante de numerosos componentes volátiles mediante secado por atomización (Lee et al., 1999). Estas cápsulas de gelatina pueden ser usadas en un gran número de productos como especias y muchos otros aromas usados en la industria alimentaria (Goudel y Trounel, 2001).

La adición de gelatina (1%) a una mezcla de MD y gomas arábicas incrementó la retención de etilbutirato en la encapsulación por medio del secado por atomización, permitiendo un mejor control de la liberación del mismo (Yoshii et al., 2001).

El carácter anfipático y las propiedades emulsificantes del caseinato de sodio ofrecen las características físicas y funcionales requeridas para encapsular AE (Hogan et al., 2001). Este caseinato ofrece unas características ideales para la retención del AE de naranja (Kim y Morr, 1996).

3.2. TÉCNICAS DE ENCAPSULACIÓN

Las técnicas de encapsulación continúan emergiendo y muchas compañías lanzan nuevos productos derivados de sus tecnologías patentadas. La encapsulación de aromas se lleva a cabo por una gran variedad de métodos, siendo los dos procesos más importantes el secado por atomización y la extrusión (Beristain et al., 1996; Goubet et al., 1998). La **Figura I.3.1** resume los diferentes procesos de microencapsulación.

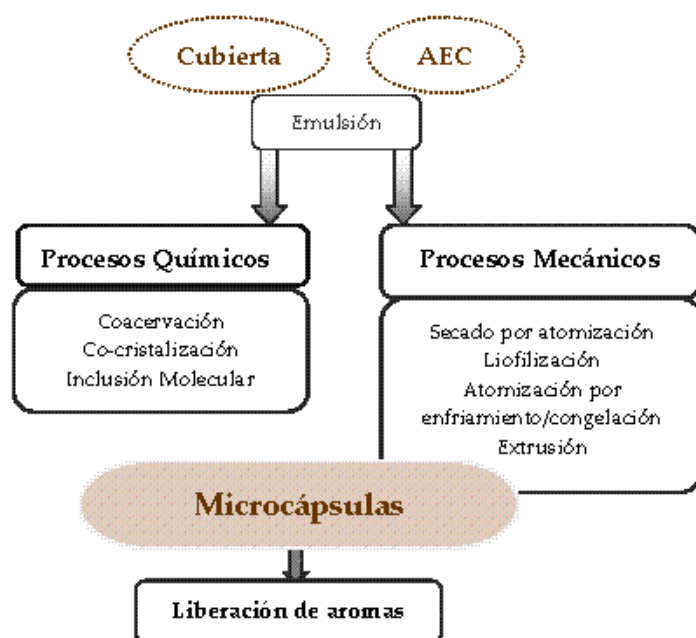


Figura I.3.1 Procesos de microencapsulación de aromas y AE.

3.2.1. Procesos químicos

3.2.1.1. Coacervación

La coacervación o separación de fases es una técnica de microencapsulación que se basa en la inducción de la desolvatación de un polímero que, a continuación, se deposita en forma de gotículas de coacervado alrededor de la sustancia que se va a encapsular.

El término coacervación fue introducido por Bungenberg de Jong y Kruyt en 1929 para describir el fenómeno de agregación macromolecular o separación de fases líquidas que tenía lugar en el seno de un sistema coloidal. En el proceso se obtienen dos fases líquidas, una rica (coacervado) y otra pobre en coloides (sobrenadante). La coacervación es una etapa intermedia entre disolución y precipitado, es decir, conlleva una desolvatación parcial en contraposición a la desolvatación total asociada al proceso de precipitación. Cualquier factor que induzca la desolvatación del polímero producirá el fenómeno de coacervación. Entre los factores inductores de la coacervación se puede destacar cambios de temperatura, modificación de pH y la adición de un no solvente, una sal o un polímero incompatible.

El proceso de coacervación consiste en las siguientes etapas:

1. Dispersión del compuesto a encapsular mediante agitación (líquido o partículas sólidas) en una solución del polímero formador de la cubierta.
2. Inducción de la coacervación por alguno de los procedimientos señalados. En esta fase se observa que el sistema sufre una opalescencia y, al microscopio óptico, las gotas de coacervado presentan una apariencia semejante a la de una emulsión.
3. Deposición (adsorción) de las gotas de coacervado alrededor de los compuestos a encapsular. El sobrenadante, en principio turbio, se va clarificando a medida que transcurre el proceso de coacervación. La deposición continuada de la cubierta es promovida por una reducción de la energía libre interfacial del sistema debido a una disminución del área superficial durante la coalescencia de las gotículas líquidas.
4. Coalescencia de las gotas de coacervado para formar una cubierta continua alrededor de los núcleos.

5. Endurecimiento de la cubierta de coacervado, sometiendo al sistema a un enfriamiento. Finalmente, las microcápsulas obtenidas son aisladas por centrifugación o filtración.

Este proceso ha sido muy utilizado para la producción de microcápsulas de alcohol polivinilo, gelatina-acacia y varios otros polímeros (Maji et al., 2007).

Sin embargo, la coacervación no es muy utilizada en la industria, debido a que es complicado y tiene costes elevados (Soper, 1995; Tuley, 1996). La optimización de la concentración de agente encapsulante suele ser problemática debido a que la concentración necesaria para obtener una emulsión fina suele ser diferente de la necesaria para producir microcápsulas (Nakagawa et al., 2004). Otras limitaciones de la encapsulación de aromas por coacervación son la evaporación de volátiles, la disolución del compuesto activo en el solvente y la oxidación del producto (Miles et al, 1971; Flores et al., 1992).

3.2.1.2. *Co-cristalización*

Comparado con otros métodos de encapsulación de aromas, la co-cristalización ofrece una económica y flexible alternativa ya que es un proceso relativamente simple (Jackson y Lee, 1991; Chen, 1994).

Es un proceso donde dos ingredientes son incorporados en un conglomerado poroso de microcristales de sacarosa formados por cristalización espontánea. Los procesos son llevados a cabo por concentración de jarabes de sacarosa hasta supersaturación. Para ello, el material a encapsular se mantiene en agitación constante, lo que permite una nucleación y aglomeración del producto (Astolfi et al., 2005). Esta técnica ha sido utilizada en la encapsulación de numerosos productos: jugos de frutas, AE, saborizantes, aromatizantes y azúcar moreno. La estructura del cristal de sacarosa puede ser modificada para formar agregados de cristales muy pequeños que incorporan los sabores, un ejemplo puede ser la cristalización espontánea del jarabe de sacarosa lograda a altas temperaturas (120 °C aproximadamente). El producto formado tiene baja higroscopicidad, buena fluidez y propiedades de dispersión (Labell, 1991; Quellet et al., 2001). Sin embargo, durante el proceso en el que el líquido con el aroma se transforma en gránulos secos, muchos compuestos termosensibles pueden ser degradados (Bandhari et al.,

1999). Beristain y colaboradores en 1996 encapsularon AE de naranja usando este método y demostraron que la co-cristalización de los productos retenía mucho más los componentes volátiles que el secado por atomización.

3.2.2. Procesos mecánicos

3.2.2.1 Secado por atomización

El método de encapsulación de secado por atomización (spray drying) es muy utilizado en la encapsulación de aromas y volátiles (Deis, 1997). Este proceso permite el uso de una amplia gama de materiales para encapsular, da una buena estabilidad al producto acabado y presenta buen rendimiento del proceso de modo continuo (Reineccius, 1989). El proceso conlleva la dispersión de la sustancia a encapsular en el agente encapsulante, seguido de una atomización de la muestra en una cámara a alta temperatura (Dziezak, 1998; Watanabe et al., 2002). Las microcápsulas resultantes son transportadas a un ciclón separador para su recuperación. La formación de una emulsión estable es importante a la hora de encapsular aromas. La retención de volátiles en el secado por atomización depende de las propiedades fisicoquímicas del material encapsulante, del compuesto a encapsular, del contenido en sólidos de la emulsión y de la temperatura de procesamiento. Los mejores resultados se obtienen con emulsiones estables, y baja viscosidad a alta concentración de sólidos en la emulsión (Rosenberg et al., 1990; Goubet et al., 1998).

La encapsulación de compuestos con limitada solubilidad acuosa mediante secado por atomización da lugar a microcápsulas con una estructura en la que el material encapsulado se organiza en pequeñas gotas cubiertas con el agente encapsulante. La microestructura de las cápsulas se ve afectada por la composición y propiedades de los materiales encapsulantes, la proporción de aroma o AE, el agente encapsulante y los parámetros de atomización y secado (Buma y Henstra, 1971a, b; Kalab, 1979; Greewald y King, 1982; Keith, 1983; Mistry et al, 1992; Rosenberg y Young, 1993; Young et al., 1993a, b).

Una de las desventajas que presenta el método de encapsulación por atomización es que algunos compuestos aromáticos con bajo punto de ebullición, pueden perderse durante el proceso. Además el material encapsulante puede estar en la superficie de la microcápsula, fomentando la oxidación y posibles cambios de

los aromas encapsulados (Dziezak, 1998; Desobry et al., 1997). Según Kerkhof (1994), el grado de retención de aromas depende fuertemente del contenido de humedad de la muestra y de la humedad del aire. La **Tabla I.3.1** resume las ventajas y desventajas de la encapsulación por secado por atomización.

Tabla I.3.1 *Ventajas e inconvenientes del uso del secado por atomización*

<i>Ventajas</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Bajo coste de la operación • Alta calidad de las microcápsulas • Alta solubilidad de la microcápsulas • Alta estabilidad de las microcápsulas
<i>Inconvenientes</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Producción no uniforme de las microcápsulas • Limitación en la elección del material encapsulante (necesita baja viscosidad a altas concentraciones) • Produce un polvo tan fino que necesita posterior procesamiento (aglomeración) • No recomendable para materiales sensibles al calor

3.2.2.2 Liofilización

La liofilización es uno de los procesos más usados para el secado de sustancias termosensibles que son inestables en soluciones acuosas. Buffo y Reineccius (2001) compararon distintos métodos de secado en la encapsulación de AE de naranja con goma acacia y almidón modificado. El estudio demostró que la liofilización ofrece las propiedades más deseables para encapsular el AE de naranja. Minemoto et al. (1997) compararon la oxidación de mentil linoleato encapsulado con goma arábica mediante secado por atomización o con secado por liofilización. Los resultados definieron a este último como el método más adecuado para la encapsulación. Además, el compuesto encapsulado por liofilización mostró una oxidación mucho más lenta a cualquier humedad relativa y no se vio afectado por el almacenamiento. El estudio de la encapsulación de aceite de pescado por liofilización ofreció una oportunidad para conseguir un producto con buena resistencia a la oxidación (Heinzelmann y Franke, 1999). Nagata (1996) describió la

liofilización como el método más idóneo para mantener la estructura y forma de las microcápsulas debido a la fijación por congelado. Sin embargo, esta técnica es mucho menos atractiva para la industria debido al alto coste que supone: hasta 50 veces más costoso que el secado por atomización (Desobry et al., 1997). Igualmente, el almacenamiento y transporte de las partículas es extremadamente caro (Jacquot y Perneti, 2003) y la aplicabilidad comercial también se ve severamente afectada por los largos tiempos de procesado (Barbosa-Canovas y Vega-Mercado, 1996).

3.2.2.3. Atomización por enfriamiento/congelación

En este método el material encapsulante o cubierta es sometido a un proceso de fusión. La mezcla de la cubierta junto con el material a encapsular, que se encuentra disuelto o dispersado en la misma, es fundido en una cámara en la que circula una corriente de aire frío o un gas previamente enfriado. A continuación la muestra se pulveriza. Los materiales utilizados para formar la cubierta son productos de bajo punto de fusión entre los que se destacan las ceras, las grasas y los ácidos grasos. Es una técnica muy adecuada para la encapsulación de compuestos termolábiles.

Las técnicas de aspersión por enfriamiento o congelación son valoradas como las técnicas más caras y se utilizan en la encapsulación de aromas para mejorar la estabilidad al calor, el retraso de la liberación y en ambientes húmedos o en la conversión de aromas líquidos en polvo (Gouin, 2004).

En la atomización por enfriamiento, el material utilizado para encapsular es fundido y atomizado en una cámara que generalmente contiene un baño de hielo con CO₂. Las gotas se adhieren sobre las partículas y forman una cubierta solidificada. Este proceso es adecuado para la protección de algunos componentes hidrosolubles, que pueden ser volatilizados o dañados durante el procesamiento térmico (Augustin et al., 2001). El material encapsulante es típicamente un aceite vegetal fraccionado o hidrogenado con un punto de fusión de 32-42 °C.

La atomización por congelación es un método muy similar a la atomización por enfriamiento, la única diferencia es la temperatura del reactor en el que el material encapsulante es pulverizado.

Las microcápsulas obtenidas son insolubles en agua y se liberan del producto encapsulado cuando estas se someten a temperaturas por encima del

punto de fusión de la grasa (Schrooyen, et al., 2001). Este tipo de encapsulación tiene aplicaciones en aromas y AE, productos de bollería, sopas deshidratadas y alimentos con alto contenido en grasa.

3.2.2.4. *Extrusión*

La extrusión como método de microencapsulación fue patentada en 1957 por Swisher. La encapsulación de aromas por extrusión se ha usado en volátiles y aromas inestables utilizando principalmente carbohidratos como matrices (Reineccius, 1991; Blake, 1994; Benczedi y Blake, 1999; Gunning et al., 1999; Qi y Xu, 1999; Benczedi y Bouquerand, 2001). Este proceso involucra el paso de una emulsión del compuesto activo y el material encapsulante a través de una cámara a alta presión. La principal ventaja del método de extrusión es la estabilidad de los aromas frente a la oxidación. Las matrices de hidratos de carbono en estado cristalino tienen buenas propiedades barrera por lo que son muy adecuadas para la extrusión de aromas y AE (Gouin, 2004). Sin embargo, la difusión se ve potenciada en carbohidratos por defectos en las paredes, capas finas, o poros formados durante o después del procesado (Wampler, 1992). Este tipo de encapsulación es útil a escala de laboratorio.

4. INCLUSIÓN MOLECULAR: CICLODEXTRINAS (CDs)

4.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son azúcares cíclicos naturales de seis (α -CDs), siete (β -CDs) u ocho (γ -CDs) unidades de glucosa, unidas por enlaces α (1-4) (**Figura I.4.1**). También son conocidas como cicloamilosa, ciclomaltosa o dextrinas de Schardinger (Villiers, 1891; Eastburn y Tao, 1994). Se obtienen como resultado de una reacción de transglucosilación intramolecular en la degradación del almidón, llevada a cabo por la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) de *Bacillus macerans* (Szetjili, 1998).

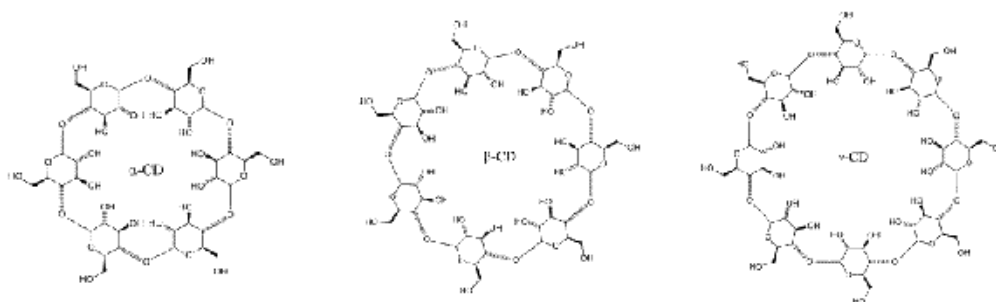


Figura I.4.1. Estructura de α β - y γ -CDs.

Fueron descubiertas en 1891 por Villiers, obteniendo una pequeña cantidad de dextrinas tras la digestión del almidón por *Bacillus amylobacter*. La cantidad obtenida fue aproximadamente de 3 g/Kg de almidón. Tras permanecer unas semanas en alcohol se observó la presencia de cristales precipitados que respondían a la fórmula de las CDs ($C_6H_{10}O_5$) \cdot 3 H₂O. Probablemente y de acuerdo con otros autores, Villiers observó que las CDs se produjeron por la contaminación de *Bacillus macerans* (Villiers, 1891). En 1903, Schardinger fue capaz de aislar dos productos cristalinos, dextrina A y dextrina B, que no tenían poder reductor, pero la cepa que

los producía no fue identificada. En 1904, Schardinger aisló un nuevo microorganismo capaz de producir acetona y alcohol etílico a partir de azúcar y material vegetal que contenía almidón (Eastburn y Tao, 1994). Más tarde, en 1911, describió que dicho microorganismo, llamado *Bacillus macerans*, producía grandes cantidades de dextrinas cristalinas a partir del almidón (25-30%). Schardinger nombró sus productos cristalinos como dextrina cristalina α y dextrina cristalina β . La dextrina cristalina γ no fue aislada hasta 1935. En 1942 se observó la estructura de α - y β -CDs por cristalografía de rayos X, corroborando así las estructuras propuestas con anterioridad. En 1948, se elucidó la estructura de γ -CDs por rayos X y se reconoció que las CDs pueden formar complejos de inclusión. Se observó que todos los tipos de CDs tenían estructura troncocónica, debido a la conformación en forma de silla de las unidades de glucopiranosas. Orientados hacia la boca ancha de la estructura troncocónica se encuentran los -OH secundarios de los carbonos C₂ y C₃ de cada unidad de glucosa; y hacia la boca estrecha de la estructura se encuentran los -OH primarios de los C-6, quedando los grupos -CH₂OH orientados hacia la superficie externa del cono. Los hidrógenos de los carbonos más apolares de los azúcares (C-3 y C-5) y el oxígeno de los enlaces glucosídicos entre las unidades de glucosa, quedan orientados hacia el interior de la estructura troncocónica (**Figura 1.4.2**). La orientación específica de todos estos grupos, da lugar a una molécula cuya superficie externa es hidrofílica, por lo que es soluble en agua, y cuya cavidad interna es hidrofóbica (Szejtli, 1985).

En 1950 dos grupos de investigadores, liderados por Cramer en 1954 y French en 1957, empezaron a trabajar en la producción enzimática de CDs, fraccionando los compuestos puros y caracterizando sus propiedades químicas y físicas. French descubrió que existían otras CDs naturales, formadas por un número mayor de unidades de glucosa, que en 1961 fueron denominadas como δ -, ζ -, ξ - y η -CDs (9-12 residuos) (Hirose y Yamamoto, 2001), mientras que el grupo de Cramer se centró en el estudio de las propiedades de los complejos de inclusión formados por las CDs. En 1953 Freudenberg y colaboradores obtuvieron una patente, en la que se desarrollaban los aspectos más importantes de la aplicación de las CDs en la formulación de drogas para su protección frente a la oxidación, aumento de la solubilidad y protección de compuestos volátiles.

La primera revisión de CDs fue publicada en 1957 por French y en ella se hablaba, por primera vez, de la toxicidad de las CDs. Esta fue seguida por la de Caesar en 1968.

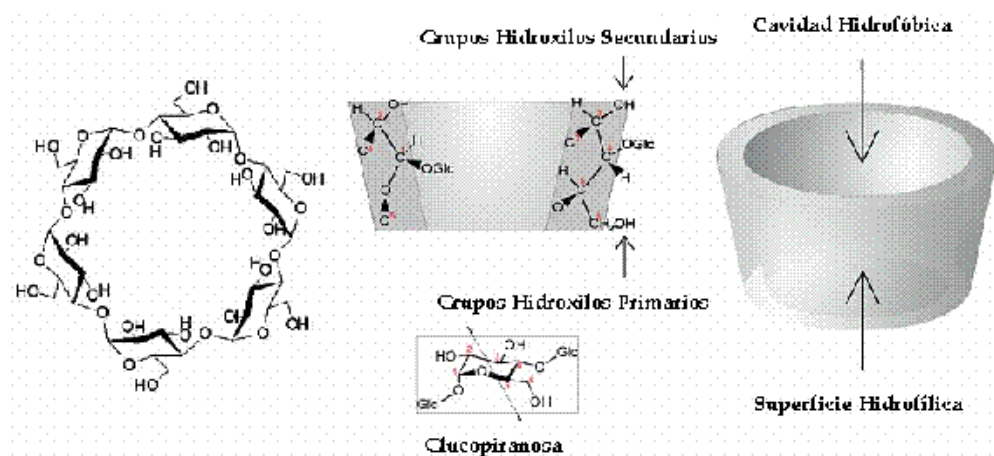


Figura I.4.2. Estructura de β -CDs.

Durante los 25 años siguientes, se realizaron numerosos estudios sobre la toxicidad de las CDs para el uso en humanos. En 1981 se celebró el primer congreso internacional de CDs, decidiendo organizar este evento cada dos años.

4.2 PROPIEDADES

Hay tres tipos de CDs denominadas de primera generación, parentales o naturales: α -, β - y γ -CDs. β -CDs es el tipo más utilizado debido a su bajo coste. Las principales características de las CDs naturales se describen en la **Tabla I.4.1**.

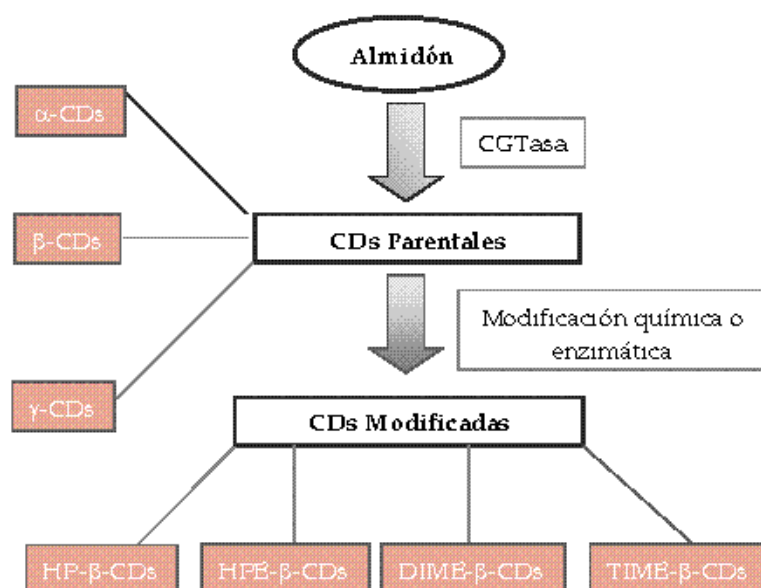
Tabla I.4.1 *Propiedades de las CDs.*

Propiedades	α -CDs	β -CDs	γ -CDs
Número de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25 °C (%) (p/v)	14,5	1,85	23,2
Diámetro exterior (Å)	14,6	15,4	17,5
Diámetro de la cavidad(Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura de la cavidad (Å)	7,9	7,9	7,9
Volumen de la cavidad(Å ³)	174	262	427

A partir de las CDs naturales se han sintetizado otros tipos de CDs llamadas derivadas o modificadas, que son obtenidas por acilaciones, esterificaciones o eterificaciones de los OH de los carbonos primarios y secundarios de las CDs naturales.

Dependiendo del sustituyente adicionado, la solubilidad de las CDs modificadas es diferente a las de su parental. Prácticamente, todas las CDs modificadas tienen cambios en el volumen de su cavidad hidrofóbica y, estas modificaciones pueden mejorar su solubilidad acuosa (Villiers, 1891).

La síntesis de CDs modificadas requiere la selección de reactivos, optimización de las condiciones de reacción y una buena separación de los productos. Las β -CDs han sido modificadas con más de 20 sustituyentes diferentes en una región específica de manera selectiva (**Figura I.4.3**).



HP-β-CDs: hidroxipropil-β-CDs

HPE-β-CDs: hidroxietil-β-CDs

DIME-β-CDs: (2,6-dimetil)-β-CDs

TIME-β-CDs: (2,3,6-trimetil)-β-CDs

Figura I.4.3 Tipos de CDs modificadas.

Debido a su capacidad para unirse de forma específica mediante enlace covalente o no covalente a otras CDs, estos azúcares cíclicos se pueden utilizar como bloques para la construcción de complejos supramoleculares. Su habilidad para formar complejos de inclusión con moléculas huésped de carácter orgánico, ofrece la posibilidad de desarrollar hilos supramoleculares. Así, se pueden construir arquitecturas moleculares como catenanos, rotaxanos, polirrotaxanos y tubos (**Figura I.4.4**). Estos bloques de construcción, que no se pueden obtener por otros métodos, se emplean para la separación de mezclas complejas de moléculas y enantiómeros (Szejtli, 1998).

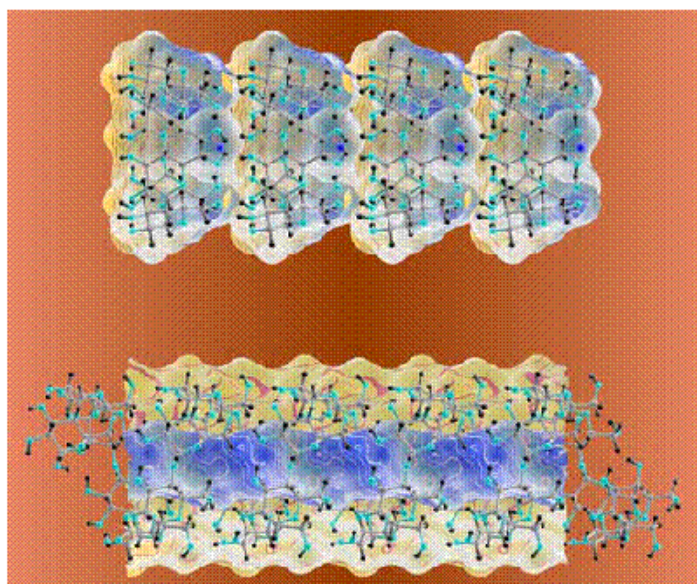


Figura I.4.4. *Hilos supramoleculares.*

4.3. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS

Los estudios de toxicidad han demostrado que las CDs administradas por vía oral no son tóxicas, debido a su escasa o nula absorción en el tracto gastrointestinal (Irie y Uekama, 1997). Además, una serie de evaluaciones de seguridad han demostrado que γ -, 2-hidroxipropil- β -, sulfobutíler- β -, sulfatada- β - y maltosil- β -CDs son seguras, incluso administradas de forma parenteral. Sin embargo, otros estudios toxicológicos revelan que las parentales α - y β -CDs y las modificadas metil- β -CDs no deben de ser administradas por vía parenteral (Martín del Valle, 2004).

4.3.1. α -CDs

Son bastante irritantes tras su aplicación intramuscular; se unen a algunos lípidos produciendo irritación ocular y se absorben entre el 2 y 3% tras su administración vía oral en ratas. No son metabolizadas en el tracto intestinal superior, pero sí son degradadas por la flora intestinal del ciego y colon (Martín del Valle, 2004).

4.3.2. β -CDs

Son menos irritantes que las α -CDs cuando se administran intramuscularmente. Cuando se ingieren por vía oral, éstas se unen al colesterol absorbiéndose en el tracto gastrointestinal superior en cantidades muy pequeñas (1-2%). Al igual que en el caso de α -CDs no son metabolizadas en el tracto intestinal superior, pero sí son degradadas por las bacterias de ciego. Actualmente, son las CDs más comunes en formulaciones farmacéuticas y por lo tanto, las CDs mejor estudiadas en humanos. No es recomendable su aplicación en dosis elevadas, ya que al ser degradadas en el intestino grueso, fermentan dando lugar a la producción de gas y diarrea (Martín del Valle, 2004).

4.3.3. γ -CDs

De los tres tipos de CDs naturales, es para las que menos efectos adversos se han descrito (Szente et al., 1998), por lo que son promovidas activamente como aditivo alimentario por sus principales fabricantes. Provocan una irritación insignificante tras de su inyección intramuscular, y son rápidamente y degradadas a glucosa en el tracto intestinal superior por las enzimas intestinales (incluso a altas dosis, por ejemplo, 10-20 g /kg/día). No son absorbidas tras su administración por vía oral y hay prácticamente ausencia de metabolismo después de su administración intravenosa. Su habilidad para formar complejos, en general, es menor que β -CDs y sus modificadas. Con frecuencia, sus complejos tienen una solubilidad limitada en soluciones acuosas, tendiendo a precipitar generando soluciones opalescentes (Szente et al., 1998).

4.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

La característica más notable de las CDs es su capacidad para formar complejos de inclusión con numerosos compuestos tanto orgánicos como inorgánicos en sus diferentes estados de agregación, siempre que el compuesto que se vaya a incluir tenga un tamaño compatible con las dimensiones de la cavidad hidrofóbica de la CDs (Villiers, 1891). Además, la formación del complejo se ve favorecida por las características de polaridad de la molécula huésped, aunque son

muchos los autores que especulan que los factores decisivos en la formación del complejo son más bien geométricos que químicos (Muñoz-Botella et al., 1995). Puede afirmarse que el proceso de inclusión transcurre gracias a la interacción -energéticamente favorable- entre la molécula huésped, relativamente apolar, y la cavidad hidrofóbica -imperfectamente solvatada- de las CDs.

Para que se forme el complejo de inclusión, ha de producirse una interacción entre la molécula huésped y la CD, que generalmente se califica como "interacción hidrofóbica", dada la naturaleza de las fuerzas que conducen a la formación del complejo, que va acompañada por un cambio favorable en el valor de la entalpía y, generalmente desfavorable en el de entropía. Para explicar este cambio considerable de la entalpía, se argumentan diferentes razones (Szejtli, 1998), entre las que se incluyen: *i*) interacciones de tipo Van der Waals entre molécula huésped y CD, *ii*) formación de puentes de hidrógeno entre la molécula huésped y los grupos hidroxilo de la CD, *iii*) pérdida de energía debida a las moléculas de agua alojadas en el interior de la cavidad de la CD, *iv*) relajación de la energía de tensión del anillo de la macromolécula de CD e *v*) interacciones polares; de modo que la variación de la energía libre total del sistema (ΔG_T) sería la suma de todas las contribuciones individuales $[\Sigma(\Delta G)_{i,v}]$ (Schneiderman y Stalcup, 2000).

Los estudios sobre la naturaleza de estos enlaces con moléculas huésped seleccionadas, han puesto de manifiesto la importancia de cada una de las fuerzas implicadas en el proceso de inclusión (Schneiderman y Stalcup, 2000). La comparación de la magnitud de cada una de las fuerzas implicadas demuestra que para un huésped apolar, las interacciones *i*, *iii*, y *iv*, son las más significativas. En cualquier caso, la importancia de cada una de las fuerzas va a depender de las características de la molécula huésped así como de la CD, ya que además de fuerzas de enlace parece ser que la pérdida de la estructura del agua alrededor de la molécula huésped (apolar), proceso íntimamente relacionado con las interacciones apolares o hidrofóbicas, así como la restricción en la liberación de movimiento de la molécula huésped en solución, ejercen en conjunto una cierta influencia en la formación del complejo de inclusión.

Estas interacciones hidrofóbicas son relativamente débiles, ya que las fuerzas implicadas en la formación de los complejos son interacciones de tipo Van der Waals e interacciones dipolo-dipolo. Así, si se compara la energía necesaria para la formación de un enlace covalente (10^2 kcal/mol) con la necesaria para

establecer un enlace por puente de hidrógeno (10 kcal/mol) y la imprescindible para las interacciones por fuerzas de Van der Waals (1 kcal/mol), se deduce que estas interacciones son las más débiles y en muchos casos, no permiten la formación de un complejo estable.

Sin embargo, si la molécula apolar adopta o posee una disposición espacial específica, cuyo radio de Van der Waals sea compatible con el tamaño de la cavidad de la CD, pueden establecer estas interacciones hidrofóbicas y las especies se incluyen dando lugar a un complejo cuya estabilidad puede ser, en muchos casos, semejante a la que resultaría de una unión covalente. Los complejos más estables se forman en el caso de moléculas hidrofóbicas que no son capaces de formar enlaces por puente de hidrógeno, por ejemplo benceno. La estabilidad del complejo es proporcional al carácter hidrofóbico de los sustituyentes sobre la molécula base. Así, los sustituyentes metilo o etilo incrementan la estabilidad de los complejos, mientras que los hidroxilos la disminuyen al igual que los grupos ionizables.

Si en una molécula se dan todas estas características geométricas, químicas, estéricas y energéticas favorables para la inclusión, entonces se iniciará el proceso de formación del complejo.

De todo lo expuesto, se desprende que el ajuste de la molécula de sustrato a la cavidad de la CDs es un proceso decisivo y en cierta medida independiente del carácter de la molécula huésped (Loftsson y Brewster, 1996). Sin embargo, esta independencia es relativa debido a que para la formación del complejo es necesaria la deshidratación total o parcial del sustrato, seguida de la rehidratación que se produce tras el proceso de incorporación, siendo estos procesos características de los sustratos.

La unión resultante entre la CD y la molécula huésped no es fija o permanente, sino que es un equilibrio dinámico gobernado por una constante, cuya fuerza depende del tamaño relativo de la molécula complejada y de las interacciones establecidas entre la CDs y la molécula complejada (**Figura I.4.5**).

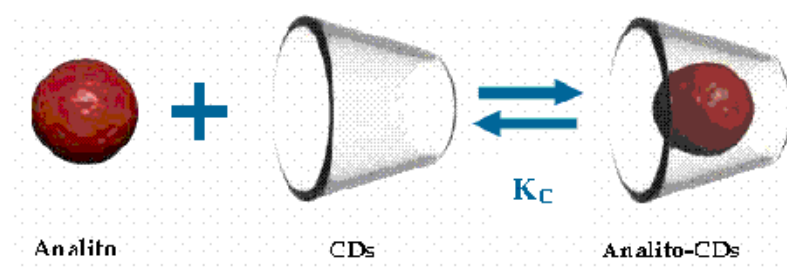


Figura I.4.5. Formación del complejo huésped-CDs.

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

La inclusión en CDs puede cambiar las propiedades físico-químicas de la molécula complejada (Schmid, 1989). Algunas de las propiedades que pueden ser modificadas por efecto de la complejación son: solubilidad acuosa de moléculas insolubles, estabilidad de las moléculas frente a los efectos de degradación del oxígeno, luz visible o ultravioleta y calor, volatilidad y sublimación, aislamiento físico de los compuestos incompatibles, movilidad cromatográfica, olores y sabores. En este sentido, las CDs han sido aplicadas con éxito en diferentes campos: alimentación (Fujishima et al., 2001), farmacia (Bhardwaj et al., 2000), cosmética (Holland et al., 1999), protección del medio ambiente (Bhardwaj et al., 2000), bioconversión (Dufosse et al., 1999), envasado e industria textil (Hedges, 1998).

La lista de moléculas susceptibles de ser encapsuladas en CDs es muy variada e incluye compuestos de diferente naturaleza: hidrocarburos alifáticos de cadena lineal o ramificada, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos, compuestos aromáticos, gases y compuestos polares tales como halógenados, oxiácidos y aminas (Schmid, 1989).

Mientras que la altura de la cavidad hidrofóbica es la misma para los tres tipos de CDs nativos, el número de unidades de glucosas de cada una de ellas determina el diámetro interior de la cavidad y su volumen (**Figura I.4.6**). En base a estas dimensiones, las α -CDs pueden complejar moléculas de bajo peso molecular o compuestos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos; las β -CDs pueden

complejar moléculas aromáticas y heterocidos; y las γ -CDs pueden acomodar moléculas más grandes, tales como macrociclos y esteroides (Martín del Valle, 2004). El equilibrio inicial para formar el complejo es muy rápido (a menudo en cuestión de minutos), sin embargo, el equilibrio final puede dilatarse más en el tiempo. Por otra parte, la disociación del complejo de inclusión es un proceso relativamente rápido, generalmente impulsado por un gran aumento en el número de moléculas de agua en el medio ambiente circundante. En disoluciones poco concentradas resulta difícil que la molécula huésped encuentre la CD, quedando libre en el medio acuoso.

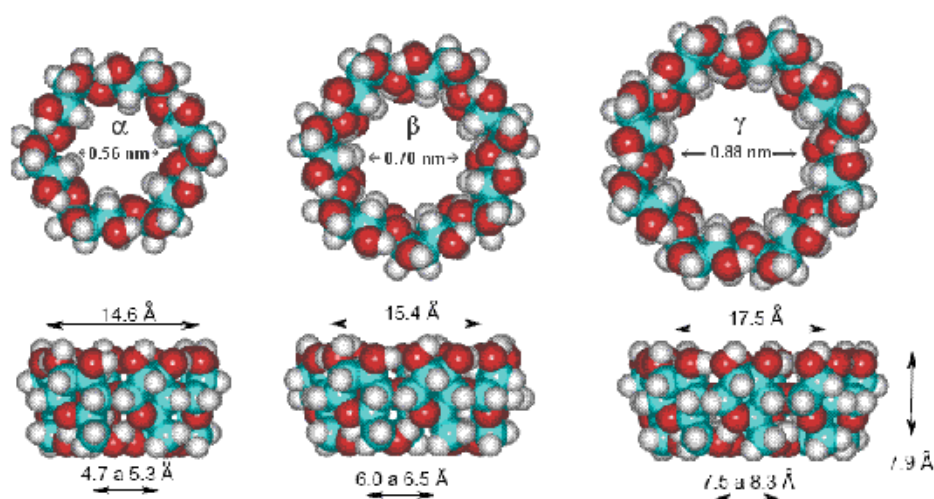


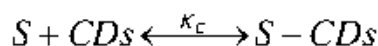
Figura I.4.6. *Diámetro externo e interno de las diferentes CDs.*

4.4.1. Equilibrio de los complejos de inclusión

El estudio de la estabilidad de los complejos de inclusión a través del cálculo de la constante que gobierna el equilibrio (constante de complejación, K_c) es muy importante. La mayoría de los métodos utilizados para determinar el valor de K_c se basan en los cambios producidos en las propiedades físico-químicas de la molécula complejada: solubilidad en agua (Higuchi y Connors, 1965); absorptividad molar UV-VIS (Sigurdardottir y Loftsson, 1995; Hussain et al., 1993); oxidación enzimática (Núñez-Delicado et al., 1999a); reactividad química (Loftsson, 1995; Másson et al., 1998); fluorescencia (Muñoz de la Peña et al., 2007), resonancia

magnética nuclear (Harabagiu et al., 2004); pKa de grupos funcionales; cambios calorimétricos (Uekama, 1979); descenso del punto de congelación (Suzuki et al., 1993) y cambios en los tiempos de retención cromatográfica (López-Nicolás, et al., 2006).

El equilibrio dinámico de la formación de complejos de inclusión puede ser representado como:



La constante de equilibrio o constante de complejación (K_c) que determina la estabilidad de los complejos formados puede ser descrita cuantitativamente mediante la siguiente expresión:

$$K_c = \frac{S - CDs}{[S]_l [CDs]_l} \quad [I.4.1]$$

donde S-CDs representa la concentración de sustrato complejado con CDs, mientras que $[CDs]_l$ y $[S]_l$ representan respectivamente la concentración de CDs y sustrato libre en el equilibrio. Cuanto mayor sea el valor numérico de K_c más estable será el complejo formado. Este valor depende del pH del medio, de la temperatura, fuerza iónica del medio y del solvente en el que se encuentre.

4.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS

4.5.1. Solución dinámica

En forma cristalina, solo las moléculas que se encuentran en la superficie de los cristales de CDs están disponibles para la formación de complejos. Sin embargo, en disolución, hay más moléculas de CDs disponibles para este fin. Por otra parte, al aumentar la temperatura del disolvente, aumenta tanto la solubilidad de la CDs como la del analito, aumentando por tanto, la probabilidad de formar complejos. Por este motivo, la complejación se produce más rápidamente cuando CDs y analito están en disolución o en forma de partículas finas dispersas.

4.5.1.1. *Efecto de la temperatura*

La temperatura ejerce más de un efecto sobre la formación de complejos con CDs. Al calentar la disolución puede aumentar la solubilidad del complejo, pero al mismo tiempo, éste se puede desestabilizar, por lo que estos efectos deben estar en equilibrio. La estabilidad térmica del complejo varía dependiendo del analito, pero la mayoría de los complejos empiezan a desnaturalizarse a partir de 50-60 °C. Hay algunos complejos que son estables a temperaturas más altas, especialmente si el analito está fuertemente ligado o el complejo es muy insoluble.

4.5.1.2 *Empleo de disolventes*

El agua es el disolvente más ampliamente utilizado para llevar a cabo la formación de complejos de inclusión. Cuanto más solubles sean las CDs en el disolvente, más moléculas habrá disponibles para la formación de los complejos. El analito debe ser capaz de desplazar al disolvente que ocupa la cavidad hidrofóbica de la CD, siendo el agua el más fácil de desplazar.

No todos los analitos son fácilmente solubles en agua, haciendo que la complejación sea muy lenta o, imposible en algunos casos. Por tanto, para conseguir la formación de complejos se puede utilizar disolventes orgánicos para solubilizar previamente la molécula a complejar. El disolvente que se utilice debe de ser fácil de eliminar por evaporación, por ejemplo etanol y éter dietílico.

4.5.1.3. *Efecto del agua*

Cuando la cantidad de agua aumenta, también lo hace la solubilidad de CDs y analito, de modo que la complejación se produce con mayor facilidad. Sin embargo, cuando la cantidad de agua es muy alta, las CDs y el analito pueden estar tan diluidos que no se ponen en contacto con la misma facilidad que lo harían en una solución más concentrada. Por lo tanto, es conveniente mantener la cantidad de agua lo suficientemente baja para garantizar que la formación de complejos se produce a un ritmo adecuado.

Algunos compuestos de elevado peso molecular, como los aceites tienen una tendencia a asociarse entre ellos para formar micelas en lugar de interactuar con CDs. En tal caso, utilizar más agua y una buena mezcla permite una mejor dispersión, dando lugar a la separación y aislamiento de las moléculas del aceite.

4.5.1.4. Analitos volátiles

Los analitos volátiles pueden sufrir mermas durante la formación de complejos, especialmente si se utiliza calor. Este inconveniente, se puede solventar mediante el empleo de un reactor sellado o bien, aprovechando el reflujo de las moléculas volátiles al volver al recipiente de mezcla.

4.5.2. Co-precipitación

Las CDs se disuelven en agua caliente y el analito se añade a la mezcla en agitación. La concentración de β -CDs puede ser del 20% si el analito tolera temperaturas altas. Si la concentración que se elige de CDs es muy alta, la solubilidad de los complejos disminuirá a medida que avanza la reacción y disminuye la temperatura. En muchos casos, la solución de CDs y analito se debe enfriar mientras se agita para que se produzca la precipitación de los complejos.

El precipitado se puede separar por decantación, centrifugación o filtración y se puede limpiar con una pequeña cantidad de agua o algún otro solvente miscible, como alcohol etílico, metanol o acetona. El lavado con disolventes orgánicos puede perjudicar algunos complejos, por lo que se debe probar con anterioridad.

La principal desventaja de este método reside en la expansión masiva debido a la baja solubilidad de las CDs, por lo que se deben utilizar grandes volúmenes de agua. La capacidad del depósito, el tiempo y la energía para calentar y refrigerar las muestras pueden convertirse en factores limitantes, debido al alto coste del proceso. El tratamiento y eliminación del agua tras recoger los complejos, también puede ser motivo de preocupación debido al coste de las operaciones y las posibles repercusiones medioambientales. Esto se puede solucionar en muchos casos con el reciclaje del agua (Loftsson et al., 1993; Pitha et al., 1992).

Los analitos ionizados suelen formar complejos más estables con las CDs que sus respectivos no ionizados, por tanto, la complejación de analitos básicos se puede mejorar mediante la aplicación de amoníaco a los medios acuosos de complejación. Por ejemplo, la solubilidad de pancratistatina con HP- β -CDs se optimizó tras la adición de hidróxido de amonio (Torres-Labandeira et al., 1990).

4.5.3. Complejación por método "slurry"

En este caso, no es necesario disolver las CDs por completo para formar los complejos. La cantidad de CDs que se puede añadir al agua alcanza concentraciones en torno al 50-60% de sólidos solubles, que deben de estar en agitación continua para obtener una solución acuosa saturada de CDs. La molécula huésped es complejada por las CDs en solución y, cuando el complejo satura la fase acuosa, cristaliza o precipita pudiendo recoger los precipitados como se describe en el método de co-precipitación.

El tiempo requerido para que se produzca la formación de los complejos es variable y depende del analito que se quiera complejar, por lo que deben realizarse ensayos para determinar el tiempo que se necesita para que se formen los complejos. En general, este tipo de complejación se realiza a temperatura ambiente.

4.5.4. Complejación en pasta

En este método se añade una pequeña cantidad de agua para formar una pasta con CDs. La mezcla se realiza en un mortero o bien una amasadora cuando se quiere trabajar a gran escala. El tiempo de formación de los complejos depende del analito a complejar.

El complejo resultante se puede secar directamente o lavarse con una pequeña cantidad de agua y recoger los complejos por filtración o centrifugación. A veces se seca formando una masa dura en lugar de un polvo fino. Esto depende del analito y de la cantidad de agua utilizada en la pasta. En general, la masa dura se puede secar completamente y se muele para obtener los complejos en forma de polvo.

4.5.5. Mezcla húmeda y calefacción

En este método se añade poco o nada de agua. La cantidad de agua para hidratar las CDs y el analito puede variar entre un 20-25% o también se puede hacer totalmente en seco. El analito y las CDs se mezclan bien y se colocan en un recipiente cerrado. Este recipiente, cerrado herméticamente, se calienta a unos 100 °C y luego se secan los complejos. La cantidad de agua añadida, el grado de mezcla y el tiempo de calentamiento deben ser optimizados previamente para cada analito.

4.5.6. Método de extrusión

La extrusión es un método que combina el mezclado y el calentamiento. CDs, analito y agua pueden ser mezclados antes de ser introducidos en la extrusora. El grado de mezcla, la cantidad de calentamiento y el tiempo, son variables que puede ser controlados. Dependiendo de la cantidad de agua, los complejos de extrusión pueden ser secados a medida que se enfrían o bien, pueden secarse en un horno.

El método de extrusión tiene la ventaja de ser un proceso continuo y que utiliza muy poca agua. Uno de los problemas que presenta este método es debido al calor generado, ya que puede afectar al analito que se va a complejar.

4.5.7. Mezcla en seco

Algunos analitos pueden ser complejados simplemente al mezclarlos con las CDs. Esto se suele dar con aceites o analitos líquidos. La cantidad que se puede mezclar o el tiempo que se necesita varía dependiendo del analito. En general, este método se realiza a temperatura ambiente. Su principal ventaja es que no es necesario agregar agua, a menos que se utilice una etapa de lavado. Entre sus desventajas destaca el riesgo de aglomeración al trabajar a gran escala dando lugar a que la mezcla entre el analito y las CDs no sea homogénea, provocando que la formación de los complejos no sea completa.

4.6. MÉTODOS DE SECADO DE LOS COMPLEJOS FORMADOS

Los complejos pueden secarse en un horno, un secador de lecho fluido u otros tipos de secadores. Hay que tener especial cuidado con los complejos durante el proceso de secado para que la temperatura no afecte al analito.

4.6.1. Analitos altamente volátiles

Para secar complejos de analitos con una temperatura de ebullición inferior a 100 °C, se deben utilizar temperaturas bajas para evitar pérdidas de analito.

4.6.2. Secado por atomización

Los complejos también pueden ser secados por aspersión. La precipitación debe de ser controlada con el fin de evitar que las partículas que son demasiado grandes bloqueen el dispositivo de vaporización o la boquilla. Cuando los analitos son volátiles, algunas condiciones por secado de atomización deben de ser modificadas con el fin de minimizar lo máximo posible las pérdidas.

4.6.3. Secado a baja temperatura

Se puede utilizar un liofilizador para secar los complejos. La baja temperatura reduce mucho la pérdida de analitos volátiles. El secado por congelación es muy útil para analitos sensibles al calor y para complejos solubles como son los hidroxipropilados.

4.7. LIBERACIÓN

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

Cuando los complejos se disuelven en agua se produce la liberación controlada de analito. En primer lugar se disuelve el complejo y seguidamente se libera analito hasta su límite de solubilidad en agua, ocupando las moléculas de agua su lugar en la cavidad interna de las CDs y estableciéndose un equilibrio entre analito libre y complejo.

Cuando los complejos están formados por diferentes analitos no se van a liberar al medio en la misma proporción, ya que cada uno de ellos tiene diferente límite de solubilidad en agua y siempre se tiene que cumplir un equilibrio.

4.8. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CDs

La formación de complejos de inclusión puede detectarse por métodos muy diversos, gracias a las modificaciones que se producen en las propiedades de la molécula complejada. Estas modificaciones pueden ser físicas (solubilidad, tensión superficial); químicas (reactividad, variaciones en el valor de las constantes de ionización ácido-base) o espectroscópicas, tanto modificaciones cualitativas (posición de los máximos) como cuantitativas (variaciones en el coeficiente de absorción molar o en la intensidad de fluorescencia) de los parámetros espectrales. Los métodos espectroscópicos son los más adecuados para la detección de estos complejos en disolución, teniendo en cuenta que la naturaleza de las fuerzas implicadas en su formación son débiles (Martín, 1985).

4.8.1. Métodos de detección de complejos sólidos

4.8.1.1. Difracción de rayos-X

Constituye la metodología más apropiada para realizar el análisis de la estructura cristalina del complejo (Saenger, 1984). Estas técnicas no son útiles en análisis de rutina, debido a las dificultades que entraña la preparación de la muestra y a la infraestructura necesaria para realizar los análisis. No obstante, los diagramas de difracción son una prueba concluyente para demostrar la inclusión, ya que el difractograma del complejo es diferente al que se obtiene tras superponer los difractogramas de la molécula encapsulada y el de las CDs aisladas.

4.8.1.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopia de RMN de ^{13}C aplicada a sólidos, es una técnica que permite el estudio de las propiedades dinámicas de los complejos de inclusión en estado sólido (Saitô et al., 1982), a diferencia de la difracción de rayos-X que suministra información de las propiedades estáticas. Las variaciones en el valor del desplazamiento químico para los átomos C_1 y C_4 de

la CDs se relacionan con los cambios de conformación que se producen debido a la formación de complejos de inclusión (Inane et al., 1986).

4.8.1.3. Espectroscopia de absorción infrarroja

En el espectro de absorción (IR), se pueden apreciar desplazamientos de aproximadamente 40 cm en las bandas de absorción de las moléculas huéspedes, tras la formación del complejo de inclusión. Por ejemplo, las bandas de tensión correspondientes a la absorción del carbonilo y a los -OH, se desplazan debido a que en la formación de complejos de inclusión se rompen los puentes de hidrógeno intermoleculares, y las moléculas quedan aisladas en el interior de la cavidad. Estos hechos se han demostrado para el ácido benzoico y el ácido salicílico (Nakai et al., 1980). No obstante, la espectroscopia IR no constituye una prueba concluyente en sí misma ya que muchas de las alteraciones espectrales quedan enmascaradas por el espectro de absorción IR de las CDs.

4.8.1.4. Espectroscopia Raman

Esta técnica es complementaria del IR y la información que aporta es semejante. Las bandas se desplazan y se modifican como consecuencia del proceso de inclusión. Probablemente, la espectroscopia Raman resulta de mayor utilidad en el caso de complejos en medios líquidos, donde la presencia de soluciones acuosas no supone un obstáculo, como ocurre en el caso de la espectroscopia IR (Rao et al., 2006).

4.8.1.5. Métodos térmicos

Las distintas técnicas que se engloban bajo el nombre de métodos térmicos son muy apropiadas para la investigación de complejos de inclusión en estado sólido, o bien de complejos formados en medios líquidos pero aislados y cristalizados para hacer posible su estudio. Los métodos térmicos más utilizados son: calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis térmico diferencial (DTA), termogravimetría (TG) y termogravimetría diferencial (OTGL).

Cuando se produce la inclusión en la CD, el punto de fusión o ebullición de la molécula encapsulada se desplaza a temperaturas más

elevadas, pudiendo desaparecer o bien, quedar enmascarado en torno a la temperatura de descomposición de las CDs (300 °C). Este desplazamiento implica una mejora en las características de estabilidad de numerosos principios activos, especialmente en el caso de aceites y líquidos volátiles (Uekama, 1979).

4.8.2. Métodos de detección de complejos en solución

La mayoría de los métodos permiten la caracterización del complejo mediante el cálculo de su estequiometría y sus constantes de asociación. En general puede hablarse de estequiometría 1:1 para la mayoría de los complejos con CDs. Sin embargo, si la molécula huésped es demasiado grande para el tamaño de la cavidad, pueden producirse asociaciones de dos moléculas de CDs por cada molécula huésped. Si por el contrario la cavidad es lo suficientemente grande como para alojar a dos moléculas huésped, la estequiometría anteriormente citada se invierte. El cálculo de la constante de asociación que define la estabilidad del complejo, puede llevarse a cabo en virtud de la variación de alguna de las propiedades físicas o químicas de la molécula huésped al producirse la inclusión. Esta variación puede relacionarse con la concentración de CDs, lo que permite el cálculo de la constante de estabilidad.

4.8.2.1. Método de variación de la solubilidad

Debido a que las moléculas quedan "envueltas" por las CDs que son hidrosolubles, se puede observar un incremento notable en la solubilidad de compuestos débilmente hidrosolubles. Aunque por regla general, el complejo es menos hidrosoluble que la CD sola, la solubilidad en agua de las moléculas hidrofóbicas se ve siempre notablemente mejorada y puede incrementarse desde un 10%, en el peor de casos, hasta un 300% para los complejos más hidrosolubles (Lath, 1964).

La elaboración de diagramas de fases sirve para calcular la K_c y consiste en la saturación de analito de disoluciones acuosas con concentraciones crecientes de CDs. Estas disoluciones se mantienen a temperatura constante, hasta alcanzar el equilibrio y posteriormente son filtradas para eliminar el analito no disuelto. Se

cuantifica la cantidad de analito presente en el filtrado de cada disolución y se representa frente a la concentración de CDs usada en cada caso (Higuchi y Connors, 1965) (**Figura I.4.7**).

Se han descrito diferentes tipos de diagramas de fases (Higuchi y Connors, 1965), que se pueden agrupar en dos categorías, tipo A y tipo B, que a su vez se dividirán en otros subgrupos. En general, en los diagramas tipo A, el complejo formado tiene un límite de solubilidad muy alto y no precipita, mientras que los de tipo B describen la formación de un complejo poco soluble que precipita en las condiciones del experimento. Los diagramas tipo B se subdividen en dos grupos: tipo B_s, que indica la presencia de complejos con una solubilidad limitada y tipo B_i, que indica la presencia de complejos totalmente insolubles. Los diagramas tipo A se subdividen en tres grupos: tipo A_L, la solubilidad del complejo aumenta de forma lineal conforme aumenta la concentración de CDs, tipo A_F, isoterma de desviación positiva y tipo A_N isoterma de desviación negativa (**Figura I.4.7**).

Los diagramas de tipo A_L son de primer orden con respecto a la concentración de CDs (L) y pueden ser de primer orden o superior con respecto a la concentración de analito (S); por ejemplo: SL, S₂L, S₃L, ..., S_mL. Si la pendiente del sistema tipo A_L es mayor que uno, indica que los complejos son de orden superior a uno para el analito. Una pendiente menor de uno no excluye necesariamente los complejos de orden superior, sino que se supone que los complejos son 1:1, en ausencia de otra información. El tipo A_F sugiere la formación de complejos de orden superior a uno respecto a las CDs, es decir, SL₂, SL₃, ..., SL_n. La estequiometría del tipo A_F se puede calcular al ajustar las curvas. Los diagramas de tipo A_N son sistemas difíciles de interpretar.

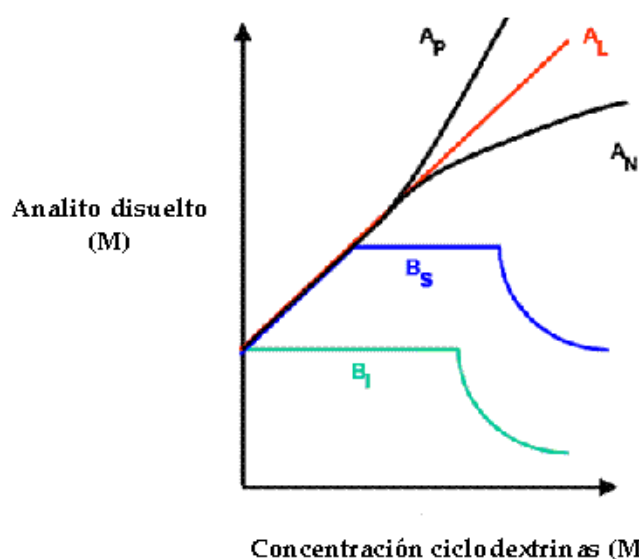


Figura I.4.7. Tipos de diagramas de fases con CDs.

A menudo, las β -CDs, suelen presentar diagramas de fase tipo B, forman complejos insolubles, mientras que las CDs modificadas presentan diagramas de fases tipo A, ya que forman complejos altamente solubles.

Estos sistemas de diagrama de fases, no solo permiten una evaluación cualitativa de los complejos de inclusión, sino que también permiten calcular la K_c . Para complejos con estequiometría 1:1, la solubilidad del complejo se puede representar como:

$$S_T = S_0 + [S - CD] \quad [I.4.2]$$

donde S_0 es la solubilidad acuosa del analito en el medio de complejación. En este caso, la K_c puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$K_{1:1} = \frac{Pendiente}{S_0(1 - Pendiente)} \quad [I.4.3]$$

donde la pendiente de la recta siempre será menor que la unidad. La K_c para la formación de complejos $[S_mL_n]$ puede ser representada por:

$$[S]_f = S_0 + m[S_m L_n] \quad [I.4.4]$$

$$[L]_f = [L] + n[S_m L_n] \quad [I.4.5]$$

Por otro lado, los valores de $[S_m L_n]$, $[Su]$ y $[L]$ pueden ser obtenidos con las siguientes ecuaciones:

$$[S] = S_0 \quad [I.4.6]$$

$$[S_m L_n] = \frac{[S]_f - S_0}{m} \quad [I.4.8]$$

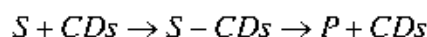
$$[L] = [L]_f - n[S_m L_n] \quad [I.4.9]$$

donde S_0 es el producto de solubilidad de Su (en ausencia de CDs), $[S]$ es la concentración total de Su (complejado y no complejado) y $[L]$ es la concentración total de CDs.

4.8.2.2. Métodos cinéticos

Las CDs aceleran determinadas reacciones gracias a un efecto catalítico (Breslow et al., 1980; Sojo et al., 1999), aunque a veces pueden ralentizarlas al proteger a los sustratos de especies reactivas externas tales como oxígeno (Uekama et al. 1983; Núñez-Delicado et al., 1999a; Lucas-Abellán et al., 2008a) y luz ambiental (Uekama et al., 1978a), debido a la formación de complejos de inclusión. En resumen, podemos decir que modifican la constante de velocidad de reacción.

Si representamos el proceso de inclusión y de reacción de acuerdo con el siguiente esquema:



el incremento o el descenso de la velocidad de reacción, será indicativo de la formación del complejo de inclusión. Aplicando una metodología análoga a la de la cinética de Michaelis-Menten, puede calcularse la constante de formación del complejo K_c . Este valor puede determinarse igualmente mediante las representaciones gráficas de Lineweaver-Burk. Los métodos

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

4.8.2.3. Métodos instrumentales

Con el rápido y creciente desarrollo que las técnicas instrumentales han experimentado en los últimos años, constituyen la metodología más utilizada para la detección de complejos de inclusión así como para el cálculo de las constantes de asociación de los mismos, abarcando desde las más versátiles y más utilizadas, como la espectroscopia de absorción UV-VIS, hasta las más sofisticadas como la de resonancia magnética nuclear.

4.8.2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-VIS

Constituye, junto con el dicroísmo circular (DC), una de las técnicas instrumentales más utilizadas en la detección de complejos de inclusión con CDs. Su utilidad reside en el hecho de que es una técnica versátil, de muy sencillo manejo, al tiempo que precisa, por lo que proporciona datos de gran fiabilidad en el cálculo de la K_a . Es una técnica de amplia aplicación ya que la mayoría de las moléculas orgánicas absorben en la región UV o visible del espectro, experimentando variaciones en las posiciones de los máximos de absorción (cualitativas) o en el valor del coeficiente de absorción molar (cuantitativas), tras la formación del complejo con CDs. Asimismo, ha de considerarse que numerosas moléculas orgánicas son débilmente solubles en agua, por lo cual, al no dar lugar a soluciones homogéneas, son difícilmente analizables por esta espectrofotometría. Sin embargo, la inclusión conlleva la solubilización, lo cual permite obtener el espectro de absorción en solución acuosa, pudiéndose producir variaciones en su espectro comparables a las que se observarían al disolver la molécula en solventes de baja polaridad, con respecto a otros solventes más polares (Basan, 2001).

Debido a la formación del complejo, los desplazamientos de los máximos de absorción son semejantes a los observados al transferir la molécula de un solvente de mayor polaridad, a otro de menor polaridad y pueden explicarse por la protección parcial que proporciona la cavidad de la CD a los electrones excitables.

4.8.2.3.2. Espectroscopía de luminiscencia

Las espectroscopías de luminiscencia molecular, en sus vertientes de fluorimetría y fosforimetría (Benesi y Hildebrand, 1949; Scatchard, 1949), son técnicas de gran utilidad en el estudio de los complejos de inclusión, fundamentalmente debido a su extrema sensibilidad. Esta característica, las hace apropiadas para estudiar los cambios conformacionales que se producen en las moléculas al pasar del estado fundamental al excitado, así como para profundizar en la geometría de los complejos de inclusión.

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

Si bien el empleo de CDs ha permitido observar fosforescencia a temperatura ambiente, lo cual conlleva un cambio cualitativo o cuantitativo muy importante (Hurtubise, 1990), la espectrofluorimetría se utiliza con mayor frecuencia en la detección de complejos de inclusión debido a su sensibilidad y mayor versatilidad, por lo que en general hablaremos de mejora en la fluorescencia y de determinaciones espectrofluorimétricas, más que de espectrofosforimetría.

4.8.2.3.3. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular permite la detección de complejos de inclusión con CDs en solución acuosa. La formación de complejos de inclusión induce actividad óptica en compuestos que no la poseen, debido al proceso de inclusión en sí y a los cambios conformacionales que se producen en la cavidad 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. La intensidad del efecto depende de la rigidez del complejo formado.

4.8.2.3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), proporciona información muy valiosa acerca de la formación de complejos de inclusión con CDs, debido a que el estudio de los espectros de RMN permite esclarecer las relaciones geométricas y la disposición de la molécula huésped en el interior de la cavidad de las CDs, así como las características dinámicas de los complejos en solución acuosa, a partir de las variaciones en el valor del desplazamiento químico y de las constantes de acoplamiento (Harabagiu et al., 2004).

Aunque se pueden realizar distintos tipos de RMN, los más difundidos son de ^{15}N , ^1H y ^{13}C . La ^1H -RMN permite la obtención de espectros en solución acuosa deuterada. Puesto que la mayoría de los complejos con CDs se estudian en agua, es la más aplicada. Sin embargo, por regla general, los complejos con CDs presentan una solubilidad en D_2O muy baja, lo que dificulta la obtención de los mismos al tener que trabajar a bajas concentraciones de CDs. Por el contrario, la ^{13}C -RMN permite la obtención de los espectros en agua donde la solubilidad es mayor, pero dado que es menos sensible, necesitan emplearse concentraciones más elevadas de CDs y complejo.

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

La detección de complejos de inclusión mediante esta técnica, se basa en las variaciones en el valor del desplazamiento químico de los protones (δ) de las CDs o de la molécula complejada.

4.8.2.3.5. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico

Esta técnica resulta de gran utilidad para el estudio de las propiedades de un gran número de complejos en solución. Sin embargo, presenta el inconveniente de que las moléculas que se estudian deben ser paramagnéticas (generalmente radicales libres) o bien hallarse marcadas con "marcadores de espín". No obstante, puesto que las CDs tienen una gran utilidad en catálisis,

se han utilizado para detectar la presencia de ciertos radicales libres que se forman en el curso de estas reacciones. Las constantes de acoplamiento son muy sensibles a los cambios en la polaridad del entorno, por lo que su variación puede utilizarse igualmente para detectar el proceso de inclusión (Karoui y Tordo, 2004).

4.8.2.3.6. Métodos voltamétricos

Los métodos voltamétricos son útiles para verificar la inclusión de sustancias electroactivas en el interior de la cavidad de las CDs, ya que la formación de complejos conlleva la modificación de los potenciales redox de los sustratos que se van a incluir (Olea-Azar et al., 2008).

4.8.2.3.7. Conductimetría

La formación de complejos de inclusión de moléculas ionizables puede estudiarse por conductimetría ya que la conductancia equivalente de las moléculas huésped disminuye con la complejación, debido al incremento en el diámetro del anión. De esta forma se han podido calcular las constantes de estabilidad de los complejos de iones de gran tamaño, como el dodecil sulfato sódico (SDS) y el bromuro de trimetilcetilamonio con CDs (Trayler, 1988).

4.8.2.3.8. Cromatografía

La formación de complejos de inclusión con CDs solubles en la fase móvil que se emplea en un proceso de separación cromatográfica, altera los valores del tiempo de retención. Así pues, cuando en cromatografía líquida se añaden CDs a la fase móvil, los tiempos de retención se acortan, dependiendo del valor de la constante de asociación del complejo (Hioki, 1977). En consecuencia, estudiando la variación en el valor del tiempo de retención con respecto a la concentración de CDs puede calcularse el valor de la K_c de los complejos (Barr y Spach, 1978; Uekama et al., 1978). La modificación de estos parámetros cromatográficos se ha empleado con fines analíticos (Muñoz de la Peña et al., 1991)

4.9. APLICACIONES DE LAS CDs

Cada molécula de analito es complejada por una molécula de CDs produciendo una microencapsulación desde el punto de vista microscópico. Esto puede producir cambios en las propiedades químicas y físicas de la molécula huésped, como pueden ser:

- Estabilización de moléculas sensibles a la oxidación en presencia de oxígeno y luz.
- Modificación de la reactividad química.
- Fijación de moléculas altamente volátiles.
- Aumento de la solubilidad.
- Transformación de sustancias líquidas en polvo.
- Protección frente a la degradación por microorganismos.
- Enmascaramiento de malos olores y sabores.
- Enmascaramiento de pigmentos o colores.

Estas características de las CDs, hacen que sean adecuadas para su aplicación en diferentes campos como: química analítica, agricultura, farmacia, industria alimentaria y cosmética (Singh et al., 2002).

4.9.1. Cosmética y aseo personal

Las CDs se utilizan en la preparación de cosméticos y fragancias, principalmente para la protección de aromas en la fabricación de ambientadores y detergentes. En este sector, el empleo de CDs está ampliamente extendido, ya que estabilizan los compuestos de interés, permiten el control de olores desagradables y mejoran la conversión de un ingrediente líquido en sólido. Estas aplicaciones se están llevando a cabo en pastas de dientes, cremas sólidas y líquidas para la piel, suavizantes para la ropa, toallitas de papel, tejidos y desodorantes, protección de aromas y sabores en barras de labios, aumento de la solubilidad de sustancias en agua y una mayor estabilidad térmica de los aceites.

Las CDs interactúan con los compuestos volátiles creando una barrera energética para vencer la volatilización, produciendo fragancias de larga duración (Prasad et al., 1999). En la preparación de productos de baño, las CDs regulan la

salida de la fragancia al formar complejos de inclusión con éstas y con fosfato de calcio (Tatsuya, 1999). En 1999 Holland et al. prepararon composiciones (en cosmética) que contenían CDs para prolongar la duración de la fragancia, pero las CDs también se utilizan para secuestrar y así reducir los olores corporales (Trinh et al., 1999).

El uso de CDs como agentes complejantes en la elaboración de polvos de talco, se realiza con el fin de estabilizar las fragancias reduciendo las mermas por evaporación u oxidación, mejorando también la eficacia antimicrobiana (Hedges, 1998).

El polvo seco de CDs, con un tamaño de partícula inferior a 12 μm , se utiliza para el control de olores en pañales, productos menstruales, toallitas de papel y preparaciones para el cuidado del cabello con el fin de proteger los mercaheptanos volátiles. Las HP- β -CDs son el tipo de CDs que proporcionan una mayor protección antimicrobiana (Woo et al., 1999).

Las CDs también se utilizan en detergentes de lavavajillas y de ropa para enmascarar los olores en el punto de lavado (Foley et al., 2000; Angell y France, 2001).

Las CDs se han empleado en pasta de dientes a base de sílice para aumentar casi tres veces la disponibilidad de triclosán (agentes antimicrobiano) (Loftsson et al., 1999). También se utilizan en la preparación de lociones de protección solar en una proporción 1:1 (pantalla solar/HP- β -CDs). De forma similar las CDs se utilizan en los autobronceadores y cremas para estabilizar la emulsión y mejorar su aplicación, de tal forma que mejora el bronceado haciéndolo más natural que los tintes amarillos o rojizos fruto del empleo de los productos tradicionales a base de dihidroxicetona tradicional (Scalia et al., 1999).

4.9.2. Industria alimentaria

En la industria alimentaria, las CDs se han utilizado como agentes complejantes de vitaminas, colorantes alimentarios y aromas (Loftsson y Brewster, 1996; Buschmann y Schollmayer, 2002; Szejtli, 1998). También se han usado para la protección del flavor en los alimentos durante el procesado y almacenamiento. Las CDs forman complejos de inclusión con grasas, sabores y aditivos alimentarios, protegiéndolos de su degradación u oxidación. Los sabores pueden ser volátiles,

aceites o líquidos y su complejación con CDs constituye una alternativa a la tecnología convencional de encapsulación usada para la protección de sabores (Reineccius et al., 2002, 2003, 2005; Reineccius y Risch, 1986). Las CDs también se han utilizado para retener compuestos en determinados procesos industriales, por ejemplo para eliminar colesterol en leches, mantequilla o huevos (Kwak et al., 2004; Jung et al., 2008) (**Figura I.4.8**).

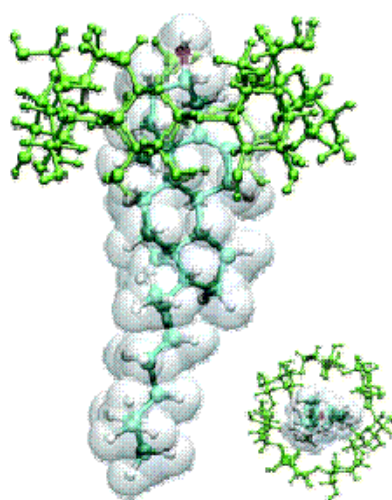


Figura I.4.8. *Complejo de inclusión colesterol-CDs.*

4.9.2.1. CDs como agentes atrapadores de sabores

La formación de complejos de inclusión con sabores, ofrece una protección efectiva de cada uno de los sabores que hay en un alimento. Esta encapsulación molecular, inhibe o excluye las interacciones moleculares entre los diferentes componentes naturales o sintéticos que dan sabor a los alimentos.

4.9.2.2. CDs como agentes protectores frente a la oxidación por oxígeno

Hay sabores o ingredientes alimentarios sensibles al oxígeno (ácidos grasos no saturados, colorantes, etc.) que al ser complejados con CDs, mejoran su estabilidad química. Este efecto fue descrito en 1987 por Szente y Szejtli, que midieron el consumo de O_2 para registrar su efecto sobre ingredientes libres o complejados. Los resultados de estos experimentos y otros posteriores mostraron

que la complejación con CDs impide casi totalmente las alteraciones químicas del sabor debidas a la presencia de oxígeno, incluso cuando se almacena el alimento en atmósferas de oxígeno puro (Szente y Szejtli 1987, 2004).

4.9.2.3. CDs como agentes protectores frente a la luz

Numerosos componentes de los alimentos son sensibles a la luz, como es el caso del citral (componente responsable del olor a cítricos frescos). Este compuesto, en presencia de luz UV se transforma en fotocitral A y fotocitral B. Estos dos metabolitos le confieren al alimento un aroma y sabor no deseados. Cuando el citral es complejado con β -CDs, no se observan productos de descomposición en las 6 primeras horas de exposición del alimento a la luz (Szejtli et al 1985). Resultados similares se obtuvieron al complejar el cinamaldehído con β -CDs, estabilizándolo frente a la luz UV (Szente y Szejtli 1987, 2004).

4.9.2.4. CDs como agentes protectores frente a la temperatura

Los complejos formados con sabores volátiles o aceites esenciales, en estado sólido, poseen una notable resistencia al calor, de hecho al comparar con las formulaciones tradicionales, la retención de dicho sabor en el alimento mejora mediante el empleo de CDs. Este hecho, se ha puesto de manifiesto en diferentes trabajos, demostrando que la complejación de aceites esenciales naturales con CDs ejerce un efecto protector frente a la evaporación, evitando que se volatilicen durante el procesado del alimento (Szente y Szejtli 1987, 2004).

4.9.2.5. CDs para mejorar la vida útil de los alimentos

Según las afirmaciones anteriores, bajo condiciones no extremas de temperatura y humedad relativa (25 °C y 60%), cabe esperar que durante el almacenamiento se alargue la vida media de los sabores complejados con CDs en los alimentos (Szente y Szejtli 1987, 2004).

En un estudio llevado a cabo con doce sabores diferentes (naturales y sintéticos) complejados en β -CDs y almacenados en condiciones no extremas de temperatura y humedad relativa durante 14 años, se demostró, tras analizar cada año las muestras por cromatografía de gases, que la encapsulación molecular de dichos compuestos concentrados con CDs, mejorando notablemente su estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo (Szente y Szejtli 1987, 2004). El poder de

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

4.9.2.6. *Aplicaciones de las CDs vacías*

Las CDs pueden ser utilizadas para estabilizar emulsiones de aceite en agua, como mayonesa y aderezos de ensaladas. Los colorantes naturales de salsa de tomate pueden ser estabilizados mediante la adición de 0,2% de β -CDs, no alterándose el color al elevar la temperatura a 100 °C durante 2 h (Kawashima, 1980). En productos cárnicos transformados, las CDs mejoran la retención de agua y la textura del alimento (Ota y Takeda, 1981).

También pueden ser utilizadas para prevenir el pardeamiento en alimentos mínimamente procesados. (Núñez-Delicado et al., 2005).

La gelatinización es una característica importante de almidones y los alimentos que lo contengan, como las harinas. La presencia de β -CDs modifica considerablemente la gelatinización de la harina de trigo (Kim y Hill, 1984). La presencia del 1,5% de β -CDs aumenta el poder de hinchamiento y la solubilidad de los gránulos de almidón de trigo y especialmente la lixiviación de la fracción de amilosa, aumentando en un factor de 4, la viscosidad de estas pastas. Esto puede ser debido a que las CDs desestabilizan los complejos almidón-lípidos, ya que al utilizar harinas deslipidadas el efecto de las CDs se vió sensiblemente reducido.

Las CDs también se pueden utilizar para enmascarar sabores no deseados. Es importante tener en cuenta que la cantidad de compuesto complejo que se libera al medio acuoso en una disolución, depende de diferentes factores, como la temperatura, la constante de complejación y las concentraciones relativas de ambos componentes. En disoluciones concentradas y a baja temperatura, el equilibrio se desplaza hacia la complejación, mientras que en disoluciones más diluidas y a mayor temperatura, el equilibrio se desplaza hacia la liberación del compuesto encapsulado. Por este motivo, cuando los complejos flavor-CDs entran en contacto con las papilas gustativas en el interior de la boca, se comportan como una disolución diluida a 37 °C, liberan de fácilmente su sabor y aroma. Para intentar eliminar los compuestos fenólicos responsables del sabor amargo del café y el té, que se forman debido a las altas temperaturas alcanzadas en los procesos de elaboración de dichos alimentos (90 °C durante varias horas), se adicionaron β -CD

al 0,1% a dichas bebidas, obteniéndose resultados favorables cuando se evaluaron mediante análisis sensorial (Yu, 1988), resultados que no se han podido reproducir posteriormente. Sin embargo, trabajando a temperaturas menores y a mayor concentración de CDs si se pueden enmascarar sabores y olores desagradables por complejación (Szente y Szejtli 1987, 2004).

El hidrolizado de caseínas de leche es un extracto proteico fácilmente digerible, pero tiene un desagradable sabor amargo que limita su uso. Mediante la adicción del 10 % de β -CDs, el sabor amargo puede ser enmascarados (Specht et al., 1981), ampliando así el uso alimentario que se le puede dar a dichas proteínas. De forma similar se puede eliminar el sabor amargo del extracto de ginseng, ya que el propilenglicol puede ser eliminado usando β -CDs (Akiyama y Miyao, 1979).

Los olores característicos de cordero y pescado, de harinas de hueso (usado como suplemento de calcio en los forrajes de los animales) o de solución de caseinato de sodio, pueden ser eliminados mediante el uso de CDs. También se pueden obtener productos derivados de soja (lecitina de soja), libres de olor a grasa y sabor astringente, para uso en alimentación (Hatae y Nakajima, 1986).

El sabor amargo de zumos de uva o mandarina también disminuye sensiblemente al añadir el 0,3% de β -CDs antes del tratamiento térmico. Esto es debido a que naringina y limonina (compuestos responsables del sabor amargo) forman complejos estables con β -CDs, lo que reduce el amargor del zumo (Shaw y Wilson, 1983).

Las CDs también se pueden utilizar para secuestrar determinados componentes de los alimentos. En el caso de la elaboración de café soluble, la extracción acuosa del café tostado en presencia de CDs, para su posterior secado por spray-drying o freeze-drying, genera un café soluble que conserva mejor los compuestos volátiles exhibiendo un mejor aroma que el elaborado en ausencia de CDs (Wagner et al., 1988). También se ha probado el uso de CDs para eliminar la cafeína del café, pero no es un proceso muy efectivo (elimina 4-26%), comparado con el uso de carbón vegetal que consigue eliminar el 77%. Sin embargo, el empleo de polímeros de β -CDs sí es efectivo para eliminar el ácido clorogénico (70%, casi como el carbón vegetal que elimina el 71%) (Ujhazy y Szejtli, 1989).

También se han utilizado las β -CDs para elaborar mantequilla baja en colesterol, que se comercializada en Bélgica, con el nombre de Balade™, desde 1992

(Comini y Mentink, 1991). Para conseguirlo, se mezcla la mantequilla con β -CDs, que forman complejos estables con el colesterol, siendo fácilmente extraíbles en la fusión de la mantequilla. Esta técnica de eliminación del colesterol también ha sido aplicada con éxito en la leche a emplear posteriormente en la elaboración de mantequilla, consiguiendo eliminar más del 90% del colesterol de forma sencilla. Tras este tratamiento la mantequilla fabricada no contiene CDs. Con esta tecnología también se han elaborado quesos, cremas e incluso huevos bajos en colesterol (Szente y Szejtli 1987, 2004).

4.9.2.7. Aplicaciones especiales de las CDs en alimentos

Una de las aplicaciones más interesantes y desafiantes de las CDs es su uso en envases activos. Las CDs vacías o los complejos CDs-agente antimicrobiano y antioxidante incorporados en las películas de plásticos para el envasado de alimentos, reduce eficazmente la pérdidas de sustancias aromáticas y alargan la vida útil del producto. Así, se ha descrito que la adición a pasta de pescado al 0,1% de complejos yodo-CDs inhibe la putrefacción durante dos meses a 20 °C (Hara y Hashimoto, 2002). También se ha comprobado que la incorporación de complejos CDs-fungicida a films utilizados para el envasado de quesos, inhiben el crecimiento rápido de hongos en la superficie del queso, alargando así la vida útil de producto (Karatsu, 1992).

4.9.3. Industria farmacéutica

Los fármacos deben tener un cierto nivel de solubilidad en agua para poder llegar a las membranas celulares, pero también han de ser lo suficientemente hidrofóbicos para poder atravesarlas.

Una de las propiedades de las CDs es su capacidad para mejorar la absorción de fármacos a través de las membranas biológicas. Las CDs son relativamente grandes y poseen una superficie exterior hidrofílica, por lo que en condiciones normales atravesarán las membranas celulares con dificultad (Frömming et al., 1994). Se ha demostrado que las CDs actúan como portadores de fármacos aumentando su solubilidad y transportándolos hasta la superficie de las membranas celulares de tejidos como la piel, la mucosa o la cornea del ojo. Las CDs no atraviesan las membranas celulares, actuando por tanto, como vehículos

moleculares y potenciadores de la penetración, al aumentar la disponibilidad del fármaco en la superficie de la membrana. Se han utilizado con éxito en formulaciones acuosas cutáneas (Uekama et al., 1992), en soluciones acuosas de enjuague bucal (Kristmundsdóttir et al., 1996), sistemas de administración nasal de drogas (Kublik et al., 1996) y en soluciones oculares (Lofsson y Stefánsson, 1997).

La mayoría de los fármacos no tienen suficiente solubilidad en agua y los sistemas tradicionales para su formulación incluyen una combinación de disolventes orgánicos, surfactantes y condiciones extremas de pH, que suele causar irritación u otras reacciones adversas. Las CDs no son irritantes y ofrecen ventajas adicionales tales como: la estabilización de los compuestos activos, reducción de su volatilidad y capacidad de enmascarar sabores amargos o irritantes y malos olores de los fármacos (Szetjli, 1998; Hedges, 1998; Irie y Uekama, 1999).

Hay numerosas aplicaciones de CDs en el ámbito de los productos farmacéuticos. Por ejemplo, la adición de α - o β -CDs para aumentar la solubilidad en agua de varias sustancias poco solubles. En algunos casos esto se traduce en una mejor biodisponibilidad, aumentando el efecto farmacológico que permite una reducción de la dosis a administrar.

Los complejos de inclusión también facilitan la utilización de productos volátiles, pudiendo administrarlos en comprimidos. Las CDs se utilizan para mejorar la estabilidad de los fármacos para aumentar su resistencia a la hidrólisis, oxidación, calor, luz y metales. La inclusión de productos irritantes en CDs, también puede proteger la mucosa gástrica por vía oral, y reducir el daño de la piel por vía cutánea.

Las CDs son muy resistentes a las enzimas que degradan el almidón, aunque pueden ser degradadas en tasas muy bajas por las α -amilasas. Las CDs no pueden ser degradadas por las amilasas salivares y pancreáticas pero sí por las α -amilasas de los microorganismos del colon. Algunos estudios han demostrado que solo el 2-4 % de las CDs se pueden absorber por el intestino delgado y el resto son degradadas por los microorganismos del colon, obteniéndose glucosas como subproducto de la degradación. Esto explica su baja toxicidad en administración oral (Szetjli, 1998).

4.9.4. Agricultura e industria química

Las CDs forman complejos con una amplia variedad de productos químicos agrícolas, incluidos herbicidas, insecticidas, fungicidas, repelentes, feromonas y reguladores del crecimiento (Lucas-Abellán et al., 2008b).

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

La CDs, además de modificarse para la reacciones de catálisis también se modifican para reacciones de hidrólisis selectiva y en la hidroximetilación de fenoles. Estas modificaciones químicas de las CDs, les confiere una gran actividad catalítica, ya que aumentan la velocidad de reacción en la conversión de ácido fenilpirúvico a fenilalanina (Atwood, 1990).

Las CDs también desempeñan un papel importante en los procesos biocatalíticos debido al aumento de la enantioselectividad. Así, tras la formación de complejos de inclusión con una molécula proquiral, el ataque preferencial por los reactivos tiene lugar sólo en una de las caras enantioselectivas, dando una mayor enantioselectividad.

En 1991 Kamal et al. demostraron que la hidrólisis de ésteres de arilpropionico racémico por la enzima transportadora de albúmina de suero bovino, tenía una enantioselectividad baja (50-81%), mientras que con β -CDs no solo mejoraba la enantioselectividad (80-99 %) sino que también se mejoró la tasa de hidrólisis.

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

También se han utilizado para aumentar la solubilidad de tres tipos de fungicidas (tiabendazol, carbendazima y fuberidazol), para que estén más

disponibles en el suelo. Por otra parte, también aumentan la solubilidad de los hidrocarburos, pudiendo ser utilizadas en biodegradación y biorremediación. Las β -CDs aceleran la degradación de todos los tipos de hidrocarburos que influyen en la cinética de crecimiento, produciendo un aumento de la biomasa y una mejor utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. El bajo coste de las β -CDs, hace posible su utilización para estos fines (Bardi, 2000).

4.10. REGULACIÓN DE LAS CDs

En la actualidad, no existe armonización con respecto al empleo de CDs en los alimentos, ya que varía entre distintos países. En EEUU, α -, β -, y γ -CDs están consideradas como GRAS (lista emitida por FDA de aditivos alimentarios que son "generalmente reconocidos como seguros") y pueden ser comercializadas como tal. En Japón, α -, β -, y γ -CDs son reconocidos como productos naturales y su comercialización en el sector de la alimentación está limitada por consideraciones de pureza. En Australia y Nueva Zelanda α -y γ -CDs están clasificados como nuevos alimentos a partir de 2004 y 2003, respectivamente (Cravotto et al., 2006).

FAO/OMS a través del Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) recomienda un consumo máximo de β -CDs en alimentos de 500 mg/kg/día. Para α - y γ -CDs no se ha establecido la ingesta diaria admisible (IDA). Por otra parte, en julio de 2005 la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EEUU, acabó con la necesidad de establecer un nivel máximo admisible de residuos de α -, β -, y γ -CDs en diversos productos alimenticios (EEUU Federal Register, 2005) (Astray et al., 2009). En Europa, sólo están aprobadas α - y β -CDs como ingredientes alimentarios, y por lo tanto, deberán figurar en la composición en los alimentos que las contengan (Diario oficial de la Unión Europea 5.6.2008).

El estatus de aprobación de las mismas en varias regiones del mundo se resume en la **Tabla I.4.2.**

Tabla 1.4.2. Aprobación legal de las CDs para uso alimentario.

País/Organización	α -CDs	β -CDs	γ -CDs
OMS/FAO	IDA: no especificada 2001/2004	IDA: 5 mg/Kg/día	IDA: no especificada 1999/2000
USA	GRAS ^a , Enero 2004	GRAS ^b , octubre 2001	
Canadá	Presentado, para estado de nuevo alimento, Julio 2006		
UE	Nuevo alimento, aprobado 2008	Aditivos alimentarios (< 1g/kg)	Nuevo alimento, presentado enero 2010
Japón	Producto Natural	Producto Natural	Producto Natural
Méjico	Mediante aprobación de FDA con licencia de importación	Mediante aprobación de FDA con licencia de importación	Mediante aprobación de FDA con licencia de importación
Estados Mercosur	Aprobado para alimentos		
FSANZ	Nuevos alimentos,		
Korea	Aprobado como suplemento alimentario	Aprobado como suplemento alimentario	Aprobado como suplemento alimentario
Filipinas	Aprobado para alimentación		Aprobado para alimentación
Tailandia			Aprobado como suplemento alimentario
Taiwan	Aprobado como suplemento alimentario		

IDA: Ingesta Diaria Admisible; UE: Unión Europea; FDA: Food and Drug Administration; OMS: Organización mundial de las Salud; FSANZ: Food Standards Australia New Zealand; GRAS: Sustancias reconocidas como seguras; OMS/FAO: Organización Mundial de la Salud; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.

Estados Mercosur: Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay.

^a GRAS: como ingrediente alimentario

^b GRAS: como agente protector de aroma

5. CDs y AE

5.1. APLICACIONES DE LAS CDs-AE

Los sabores juegan papel muy importante en la industria alimentaria debido a que influyen en las características organolépticas del alimento y en la satisfacción del consumidor, repercutiendo en el consumo del producto acabado. La mayoría de componentes aromáticos son productos de síntesis química o se obtienen por medio de la extracción a partir de plantas. En la actualidad, debido a la preocupación del consumidor, se intenta minimizar el uso de productos de síntesis para dar paso a aditivos de origen natural (Teixera et al., 2004).

La estabilidad de los aromas en los diferentes sistemas alimentarios ha despertado un gran interés en la industria alimentaria debido a la relación existente entre la calidad y la aceptabilidad de los alimentos. La manufactura, el almacenamiento, los materiales de envasado y los ingredientes de los alimentos son factores que pueden causar a menudo modificación en el sabor, reduciendo la intensidad del aroma o incluso produciendo componentes que dan lugar a sabores indeseables (Lubbers et al., 1998). Generalmente, la mayoría de los componentes de los AE son sustancias, con una baja solubilidad, termolábiles, y que se volatilizan como resultado de oxidaciones e interacciones químicas (Choi et al., 2009).

Desde el punto de vista de la alimentación funcional, y considerando los problemas asociados a la utilización de los AE y las ventajas del uso de las CDs, la encapsulación de aromas con CDs permite entre otros reducir la volatilidad o inflamabilidad de líquidos, hacer que sustancias líquidas se comporten como sólidos, la separación de componentes que pueden ser reactivos entre ellos, la reducción de la toxicidad de los mismos, la protección ambiental frente a otros compuestos, la alteración de las propiedades superficiales de componentes, el control de la liberación de ciertos compuestos y el enmascaramiento del sabor astringente de ciertos compuestos (Tabla I.5.1).

Tabla I.5.1. *Ventajas de la encapsulación de aromas con CDs.*

Ventajas
<ul style="list-style-type: none">• Protección de compuestos volátiles• Transformación de líquidos en sólidos• Evita reacción entre distintos componentes de un alimento• Evita la alteración de las características organolépticas• Protección frente a agentes externos• Control de la liberación de componentes• Enmascarar el sabor astringente de alimentos

La formación de complejos de inclusión aroma-CDs ofrece un gran potencial para la protección de volátiles y/o componentes lábiles presentes en un sistema alimentario multicomponente. De este modo, se han adicionado β -CDs en distintas matrices alimentarias con el fin de reducir la volatilidad durante el tratamiento térmico de componentes aromáticos presentes en distintas matrices alimentarias (Jouquand et al., 2004). De todas las técnicas de encapsulación, la encapsulación molecular de aromas con β -CDs ha demostrado ser la mejor técnica para la protección frente al calor y la evaporación (Pagignton, 1986; Qui y Hedges, 1995).

5.1.1. Industria de alimentos y bebidas

Dentro de las múltiples funciones de las CDs como ingrediente alimentario, éstas pueden ser utilizadas como agentes encapsulantes mejorando la estabilidad de ingredientes especialmente sensibles como los AE y aromas, consiguiendo de esta forma un aumento de la vida útil del producto final.

5.1.1.1. Ventajas tecnológicas y de procesado

Los avances tecnológicos en la industria alimentaria incluyen la estandarización de la composición de un producto, utilización de dosis simples y manejo de polvo seco, consiguiendo de este modo una reducción en el coste de producción y almacenamiento y promoviendo procesos tecnológicos más económicos con una reducción de la mano de obra. Las ventajas tecnológicas del uso de CDs han puesto de manifiesto la mejora de las propiedades sensoriales y

nutricionales del producto final, así como el aumento del rendimiento de procesos tecnológicos quedando reflejado en la rentabilidad económica de la industria.

5.1.1.2. Transformación de componentes líquidos

La transformación de componentes líquidos a forma cristalina (polvo, gránulos e incluso tabletas) puede causar problemas en la industria alimentaria. El uso de CDs en este ámbito tiene como objetivo aumentar las propiedades sensoriales y la calidad de productos como por ejemplo el café instantáneo. Además, la formación de complejos de inclusión por medio de la utilización de CDs produce una reducción de la higroscopicidad de productos granulados, evitando la absorción de humedad y reduciendo de este modo el crecimiento de patógenos que puedan disminuir la vida útil del producto.

5.1.1.3. Modificación de sabores y olores

Las CDs pueden ser usadas en la modificación y/o eliminación de sabores y aromas desagradables en alimentos y bebidas. El efecto enmascarante y la reducción o eliminación de aromas indeseables ha sido probado en timol, carvacrol y extractos de ginseng (Cabral, 2010).

El uso de bajas temperaturas junto con la inclusión en CDs ha conseguido una reducción de sabores indeseables, de la astringencia de alimentos como la soja, o de componentes como la naringina, presente en zumos de cítricos, y ácido clorogénico o polifenoles presentes en el café (Szente y Szejtli, 2004).

La efectividad de α - y β -CDs ha sido evaluada en paneles de cata. Los resultados de los panelistas ha demostrado una reducción de la intensidad del olor de AE de ajo encapsulado con los diferentes tipos de CDs frente al que no lo había sido.

También se han llevado a cabo estudios con caseína hidrolizada de leche. Ésta es una buena fuente de proteína y además se digiere muy fácilmente, pero su sabor amargo limita su uso. La adición de una concentración de β -CDs del 10% ha servido para eliminar el sabor amargo. Por otro lado, también se han utilizado para eliminar el sabor amargo de zumos procedentes de uva y mandarina por medio de la adición previa al tratamiento térmico de 0,3% de β -CDs a los envases de zumos.

En un estudio llevado a cabo con diferentes extractos de plantas té de guava, ginseng y gymnema y diferentes tipos de CDs, se vió una reducción del sabor astringente mostrando una mayor efectividad γ -CDs > β -CDs > α -CDs (Szejtli y Szente, 2004).

5.1.1.4. Mejora de la estabilidad química

La encapsulación con CDs puede resultar muy beneficioso en alimentos y bebidas para disminuir la degradación o pérdidas de componentes aromáticos durante el procesado y almacenamiento (Lindner et al., 1981). De este modo, permiten una mejora de la estabilidad molecular y estabilidad física provocando un retraso en el crecimiento de cristales y también de la estabilidad química ya que disminuye la reactividad química, volatilidad o descomposición térmica, fotodegradación, hidrólisis, oxidación, y evita también la formación de isómeros que pueden dar lugar en reacciones secundarias a compuestos no deseados en el producto acabado (Cabral, 2010).

La formación de los complejos de inclusión en extractos vegetales, AE o componentes de los mismos puede tener un efecto potenciador o inhibitorio en la reactividad de la molécula huésped, dependiendo de la naturaleza de la reacción y de la orientación de la molécula huésped dentro de la cavidad de la CD. Los componentes en los que su centro activo se encuentra totalmente inducido en la cavidad de la CD suelen tener un efecto inhibitorio de la reactividad; por el contrario si éste se encuentra parcialmente inducido en la cavidad el AE la reactividad se acelera (Szejtli y Szente, 2004).

5.1.1.5. Estabilidad térmica y protección frente a la volatilidad de componentes aromáticos

El problema más común al que se enfrenta la industria de los aromas y los AE es la pérdida de los componentes aromáticos por evaporación. Los compuestos volátiles pueden ser estabilizados por la formación de complejos de inclusión con CD. La reducción de la volatilidad puede ser demostrada por un aumento del punto de ebullición de las soluciones, o en el punto de sublimación de sólidos.

La encapsulación con CDs para este fin ha sido ampliamente descrita en diferentes AE y componentes aromáticos. *d*-carvona es un monoterpeno muy volátil e inestable presente en las semillas de hinojo (*Carum Carvi L.*), que actúa como inhibidor del crecimiento de tubérculos en patata. La formación de complejos de

inclusión α -carvona-CDs ha hecho posible el uso del mismo en la reducción de las raíces en patata, potenciando su efecto debido a una disminución de la volatilidad del mismo (Silva et al., 2003). En estudios llevados a cabo con carvona y limoneno se demostró que la formación de complejos de inclusión con β -CDs parece tener un mayor efecto protector de la evaporación de sustancias volátiles durante el almacenamiento, mientras que las microcápsulas que contienen almidones modificados presentaban una mayor tolerancia al tratamiento térmico. Además las CDs han sido usadas para la estabilización de componentes aromáticos como anetol, citral, citronelal, linalol, mentol, AE de anís, salvia, canela, bergamota, naranja, limón, cebolla, mostaza y monoterpenos como geraniol y timol. (Jackson y Lee, 1991; Szente y Szejtli, 2004).

5.1.1.6 Protección frente a la oxidación de componentes aromáticos

La encapsulación con CDs como método para evitar la oxidación ha sido estudiada en cinamaldehído y benzaldehído (Szente y Szejtli, 1987). El efecto de la oxidación en estos componentes fue llevado a cabo mediante la monitorización del consumo de O_2 de las muestras. Los resultados del estudio mostraron que la complejación con CDs prevenía casi la completa oxidación de estos compuestos, incluso cuando estos eran almacenados en una atmósfera pura de oxígeno.

La preparación de complejos de inclusión con carvacrol, timol y eugenol demostró la reducción de la oxidación y una estabilización de los compuestos.

5.1.1.7. Complejación selectiva en ciclodextrinas vacías

La extracción de café tostado con soluciones acuosas de β -CDs ha conseguido extracciones más efectivas. La producción de café soluble instantáneo en polvo con β -CDs obtenido por secado por atomización o liofilización ha resultado en un aumento de la estabilidad de sus componentes volátiles, mejorando el aroma y las características organolépticas del café soluble (Cabral, 2010).

5.1.1.8. Aromas y envasado inteligente

Szente y Szejtli en 2004 mostraron las posibles aplicaciones de las CDs en alimentos y envasado activo con CDs. La complejación de agentes antimicrobianos ha sido utilizado para films de plástico, en los que se redujo la pérdida de aromas y se produjo una mejora de la conservación microbiológica durante el almacenamiento y la vida útil del producto. La complejación de α - y β -CDs con alil isotiocianato (mayor componente del AE de mostaza), ha sido evaluada para su uso como aditivo en biopolímeros (PLA-PCL) que se utilizan como films en envasado (Plackett et al., 2006).

5.1.2. CDs en la industria cosmética

Las funciones básicas de las fragancias son proveer aromas agradables, enmascarar el olor base de producto y dotar de identidad a los productos. Sin embargo, los componentes presentes en las fragancias son compuestos insolubles o con baja solubilidad en agua, normalmente en estado líquido, lo que dificulta el proceso de perfumería.

El empleo de surfactantes como agentes solubilizantes causa problemas de turbidez de las formulaciones, irritación de la piel y sensibilidad a la luz. Además, la cantidad de algunos componentes aromáticos decrece durante el almacenamiento debido a la volatilidad y baja estabilidad de los compuestos. La complejación de los componentes aromáticos con CDs aumenta la solubilidad y previene su evaporación. La interacción de la moléculas huésped con las CDs produce una mayor barrera de energía disminuyendo la volatilización, y haciendo las fragancias más duraderas (Numanoglu et al. 2005).

Numanoglu et al. (2005) probaron la efectividad de la utilización de β -CDs y HP- β -CDs en componentes utilizados en fragancias (linalol y benzil acetato) demostrando un aumento de la estabilidad (disminución de la volatilidad) y de la solubilidad en agua. Además observaron una liberación más controlada de los mismos, así como la conversión de sustancias líquidas en polvo. Procter & Gamble y otras multinacionales de la industria de la cosmética y las fragancias han desarrollado patentes dejando evidente la utilidad y ventajas de la encapsulación con CDs.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

Los componentes aromáticos suelen ser uno de los ingredientes más valorados en cualquier fórmula alimentaria. Incluso la utilización en pequeñas cantidades suele resultar costosa y debido a la y volatilidad de estos compuestos, su conservación es uno de los hándicaps más importantes a que se enfrenta la industria de los aromas y sabores, ya que afecta a la calidad del producto final.

El AEC, además de sus propiedades aromatizantes, también posee propiedades anestésicas y antimicrobianas que han dado lugar a un aumento de sus aplicaciones. Sin embargo, son numerosos los inconvenientes asociados a su uso: irritación de la piel, sabor picante, alta volatilidad, fotosensibilidad y baja solubilidad en agua. Estos inconvenientes pueden solventarse o minimizarse mediante técnicas de encapsulación.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el estudio de la encapsulación de AEC por diferentes métodos. Para la consecución de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Estudio de la complejación de AEC y de su componente mayoritario EG con diferentes tipos de CDs.
2. Cálculo de la constante de complejación (K_c) entre EG y los diferentes tipos de CDs estudiados: β y HP- β -CDs.
3. Comparación de la complejación de EG como sistema multicomponente del AEC y como compuesto puro.
4. Optimización de un método de preparación de complejos sólidos AEC-CDS
5. Estudio del efecto del método de secado de los complejos sólidos AEC-CDs sobre la cantidad de AEC retenida en el producto final.
6. Encapsulación de AEC mediante la utilización de proteínas de suero lácteo y diferentes tipos de maltodextrinas utilizando como métodos de encapsulación gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización como métodos de encapsulación.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. MATERIALES

Las β -CDs fueron suministradas por Wacker (Alemania) y las HP- β -CDs por TCI (Europa). La proteína aislada de suero lácteo (PSL) fue suministrada por Davisco Food ingredient Int. (EE.UU.). El aceite de soja se obtuvo de Archer Daniels Midland Company (EE.UU.). El aceite esencial de clavo (AEC) fue cedido por Lidervet, SL (España). El resto de reactivos fueron de grado analítico y fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (España).

1.2. MÉTODOS

1.2.1. Estudios de solubilidad

Los estudios de solubilidad de AEC y EG en presencia de CDs fueron llevados a cabo de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors en 1965, con algunas modificaciones.

Para ello, EG y AEC fueron añadidos en concentraciones saturantes a disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de β -CDs, hasta 13 mM, y HP- β -CDs, hasta 75 mM, en un volumen final de 5 mL. Las muestras se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 60 min, a 25 °C, hasta alcanzar el equilibrio. Pasado ese tiempo, se adicionó NaCl en una concentración de 0,5 M a cada una de las muestras para acelerar la precipitación de los complejos insolubles. Las muestras fueron agitadas en un vortex y posteriormente centrifugadas a 14800 g durante 30 min, a 25 °C, en una centrifuga modelo Biofugue Stratos. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de membrana de nylon de 0,2 μ m para eliminar el exceso de AEC o EG no disuelto.

Para determinar la cantidad de AEC y EG disuelto en cada filtrado, los complejos se rompieron adicionando etanol al 80% antes de la cuantificación del AEC y EG en las soluciones mediante espectrofotometría y/o GC-MS.

Cuando se observó un precipitado, éste fue redissuelto añadiendo 2 mL de etanol al 100%. Las muestras fueron centrifugadas en una microfuga modelo Labnet Internacional Inc a 13000 g, durante 2 min. Los sobrenadantes fueron utilizados para la cuantificación del EG y AEC por espectrofotometría y por GC-MS.

Los resultados obtenidos fueron representados *vs* la concentración de CDs, y el cálculo de la constante aparente de complejación para los complejos de inclusión K_c se realizó a partir de las pendientes y los interceptos de la porción lineal creciente de los diagramas de fases de los estudios de solubilidad, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$K_c = \frac{\text{Pendiente}}{S_0(1 - \text{pendiente})} \quad [\text{III.1.1}]$$

donde S_0 es la solubilidad acuosa de EG en ausencia de CDs y “pendiente” representa la pendiente correspondiente a los diagramas de fases obtenidos a partir de la representación gráfica de la concentración de compuesto *vs* concentración de β -CDs o HP- β -CDs.

La concentración de AEC y EG en las muestras se determinó usando una curva de calibrado preparada en las mismas condiciones experimentales por GC-MS o por espectrofotometría UV-Vis.

1.2.2. Análisis por GC-MS

El análisis y cuantificación del AEC y EG se realizó por cromatografía de gases en un equipo Shimadzu GC-QP 2010 acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Para los análisis se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min y una columna capilar ω -WAX 250 silica supelco (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). La programación de la temperatura fue la siguiente: 3 min a 40 °C, con un posterior aumento de temperatura a 47 °C durante 2 min a una velocidad de 2 °C/min, a continuación la temperatura se aumentó a 52 °C a una velocidad de 2 °C/min. De 52 °C la temperatura se elevó hasta 110 °C a 5 °C/min. A partir de ahí, la temperatura aumentó hasta 200 °C, con una rampa de temperatura a 25 °C/min para permanecer a 200 °C durante 5 min.

El análisis y la cuantificación de los componentes se realizó analizando las áreas obtenidas tras la inyección de las muestras. La identificación de los componentes a estudio se basó en la comparación del espectro de masas de cada pico con la base de datos del sistema y el índice kovats o índice de retención.

Debido a que el AEC es un sistema multicomponente, los análisis de cuantificación del mismo cuando fue encapsulado por los diferentes métodos, se realizaron mediante GC-MS utilizando como referencia el área del pico correspondiente a su componente mayoritario EG.

1.2.3. Análisis espectrofotométricos

La formación de los complejos de inclusión fue verificada espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1603. Los estudios fueron llevados a cabo a 282 nm, donde el AEC y EG mostraron su máxima absorción (**Figura III.1.1**).

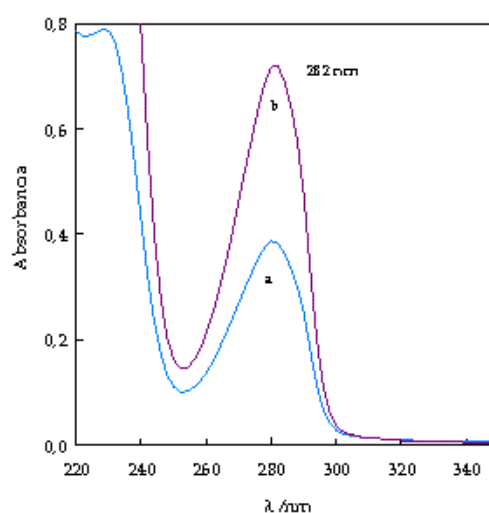


Figura III.1.1. Comparación de los espectros de máxima absorción de EG y AEC.

(a) Espectro de absorción de EG (0,035 mg/mL). (b) Espectro de absorción de AEC (0,05 mg/mL).

Para la posterior cuantificación de las muestras se prepararon curvas de calibrado de AEC y EG, usando soluciones etanólicas de concentraciones crecientes (0,005-0,05 mg/mL). Todas las medidas se realizaron por triplicado.

1.2.4. Preparación de complejos sólidos de inclusión AEC- β -CDs

Los complejos sólidos de inclusión AEC- β -CDs se prepararon mediante la adición de AEC en exceso a disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM). El volumen total de las disoluciones era 70 mL. Las soluciones acuosas de β -CDs (0-100 mM) fueron irradiadas con microondas durante 30 s, a intervalos de 10 s, hasta alcanzar una temperatura de 70 °C en la disolución. Seguidamente se añadió AEC en exceso a cada una de las muestras y de nuevo, irradiadas durante 30 s a intervalos de 10s, hasta alcanzar 70 °C. Posteriormente, las muestras se agitaron y se mantuvieron durante 12 h en viales sellados en oscuridad. Seguidamente, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, las muestras fueron irradiadas de nuevo, hasta alcanzar 70 °C. La precipitación de los complejos se vio favorecida por la adición de NaCl a una concentración de 0,5 M. Posteriormente se centrifugaron a 14800 g a 25 °C, durante 60 min.

Para el análisis de AEC disuelto en las muestras, los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0,2 μ m, eliminando así el exceso de AEC. La ruptura de los complejos AEC- β -CDs se llevó a cabo mediante la adición de etanol al 80% antes de la cuantificación de las muestras por GC-MS.

Por otro lado, los complejos de inclusión en forma de precipitado fueron suspendidos en 70 mL de agua, con el fin de obtener una suspensión con dos fases para poder retirar el exceso de AEC de la parte superior mediante decantación. La suspensión resultante se filtró a vacío a través de un filtro de membrana de nylon de 0,2 μ m. Los precipitados retenidos en el filtro se deshidrataron mediante la utilización de tres métodos de secado: estufa de desecación, liofilización y secado por atomización.

Estufa de desecación: El material precipitado obtenido por filtración a vacío se colocó en una estufa de desecación a 40 °C hasta que su masa fue constante. Los complejos sólidos AEC-CDs resultantes fueron almacenados en contenedores de cristal herméticamente sellados hasta el análisis de las muestras por GC-MS.

Liofilización: El material precipitado obtenido por filtración a vacío se congeló a 80 °C durante 3 horas. Posteriormente las muestras se dispusieron en un liofilizador modelo Christ alpha 2-2 LD plus. Durante el proceso de secado las condiciones del condensador fueron de -50 °C y presión de 0,1 mbar. Estas condiciones se mantuvieron durante todo el proceso de secado de las muestras que duró aproximadamente 4 horas. Los complejos sólidos AEC-CDs resultantes fueron almacenados en contenedores de cristal herméticamente sellados hasta el análisis de las muestras por GC-MS.

Secado por atomización: La suspensión formada por los complejos AEC-β-CDs en agua fueron introducidos en una cámara de atomización modelo B-290, Buchi. Las condiciones operacionales del equipo fueron las siguientes: temperatura del aire de entrada 140 °C, temperatura de salida del aire 60 °C, velocidad rotacional del atomizador 30000 rpm. Los complejos sólidos AEC-β-CDs resultantes fueron almacenados en contenedores de cristal herméticamente sellados hasta el análisis de las muestras por GC-MS.

El análisis de las muestras para la cuantificación del AEC de los complejos sólidos, después de su secado por estufa, liofilización y atomización se llevó a cabo por GC-MS. Para ello, los complejos sólidos fueron disueltos en 2 mL de etanol y posteriormente centrifugados en una microfuga modelo Labnet Internacional, Inc., a 13000 g, durante 2 min. Los sobrenadantes fueron inyectados para la cuantificación del AEC en las muestras por GC-MS.

1.2.5. Encapsulación por gelificación externa/interna y secado por atomización

1.2.5.1. Preparación de las emulsiones para gelificación externa (GE) y gelificación interna (GI)

La disolución de proteína se preparó a partir de proteína aislada de suero lácteo (PSL) con una concentración final del 10% (p/p) y a un pH 6,8. La disolución se preparó en agua desionizada a 40 °C con 0,02% azida sódica (NaN₃). La disolución fue posteriormente desnaturalizada. Para provocar la desnaturalización de las proteínas, la disolución se trató en un baño a 80 °C durante 30 min (PSDN). Posteriormente, se adicionó el AEC a distintas concentraciones: 20, 25 y 30% (p/p). En todos los casos, la emulsiones se prepararon a 25 °C, de acuerdo con el método de emulsificación descrito por Rosenberg y Lee en 1993. Para ello, se preparó una

emulsión inicial utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T-25 (IKA Works) a 13500 rpm durante 30 s. La segunda fase consistió en el paso de la emulsión a través de un homogeneizador modelo Niro Soavi VHP (Gea Niro, Soavi) a 50 MPa. Este proceso se repitió 4 veces. La formación de espuma durante el proceso de homogenización se evitó añadiendo 0,5 mL de un agente anti-espumante (Patcote 502K). Las emulsiones se mantuvieron a 4 °C para su posterior utilización en la microencapsulación por gelificación externa e interna.

1.2.5.2. Preparación de las emulsiones para secado por atomización

Para la preparación de las emulsiones destinadas a secado por atomización la disolución de proteína se preparó a partir de proteína aislada de suero lácteo (PSL) con una concentración final del 10% (p/p) y a un pH 6,8. La disolución se preparó en agua desionizada a 40 °C con 0,02% azida sódica (NaN_3) (PSN). En este punto se agregaron las maltodextrinas (MD): DE 4 o DE 25, dando lugar a las siguientes combinaciones:

- 10% PSN + 10% MD DE 5
- 10% PSN + 10% MD DE 4
- 5% PSN + 10% MD DE 25
- 5% PSN + 10% MD DE 4

Posteriormente, se adicionó el AEC en una concentración del 25% (p/p) en todas las muestras. En todos los casos, la emulsiones se prepararon a 25 °C, de acuerdo con el método de emulsificación descrito por Rosenberg y Lee en 1993. Para ello, se preparó una emulsión inicial utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T-25 (IKA Works) a 13500 rpm durante 30 s. La segunda fase consistió en el paso de la emulsión a través de un homogeneizador modelo Niro Soavi VHP (Gea Niro, Soavi) a 50 MPa. Este proceso se repitió 4 veces. La formación de espuma durante el proceso de homogenización se evitó añadiendo 0,5 mL de un agente anti-espumante (Patcote 502 K). Las emulsiones se mantuvieron a 4 °C para su posterior utilización mediante el secado por atomización.

1.2.5.3. Preparación de las microcápsulas

Las microcápsulas formadas por PSDN-AEC (20, 25 y 30%), se prepararon utilizando el método gelificación externa e interna mediada por Ca^{2+} .

1.2.5.3.1. Gelificación externa mediada por cloruro cálcico (CaCl_2)

En esta técnica, la formación de la cubierta de las microcápsulas tiene lugar por una reacción de gelificación iónica. Para ello, las emulsiones de PSDN-AEC fueron goteadas en una solución de CaCl_2 (100 mM) en agitación constante. El goteo se llevó a cabo utilizando una bomba peristáltica, modelo P-1 LKB-Pump, Pharmacia y mediante la utilización de puntas de pipeta de 200 μL . Después de la etapa de goteo, las microcápsulas formadas se mantuvieron en agitación constante durante 15 min para asegurar la completa gelificación de las mismas. Las microesferas formadas se filtraron y fueron conservadas en soluciones acuosas con azida sódica (0,02%) (NaN_3) a 4 °C para posteriores análisis.

1.2.5.3.2. Gelificación interna mediada por carbonato cálcico (CaCO_3).

Para la obtención de microcápsulas por gelificación interna se utilizaron 20 g de muestra de la emulsión PSDN-AEC a la que se le adicionó carbonato cálcico micronizado (CaCO_3). Por otro lado se dispusieron 100 g de aceite de soja con 5 g de surfactante (Span 65) en un erlenmeyer de doble boca. La mezcla se mantuvo en agitación constante utilizando un agitador modelo 50000-30 acoplado a una cabeza los 20 g de la emulsión PSDN-AEC fueron añadidos lentamente al aceite de soja en agitación constante. La mezcla se agitó a 250, 400 y 700 rpm durante 15 min para formar una emulsión aceite/agua/aceite. A continuación, para conseguir que la gelificación de la muestra tuviese lugar se añadieron 20 g de aceite de soja con ácido acético glacial (5%). La mezcla se agitó durante 60 min más a 400 rpm.

El lavado de las microcápsulas se llevó a cabo mediante la suspensión en una solución de Tween 80 al 1% y la mezcla se agitó durante 2 min. Este lavado se realizó dos veces más. Seguidamente se llevó a cabo un lavado final con agua destilada para eliminar los residuos de surfactante. Las partículas se filtraron a través de un filtro de celulosa y se almacenaron en una solución de azida sódica (0,02%) a 4 °C para los posteriores análisis.

La **Figura III.1.2** resume el proceso de preparación de la emulsión y las diferentes muestras obtenidas mediante gelificación externa y gelificación interna.

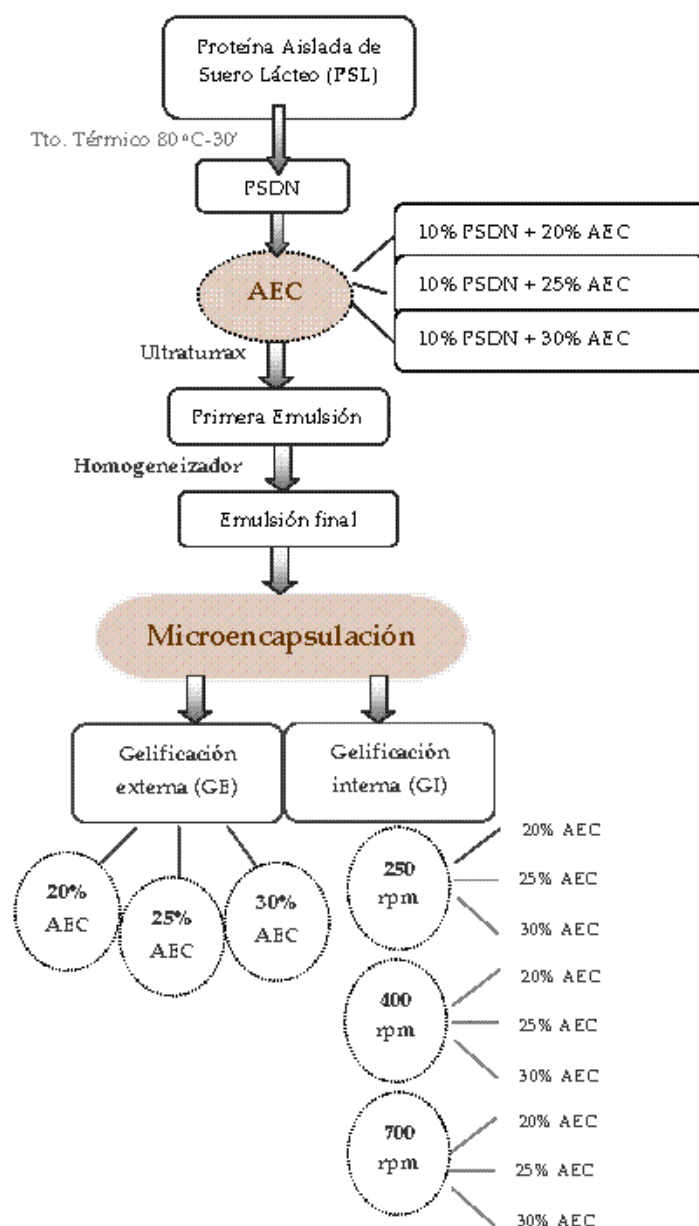


Figura III.1.2. Proceso de preparación de las microcápsulas formadas por AEC y PSL utilizando gelificación externa (GE) y gelificación interna (GI).

1.2.5.3.3. Encapsulación del AEC mediante secado por atomización

Para llevar a cabo la encapsulación mediante secado por atomización, se utilizaron cuatro emulsiones formadas la solución de proteína de suero nativa (PSN) a distintas concentraciones (5 y 10%) en combinación con MD de diferente grado de hidrólisis (valor DE 4 y 25) y con un 25% de AEC (p/p) (**Figura III.1.3**).

Las emulsiones fueron introducidas en un equipo modelo Anhydro. Las condiciones del equipo fueron las siguientes: temperatura del aire de entrada 160 °C, temperatura del aire de salida 80 °C. Los complejos sólidos AEC-CDs resultantes fueron almacenados en contenedores de cristal herméticamente sellados en un desecador hasta el análisis de las muestras por GC-MS.

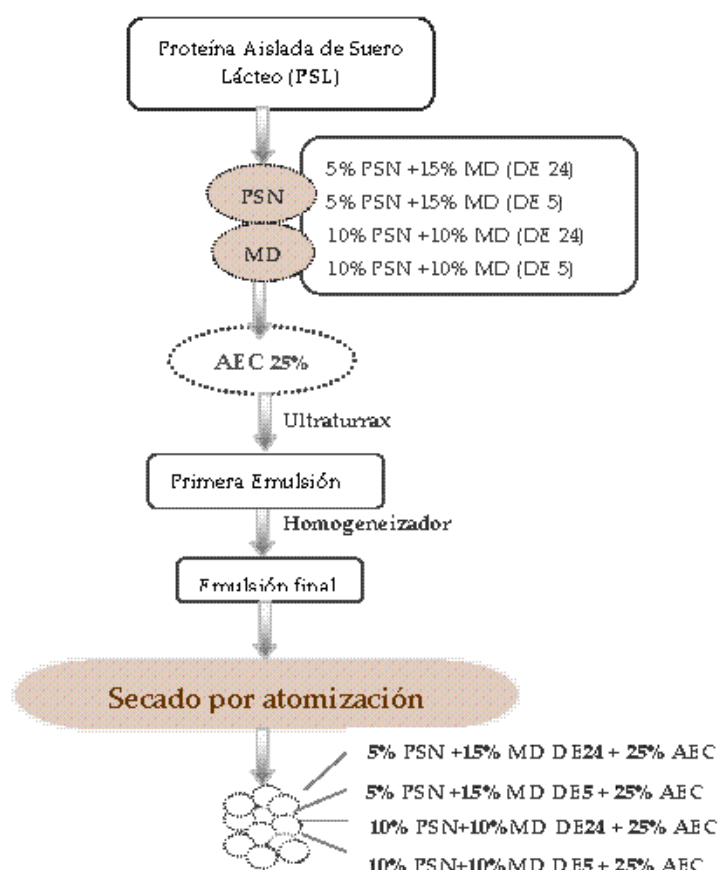


Figura III.1.3. Proceso de preparación de las microcápsulas formadas por AEC, PSL y MD utilizando secado por atomización.

La **Figura III.14** resume los distintos tipos de microcápsulas obtenidas mediante la aplicación de gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización.

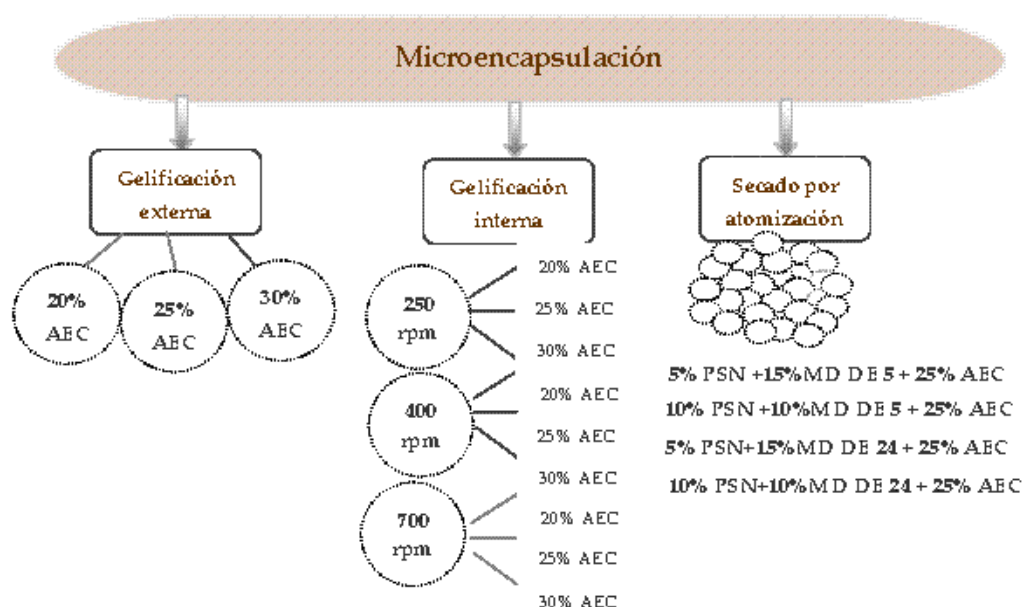


Figura III.14. Resumen de las microcápsulas obtenidas mediante la aplicación de los distintos métodos: gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización.

1.2.5.4. Extracción del AEC de las microcápsulas

Para la extracción del AEC de las microcápsulas se utilizó una mezcla de hexano: isopropanol (1:1) (Yoshii et al., 2001). Para ello, se pesaron 0,15 g de cada una de las muestras y se adicionaron 4 mL de la mezcla hexano:isopropanol y 1 mL de agua en tubos de cristal. Las muestras se agitaron en un vortex y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 15 min a 50 °C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron usados para la posterior cuantificación por GC-MS del AEC contenido en las microcápsulas. La extracción de cada una de las muestras se realizó por triplicado.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. COMPLEJACIÓN DE EG EN CDs

EG es el principal compuesto volátil presente en el aceite de las semillas de clavo, *Syzygium aromaticum* L. Constituye alrededor del 90% del AEC (Briozzo et al., 1989) y es el que determina la mayoría de las propiedades biológicas que se le atribuyen al aceite. Su estructura química está representada en la **Figura IV.1.1**.

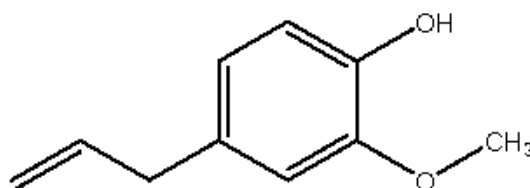


Figura IV.1.1. Estructura química de EG.

La caracterización y cuantificación de los aceites esenciales generalmente se lleva a cabo por GC debido a las características físicas de sus componentes. En el presente estudio, además de la GC, también se ha utilizado la espectrofotometría UV-Vis para analizar el efecto de las CDs en el espectro de absorción de EG. Por otra parte, y debido a la sencillez y rapidez del método espectrofotométrico para cuantificar compuestos, se validaron ambos métodos de cuantificación (GC-MS y espectrofotometría UV-Vis) para determinar cuál de ellos permitiría llevar a cabo la cuantificación del AEC encapsulado en CDs con mayor precisión.

1.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE EG

La validación del método analítico se considera una parte esencial del desarrollo de un estudio para asegurar que el análisis en cuestión y los resultados obtenidos son fiables y consistentes. Con este objetivo, y previo a los estudios de complejación llevados a cabo con EG, se realizó una validación de los dos métodos de cuantificación usados en este trabajo: cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas (GC-MS) y espectrofotometría UV-vis a 282 nm (longitud de onda de máxima absorción de EG) (**Figura IV.1.2**). Para ello se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y robustez.

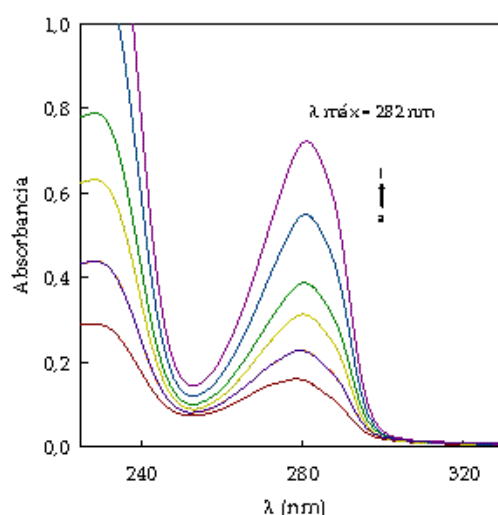


Figura IV.1.2. Espectro de absorción de EG. Soluciones etanólicas de concentraciones crecientes de EG: (a) 0,005, (b) 0,01, (c) 0,0175, (d) 0,025, (e) 0,03, (f) 0,045 mg/mL.

1.1.1. Linealidad

Se utiliza para verificar la capacidad del método analítico para obtener resultados dentro de un rango predefinido y que sean directamente proporcionales a la concentración del analito presente en la muestra. La **Figura IV.1.3** muestra la relación lineal existente entre la concentración de EG y el área del pico obtenido por GC-MS. La relación entre la concentración de EG y la absorbancia queda representada en la **Figura IV.1.4**.

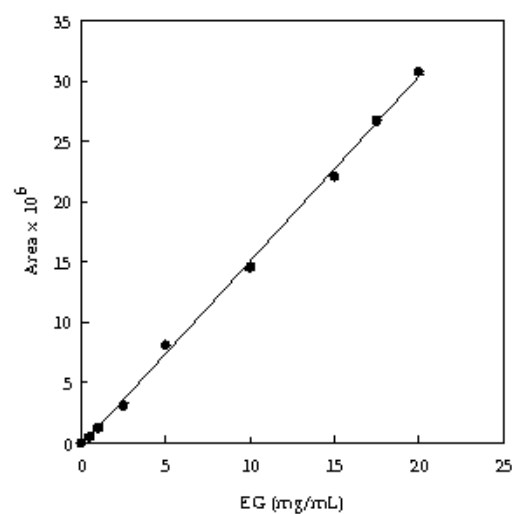


Figura IV.1.3. Recta de calibrado de EG determinada por GC-MS. Soluciones etanólicas de concentraciones crecientes de EG ($5 \cdot 10^{-3}$ -20 mg/mL).

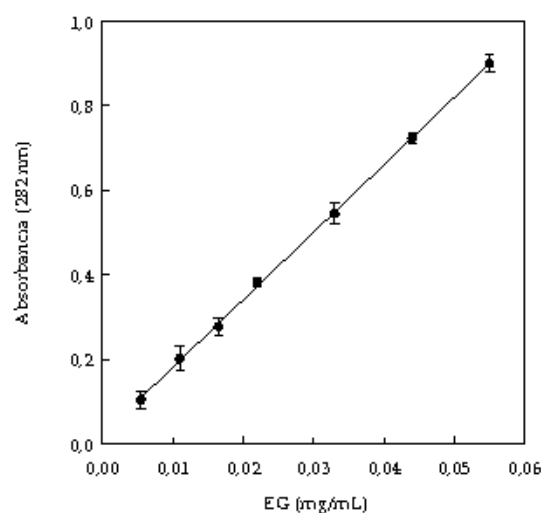


Figura IV.1.4. Recta de calibrado de EG determinada por espectrofotometría UV-vis a 282 nm. Soluciones etanólicas de concentraciones crecientes de EG ($5 \cdot 10^{-3}$ -0,06 mg/mL).

La regresión lineal de los datos experimentales de las **Figuras IV.1.3** y **IV.1.4**, que relacionan la concentración de EG con el área de pico y la absorbancia a 282 nm respectivamente, dieron como resultado las siguientes ecuaciones:

$$y = 1,7 \cdot 10^3 + 1,51 \cdot 10^6 x \quad \text{GC-MS [IV.1.1]}$$

$$y = 0,025 + 15,91x \quad \text{Espectrofotometría UV-vis [IV.1.2]}$$

con un coeficiente de correlación r^2 de 0,999 para ambos métodos.

1.1.2. Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

El límite de detección, o la menor dosis detectable (LOD), es la menor concentración de analito que produce una señal significativamente distinta de cero con un grado de confianza establecido. Existe un consenso general para fijar este límite como el resultado de la señal del blanco multiplicado por 3 veces la desviación estándar (DE) de la media de las medidas de la señal del blanco. El LOD para los análisis de GC-MS y de los ensayos de espectrofotometría UV-vis se obtuvo mediante el análisis de 5 grupos de 12 muestras estándar cero. El área de pico y los valores de absorbancia a 282 nm multiplicado por tres veces la DE correspondió al límite de detección estimado: $3,2 \cdot 10^{-4}$ y $2,2 \cdot 10^{-3}$ mg/mL de EG para GC-MS y espectrofotometría UV-vis, respectivamente (**Tabla IV.1.1**).

Tabla IV.1.1. Resultados de la validez del método de cuantificación de EG.

Método	Linealidad (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	Precisión (%)		
				Interdía	Intradía	Robustez
GC-MS	0,5-30	$3,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,004$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,003$	4,6	1,5	6,3
Spectrof UV-Vis	$5,5 \cdot 10^{-3}$ -0,05	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,005$	$7,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,007$	4,1	1,1	6,6

En los datos presentados en la **Tabla IV.1.1** se observa que el LOD de EG para GC-MS es menor que el LOD de EG para espectrofotometría UV-Vis.

El límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración de analito que puede ser medida en las muestras para predecir una concentración con cierto nivel de precisión y exactitud. Comúnmente, el límite de cuantificación se define como la media del área de pico o el valor de absorbancia a 282 nm multiplicado por 10 veces la desviación estándar (DE). El LOQ de ambos métodos fue calculado mediante el

análisis de 20 muestras y dió un valor de $1,1 \cdot 10^3$ mg/mL para los análisis por GC-MS y $7,2 \cdot 10^3$ mg/mL para los análisis por espectrofotometría UV-vis (**Tabla IV.1.1**). Nuevamente, el valor obtenido de LOQ de EG fue menor para el método de GC-MS que para el método espectrofotométrico.

1.1.3. Precisión

La precisión es la expresión del grado de comparabilidad entre resultados individuales cuando el método se lleva a cabo en las mismas condiciones experimentales. El ensayo para corroborar la precisión del método se probó mediante estudios de repetibilidad (variación intradía) y la reproducibilidad (variación interdía). Para ello, se fortificaron 6 muestras a una concentración de 5 mg/mL para los análisis por GC-MS y 25 µg/mL para los análisis por espectrofotometría UV-vis. La concentración de EG se midió 6 veces (por triplicado) en el mismo día (repetibilidad) y en cinco días diferentes (reproducibilidad). El cálculo de la DE y el coeficiente de variación (% CV) interdía e intradía de las áreas de pico y de la absorbancia a 282 nm se calcularon dando como resultados valores de 4,6% y 1,5% para los análisis por GC-MS, y 4,1% y 1,1% para los estudios espectrofotométricos (**Tabla IV.1.1**).

1.1.4. Robustez

La robustez mide la capacidad del método de permanecer invariable después de pequeñas variaciones deliberadas aplicadas al método. Para determinar la robustez de ambos métodos, GC-MS y espectrofotometría UV-vis, se prepararon muestras fortificadas a concentraciones de 5 mg/mL para los análisis por GC-MS y 25 µL/mL para los análisis espectrofotométricos. Las muestras fueron analizadas durante un período de 30 días, tiempo durante el cual las muestras presentaron un CV de 6,3% para las muestras de GC-MS y de 6,6% para los análisis espectrofotométricos, confirmando la fiabilidad de ambos ensayos (**Tabla IV.1.1**).

Como se observa en la **Tabla IV.1.1**, la utilización de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS) resultó más sensible tanto a la hora de identificar como de cuantificar EG dando un valor de LOD de $3,2 \cdot 10^4 \pm 0,004$ (mg/mL) frente a $2,2 \cdot 10^3 \pm 0,005$ (mg/mL) obtenido con espectrofotometría UV-vis. Los resultados del LOQ también demostraron la mayor sensibilidad de GC-

MS a la hora de cuantificar concentraciones más bajas de EG, mostrando un valor de $1,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,003$ para GC-MS y $7,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,007$ para espectrofotometría UV-vis. Por ello, los análisis de cuantificación de EG en los estudios de complejación fueron llevados a cabo por GC-MS.

1.2. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE EG EN β -CDs (INCLUSIÓN MOLECULAR)

Los estudios de solubilidad de EG en presencia de β -CDs fueron llevados a cabo utilizando el método descrito por Higuchi y Connors en 1965 con algunas modificaciones.

Para ello, se realizaron diagramas de fases de EG en presencia de concentraciones crecientes de β -CDs hasta 13 mM que fueron saturadas con EG. Estas disoluciones se mantuvieron en un baño de ultrasonidos, a 25 °C durante 1 h hasta que se alcanzó el equilibrio. La concentración de EG se cuantificó por GC-MS tal y como se detalla en el capítulo de materiales y métodos.

El perfil obtenido para el diagrama de fases de EG con β -CDs fue de tipo B, más concretamente de tipo Bs (**Figura IV.15**), si bien, el límite de solubilidad acuosa de las β -CDs no permitió ver la fase final del diagrama en la que, habitualmente, hay una disminución de la solubilidad de los complejos de inclusión.

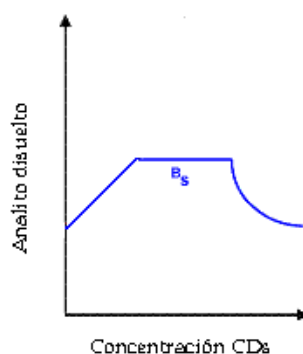


Figura IV.15. *Diagrama de Fases tipo Bs.*

La **Figura IV.16** muestra un incremento de la solubilidad acuosa de EG conforme aumenta la concentración de β -CDs en el medio hasta 2 mM, para a partir de ahí permanecer constante. Estos datos muestran que el nivel de saturación de EG

que puede alcanzar en una disolución de β -CDs es de 13 mM, y se consigue con una concentración de β -CDs de 2 mM.

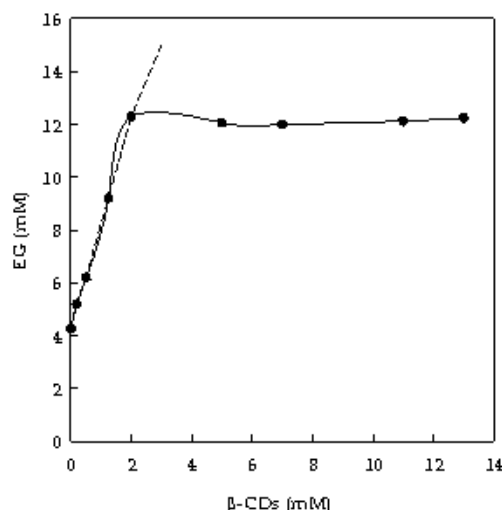


Figura IV.16. Diagrama de fases EG- β -CDs. La línea discontinua representa el ajuste lineal de los datos experimentales de la porción lineal creciente.

El cálculo de la pendiente de la porción lineal creciente (0-2 mM β -CDs) del diagrama de fases (**Figura IV.16, línea discontinua**) dio como resultado un valor de aproximadamente 5. Este valor, por encima de la unidad, indicó la formación de complejos de inclusión con una estequiometría mayor de 1:1 para EG: β -CDs con respecto a eugenol. Este comportamiento no había sido descrito hasta ahora para EG en la literatura. Sin embargo, sí hay estudios que describen la formación de complejos de inclusión 1:1, pero usando concentraciones de EG por debajo de su límite de solubilidad acuosa y no a saturación (Yang y Son, 2005).

Con el fin de analizar cuál es el proceso de formación de complejos a concentraciones de EG por debajo de su solubilidad acuosa (S_0) y poder calcular la K_c de los complejos 1:1 se realizaron estudios de espectrofotometría UV-Vis en los que se estudió el efecto de la complejación en CDs sobre el espectro UV-vis del EG.

El estudio del efecto de la adición de concentraciones crecientes de β -CDs sobre el espectro de absorción de EG a concentraciones por debajo de su límite de solubilidad acuosa (S_0) (4,26 mM), se llevó a cabo utilizando concentraciones

crecientes de β -CDs de 0 a 3 mM, mientras que las concentración de EG se mantuvieron constantes.

La **Figura IV.1.7** muestra la evolución del espectro de absorción de EG con el aumento de la concentración de β -CDs en el medio. Los resultados mostraron una evidente caída de la absorbancia a 282 nm (máximo de absorbancia del EG) a medida que se incrementaba la concentración de CDs en el medio.

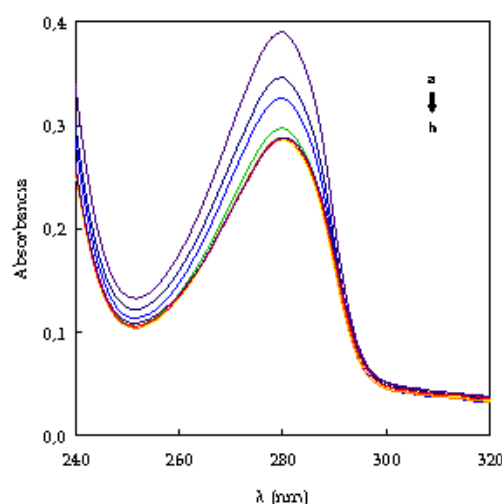


Figura IV.1.7. Evolución del espectro de absorción de EG con concentraciones crecientes de β -CDs: (a) 0, (b) 0,075, (c) 0,1 (d) 0,5, (e) 0,75, (f) 1, (g) 2 y (h) 3 mM.

Cuando se representó la absorbancia a 282 nm *vs* la concentración de β -CDs (**Figura IV.1.8**), se observó una caída exponencial de la misma en el rango de 0-1 mM de β -CDs para todas las concentraciones de EG utilizadas. Tal y como muestra la **Figura IV.1.8**, la disminución en la absorbancia a 282 nm es muy brusca al principio de la curva mientras que a concentraciones mayores de 0,5 mM de β -CDs, el descenso es mucho menor, para permanecer constante a partir de 1 mM de β -CDs. Este comportamiento sugiere que a concentraciones por encima de 1 mM de β -CDs, la mayor parte del EG ya había sido incluido en la cavidad interna de las CDs formando complejos de inclusión y por tanto no se observaron cambios en el espectro de absorción a concentraciones superiores de CDs. Este comportamiento es

similar al descrito para el espectro de fluorescencia del kaempferol (Mercader-Ros et al., 2010).

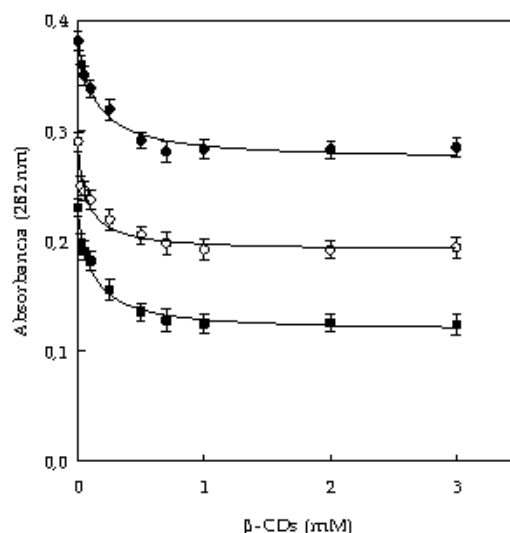


Figura IV.1.8. Absorbancia de EG a 282 nm en presencia de concentraciones crecientes de β -CDs (0-3 mM). (■) EG 0,04 mM, (○) EG 0,05 mM y (▲) EG 0,07 mM.

Tanto la estequiometría de los complejos de inclusión formados entre EG y β -CDs, como la magnitud de la constante de complejación (K_c), se puede obtener del análisis de los datos experimentales de la **Figura IV.1.8**. El cálculo del valor de (K_c) se llevó a cabo mediante la aplicación de distintos tratamientos a los resultados: **Connors** (Ecuación IV.1.3), **Benesi- Hildebrand** (Ecuación IV.1.4) y **Scatchard** (Ecuación IV.1.5).

Tal y como describió **Connors** en 1987, la absorbancia de un compuesto a cualquier longitud de onda (λ) se puede relacionar con la concentración de CDs presente en el medio mediante la siguiente ecuación:

$$A = A_0 + \frac{(A_{\infty} - A_0)K_c[CDs]}{1 + K_c[CDs]} \quad [IV.1.3]$$

donde A_{∞} es la absorbancia cuando todo el EG ha sido completamente complejoado por las CDs y A_0 es la absorbancia del EG en ausencia de dichos azúcares cíclicos.

El tratamiento de la ecuación de **Benesi-Hildebrand**, o doble recíproca, permite linealizar la **Ecuación IV.1.3**, pudiendo obtener el valor de K_c entre EG y β -CDs dividiendo el punto de corte con el eje de ordenadas entre la pendiente de la recta (**Ecuación IV.1.4**) (Benesi-Hildebrand, 1949).

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{(A_\infty - A_0)K_c[CDs]} \quad [\text{IV.1.4}]$$

El valor de K_c también se puede calcular utilizando la ecuación de **Scatchard** (**Ecuación IV.1.5**), que relaciona la absorbancia con la concentración total de CDs (Scatchard, 1949). El valor de K_c se obtiene de la pendiente de la recta.

$$\frac{A - A_0}{[CDs]} = (A_\infty - A_0)K_c - (A - A_0)K_c \quad [\text{IV.1.5}]$$

El valor de K_c entre EG y β -CDs fue calculado en primer lugar ajustando los datos experimentales obtenidos en la **Figura IV.1.8** a la ecuación de Connors (**Ecuación IV.1.3**). Los resultados de K_c fueron muy similares para las tres concentraciones de EG utilizadas (0,04, 0,05 y 0,07mM) dando unos valores de 9841 ± 220 , 9942 ± 278 y $10045 \pm 225 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (**Tabla IV.1.1**). El valor medio de K_c fue de $9942 \pm 221 \text{ M}^{-1}$.

Tabla IV.1.2. Constantes de complejación (K_c) entre EG y β -CDs calculadas por distintos tratamientos de los datos obtenidos por espectrofotometría UV-Vis (282 nm).

Método: UV-Vis (282 nm)			
[EG] (mM)	Connors K_c (M^{-1})	Benesi-Hildebrand K_c (M^{-1})	Scatchard K_c (M^{-1})
0,04	9841 ± 220	10663 ± 214	8754 ± 156
0,05	9942 ± 278	10879 ± 190	8971 ± 225
0,07	10045 ± 225	10578 ± 250	8567 ± 210
K_c (M^{-1})	9942 ± 241	10706 ± 218	8764 ± 197

El cálculo de K_c por medio de la ecuación de Benesi-Hildebrand se llevó a cabo mediante la nueva representación de los resultados de la **Figura IV.1.8** como

$1/[\text{CDs}]$ vs $1/A-A_0$ en la **Figura IV.1.9**. La representación de cada una de las concentraciones de EG sometidas a estudio mostró valores negativos en la pendiente de las rectas obtenidas debido a la disminución de la absorbancia con un aumento de la concentración de CDs en el medio de reacción (**Figura IV.1.9**).

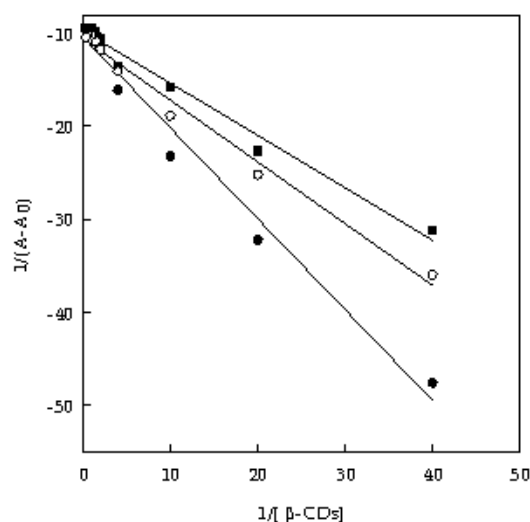


Figura IV.1.9. Representación de Benesi-Hildebrand para EG con β -CDs (0-3 mM). (■) EG 0,04 mM, (○) EG 0,05 mM y (●) EG 0,07 mM.

Ajustando los datos de la **Figura IV.1.9** a la **Ecuación IV.1.4** se obtuvieron unos valores de K_c de 10663 ± 214 , 10879 ± 190 y $10578 \pm 250 \text{ M}^{-1}$, para cada una de las concentraciones de EG utilizadas. El valor medio de K_c fue de $10706 \pm 218 \text{ M}^{-1}$. Zhan y colaboradores, en 2008, llevaron a cabo estudios muy similares con EG y β -CDs utilizando como método de cuantificación la espectroscopía de fluorescencia. Sin embargo, el valor de la constante obtenido fue de $357,46 \text{ M}^{-1}$, inferior al obtenido en este estudio. Estos resultados concuerdan con los expuestos por otros autores, que aunque se tratara de otros compuestos, se confirmó que el método de fluorescencia subestimaba el valor de las constantes de complejación (Lucas-Abellán et al., 2008a; Mercader-Ros et al., 2010).

Los datos experimentales de absorbancia (**Figura IV.1.8**) también se utilizaron para determinar los valores de K_c entre EG y β -CDs utilizando la ecuación de Scatchard (Scatchard, 1949). En este caso, la relación entre el aumento

de la absorbancia ($A-A_0$) y la concentración de CDs viene dada por la **Ecuación IV.1.5**. La representación de los datos de la **Figura IV.1.8** como $(A-A_0)/[\beta\text{-CDs}]$ frente a $(A-A_0)$ (**Figura IV.1.10**), dio lugar a tres líneas rectas, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de K_c . En este caso, los valores de K_c fueron de 8754 ± 156 , 8971 ± 225 y $8567 \pm 210 \text{ M}^{-1}$ para las concentraciones de EG utilizadas de (0,04, 0,05 y 0,07 mM). El valor medio de K_c fue de 8764 ± 197 (**Tabla IV.1.2**)

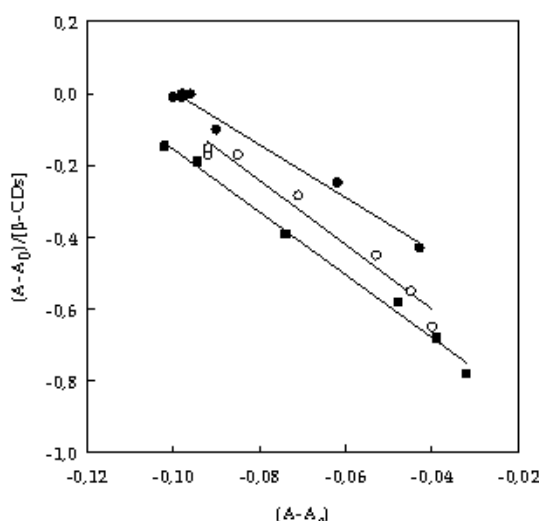


Figura IV.1.10. Representación de Scatchard para EG con $\beta\text{-CDs}$ (0-3 mM). (■) EG 0,04 mM, (○) EG 0,05 mM y (●) EG 0,07 mM.

Estos valores de K_c fueron similares a los obtenidos usando las ecuaciones de Connors y Benesi-Hildebrand (**Tabla IV.1.2**). El valor medio de K_c para EG y $\beta\text{-CDs}$ obtenido teniendo en cuenta los tres métodos de cálculo utilizados es: $9804 \pm 218 \text{ M}^{-1}$.

Es importante remarcar que la complejación de EG con $\beta\text{-CDs}$ a concentraciones por debajo de su límite de solubilidad acuosa (S_0) refleja claramente una estequiometría de formación de complejos 1:1, tal y como fue descrita en la literatura por Yang y Song en 2005. Sin embargo, los estudios de complejación entre EG y $\beta\text{-CDs}$ llevados a cabo a concentraciones por encima del límite de solubilidad de EG y a altas concentraciones de $\beta\text{-CDs}$ (hasta 13 mM), mostraron la formación de complejos de inclusión EG- $\beta\text{-CDs}$ con una

estequiometría mayor de 1 para EG (reflejado por una pendiente > 1 en los diagramas de fases).

1.3. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE EG EN HP- β -CDs (INCLUSIÓN MOLECULAR)

Una vez estudiada la complejación de EG con β -CDs nativas se pasó a estudiar dicha complejación con β -CDs modificadas, concretamente HP- β -CDs.

El estudio de solubilidad acuosa de EG en presencia de HP- β -CDs se llevó a cabo utilizando concentraciones crecientes de HP- β -CDs hasta 75 mM que fueron saturadas con EG. Estas disoluciones se mantuvieron en un baño de ultrasonidos, a 25 °C durante 1 h hasta que se alcanzó el equilibrio. La concentración de EG se cuantificó por GC-MS tal y como se detalla en el capítulo de materiales y métodos.

El estudio de complejación de EG derivó en una respuesta lineal al tiempo que se incrementó la concentración de HP- β -CDs (**Figura IV.1.11**). Esta respuesta lineal corresponde con un perfil tipo A_L. El valor de K_c para la formación de complejos de inclusión entre EG con HP- β -CDs se calculó usando la **Ecuación III.1.1** obteniendo un valor de $455,5 \pm 199 \text{ M}^{-1}$.

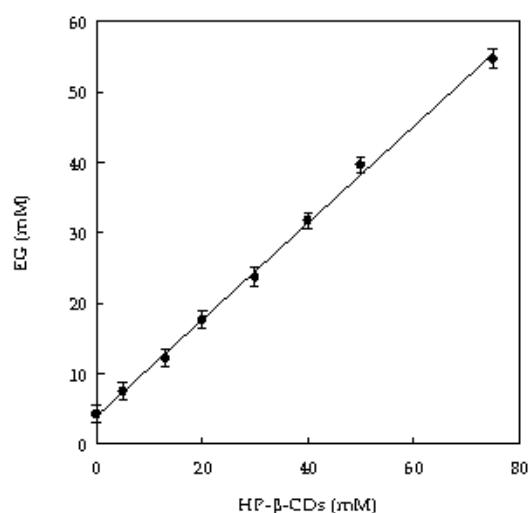


Figura IV.1.11. Estudio de solubilidad acuosa de EG con HP- β -CDs.

Esta relación lineal con un valor de pendiente menor a la unidad (0,685) sugiere la formación de complejos de inclusión con una estequiometría de formación 1:1. El perfil tipo A₁ es propio de las β -CDs modificadas y es indicativo del alto límite de solubilidad acuosa de los complejos formados. Estudios similares llevados a cabo por Garg y colaboradores en 2010 describieron la complejación de EG con HP- β -CDs mediante el análisis por espectrofotometría UV-Vis, dando como resultado una constante de complejación del mismo orden de magnitud ($1206,4 \text{ M}^{-1}$) que la obtenida en este estudio.

El valor de K_c obtenido para EG y β -CDs ($9804 \pm 218 \text{ M}^{-1}$) fue mayor que el obtenido para sus modificadas HP- β -CDs ($455,5 \pm 199 \text{ M}^{-1}$). Parece ser que la cadena lateral que las HP- β -CDs tienen en la cabeza del cono puede interrumpir la inclusión molecular de EG en el interior de la cavidad de HP- β -CDs. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Choi y colaboradores en 2009 en estudios de inclusión molecular de EG con CDs nativas y modificadas basados en la eficiencia de encapsulación. Estos autores obtuvieron unos resultados en los que se definieron β -CDs como más efectivas que sus modificadas HP- β -CDs para la complejación de EG.

En conclusión, este estudio demostró claramente que EG puede ser encapsulado con β y HP- β -CDs. En base a los valores de K_c obtenidos se puede decir que EG es más susceptible a la encapsulación por β -CDs que por sus modificadas HP- β -CDs. El trabajo demostró que en el caso de β -CDs, la estequiometría de los complejos formados con EG fue 1:1 a bajas concentraciones de EG y β -CDs. Sin embargo, el uso de altas concentraciones de ambos compuestos dio lugar a la formación de complejos de inclusión con una estequiometría de mayor orden para EG.

En el caso de EG con HP- β -CDs se formaron complejos de inclusión con estequiometría 1:1 independientemente de la concentración de EG y HP- β -CDs presentes en el medio.

Basándose en los valores de K_c , este estudio muestra claramente que EG puede ser complejoado tanto por β -CDs como por sus modificadas HP- β -CDs, otorgando protección al compuesto y aumentando la solubilidad al mismo.

2. COMPLEJACIÓN DE AEC EN CDs

Tal y como ha sido descrito en capítulos anteriores, EG es el componente principal del AEC (90-95%) y su inclusión molecular en CDs ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han focalizado en la complejación de EG como compuesto puro, pero no en la complejación del mismo cuando forma parte de una estructura más compleja como es el AEC.

Antes de llevar a cabo los estudios de complejación de AEC en presencia de CDs, se realizó una caracterización por espectrometría de masas del AEC suministrado. El pico mayoritario presente en una solución etanólica de AEC correspondió a EG coincidiendo con lo descrito en la bibliografía por Briozzo y colaboradores en 1989, con un tiempo de retención de 29 min. También se detectó otro segundo pico de importancia correspondiente a β -cariofileno, con un tiempo de retención de 24 min (**Figura IV.2.1**).

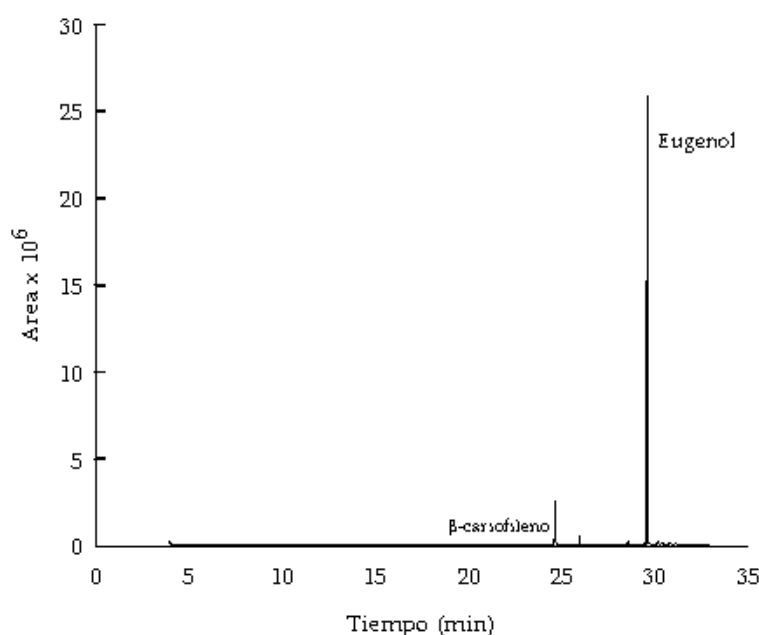


Figura IV.2.1. Cromatograma de AEC analizada por GC-MS.

El análisis de masas del pico mayoritario (**Figura IV.2.2**) definió a este compuesto como eugenol.

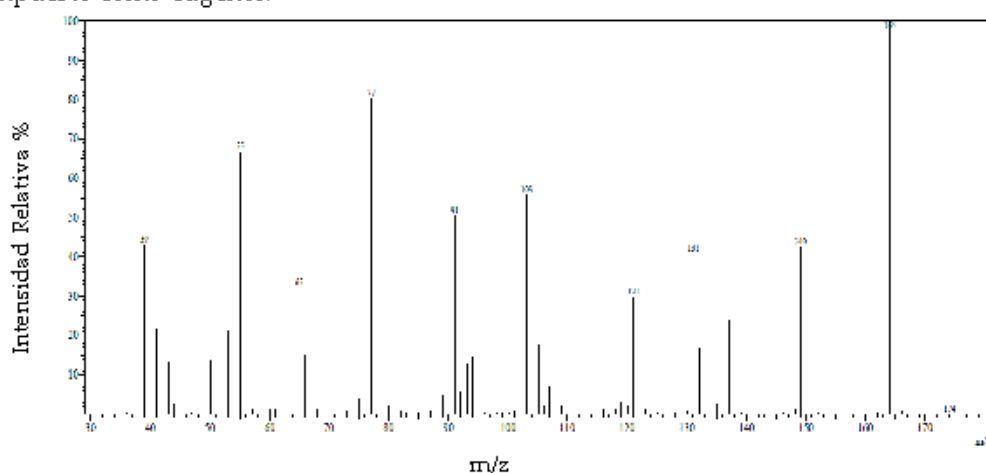


Figura IV.2.2. Espectro de masas del componente mayoritario del AEC (EG).

Una vez conocido su componente mayoritario se realizó una curva de calibrado por GC-MS (**Figura IV.2.3**), cuya ecuación es $3,52 \cdot 10^5 + 1,93 \cdot 10^6 x$ con un coeficiente de regresión lineal r^2 de 0,999. Se utiliza como referencia el área del pico correspondiente a EG, su componente mayoritario.

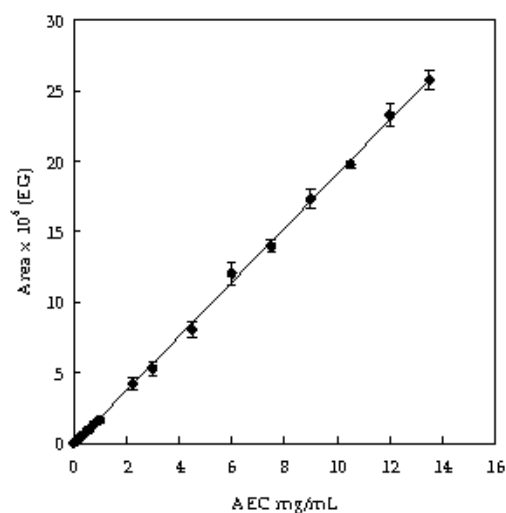


Figura IV.2.3. Recta de calibrado de AEC determinada por GC-MS (en base a su componente mayoritario EG). Soluciones etanólicas de AEC (0-14 mg/mL).

Posteriormente, se estudió el espectro de absorción UV-vis de una solución etanólica de AEC, mostrando un máximo de absorción a 282 nm (**Figura IV.2.4**). Este máximo de absorbancia coincidió con el obtenido para EG en el capítulo anterior.

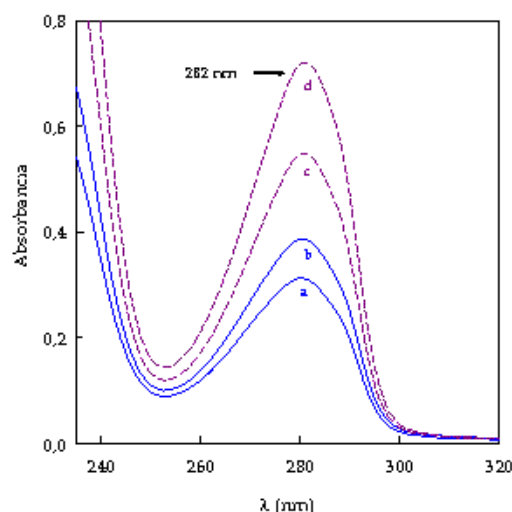


Figura IV.2.4. Comparación de los espectros de máxima absorción de EG y AEC. (a, b) espectro de absorción de EG (0,035-0,045 mg/mL) (c, d) espectro de AEC (0,04-0,05 mg/mL).

Con el fin de comparar los resultados de la cuantificación por GC-MS con los obtenidos por espectrofotometría UV-vis, se realizó una recta de calibrado de AEC a 282 nm (**Figura IV.2.5**). La ecuación que define la recta es $y = 0,014 + 13,8x$ y el coeficiente de regresión lineal r^2 fue de 0,99.

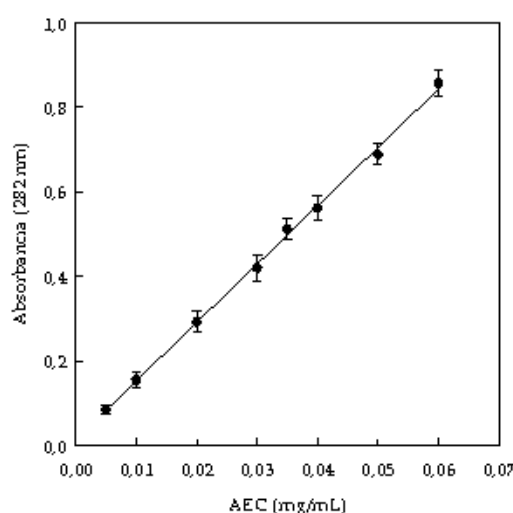


Figura IV.25. Recta de calibrado del AEC determinada por espectrofotometría UV-vis a 282 nm. Soluciones estándares de concentraciones crecientes de AEC ($5 \cdot 10^{-3}$ –0,06 mg/mL).

2.1. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE AEC EN β -CDs (INCLUSIÓN MOLECULAR)

Los estudios de solubilidad del AEC con CDs nativas (β -CDs) se realizaron de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors, en 1965, con algunas modificaciones.

Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de β -CDs (hasta 13 mM). A cada una de las disoluciones se le añadió una cantidad saturante de AEC, tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos, y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos a 25 °C hasta que se alcanzó el equilibrio.

La cantidad de AEC disuelto, siempre utilizando como referencia la concentración de su componente mayoritario EG, aumentó con la concentración de β -CDs hasta 2 mM (**Figura IV.2.6**). En este punto, se alcanzó el máximo nivel de AEC en la disolución (13 mM). Por encima de 2 mM de β -CDs, la cantidad de AEC disuelto decreció hasta alcanzar un nivel constante de 6 mM, creando un perfil de solubilidad tipo-B. Estos resultados apuntaron a la formación de complejos AEC- β -CDs con solubilidad acuosa limitada, comportamiento típico de las β -CDs nativas.

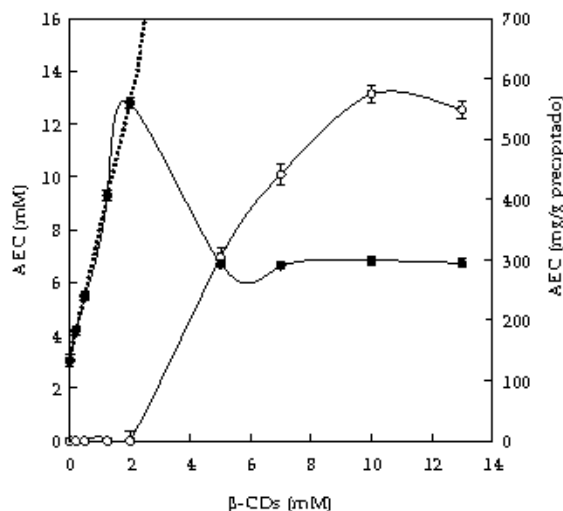


Figura IV.2.6. Diagrama de fases AEC-β-CDs: (●) AEC soluble (○) AEC en complejos de inclusión insolubles (en base a su componente mayoritario EG). La línea discontinua representa el ajuste lineal de los datos experimentales de la porción lineal creciente.

Más específicamente, el diagrama de fases obtenido fue de tipo-Bs. Como se muestra en la **Figura IV.2.6** (●), el aumento de la concentración de β-CDs por encima de 2 mM no mejoró la solubilidad del AEC. Así, el límite de solubilidad de los complejos AEC-β-CDs se alcanzó a una concentración de 2 mM de β-CDs y 13 mM de AEC. La adición de β-CDs al medio de reacción dio como resultado la formación de complejos de inclusión menos solubles, tal y como ha sido previamente descrito por Grant e Higuchi (1990).

Concentraciones de β-CDs por encima de 2 mM dio lugar a un incremento gradual de la formación de complejos insolubles de AEC en β-CDs, hasta alcanzar un máximo correspondiente a 550 mg de AEC por g de precipitado (**Figura IV.2.6**, (○)). Otros autores también han mostrado perfiles tipo B para la complejación de otros AE con β-CDs, como por ejemplo para el AE de camomila (Waleczek et al. 2002).

El cálculo del valor de la pendiente de la porción lineal creciente del diagrama de fases (0-2 mM de β-CDs) dio un valor de 5 (**Figura IV.2.6**, línea discontinua), lo que indicó la formación de complejos de inclusión con una

estequiometría mayor de 1:1 (AEC:CDs), con respecto al AEC. Este comportamiento fue similar al descrito para EG en el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral.

Tal y como se llevó a cabo con EG en el capítulo anterior, y para profundizar en el estudio de la asociación entre AEC y β -CDs, se estudió el comportamiento del AEC por debajo de su límite de solubilidad acuosa (S_0). En estos experimentos, la concentración de AEC se mantuvo constante a diferentes niveles (0,04, 0,05 y 0,07 mg/mL) y se varió la concentración de β -CDs de 0 a 3 mM.

La **Figura IV.2.7** muestra la caída en el espectro de absorción del AEC cuando aumentó la concentración de β -CDs en el medio.

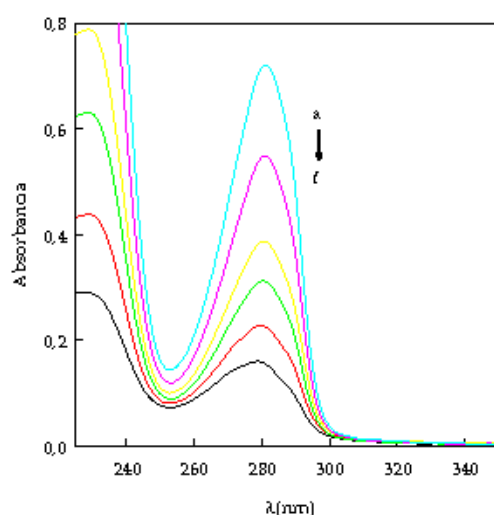


Figura IV.2.7. Evolución del espectro de absorción de AEC con concentraciones crecientes de β -CDs: (a) 0,025 (b) 0,05, (c) 0,1, (d) 0,2, (e) 0,5 y (f) 1 mM.

Cuando se representó la absorbancia a 282 nm vs la concentración de β -CDs (**Figura IV.2.8**) el incremento de la concentración de β -CDs en el medio de reacción condujo a una caída exponencial de la absorbancia en el rango de concentraciones de 0-1 mM de β -CDs.

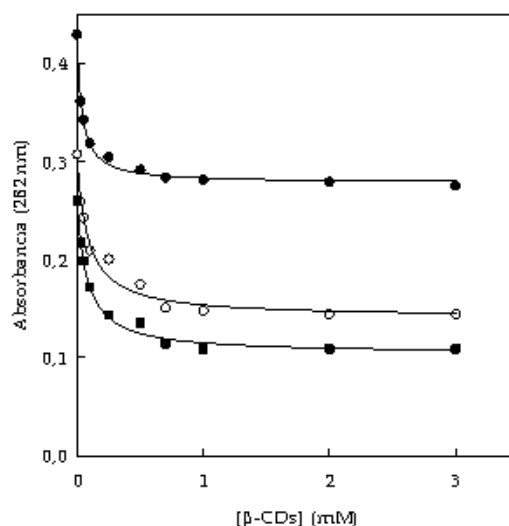


Figura IV.2.8. Absorbancia de AEC a 282 nm en presencia de concentraciones crecientes de β -CDs (0-3 mM). (■) AEC 0,04 mg/mL (○) AEC 0,05 mg/mL y (●) AEC 0,07 mg/mL.

La estequiometría de los complejos de inclusión formados entre AEC y β -CDs, y la magnitud de la correspondiente constante de complejación (K_c), se puede obtener del análisis de los datos experimentales de la **Figura IV.2.8**. La absorbancia decreció bruscamente al principio de la curva y después se mantuvo constante para concentraciones de β -CDs por encima de 0,5 mM. Este comportamiento indicó que cuando la absorbancia permanecía constante, la mayor parte del AEC había sido inducido en la cavidad de las CDs y por ello no se observaban cambios en la absorbancia aún cuando se aumentaba la concentración de CDs por encima de 0,5 mM.

El cálculo del valor de K_c se llevó a cabo mediante la aplicación de distintos métodos de cálculo propuestos por: **Connors** (Ecuación IV.1.3), **Benesi-Hildebrand** (Ecuación IV.1.4) y **Scatchard** (Ecuación IV.1.5).

En primer lugar, el valor de K_c entre β -CDs y AEC fue calculado ajustando los datos experimentales obtenidos en la **Figura IV.2.8** a la ecuación de Connors (Ecuación IV.1.3). Los valores de K_c obtenidos fueron muy similares para las tres

concentraciones de AEC utilizadas (0,04, 0,05 y 0,07 mg/mL): 17515 ± 220 , 17262 ± 257 y $17245 \pm 199 \text{ M}^{-1}$ (**Tabla IV.2.1**). El valor medio de K_c fue de: 17340 ± 225 .

Tabla IV.2.1. Constantes de complejación (K_c) entre AEC y β -CDs calculadas por distintos tratamientos mediante estudios espectrofotométricos UV-Vis (282 nm).

<i>Método: UV-Vis (282 nm)</i>			
<i>[AEC]</i> (mg/mL)	Connors K_c (M^{-1})	Benesi-Hildebrand K_c (M^{-1})	Scatchard K_c (M^{-1})
0,04	17515 ± 220	17391 ± 378	23150 ± 275
0,05	17262 ± 257	17716 ± 314	14202 ± 198
0,07	17245 ± 199	17121 ± 241	16665 ± 230
K_c (M^{-1})	17340 ± 225	17409 ± 311	18005 ± 234

El cálculo de K_c por medio de la ecuación de Benesi-Hildebrand se llevó a cabo mediante la nueva representación de los resultados de la **Figura IV.2.8** en función de $1/[\text{CDs}]$ vs $1/A - A_0$ (**Figura IV.2.9**). La representación de cada una de las concentraciones de AEC sometidas a estudio, mostró valores negativos en la pendiente de las rectas obtenidas, debido a la disminución de la absorbancia con un aumento de la concentración de CDs en el medio de reacción (**Figura IV.2.9**).

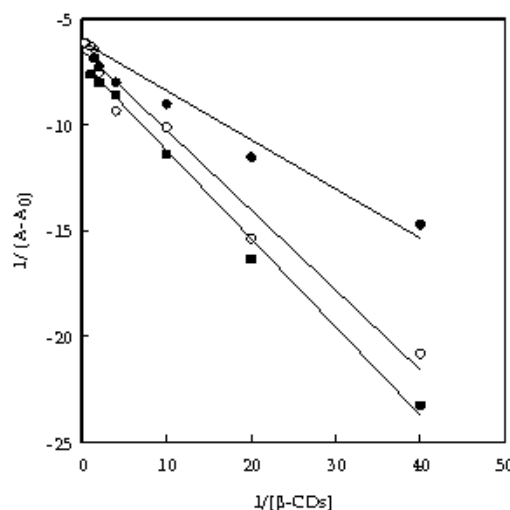


Figura IV.2.9. Representación de Benesi-Hildebrand para AEC con β -CDs (0-3mM).

(■) AEC 0,04 mg/mL, (○) AEC 0,05 mg/mL y (●) AEC 0,07 mg/mL.

Los resultados de los valores de K_c obtenidos fueron similares a los calculados por Connors, dando valores de 17391 ± 378 , 17716 ± 314 y $17121 \pm 241 \text{ M}^{-1}$. El valor medio de K_c fue $17409 \pm 344 \text{ M}^{-1}$.

El cálculo del valor de K_c entre AEC y β -CDs utilizando la ecuación de Scatchard (Scatchard, 1949) se llevó a cabo utilizando los resultados de absorbancia representados en la **Figura IV.2.8**. Para su cálculo se tuvo en cuenta la relación entre el aumento de absorbancia ($A-A_0$) y la concentración de CDs (**Ecuación IV.1.5**). La representación gráfica de los datos de la **Figura IV.2.10** mostrados como $(A-A_0)/[\text{CDs}]$ frente a $(A-A_0)$ dio lugar a tres líneas rectas, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de K_c . El tratamiento de esta ecuación a los datos dio como resultado valores de K_c de 23150 ± 275 , 14202 ± 198 y $16665 \pm 230 \text{ M}^{-1}$ para las concentraciones de AEC utilizadas (0,04, 0,05 y 0,07 mg/mL), obteniendo un valor medio de 18005 ± 234 . La variabilidad de los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de AEC puede deberse a la alta sensibilidad del método cuando se trabaja a bajas concentraciones de CDs, pudiendo variar el valor de K_c obtenido.

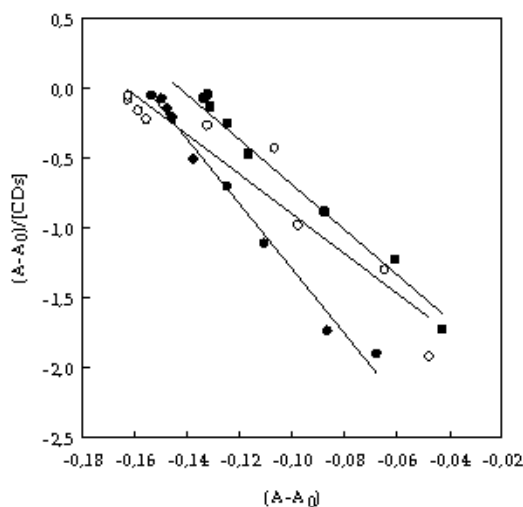


Figura IV.2.10. Representación de Scatchard para AEC con β -CDs (0-3mM). (■) AEC 0,04 mg/mL, (○) AEC 0,05 mg/mL y (●) AEC 0,07 mg/mL

El valor medio de K_c para los complejos AEC- β -CDs obtenido a partir de los tres métodos de cálculo fue $17584 \pm 256 \text{ M}^{-1}$

El estudio de las constantes de complejación a baja concentración de EG como compuesto puro y β -CDs descrito en el **Capítulo IV.1** dio como resultado un valor medio de K_c de $9804 \pm 218 \text{ M}^{-1}$, mientras que para el AEC el valor medio de K_c ha sido $17584 \pm 256 \text{ M}^{-1}$. La diferencia entre las constantes puede ser debida a la presencia de componentes presentes en el AEC que favorecen la complejación.

La bibliografía no recoge ningún estudio de la complejación del AEC como tal, sino que la mayoría de los estudios se centran en la encapsulación de su componente mayoritario EG. Sin embargo, sí existen otros trabajos en los que se estudia y compara la encapsulación de otros AE y de su componente mayoritario como compuesto puro.

En 2002, Waleczek y colaboradores describieron un estudio de solubilidad acuosa del AE de camomila y de su componente mayoritario α -bisabolol. Los resultados mostraron un valor ligeramente mayor de constante de complejación del AE de camomila con β -CDs que en el caso del compuesto puro dando valores de 273 M^{-1} para el compuesto puro y 304 M^{-1} para el AE de camomila.

Es importante remarcar la importancia que tuvo en el estudio el hecho de trabajar a concentraciones de AEC por debajo de su límite de solubilidad acuosa (S_0). El estudio a bajas concentraciones de AEC y β -CDs claramente reflejó una estequiometría de formación de los complejos AEC- β -CDs 1:1. Estos resultados coinciden con los descritos en la complejación de EG y β -CDs por Yang y Son en 2005. Sin embargo, el estudio de la complejación de AEC a concentraciones por encima de su límite de solubilidad (S_0) y a alta concentración de β -CDs (hasta 13 mM), dio lugar a la formación de complejos de inclusión con una estequiometría de orden mayor a la unidad para el AEC, quedando reflejado por una pendiente mayor de uno en el diagrama de fases.

Si se compara el perfil de solubilidad acuosa de AEC y EG en presencia de β -CDs, se observa que no fue el mismo (**Figura IV.2.11**). Mientras que en el caso del AEC, un aumento de la concentración de β -CDs por encima de 2 mM provoca un descenso en la solubilidad de los complejos de inclusión AEC- β -CDs formados, en el caso del EG, dicho aumento no provoca la precipitación de los complejos. En esta ocasión, por encima de 2 mM de β -CDs la solubilidad de los complejos EG- β -CDs no varía.

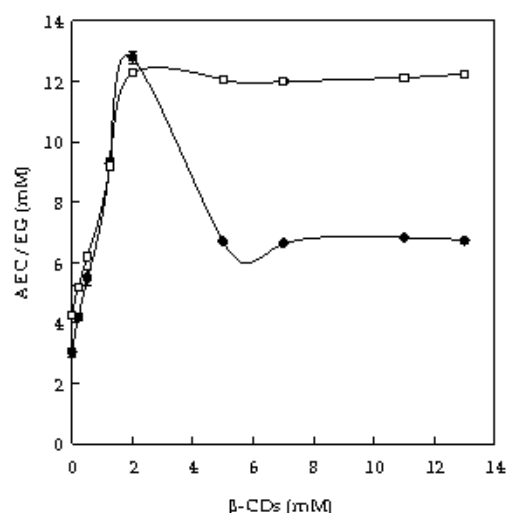


Figura IV.2.11. Comparación de los diagrama de fases de (□) EG con β -CDs (●) y AEC con β -CDs (en base a su componente mayoritario EG).

2.3. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN DE AEC EN HP- β -CDs (INCLUSIÓN MOLECULAR)

Para llevar a cabo el estudio de inclusión molecular de AEC con β -CDs modificadas se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de HP- β -CDs (hasta 75 mM). A cada una de las disoluciones se le añadió una cantidad saturante de AEC, tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos, y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos a 25 °C hasta que se alcanzó el equilibrio.

El estudio de solubilidad de AEC en presencia de HP- β -CDs mostró un diagrama de fases de tipo A₁ (**Figura IV.2.12**). Esto implica un aumento lineal de la concentración de AEC al mismo tiempo que lo hace la concentración de HP- β -CDs.

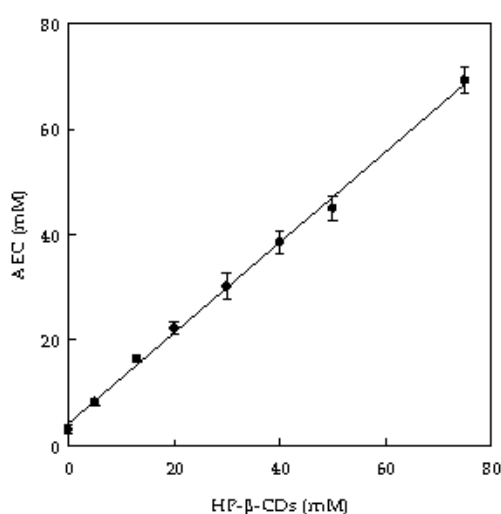


Figura IV.2.12. Estudio de solubilidad acuosa de AEC con HP- β -CDs (en base a su componente mayoritario EG).

El cálculo del valor de la constante de complejación (K_c) entre AEC y HP- β -CDs se realizó aplicando la **Ecuación III.1.1**, obteniendo como resultado un valor de $2005 \pm 225 \text{ M}^{-1}$. Esta relación lineal con un valor de pendiente menor que uno (0,857) indicó la formación de complejos de inclusión con estequiometría 1:1. Es importante destacar que debido a la alta solubilidad de los complejos de inclusión AEC-HP- β -

CDs, es posible solubilizar una alta cantidad de AEC (por ej: 70 mM usando 75 mM de HP- β -CDs).

Estos resultados difieren notablemente de los obtenidos en el estudio de solubilidad llevado a cabo con AEC y β -CDs en el que se formaron complejos insolubles incluso dentro del límite de solubilidad de las β -CDs. En este caso, el nivel más alto de AEC solubilizado es de 12 mM, usando 2 mM de β -CDs.

Tal y como se describe en el capítulo anterior, los resultados derivados del estudio de solubilidad del compuesto puro EG y HP- β -CDs dieron un valor de K_c menor que cuando se utilizó AEC ($455,5 \pm 199 \text{ M}^{-1}$ vs $2005 \pm 225 \text{ M}^{-1}$) (Figura IV.2.13). Estos resultados pueden explicarse debido a la presencia de otros componentes minoritarios presentes en el AEC que podrían incrementar la solubilidad acuosa del EG presente en el aceite y por tanto, aumentar la complejación del mismo con las CDs.

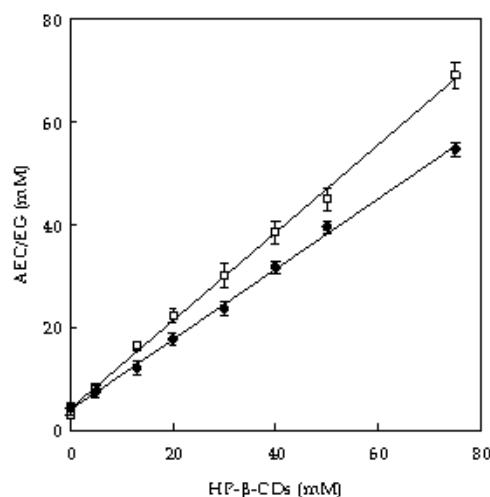


Figura IV.2.13. Diagrama de fases de (●) EG y (□) AEC (en base a su componente mayoritario EG) con HP- β -CDs.

A la luz de los resultados obtenidos en este capítulo, el trabajo demostró que el AEC puede ser encapsulado con β - y HP- β -CDs, a pesar de que las características de encapsulación son diferentes.

El AEC forma complejos de inclusión insolubles con β -CDs, mientras que en el caso de HP- β -CDs los complejos de inclusión son totalmente solubles. La

estequiometría de formación de los complejos AEC- β -CDs fue mayor de 1:1 cuando se utilizó una alta concentración de AEC. Sin embargo, el estudio llevado a cabo con bajas concentraciones de ambos componentes permite la formación de complejos de inclusión 1:1. Estos resultados sugirieron que ambos tipos de CDs, β -CDs y sus modificadas HP- β -CDs pueden ser consideradas como una alternativa para solventar los problemas prácticos asociados al uso del AEC. Basándose en los valores de las constantes de estabilidad, los resultados dejaron patente la mayor efectividad de β -CDs para la encapsulación de AEC.

3. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS AEC- β -CDS

La complejación de sustancias aromáticas con β -CDs se puede conseguir mediante la utilización de diferentes métodos (Pagington, 1986): la agitación de los componentes aromáticos junto con las CDs en soluciones acuosas, en presencia o no de algún disolvente orgánico, otras veces la complejación se consigue por medio de la adición de los aromas en forma de vapor sobre una solución de CDs, o mediante la mezcla de los mismos con una pasta de CDs. La selección del método de preparación de los complejos depende de factores como el rendimiento, rapidez, simplicidad, coste y características del producto acabado (Fernandes et al., 2004).

La literatura recoge numerosos trabajos en los que se describe la complejación de componentes aromáticos con CDs utilizando diferentes métodos. El método de agitación se ha aplicado a numerosos componentes aromáticos como α -limoneno, EG y menta (Yoshi et al., 1998a; Yang y Song, 2005; Martins et al., 2007). La co-precipitación como método de preparación de complejos de inclusión también se ha utilizado con AE de ajo, menta y canela (Martins et al., 2007; Petrovic et al., 2010). Bandhari y colaboradores en 1999 llevaron a cabo estudios en los que compararon la encapsulación de AE de limón con β -CDs mediante la utilización de varios métodos de formación de complejos.

La irradiación por microondas (MWI) es un método que puede evitar los inconvenientes asociados a las técnicas tradicionales de complejación, aportando un ahorro de tiempo y un incremento del rendimiento del proceso (Zhao et al., 2002, 2003). La principal ventaja de este método es la ausencia de residuos derivados de disolventes. En la industria farmacéutica se emplea por sus efectos térmicos, provocando la aceleración de los procesos de secado (gránulos o cristales) y también se ha extendido su uso en la esterilización de material intrahospitalario (Loh et al., 2008; Szepes et al., 2005). Por otro lado, la utilización de MWI como método para la formación de complejos de inclusión con CDs ha mostrado su efectividad en la mejora de la solubilidad acuosa de numerosos componentes (Shen et al., 2005; Wen et al., 2004).

La literatura recoge estudios sobre la complejación del AEC, sin embargo no se ha considerado el efecto del método de secado de los complejos sólidos de inclusión formados a la hora valorar la cantidad de compuesto finalmente retenido en la encapsulación. Por tanto, no sólo la metodología utilizada a la hora de preparar los complejos de inclusión formados es importante, sino que el secado de los mismos, una vez formados, puede ser un factor limitante que desemboque en grandes pérdidas económicas en la industria de los aromas.

De entre los distintos métodos utilizados, el secado por atomización es una técnica comúnmente utilizada para la microencapsulación de ingredientes alimentarios en la que proteínas, polisacáridos, o la combinación de ambos, se utilizan para formar una cubierta protectora (Desobry et al., 1997). Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes como la necesidad de trabajar a altas temperaturas de secado (alrededor de 200 °C) y el hecho de que solo es aplicable a matrices solubles en agua (Gharsallaoui et al., 2007). La utilización del secado por atomización en un AE puede ser peligrosa debido a que las altas temperaturas pueden llevar a un deterioro y pérdida de componentes volátiles presentes en los mismos.

El uso de una estufa de desecación para el secado de los complejos conlleva el uso de temperaturas más bajas que en el secado por atomización, pero el tiempo de exposición de las partículas al calor es mayor. Por esta razón, el tratamiento térmico a alta temperatura se ha descrito como un factor determinante a la hora de determinar la estabilidad del polvo.

La liofilización ha resultado ser un método atractivo para prolongar la vida útil de los alimentos. El secado tiene lugar a baja temperatura y la ausencia de aire previene el deterioro del producto causado por la oxidación o por modificaciones químicas. Este proceso minimiza los daños del producto provocados por descomposición, cambios en la estructura, textura, apariencia y flavor que pueden ocurrir como consecuencia de las altas temperaturas usadas en el secado por atomización (Longmore, 1971).

Partiendo de los resultados obtenidos en el capítulo anterior a partir de los estudios de solubilidad en los que se demostró la capacidad de β -CDs para formar complejos sólidos con AEC, el objetivo de este capítulo fue la evaluación de MWI como método para la preparación de complejos sólidos de inclusión AEC- β -CDs, con el fin de demostrar las ventajas asociadas a su uso y evitar los inconvenientes

de los métodos tradicionales de complejación. Además también se llevó a cabo el estudio de la influencia de los métodos de secado de los complejos sólidos AEC- β -CDs en la concentración final de AEC presente en los complejos.

3.1. OBTENCIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS DE INCLUSIÓN AEC- β -CDs

3.1.1. Optimización del método de preparación de complejos sólidos de AEC con β -CDs.

Las conclusiones derivadas del capítulo anterior han dejado evidente la capacidad del AEC de formar complejos sólidos de inclusión con β -CDs, que podría ser de gran utilidad en la industria alimentaria ya que facilitaría el manejo y almacenamiento del AE al pasar de estado líquido a estado sólido.

La optimización del método de preparación de los complejos sólidos tuvo como objetivo maximizar la rentabilidad del proceso de complejación. Para ello se trabajó a concentraciones de β -CDs por encima de su límite de solubilidad acuosa tal y como se ha descrito en la literatura (Souto, 2009) y se comparó la eficacia de la complejación del AEC utilizando dos alternativas como fuente de energía: MWI y ultrasonidos. El proceso de optimización queda resumido en la **Figura IV.3.1**.

Los complejos sólidos de inclusión de AEC con β -CDs se prepararon mediante la adición de concentraciones saturantes de AEC a suspensiones de concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) con un volumen total de 70 mL. Para llevar a cabo la formación de los complejos sólidos por MWI se utilizó el método descrito por Souto en 2009, con algunas modificaciones. Las suspensiones de β -CDs (0-100 mM) fueron irradiadas en un horno microondas durante 30 s, en intervalos de 10 s, hasta alcanzar 70 °C. Este proceso se realizó con el fin de aumentar la solubilidad acuosa de las β -CDs y así facilitar la complejación del AEC una vez adicionado. Seguidamente, se añadió un exceso de AEC a cada una de las muestras y, de nuevo, las muestras fueron irradiadas hasta alcanzar 70 °C, durante 30 s, en intervalos de 10 s. A continuación, las muestras se agitaron y se mantuvieron 12 horas en viales sellados en oscuridad a 25 °C. Transcurrido ese tiempo, parte de las muestras se centrifugaron a 14800 g a 25 °C, durante 60 min (muestras 1T) y el resto fueron sometidas de nuevo al mismo proceso (MWI hasta 70 °C y 12 horas en oscuridad) (muestras 2T).

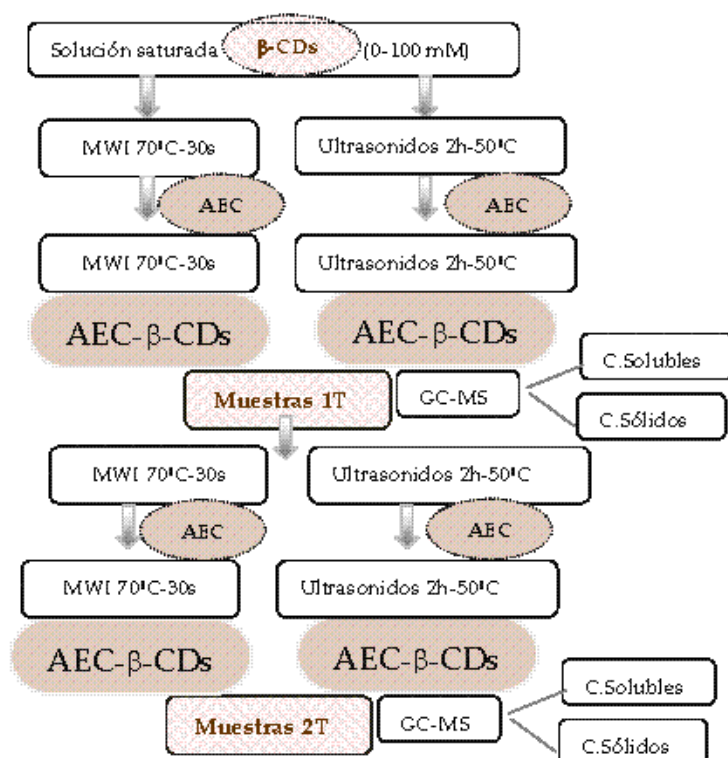


Figura IV.3.1. Proceso de preparación de complejos sólidos de inclusión de AEC- β -CDs para la optimización del método de preparación de complejos sólidos AEC- β -CDs.

Tras la centrifugación de las muestras se obtuvieron en el sobrenadante los complejos solubles de AEC- β -CDs y en el precipitado, tanto las β -CDs sobrantes como los complejos insolubles de AEC- β -CDs.

Para el análisis de AEC presente en los sobrenadantes, éstos se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0,2 μ m, eliminando así el exceso de AEC no complejoado ni disuelto. En el filtrado se obtuvo el AEC disuelto y el complejoado en forma de complejos AEC- β -CDs solubles. Antes de proceder a la cuantificación del AEC por GC-MS se rompieron los complejos mediante la adición de etOH al 80%.

Por otro lado, el precipitado obtenido fue resuspendido en 70 mL de agua, con el fin de obtener de nuevo una suspensión que nos permitiera retirar el exceso de AEC. Una vez retirada cuidadosamente la capa de exceso de AEC, la suspensión

resultante se filtró a vacío a través de un filtro de membrana de nylon de 0,2 μm , haciendo que los complejos insolubles quedaran retenidos en el filtro. Para la cuantificación del AEC en el precipitado obtenido se utilizó una estufa de desecación a 40 $^{\circ}\text{C}$ hasta obtener un peso constante. Posteriormente las muestras fueron redissueltas en etOH al 100% y analizadas por GC-MS.

En la **Figura IV.3.2** se muestran la evolución de la cantidad de AEC complejoado en función de las concentraciones de β -CD utilizadas. El aumento en la concentración de CDs provocó un aumento de la concentración de AEC disuelto en las muestras, tanto para las muestras con un solo ciclo de MWI como en las de dos ciclos. El aumento en la solubilidad del AEC fue de 4 veces en las muestras T1, y de 8,5 veces en las muestras T2.

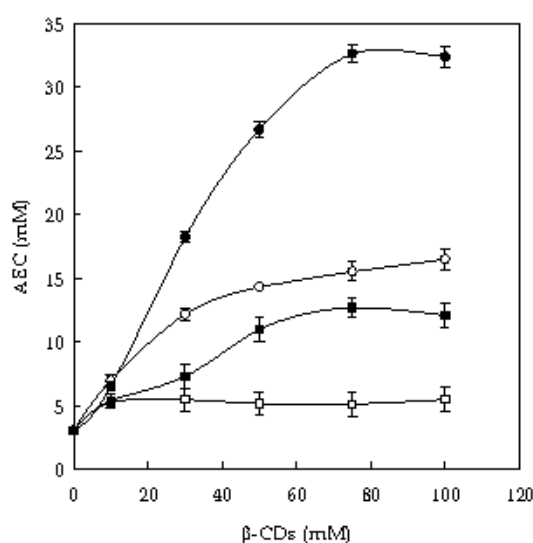


Figura IV.3.2. Influencia del método de preparación (MWI o ultrasonidos) en la formación de complejos solubles AEC- β -CDs con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) (en base a su componente mayoritario EG). (□) Complejos solubles AEC- β -CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (1T). (■) Complejos solubles AEC- β -CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (2T). (○) Complejos solubles AEC- β -CDs realizados mediante MWI (1T) (●) Complejos solubles AEC- β -CDs realizados mediante MWI (2T).

Se observa un cierto nivel de saturación en las muestras a medida que la concentración de CDs aumenta. Cuando las muestras han sido tratadas con un solo ciclo de MWI, el aumento de la cantidad de AEC disuelto es más acusado hasta llegar a 30 mM de β -CD, y a partir de este valor la solubilidad del AEC aumenta de manera menos pronunciada. En el caso de las muestras tratadas con dos ciclos de MWI, el incremento de la solubilidad del AEC aumenta progresivamente hasta alcanzar el valor máximo para 75 mM de β -CDs. La realización de dos ciclos de microondas ha dado lugar a un aumento significativo en la cantidad de AEC disuelto con respecto a las muestras que solo se han tratado una vez. La diferencia ha sido mayor cuanto mayor ha sido la concentración de CDs en el medio. A modo de ejemplo, y tomando como referencia la máxima concentración de β -CDs (100 mM), el hecho de repetir el ciclo de MWI ha dado como resultado el aumento del AEC disuelto de las muestras T2 (dos ciclos) al doble de las muestras T1 (un ciclo).

En la utilización de ultrasonidos como fuente de energía para preparar los complejos de inclusión, las suspensiones de concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) suplementadas con AEC fueron mantenidas a 50 °C en un baño de ultrasonidos, durante 2 h. Pasado este tiempo, parte de las muestras se centrifugaron a 14800 g a 25 °C durante 60 min (muestras 1T) y el resto se mantuvieron 12 horas en oscuridad para posteriormente repetir el proceso de sonicado (2T). Tras el centrifugado de las muestras se obtuvo un sobrenadante que contenía el AEC disuelto y AEC en forma de complejos AEC- β -CDs.

La representación gráfica de los datos obtenidos tras el tratamiento de las muestras con ultrasonidos (**Figura IV.3.2**) muestra un aumento de la solubilidad del AEC con la concentración de β -CDs. Sin embargo, este aumento ha sido más limitado que el observado con el método de MWI. El uso de ultrasonidos provocó un aumento en la solubilidad del AEC de 1,25 veces en las muestras T1, y de 3,5 veces en las muestras T2. Esto demuestra que el método de ultrasonidos es menos eficaz que el método de MWI a la hora de formar complejos solubles de AEC.

Los valores máximos de solubilidad de AEC, que se obtuvieron para concentraciones de entre 80 y 100 mM de β -CDs, fueron de 16 mM para un solo ciclo de MWI y 5 mM para un solo ciclo de ultrasonidos; y de 34 mM para dos ciclos de MWI y 13 mM para dos ciclos de ultrasonidos. En resumen, el método de

MWI consiguió una solubilidad del AEC entre 3,5 y 2,5 veces mayor que el método por ultrasonidos.

Una vez analizados los complejos AEC- β -CDs solubles obtenidos, se procedió a analizar los complejos insolubles obtenidos en los precipitados tras la centrifugación de las muestras tratadas por ultrasonidos y por MWI.

Para llevar a cabo el análisis de estos complejos sólidos, en primer lugar se redisolviéron los precipitados en 70 mL de agua con el fin de obtener de nuevo una suspensión que nos permitiera retirar fácilmente el exceso de AEC no complejoado (separación de fases por distinta densidad).

Una vez retirada cuidadosamente la fase superior de la disolución correspondiente al AEC en exceso, la suspensión se filtró a vacío a través de un filtro de nylon de 0,2 μ m. El precipitado recogido en el filtro se secó en estufa a 40 °C hasta masa constante y el polvo obtenido se redisolvió en etOH para cuantificar el AEC por GC-MS.

El análisis de los complejos sólidos de AEC- β -CDs formados cuando se usaron ambos métodos (**Figura IV.3.3**) mostró que la complejación del AEC con β -CDs fue más efectiva mediante el tratamiento por MWI consiguiendo una concentración de 50 mg de AEC por g de precipitado, mientras que en caso de ultrasonidos, el máximo alcanzado fue de 15 mg de AEC por g de precipitado. Es importante resaltar la diferencia en la cantidad de AEC encapsulado cuando las muestras fueron sometidas a un doble tratamiento tras un tiempo de reposo en la oscuridad. Esta diferencia es mucho más acusada en el caso de las muestras tratadas con MWI que en el caso de las muestras tratadas con ultrasonidos (49 mg/g de precipitado *vs* 19 mg/g de precipitado) (**Figura IV.3.3**).

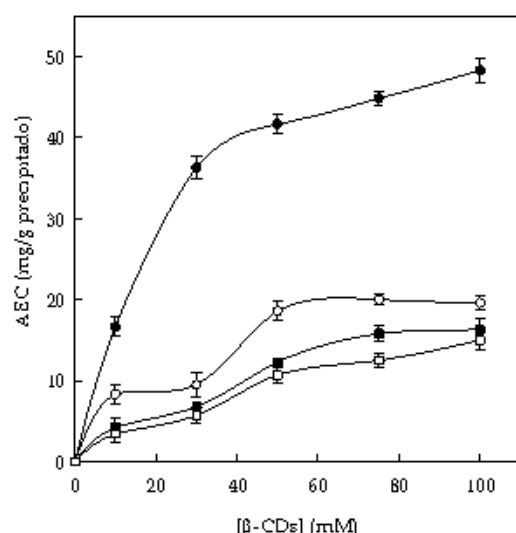


Figura IV.3.3. Influencia del método de preparación (MWI o ultrasonidos) en la formación de complejos sólidos AEC-β-CDs con concentraciones crecientes de β-CDs (0-100 mM) (en base a su componente mayoritario EG). (□) Complejos sólidos AEC-β-CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (1T). (■) Complejos sólidos AEC-β-CDs aplicando tratamiento de ultrasonidos (2T). (○) Complejos sólidos AEC-β-CDs realizados mediante MWI (1T). (●) Complejos sólidos AEC-β-CDs realizados mediante MWI (2T).

En base a los resultados obtenidos en estos estudios, el método óptimo de preparación de los complejos sólidos AEC-β-CDs es el método MWI con doble tratamiento (2T), que además de resultar en una mayor eficacia del proceso, conlleva otras ventajas tecnológicas y económicas de gran interés para la industria alimentaria como es el escalado de procesos a nivel industrial, el ahorro energético y de tiempo.

Estos resultados coinciden con los descritos por Mohitm y colaboradores en 2010, en los que estudiaron la complejación de cefdinir con β-CDs mediante MWI, demostrando que la utilización de este método permite una elevada tasa de disolución de los complejos formados. Otros autores estudiaron y compararon la preparación de complejos de inclusión de loratadina usando la MWI y un método convencional como es el método de agitación. A pesar de que los resultados fueron muy similares en cuanto al nivel de complejación, los autores definen como más conveniente el MWI por varias razones: tiempo de secado fue mucho menor,

facilidad de manejo a la hora de llevarlo a gran escala, y rapidez de la preparación de complejos de inclusión con β -CDs y sustancias con baja solubilidad acuosa (Nacsa et al., 2008).

3.1.2. Influencia del método de secado de los complejos sólidos de AEC- β -CDs en el contenido final de AEC.

Para llevar a cabo el estudio de la influencia del método de secado en el contenido final de AEC en los complejos sólidos se utilizó el método optimizado en el apartado anterior para la formación de los complejos: MWI con doble tratamiento (muestras 2T). En este apartado se evaluó la influencia del método de secado de los complejos sobre la cantidad final de AEC, con el fin de optimizar la última parte del proceso. Para ello, se compararon tres métodos de secado: estufa a 40 °C, secado por atomización y liofilización.

El secado en estufa a 40 °C de los complejos sólidos AEC se llevó a cabo hasta peso constante. La cantidad máxima de AEC retenida en los complejos de AEC- β -CDs fue de 49 mg/g y alcanzó para una concentración de 100 mM (Figura IV.3.4).

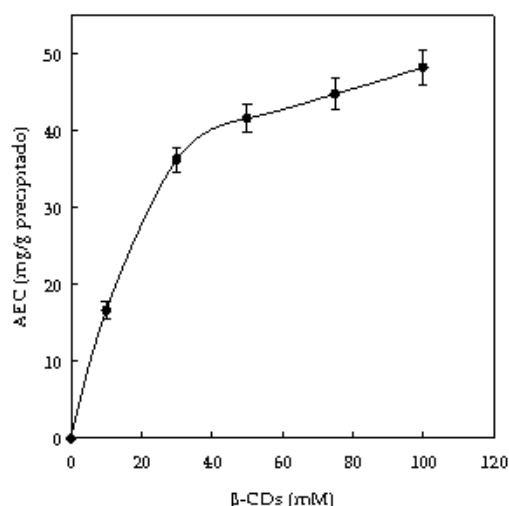


Figura IV.3.4. Contenido de AEC de complejos sólidos AEC- β -CDs. (en base a su componente mayoritario EG) con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) usando MWI. Efecto del secado en estufa a 40 °C en la concentración final de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs.

Como se observa en la **Figura IV.3.5**, el secado de los complejos por atomización permitió obtener complejos sólidos con una concentración máxima de que contenía 28 mg de AEC por gramo de precipitado.

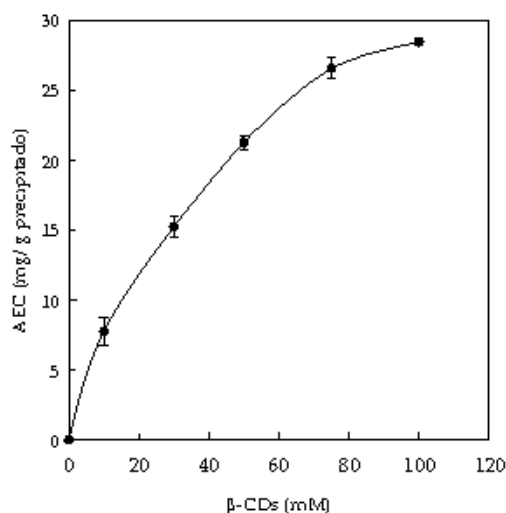


Figura IV.3.5. Contenido de AEC de los complejos sólidos AEC-β-CDs (en base a su componente mayoritario EG) con concentraciones crecientes de β-CDs (0-100 mM) usando MWI. Efecto del secado por atomización en la concentración final de AEC de los complejos sólidos AEC-β-CDs.

Tanto el uso de la estufa, como el secado por atomización, conllevan el uso de altas temperaturas. En el caso del secado en estufa, a pesar de que la temperatura fue moderada (40 °C), el tiempo de exposición fue alto. Sin embargo, en el secado por atomización, a pesar de que el tiempo de exposición fue menor, la temperatura del interior del atomizador alcanzó 160 °C.

Con el fin de obtener información de la cantidad de AEC encapsulado cuando el proceso de secado empleado no conlleva la utilización de calor se estudió el secado por liofilización (**Figura IV.3.6**).

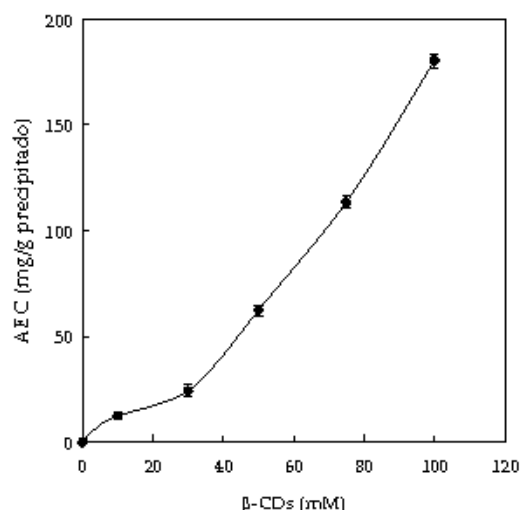


Figura IV.3.6. Contenido de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs (en base a su componente mayoritario EG) con concentraciones crecientes de β -CDs (0-100 mM) usando MWI. Efecto de la liofilización en la concentración final de AEC de los complejos sólidos AEC- β -CDs.

En la **Figura IV.3.6** se muestran los valores de AEC retenido en los complejos sólidos secados por liofilización. Al igual que en los otros dos métodos de secado ensayados, el máximo valor se ha obtenido para la máxima concentración de 100 mM de β -CD. Sin embargo, se observa que la cantidad de AEC retenida por el método de liofilización (170 mg/g) es sensiblemente mayor a la de los métodos de secado que usan calor, 48 mg/g mediante estufa y 28 mg/g mediante secado por atomización.

Considerando que el método por liofilización ha sido el más respetuoso con la cantidad de AEC encapsulado, haciendo la suposición de que la máxima cantidad de AEC que se puede retener en los complejos deshidratados es 180 mg/g, la **Figura IV.3.7** recopila los resultados obtenidos para el secado de los complejos AEC- β -CDs insolubles por los tres métodos estudiados.

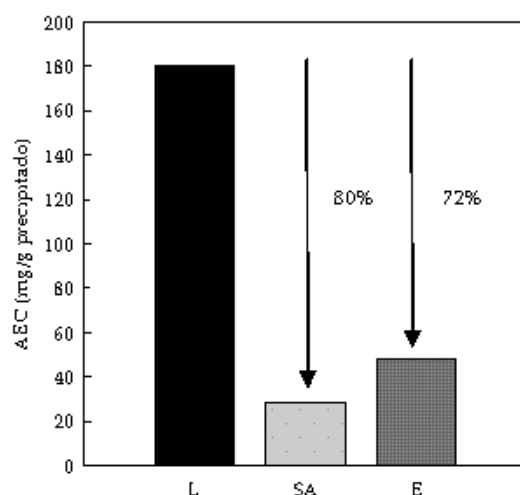


Figura IV.3.7. Concentración máxima de AEC retenida tras la aplicación de diferentes métodos de secado de los complejos AEC- β -CDs (en base a su componente mayoritario EG). (Barras negras) Liofilización, (Barras gris claro) secado por atomización y (Barras gris oscuras) secado por estufa.

La representación gráfica de los datos (**Figura IV.3.7**) muestra claramente como la liofilización fue el método de secado más eficaz a la hora de evitar las pérdidas del AEC. Los métodos de estufa y atomización han degradado el aceite en el proceso de secado. Se puede resumir que la deshidratación por estufa ha provocado una pérdida de compuestos volátiles durante el secado de casi un 72%, mientras que el secado por atomización ha sido el más agresivo con el aceite, generando una pérdida de volátiles de más del 80% durante la deshidratación. Por tanto, sólo la rentabilidad industrial de los procesos de secado podría decantar la elección hacia métodos de deshidratación por calor, los cuales deberían ser meticulosamente configurados para minimizar las pérdidas de aceite esencial que producen.

Estos resultados sugieren que el método de secado y su temperatura son importantes en la preparación de este tipo de complejos sólidos. En un estudio reciente, Haryany y Kunz, en 2011, compararon la estabilidad de las microcápsulas preparadas usando distintos métodos de secado, en el que se incluía el secado por atomización y liofilización. A pesar de que la liofilización no utiliza calor, estos

autores demostraron que la morfología final de la partícula es un factor limitante para la difusión de oxígeno. Además, el tamaño del poro del producto final puede acelerar la oxidación debido a la facilidad con la que el oxígeno entra en las matrices y alcanza el AE no encapsulado. Sin embargo, en contraste con esto, Franke y colaboradores, en 1999, describieron la liofilización como una oportunidad para producir aceite de pescado microencapsulado con una buena estabilidad, mientras que los experimentos llevados a cabo con atomización afectaron a la oxidación del aceite debido a las altas temperaturas.

A la luz de los resultados obtenidos en este capítulo, el uso de MWI podría ser una alternativa para la industria de aromas tanto en la preparación de complejos solubles como complejos en estado sólido AEC- β -CDs. De este modo se podría minimizar el tiempo de preparación de los mismos, así como la energía, resultando en un mayor beneficio en términos económicos.

La liofilización ha demostrado ser el mejor método de secado de los complejos sólidos AEC- β -CDs, seguido del secado en estufa y del secado por atomización, con grandes diferencias en la cantidad de AEC encapsulado presente en las muestras.

4. ESTABILIDAD DEL AEC MICROENCAPSULADO CON PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO Y MALTODEXTRINAS

La incorporación de aromas a distintas matrices en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica ha tomado gran relevancia desde que el empleo de la microencapsulación permite mejorar la retención de compuestos volátiles, así como su liberación controlada (Yoshii et al., 2001).

Como se ha descrito en capítulos anteriores, la microencapsulación es una técnica por la cual gotas líquidas o partículas sólidas son recubiertas por un material encapsulante (Sheu y Rosenberg, 1995). Esta cubierta protege al material activo del deterioro, limita su evaporación y ayuda a la liberación del mismo bajo las condiciones deseadas. En la industria alimentaria se utiliza para proteger compuestos volátiles, sabores, vitaminas, AE y oleorresinas, bacterias, enzimas y minerales.

Las proteínas de suero lácteo (PSL) han demostrado tener propiedades microencapsulantes muy efectivas y apropiadas para la preparación de microcápsulas solubles en agua mediante secado por atomización (Moreau y Rosenberg, 1993; Rosenberg y Lee, 1993; Young et al., 1993a, b; Sheu y Rosenberg, 1995; Moreau y Rosenberg, 1996; Rosenberg y Sheu, 1996; Rosenberg, 1997; Moreau y Rosenberg, 1998, 1999).

Las maltodextrinas (MD) también han sido utilizadas como agentes encapsulantes de componentes alimentarios (Kenyon y Anderson, 1988; Shahidi y Han, 1993). Sin embargo, la baja viscosidad de las soluciones que forman estos carbohidratos hacen que no posean las características de emulsificación necesarias para encapsular aceites. La estabilidad de la emulsión es crítica a la hora de la microencapsulación (Kenyon y Anderson, 1988; Rish y Reineccius, 1998), por ello, cuando se utilizan carbohidratos como las MD o sirope de maíz sólido como materiales encapsulantes, es necesario utilizar otro componente que mejore las propiedades emulsificantes.

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos en el estudio de la microencapsulación de AEC utilizando como matriz proteínas de suero lácteo

(PSL) o la combinación de las mismas con MD de distinto grado de hidrólisis (DE 4 y 25). Las técnicas utilizadas para la preparación de las microcápsulas fueron gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización.

Estos procesos de encapsulación se llevaron a cabo en el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de California (Davis, EE.UU.), bajo la dirección del Dr. Rosenberg. En dicho departamento se llevaron a cabo los procesos de encapsulación propiamente dichos, mientras que los estudios de cuantificación de AEC encapsulado se llevaron a cabo en la Universidad Católica San Antonio de Murcia.

La gelificación externa, tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos, conlleva el goteo de la emulsión de la proteína desnaturalizada y AEC en una solución de CaCl_2 para la formación de las microcápsulas. Sin embargo, las microcápsulas obtenidas por gelificación interna se consiguieron por medio de la acidificación del sistema añadiendo ácido acético glacial que provoca la liberación del ión de calcio del CaCO_3 y la gelificación de la emulsión, formando las microcápsulas.

Durante el proceso de secado por atomización las emulsiones iniciales fueron sometidas a un proceso de secado por una corriente de aire a alta temperatura (160 °C) que permite que el material activo (AEC) presente en la emulsión quede atrapado dentro de la película del material encapsulante, en este caso la proteína nativa (sin desnaturalizar) con MD.

Una vez formadas las diferentes microcápsulas conteniendo AEC se evaluó su estabilidad almacenándolas en distintas condiciones. Para ello, y como paso previo, fue necesario la optimización del método de extracción del AEC contenido en las microcápsulas.

4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE AEC DE LAS MICROCÁPSULAS

Para la optimización del método de extracción del AEC retenido en las diferentes microcápsulas se escogió una muestra representativa de cada una de las técnicas empleadas en la preparación de microcápsulas: gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización.

La elección del método de extracción del AEC presente en las microcápsulas supuso la realización de un estudio previo en el que las muestras fueron tratadas con mezclas de disolventes orgánicos, y posteriormente se llevó a cabo la cuantificación del AEC por GC-MS.

Las mezclas de disolventes orgánicos utilizadas fueron hexano:isopropanol (1:1) y acetona:agua (4:1). Para llevar a cabo la extracción, 5 mL de cada una de las mezclas de extractantes se añadieron a 0,15 g de las microcápsulas. Las muestras se agitaron en un vortex y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos a diferentes temperaturas (4, 25 y 70 °C) y diferentes tiempos de sonicado (5, 15 y 30 min). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 g durante 10 min y los sobrenadantes se analizaron por GC-MS.

Los datos experimentales representados en las **Figuras IV.4.1 y 2**, muestran el contenido de AEC extraído de las microcápsulas cuando se utilizó una mezcla de hexano: isopropanol (1:1) y acetona: agua (4:1).

Tal y como refleja la **Figura IV.4.1.A**, utilizando como agente extractante hexano:isopropanol, los resultados demostraron que el mayor rendimiento en la extracción de AEC de las microcápsulas producidas por gelificación externa se produjo con un tiempo de sonicado de 15 min a una temperatura de 50 °C (134,27 mg/g microcápsulas). Merece la pena resaltar que a todas las temperaturas ensayadas, el mayor rendimiento en la extracción se obtuvo con 15 min de sonicado. Esto puede deberse a que un mayor tiempo de sonicado provoca la pérdida de parte del AEC.

En el caso de las microcápsulas generadas por gelificación interna (**Figura IV.4.1.B**) el rendimiento de la extracción fue menor que en el caso de las producidas por gelificación externa. Esto podría deberse a que las microcápsulas producidas por gelificación interna contienen una menor cantidad de AEC (por el proceso de gelificación). A pesar de los resultados obtenidos (**Figura IV.4.1.B**), es evidente que en las microcápsulas producidas por gelificación interna, la extracción con hexano:isopropanol (1:1) produjo el mayor rendimiento utilizando ultrasonidos 15 min a 50 °C (0,4 mg/g microcápsulas), al igual que en el caso de la gelificación externa.

En cuanto a las microcápsulas generadas mediante secado por atomización (**Figura IV.4.1.B**), los resultados volvieron a indicar que la extracción con

hexano:isopropanol aplicando 15 min de sonicated a 50 °C (246,13 mg/g microcápsulas) es el óptimo para la extracción del AEC, al igual que en los dos casos anteriores. En este caso, la cantidad de AEC extraída fue la más alta de los tres métodos de encapsulación comparados. Este resultado indica que la estructura física del polvo generado por secado por atomización puede favorecer la extracción del aceite encapsulado.

En la **Figura IV.4.2** se reflejan los resultados obtenidos en la extracción de AEC mediante la mezcla acetona: agua (4:1). Con esta mezcla de disolventes la cantidad de AEC extraída en todos los casos fue menor que cuando se usó hexano:isopropanol. Además, este método de extracción fue mucho más heterogéneo en cuanto a los resultados obtenidos, evidenciando en menor medida que las mejores condiciones de extracción eran 15 min sonicated a 50 °C. En este caso se volvió a repetir el resultado que mostraba que las microcápsulas fabricadas por gelificación interna retenían una menor cantidad de AEC (0,25 mg/g de microcapsulas) que las producidas por gelificación externa o secado por atomización.

Comparando los resultados obtenidos para secado por atomización y gelificación externa, volvió a evidenciarse que la extracción de AEC es más favorable en el caso de las microcápsulas generadas por secado por atomización (138 mg/g) que por gelificación externa (100,4 mg/g).

Del análisis de estos resultados se puede concluir que el método óptimo para la extracción del AEC encapsulado por gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización es la utilización de hexano:isopropanol (1:1) como agente extractante en un medio con ultrasonidos durante un tiempo intermedio de 15 min a 50 °C.

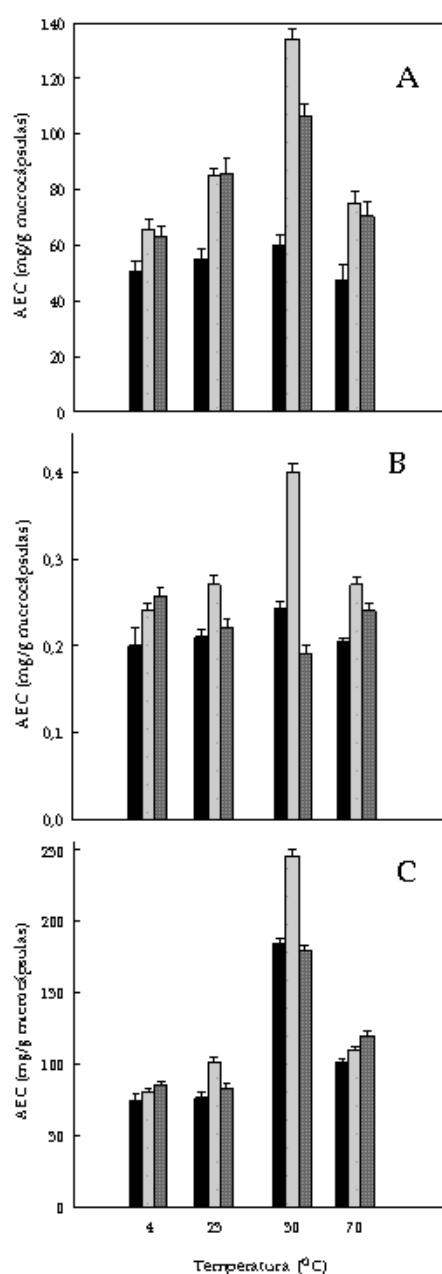
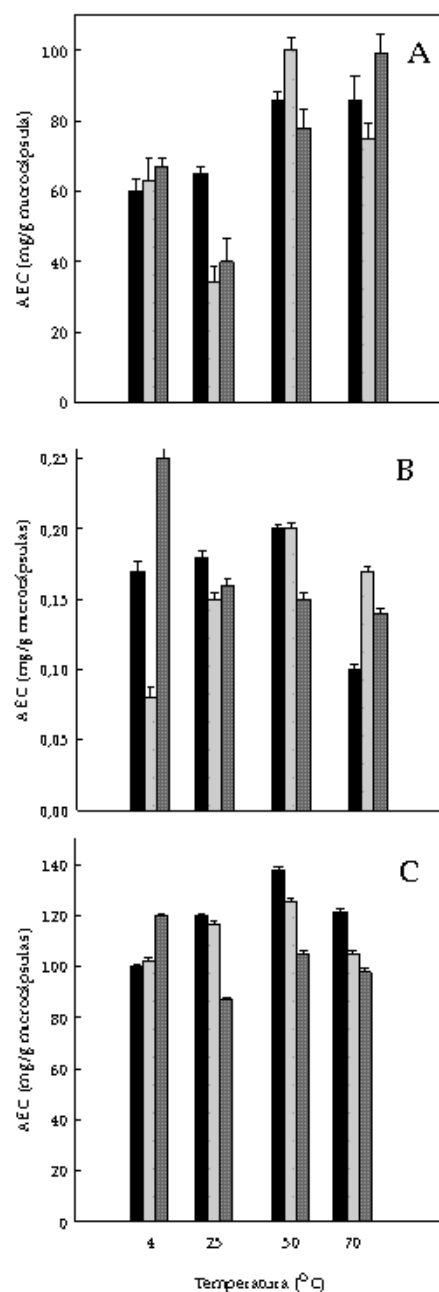


Figura IV.4.1. Extracción del AEC mediante la utilización de Hexano: Isopropanol (1:1) Efecto del tiempo de sonicado y la temperatura (barras negras: 5 min; barras grises claro: 15 min; barras grises oscuro: 30 min). La **Figura IV.4.1.A** representa las microcapsulas realizadas por gelificación externa. La **Figura IV.4.1.B** representa las microcapsulas realizadas por gelificación interna y la **Figura IV.4.1.C** refleja las microcapsulas realizadas mediante secado por atomización.



4.2 EFICACIA DE LA ENCAPSULACIÓN

La eficacia de la encapsulación (EE) se define como la relación entre la cantidad de aceite esencial teórico (adicionado a la emulsión inicial) y la cantidad de AEC encapsulado (presente en las microcápsulas obtenidas).

Para calcular esta relación, es necesario hacer una cuantificación inicial del AEC al final de cada proceso de encapsulación.

Los resultados obtenidos tras la encapsulación de AEC por los diferentes métodos empleados: gelificación externa, gelificación interna y secado por atomización se muestran en la **Tabla IV.4.1**. Todos los análisis se realizaron por triplicado, con un valor de DE no mayor al 2% en todos los casos.

La eficacia de la encapsulación (EE) se calculó en base a la cantidad teórica de AEC en la emulsión inicial y su relación con la cantidad de AEC presente en las microcápsulas al final del proceso (**Ecuación.IV.4.1**).

$$\% EE = \frac{\text{Cantidad_AEC_Encapsulado}}{\text{Cantidad_AEC_Teórica}} \times 100 \quad \text{[IV.4.1]}$$

En la encapsulación por gelificación externa y por gelificación interna se ensayaron distintos porcentajes de AEC (20, 25 y 30%) en la emulsión inicial para evaluar el efecto de esta concentración en la EE. La EE del proceso fue independiente del porcentaje de AEC presente en la emulsión inicial (**Tabla IV.4.1**). En el caso de la complejación por gelificación externa, la EE estuvo en torno al 50% cuando se usaron emulsiones iniciales con el 20%, 25% o 30% de AEC. En las microcápsulas obtenidas por gelificación interna, la EE del proceso fue tan baja que no se pudo apreciar este efecto. El uso de secado por atomización para la obtención de las microcápsulas se llevó a cabo mediante la utilización de emulsiones iniciales que contenían un 25% de AEC y por tanto tampoco se valoró el efecto de la concentración de AEC en la EE.

Tabla IV.A.1. Eficacia de encapsulación para las diferentes microcápsulas

Método	Muestras		Contenido real (mg/g)	Contenido teórico (mg/g)	EE (%)	DE
Gelificación Externa (GE)	20% AEC		112,00	232,07	48,27	0,44
	25% AEC		134,27	282,87	48,08	0,45
	30% AEC		174,73	349,47	49,96	0,47
Gelificación Interna(GI)	20% AEC	250 rpm	1,07	232,07	0,46	0,02
		400 rpm	0,40	232,07	0,17	0,002
		700 rpm	0,20	232,07	0,09	0,003
	25% AEC	250 rpm	0,40	282,87	0,14	0,001
		400 rpm	0,23	282,87	0,11	0,002
		700 rpm	0,27	282,87	0,09	0,007
	30% AEC	250 rpm	1,80	349,47	0,51	0,010
		400 rpm	0,47	349,47	0,13	0,017
		700 rpm	0,53	349,47	0,15	0,007
Secado por atomización (SA)	25% AEC	10% PSN +10% MD DE 25	246,13	282,87	87,01	1,20
		10% PSN- 10% MD DE4	165,00	282,87	58,33	1,30
		5% PSN- 15% MD DE 25	262,33	282,87	92,79	2,10
		5% PSN- 15% MD DE4	171,00	282,87	60,43	1,35

Cuando se compara la eficacia de la encapsulación de AEC por medio de gelificación externa y gelificación interna se observó claramente la ineficacia de la gelificación interna para encapsular AEC. Esta ineficacia puede deberse a diferentes motivos: en primer lugar podría deberse al proceso en sí de encapsulación o a que alguno de sus componentes impiden la correcta encapsulación. En segundo lugar hay que tener en cuenta que la cuantificación del AEC encapsulado se llevó a cabo trascurrido un mes desde su elaboración, tiempo en el que las muestras se conservaron en NaN₃ al 0,02%, a 4 °C, por lo que el AEC podría haberse perdido en este período de tiempo.

En cualquier caso, en ambos métodos de encapsulación transcurrió el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones hasta que se cuantificó el AEC, por lo tanto los resultados pueden ser comparables y se puede afirmar que el proceso de gelificación externa fue más eficaz en la encapsulación del AEC (48,55% *vs* 0,2%) (**Tabla IV.4.1**).

En cuanto a la EE del secado por atomización, éste que fue claramente superior a la del método de la gelificación externa (**Tabla IV.4.1**).

En este método de encapsulación se ensayaron distintos porcentajes de PSN y MD (10% PSN+ 10% MD; 5% PSN+ 15% MD) y MD con distinto grado de hidrólisis (Valor DE 4 y 25).

Analizando los resultados obtenidos se puede observar que tanto el porcentaje de MD utilizado, como el grado de hidrólisis de las mismas condicionaba la EE (**Tabla IV.4.1**). De este modo, se vio que para un mismo valor DE (DE 25) la EE aumentó del 87 al 92% a la vez que la concentración de MD también lo hacía de 10 a 15%. El grado de hidrólisis de las MD también demostró ser un factor importante en la eficacia de encapsulación, así se observó que las muestras que contenían MD DE 25 mostraron una EE mucho mayor que cuando se utilizó MD DE 4 (87% *vs* 58%). Estos resultados coinciden con los descritos en la bibliografía por Yoshi et al. (2001).

A la luz de los resultados obtenidos, se puede concluir que a tiempo 0 (transcurrido un mes de la encapsulación) el método es más eficiente para la encapsulación del AEC fue el secado por atomización.

4.3. ESTABILIDAD DEL AEC ENCAPSULADO CON EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO.

La encapsulación de componentes aromáticos conlleva, en la mayoría de los casos, un obligado período de almacenamiento antes de su uso en alimentación u otros sectores. Por tanto, a la hora de elegir el método de encapsulación a emplear es importante tener en cuenta no sólo la retención inicial del material activo sino también la cantidad retenida durante el almacenamiento de las microcápsulas.

Una vez analizada la EE de los métodos estudiados, se realizó el estudio de estabilidad del AEC en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento.

Para ello, se seleccionó una muestra representativa de cada una de las técnicas de encapsulación del AEC que dieron resultados óptimos de EE (gelificación externa y secado por atomización).

Para llevar a cabo el estudio de estabilidad se seleccionó una muestra de las microcápsulas preparadas por gelificación externa (GE), y dos muestras de las microcápsulas preparadas mediante secado por atomización (SA) en las que la única diferencia era el valor DE de las MD utilizadas (4 y 25) (**Tabla IV.4.2**).

Tabla IV.4.2. *Muestras seleccionadas para estudio de estabilidad.*

10% PSDN + 25% AEC- GE
10% PSN + 10% MD DE 4 SA + 25% AEC
10% PSN + 10% MD DE 25 SA + 25% AEC

Las muestras se almacenaron en viales teflonados de cristal sellados, en oscuridad y en monodosis a distintas temperaturas: 4, 25 y 40 °C. La estabilidad de las muestras se siguió durante un periodo de 30 semanas. La cuantificación del AEC se llevó a cabo a tiempo 0, 2, 4, 10, 20 y 30 semanas. Los resultados de las pruebas de estabilidad para las diferentes muestras quedan resumidos en la **Tabla IV.4.3**.

Tabla IV.4.3. Estabilidad del AEC encapsulado con el tiempo y la temperatura.

Muestras		T° (°C)	AEC (mg/g microcápsulas)					
			Semanas					
			0	2	4	10	20	30
25% EG	4	4	134,27	99,90	100,83	92,99	97,50	89,90
	25	25	134,27	120,00	79,41	73,83	70,00	68,33
	40	40	134,27	110,35	83,78	75,97	73,81	71,66
10%MD + 10% MD DE 25	4	4	246,13	185,83	177,91	177,50	172,49	170,00
	25	25	246,13	179,26	160,71	159,20	155,79	156,58
	40	40	246,13	230,78	161,75	102,72	98,05	95,55
10%MD + 10% MD DE 4	4	4	165,20	150,40	103,82	103,90	102,98	102,78
	25	25	165,20	129,15	101,63	99,10	100,62	100,12
	40	40	165,20	120,14	98,12	74,09	21,03	18,04

La **Figura IV.4.3** muestra los datos de estabilidad del AEC encapsulado mediante gelificación externa y almacenado a 4, 25 y 40 °C.

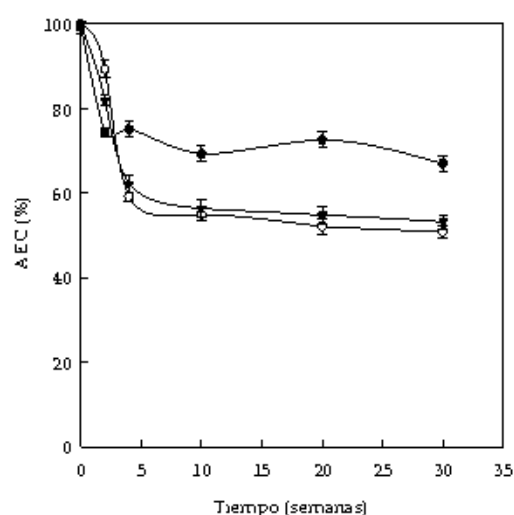


Figura IV.4.3. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AEC de las microcápsulas preparadas por gelificación externa (25% AEC-GE) tras el almacenamiento a diferentes temperaturas: (●) 4 °C, (○) 25 °C y (▼) 40 °C.

En todos los casos, la concentración de AEC cayó de forma brusca en las 4 primeras semanas de almacenamiento para, a partir de ese momento, permanecer constante. En esas 4 primeras semanas, la pérdida de AEC fue del 40% para las microcápsulas almacenadas a 25 °C y 40 °C (**Figura IV.4.3.** (○), (▼)), mientras que las

muestras almacenadas a 4 °C sufrieron una pérdida del 25%. La temperatura fue un factor determinante en la pérdida de AEC de las microcápsulas ya que influye en el equilibrio dinámico que regula la partición de fases del AEC entre la fase sólida (microcápsulas) y la fase gaseosa (espacio de cabeza de los viales de almacenamiento).

Los estudios llevados a cabo con el AEC encapsulado con 10% PSL y 10% MD mediante secado por atomización mostraron diferencias significativas en la pérdida de AE dependiendo del valor DE de las MD utilizadas.

La estabilidad de las microcápsulas fabricadas con MD DE 25 se muestra en la **Figura IV.4.4.**

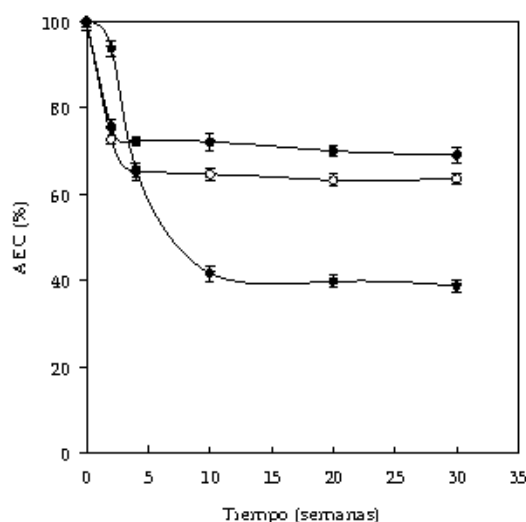


Figura IV.4.4. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AEC de las muestras preparadas mediante secado por atomización (10% PSN + 10% MD DE 25) tras el almacenamiento a diferentes temperaturas: (●) 4 °C, (○) 25 °C y (▼) 40 °C.

En el caso de las muestras almacenadas a 4 °C se observó una pérdida del 28% de AEC en las 4 primeras semanas y a partir de ahí la concentración de AEC permaneció constante hasta el final del estudio (semana 30). El perfil de AEC encapsulado en las muestras almacenadas a 25 °C fue muy similar a las anteriores, con la única diferencia de que en la semana 4 del estudio la pérdida había sido del 35% de AEC. La conservación a 40 °C, produjo una drástica caída hasta la semana

10, momento a partir del cual la pérdida se mantuvo constante en un valor de 60% hasta el final del estudio

Los resultados obtenidos para las microcápsulas fabricadas con MD con valor DE 4 se muestran en la **Figura IV.4.5**. En este caso, las muestras almacenadas a 4 y 25 °C, tuvieron el mismo comportamiento, perdiendo en ambos casos un 38% de AEC en las 4 primeras semanas de almacenamiento. Sin embargo, el almacenamiento a 40 °C de las microcápsulas resultó en una pérdida de casi la totalidad del AEC encapsulado, alcanzándose una pérdida del 90% del AEC de forma progresiva hasta el final del estudio (semana 20).

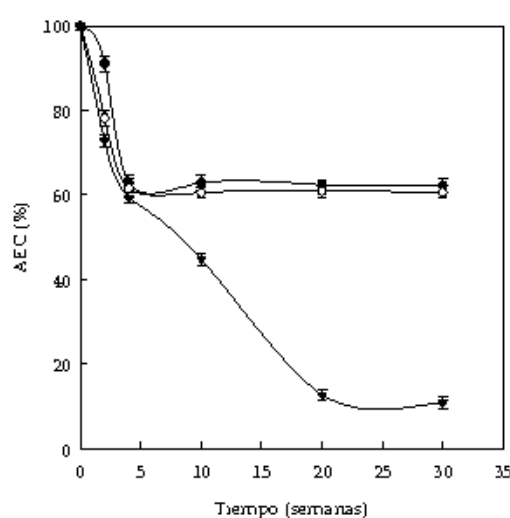


Figura IV.4.5. Efecto de la temperatura de almacenamiento en el contenido de AEC de las muestras preparadas mediante secado por atomización (10% PSN + 10% MD DE 4) tras el almacenamiento a diferentes temperaturas: (●) 4 °C, (○) 25 °C y (▼) 40 °C.

Como conclusión podemos decir que el grado de hidrólisis de las MD influye en la cinética de liberación del AEC encapsulado siendo más estables las microcápsulas fabricadas con las maltodextrinas (MD) con mayor grado de hidrólisis. Este resultado apoya el obtenido en el apartado anterior en el que las MD con mayor grado de hidrólisis presentaban mayor EE para el AEC.

Los resultados de de las pruebas de estabilidad demostraron que a pesar de que la EE de las microcápsulas preparadas por gelificación externa no fueron los mejores, sí mostraron una mayor capacidad de retención de AEC con el tiempo y la temperatura de almacenamiento que las muestras atomizadas, en las que en el mejor de los casos las pérdidas fueron del 35% frente al 25% observado en las muestras preparadas mediante secado por atomización.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral han llevado a las siguientes conclusiones:

1. Eugenol como parte del sistema multicomponente del aceite esencial de clavo o como compuesto puro es encapsulado por β y HP- β -CDs.
2. El uso de β -CDs da lugar a la formación de complejos de inclusión con estequiometría de orden mayor a 1:1 cuando son preparados a concentraciones saturantes del componente a encapsular. La formación de complejos de inclusión con estequiometría 1:1 se produce cuando la concentración de eugenol puro o aceite esencial de clavo se reduce por debajo de su límite de solubilidad. En el caso de HP- β -CDs los complejos de inclusión formados presentan siempre una estequiometría 1:1, independientemente de la concentración del compuesto a encapsular en el medio.
3. Los valores de K_c para la complejación de eugenol puro son menores que los obtenidos para la complejación de eugenol como componente del aceite esencial de clavo, tanto en el caso de β - como HP- β -CDs, indicando que la presencia de otros componentes en el AEC favorecen la complejación de eugenol. Además, la complejación en β -CDs presenta valores de K_c mayores que en HP- β -CDs.
4. La utilización de β -CDs permite la formación de complejos sólidos de inclusión con aceite esencial de clavo, pero no cuando se utiliza eugenol puro. El uso de HP- β -CDs no da lugar a la formación de complejos sólidos en ningún caso.

5. El uso de microondas como fuente de energía para la formación de complejos sólidos de aceite esencial de clavo con β -CDs es más eficaz que el uso de ultrasonidos.
6. El uso de liofilización como método de deshidratación mejora el rendimiento del proceso global de producción de complejos sólidos de AEC- β -CDs.
7. El AEC puede ser encapsulado utilizando proteínas de suero lácteo y maltodextrinas. El método de encapsulación que mejor se adapta al uso combinado de proteína de suero lácteo-maltodextrinas y aceite esencial de clavo es el secado por atomización, seguido por el método de gelificación externa.
8. Las microcápsulas fabricadas mediante el proceso de gelificación externa son las que ejercen una mayor protección sobre el aceite esencial encapsulado frente al tiempo y la temperatura de almacenamiento.

CAPÍTULO VI. RESULTS GLOBAL BRIEFING

1. INTRODUCTION

Essential oils and extracts of various species of edible and medicinal plants, herbs, and spices constitute very potent biological active agents. They have a complex composition, containing from a few to several hundred constituents, mainly hydrocarbons and oxygenated compounds. Both, hydrocarbons and oxygenated compounds are responsible for odors and flavors, generated by aromatic plants as secondary metabolites (Ebrahimi et al., 2008).

Clove oil (CO) is an essential oil contained in the dried flower buds, leaves and stem of the tree *Syzygiu aromaticum* (Eastern Hemisphere) or *Eugenia caryophyllata* and *Eugenia aromaticum* (Western hemisphere) (Schmid, 1972). It has been used for centuries as an anesthetic for toothaches, headaches and joint pain (Shelef, 1983; Soto et al., 1995). Clove has received attention as an ideal fish anesthetic (Ackerman et al., 2002; Wagner et al., 2003; Hoskonen and Pirhonen, 2004; Roubach et al, 2005) and it has been used as a fragrant and flavoring agent in a variety of food and cosmetic products (Atsumi et al., 2001; Fujisawa et al., 2002, Ito et al., 2005).

Eugenol (EG) (4-allyl-2-methoxyphenol) is the principal constituent of the essential CO, accounting for 90-95% of the total oil amount (Briozzo et al., 1989; Gulcin et al., 2010). It has a strong phenolic smell and sharp acrid taste (Mouchreck, 2000; Ozturk et al., 2005). This phenolic compound has shown several biological activities such as anti-inflammatory activity, analgesic activity, anti-oxidative activity and anti-bacterial activity.

In the food industry, clove is often used in the form of ground, extracted essential oil or oleoresin, but always in a small amount due to its intense flavour. However, the use of CO could be a problem in industrial applications due to its high volatility and low stability. Hence, irritation the mucosa and skin, pungent taste, volatility, light sensitivity and poor water solubility make it unsuitable to use as such.

Considering the effectiveness and convenience of the application of essential CO and its main compound EG, the introduction of these compounds into food and cosmetic products has many challenges. These food ingredients are susceptible of degradation due to environmental stress conditions such as

temperature, humidity, light, oxygen, interaction with other food ingredients and volatility of the aromatic compounds.

Encapsulation is the technique by which one material or a mixture of materials is coated with or entrapped within another material or system. The coated material is called active or core material, and the coating material is called shell, wall material, carrier or encapsulant. The development of microencapsulation products started in the 1950s with the research on pressure-sensitive coatings for the manufacture of carbonless copying paper (Green and Scheicher, 1955). Encapsulation technology is now well developed and accepted within the pharmaceutical, chemical, cosmetic, foods and printing industries (Augustin et al., 2001; Heinzen, 2002). In food products, fats and oils, aromatic compounds and oleoresins, vitamins, minerals, colorants and enzymes have been encapsulated (Dziezak, 1988; Jackson and Lee, 1991; Shahidi and Han, 1993).

The simplest form of microcapsules may consist of a core surrounded by a wall of uniform or non-uniform thickness. The core material may be composed of just one or several distinct types of ingredients whereas the carrier could be single or multilayered. The microcapsules are generally additives to a larger system and must be adapted to that system. Consequently, there are a number of performance requirements placed on microcapsules. A limited number of encapsulating methods exist (Versic, 1988) (**Figure VI.1.1**), but an enormous range of different materials can be used including proteins, carbohydrates (CDs, MDs, gums) and lipids (Brazel, 1999). The choice of wall materials depends upon a number of factors including: expected product objectives and requirements; nature of the core material; process of encapsulation; economics and whether the coating material is approved by the Food and Drug Administration (US) or European Food Safety Authority (Europe) (Amrita et al., 1991)

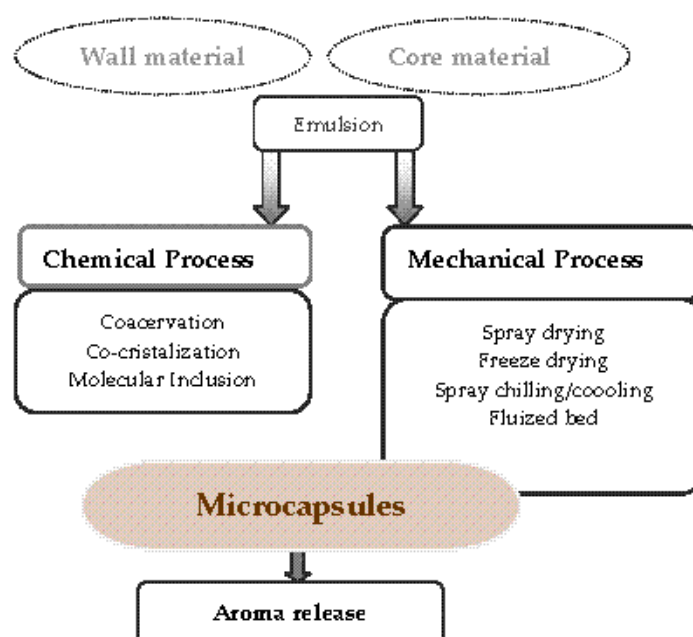


Figure VI.1.1. A Schematic illustration of different processes of encapsulation of flavours compounds

Being aware of the problems associated with the use of essential CO and its main compound EG, the aim of this study was using encapsulation as a tool in order to protect these sensitive bioactive compounds from degradation, eliminating unwanted effects and improving the effectiveness of their use in the industry.

2. MATERIALS AND METHODS

Phase solubility studies were carried out according to the method described by Higuchi and Connors (1965), with some modifications.

Formation of the inclusion complexes was verified by GC-MS or UV-vis spectrophotometry analysis.

In the first set of experiments and in order to obtain the signal for the analite in the mass spectrometer, a control sample of essential CO was spiked. As it is known, the main compound of essential CO was eugenol (**Figure IV.1.1**), which was used to prepare a calibration curve (**Figure IV.1.3**). All the GC-MS results of essential CO are given on the basis of its main compound EG.

Solid inclusion complexes of essential CO- β -CDs were prepared according to the method described by Souto in 2009, with some modifications.

The precipitates obtained (solid complexes) were dried using three different methods: vacuum oven (VO), spray drier (SD) and freeze drier (FD).

The microcapsules obtained using whey protein, maltodextrins (MD) and essential CO (**Figure III.1.4**) were prepared using the calcium mediated external, and applying internal methodologies and spray drying.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the first set of experiments, the encapsulation of EG and essential CO was carried out by molecular inclusion with CDs. To optimize and design controllable and advanced essential CO/EG-CDs carriers for food, cosmetic and other industrial applications, formation processes of complexes between CDs and essential CO/EG were characterized by solubility studies. Furthermore, the evaluation of the use of MWI for preparing solid essential CO-CDs complexes was carried out in order to evidence the advantages of this method and to overcome the drawbacks associated with traditional complexation method. In addition, different methods were used to dry the solid essential CO-CDs complexes obtained to evaluate its influence on the essential CO final concentration in the solid complexes.

Not only molecular inclusion with CDs was used to encapsulate essential CO. Whey Protein isolated (WPI) and Maltodextrins (MD) were also used as wall material for the encapsulation. For this purpose external gelation, internal and spray drying were used to obtain the microcapsules.

Prior to the aqueous solubility studies of essential CO in the presence of CDs, a GC-MS characterization of essential CO was carried out. The major peak obtained was EG (**Figure IV.4.2.3**), as could be demonstrated by the mass spectrum.

To ensure the reliability of the assay, the validation of EG quantification methods used in this study (GC-MS and UV-Vis spectrophotometry) was performed taking into account the following parameters: linearity, limit of detection (LOD), limit of Quantification (LOQ), precision and ruggedness.

The results showed GC-MS as the most sensitive method for the EG determination and quantification of the samples (**Table IV.2.1**), giving a LOD value of $3.2 \cdot 10^{-4} \pm 0.004$ (mg/mL) for GC-MS against $2.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.005$ (mg/mL) for spectrophotometric quantification. The LOQ value was also smaller for GC-MS quantification ($1.1 \cdot 10^{-4} \pm 0.003$ vs $7.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.007$ (mg/mL)). For this reason, if absence of further reference, all the determinations were performed by GC-MS.

The solubility studies were carried out according to the method described by Higuchi and Connors in 1965 with some modifications. When the complexation of EG with β -CDs was studied and the slope of the linear portion of phase solubility diagram of EG was calculated (0-2 mM β -CDs) (**Figure IV.1.6**), the result obtained

was approximately 5, indicating the formation of complexes with a stoichiometry greater than 1:1 for EG and β -CDs.

To extend the investigation of the binding between EG and β -CDs and in order to calculate the K_c of EG: β -CDs, the complexation behavior of soluble EG at low β -CDs concentrations was examined by UV-vis spectrophotometric analysis. In this experiment the concentration of soluble EG was kept constant, while the CDs concentration ranged up to 3 mM. Complexation of EG with β -CDs at EG concentrations below its aqueous solubility limit (S_0), clearly reflects a 1:1 stoichiometry complex formation. (**Figure IV.1.6**) However, when the complexation studies between EG and β -CDs were carried out at EG concentrations above S_0 and at high β -CDs concentrations (up to 13 mM), inclusion complexes with a higher stoichiometry order for EG were formed (reflected by a slope > 1 in the phase solubility diagrams) (**Figure IV.1.6**).

The association constant K_c between EG and β -CDs was calculated assuming a 1:1 stoichiometry for the complexes formed at low EG and β -CDs concentration, by applying three different treatments to the spectrophotometric data: **Connors**, **Benesi-Hildebrand** and **Scatchard**, giving as a result a K_c value of $9804 \pm 218 \text{ M}^{-1}$ (**Table IV.1.1**).

The complexation study of EG in the presence of the modified HP- β -CDs showed a linear response (A_L -type profile). The K_c value for that complexation was $455 \pm 199 \text{ M}^{-1}$ (**Figure IV.1.11**).

The K_c value for EG and β -CDs was higher than that obtained for its modified HP- β -CD ($9,804 \pm 218$ and $455 \pm 199 \text{ M}^{-1}$, respectively). It is assumed that the side chain of HP- β -CDs might interrupt EG inclusion within the hydrophobic cavity of HP- β -CDs.

When the aqueous solubility of essential CO was studied in the presence of increasing CDs concentrations, different patrons of behavior were observed in the presence of the native β -CDs vs its modified HP- β -CDs.

In the case of β -CDs, phase solubility diagram obtained was a Bs-type with a slope value of the linear portion of approximately 5, indicating the formation of inclusion complexes with a stoichiometry higher than 1:1 (CO:CDs) with respect to essential CO.

In order to study the binding process of essential CO and β -CDs, the complexation behavior of soluble essential CO at low β -CDs concentrations was examined by UV-vis spectrophotometric analysis. In this experiment the concentration of soluble essential CO was kept constant, and CDs concentration ranged from 0 to 3 mM. When increasing concentrations of β -CDs were added to the reaction medium, an exponential decay in the absorbance at 282 nm was observed. The association constant between essential CO and β -CDs was calculated applying Connors, Benesi-Hildebrand and Scatchard treatments to the experimental data, assuming a 1:1 stoichiometry for the formed complexes at low essential CO and β -CDs concentration, giving a K_c value of $17,584 \pm 256 \text{ M}^{-1}$.

The complexation of essential CO with β -CDs at concentrations below its aqueous solubility limit (S_0), clearly reflects a 1:1 stoichiometry complex formation. However, when the complexation studies between essential CO and β -CDs were carried out at essential CO concentrations above S_0 and at high β -CDs concentrations (up to 13 mM), inclusion complexes with higher stoichiometry order for essential CO (reflected by a slope > 1 in the phase solubility diagram) were formed.

When the essential CO solubility study was carried out in the presence of HP- β -CDs, a linear response was obtained as CDs concentration increased (**Figure IV.2.12**). This linear response corresponds to an A_L-type profile with a K_c value $2002 \pm 225 \text{ M}^{-1}$. This linear relationship with a slope value lower than 1 suggests a 1:1 stoichiometry for essential CO-HP- β -CDs complexes. This linear profile is typical for modified β -CDs and indicates the high aqueous solubility limit of the formed complexes. These results differ from those obtained previously for the complexation of essential CO with β -CDs, in which insoluble essential CO- β -CDs complexes were formed. The K_c value of essential CO- β -CDs was higher ($17,584 \pm 914 \text{ M}^{-1}$) than in the case of essential CO-HP- β -CDs ($2005 \pm 225 \text{ M}^{-1}$).

From the results obtained in the solubility studies between essential CO and β -CDs, it was assumed that solid complexes could be easily prepared.

Given the importance of scaling up for the industrial preparation of solid complexes and based on these results, this study was directed to the preparation of solid inclusion complexes (CO- β -CDs) using MWI. This process might, therefore, avoid the disadvantages associated with the use of an ultrasound bath (small scale and time-consuming).

To optimize the solid complexes preparation method, two different forms of energy were used: ultrasonic and MWI. The analysis of the results showed that complexation of essential CO with β -CDs was higher with a double MWI treatment (**Figure IV.3.3**). In contrast, the use of ultrasonic energy allowed levels 3 fold lower for essential CO in both soluble and solid complexes essential CO- β -CDs (**Figures IV.3.2 and IV.3.3**).

Once the method was established, the formation of both soluble and insoluble essential CO- β -CDs complexes was carried out using MWI with a double treatment of the samples. The profile of the dissolved essential CO with increasing β -CDs concentration (0 to 100 mM) obtained under MWI (2T) showed that the essential CO dissolved was approximately 3-fold higher than when a concentration range below the β -CDs solubility limit was used (**Figure IV.3.2**).

Many studies have been focused on the complexation of essential CO, but none has considered the effect of the drying method used to obtain solid complexes on the final essential CO concentration. In this study, the method used to dry obtained solid essential CO- β -CDs complexes was studied to evaluate its influence on the final essential CO concentration in the complexes.

The results suggested that the drying method and temperature are important in the preparation of solid complexes. Quantification of the essential CO in the preparation of solid complexes after applying different drying methods, clearly identified the freeze drying of samples (FD) as the best method for drying them, followed by vacuum oven (VO) and spray drying (SD) which led to significant differences in the amount of encapsulated essential CO. According to the obtained results and considering FD as the best method (100% of retention of essential CO) the use of spray drier and vacuum oven for drying the solid inclusion complexes caused losses of 80 and 72% of the essential CO, respectively (**Figure IV.3.7**).

On the other hand, the microencapsulation of essential CO using whey proteins, maltodextrins with different DE value (DE 4 and 25) as wall material and essential CO at different concentrations (20, 25 and 30%) allowed the formation of different microcapsules achieved by applying three different methods: internal gelation, external gelation and spray drying (**Table IV.4.1**).

The efficacy of encapsulation (EE) was calculated based on the relationship between the amount of theoretical essential CO (initially in the emulsion) and the amount of real essential CO in the final microcapsules (**Equation IV.6.1**)

Based on the EE value, microcapsules prepared using spray drying showed the highest essential CO retention.

The effect of maltodextrins DE value on EE of spray dried microcapsules was evidenced. In this sense, the retention of essential CO increased when the DE value increased from 4 to 25 (58.33% *vs* 87.01%). The use of external gelation as a method to prepare microcapsules allowed 50% of EE. However, internal gelation microcapsules showed no retention of essential CO.

Throughout the time, the effect of temperature (4, 25 y 40 °C) was studied in prepared external gelation microcapsules (10% WPI + 10% MD + 25% essential CO), and spray dried microcapsules (10% WPI + 10% MD DE 4 + 25% essential CO; 10% WPI + 10% MD DE 25 + 25 % essential CO) (**Figura IV.4.3, IV.4.4 and IV.4.5**).

The analysis of the data showed a pronounced effect of the temperature in the final essential CO retention. The increase of temperature from 4 °C to 40 °C reflected losses of essential CO in all samples.

Despite of the fact that prepared external gelation microcapsules did not account for the best EE values, higher levels of retention (75%) were obtained compared with spray dried microcapsules.

DE value was determinant in the stability of spray dried microcapsules; in this case, it was also evident the effect of the increase that the DE value (from DE 4 to 25) had in the essential CO retention.

4. CONCLUSIONS

The studies undergone in the present Doctoral Thesis lead to conclude the following:

1. Eugenol as main compound of essential clove oil can be successfully encapsulated in both β -CDs and HP- β -CDs.
2. The use of saturated eugenol concentrations allow the formation of inclusion complexes with a stoichiometry higher than 1:1. The formation of inclusion complexes with a stoichiometry 1:1 is produced at pure Eugenol or essential clove oil concentration below its solubility limit. The use of HP- β -CDs for the eugenol complexation permit the formation of complexes with stoichiometry 1:1 regardless of the core material concentration.
3. Pure eugenol K_c values were found to be lower than those for the complexation of Eugenol as main compound of essential clove oil with β - and HP- β -CDs. This result signals the presence of minority compounds in the essential clove oil that favor the eugenol complexation. Moreover, β -CDs K_c values were greater than HP- β -CDs K_c values in all cases.
4. Essential CO forms insoluble complexes with β -CDs, whereas no insoluble complexes can be obtained in the case of EG. The use of HP- β -CDs do not allow the formation of solid complexes
5. The use of microwave irradiation as energy source to prepare solid essential CO- β -CDs complexes could be better recommended than the use of ultrasound energy for the industrial scale CO- β -CDs complexes preparation with better yields, and at a lower cost of production.

6. Freeze drier can be considered as the best method to increase the yield of the global solid complexes essential CO- β -CDs production.
7. Essential CO can be encapsulated using whey protein and maltodextrins. The best method for their use as wall material is spray drying followed by the external gelation method.
8. Microcapsules prepared using external gelation show greater essential clove oil protection against temperature conditions throughout the time.

CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, J. L., Bellwood, D. R. Comparative efficiency of clove oil *vs* rotenone for sampling tropical reef fish assemblages. *J Fish Biol.* **2002**, 60, 893-901.
- Akiyama, Y., Miyao, K. Microencapsulation of royal jelly. Jpn. Kokai *J Patent* 7780463. **1979**.
- Alma, M. H., Ertas, M., Nitz, S. Chemical composition of content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove. *Bio Res.* **2007**, 2, 265-269.
- Amrita, K., Dabur, R. S., Kapoor, C. M. Application of microencapsulation technology in dairy industry. *Indian Food Industry.* **1999**, 18, 57-64.
- Anandaraman, S., Reineccius, G. A. Stability of encapsulated orange peel oil. *Food Technol.* **1986**, 40, 88-93.
- Anderson, G. W., Mc Kinley, S. R., Colavecchia, M. The use of clove oil as anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North Am J Fish Management.* **1997**, 17, 301-307.
- Angell, W. F., France, P. A. Detergent composition having granular cyclodextrin. *PCT Int Appl WO 01 18,163.* **2001**.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. spp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem.* **2006**, 54, 4364-4370.
- Anthony, A., Caldwell, G., Hutt, A. G., Smith, R. L. Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 10-hydroxyestragole. *Food Chem Toxicol.* **1987**, 25, 799-806.
- Apintanapong, M., Noomhorm, A. The use of spray drying to microencapsulate 2-acetyl-1-pyrroline, a major flavour component of aromatic rice. *Int J of food Sci Technol.* **2003**, 38, 95-102.
- Arnal-Schnebel, B., Hadji-Minaglou, F., Peroteau, J. F., Ribeyre, F., de Billerbeck, V. G. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *Int J Aromather.* **2004**, 14, 192-197.

- Astolfi, Z. A., Souza, E., Reipert, T. V. Encapsulation of passion fruit juice by cocrystallization with sucrose: crystallization kinetics and physical properties. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos Campinas*. **2005**, 25, 795-801.
- Astray, G., González-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, L. A review on the use cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*. **2009**, 23, 1631-1640.
- Atsumi, T., Iwaka, I., Fujisawa, S., Ueha, T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials*. **2001**, 22, 1459-1466.
- Atwood, J. L. Inclusion phenomenon and molecular recognition. New York: Plenum. **1990**.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C., Young, B. Microencapsulation of food ingredients. *Food Aust*. **2001**, 53, 220-223.
- Ávalos, A. G., Pérez-Urria, E. Metabolismo secundario de Plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. **2009**, 2, 119-145.
- Averbeck, D., Averbeck, S. DNA photodamage, repair, gene induction and genotoxicity following exposures to 254 nm UV and 8-methoxypsoralen plus UVA in a eukaryotic cell system. *J Photochem Photobiol*. **1998**, 68, 289-295.
- Averbeck, D., Averbeck, S., Dubertret, L., Young, A. R., Morliere, P. Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol*. **1990**, 7, 209-229.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol*. **2008**, 46, 446-475.
- Bangs, W. E., Reineccius, G. A. Influence of dryer infeed matrices on retention of volatile flavor compounds during spray-drying. *J Food Sci*. **1981**, 47, 254-259.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Vega-Mercado, H. *Dehydration of foods*. New York. NY: Chaman and Hall. **1996**.
- 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.
- Bauer, K., Garbe, D., Surbugurg, H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, properties and uses. Cuarta edición, Wiley-VCH, Winhein. **1985**.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. Common Fragrance and Flavors materials. **2001**.
- Bayourni, S. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yogurt. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel.* **1992**, 14, 21-26.
- Benczedi, D., Blake A. Encapsulation and the controlled release of flavors. *Leatherhead Food RA industry Journal.* **1999**, 2, 36-48.
- Benczedi, D., Bouquerand, P. E. Process for the preparation of granules for the controlled release of flavors. *Leatherhead Food RA Industry Journal.* **2001**, 2, 36-48.
- Benesi-Hildebrant, J. H. A spectrophotometric investigation on the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J Am Chem Soc.* **1949**, 71, 2703-2707.
- Beristain, C. I., Vázquez, A., García, H. S., Vernon-Carter, E. J. Encapsulation of orange peel oil by cocrystallization. *Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie.* **1996**, 29, 645-647.
- Bhandari, B. R., D'Arcy, B. R., Padukka, I. Encapsulation of lemon oil paste method using β -cyclodextrins: encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. *J Agric Food Chem.* **1999**, 47, 5194-5197.
- Bhardwaj, R., Dorr, R. T., Blanchard, J. Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclodextrins. *J Pharm Sci Technol.* **2000**, 54, 233-239.
- Blake, A. Flavor encapsulation with carbohydrate glasses. *International Food ingredient.* **1994**, 3, 30-34.
- Board, R.G., Gould, G.W. Future prospects. In: Gould, N.J.R.A.G.W. *Food Preservatives*. Blackie, Glasgow. **1991**, pp. 267-284.

- Bowles, E. J. Chemistry of Aromatherapeutic Oils. Allen y Unwin, ISBN 174114051X. **2003**.
- Boyle, W. Spices and essentials oils as preservatives. The American perfumer and essential Oil Review. **1955**, 66, 25-28.
- Brazel, C. S. Microencapsulation: offering solution for the food industry. *Cereals Foods World*. **1999**, 44, 388-393.
- 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.
- Briozzo, J. L., Chirife, J., Herzage, L., Dáquino, M. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J Appl Bacteriol*. **1989**, 66, 69-75.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (*Lauraceae*) flower calices. *Food Chem*. **2003**, 85, 415-421.
- Buffo, R. A., Reinneccius, G. A. Comparison among assorted drying processes for the encapsulation of flavours. *Perfumer and Flavorist*. **2001**, 26, 58-67.
- Buma, T. J., Henstra, S. Particles structure of spray dried caseinate and spray dried lactose as observed by scanning electron microscopy. *Nether Milk Dairy J*. **1971b**, 25, 278-283.
- Buma, T. J., Henstra, S. Particles structure of spray-dried milk products as observed by scanning electrony microscopy. *Nether Milk Dairy J*. **1971a**, 25, 75-80.
- Burkey, J. L., Sauer, J. M., Mc Queen, C. A., Sipes, I. G. Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners—a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat Res*. **2000**, 453, 25-33.
- Burt, S. A., Reinders, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*. **2003**, 36, 162-167.
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods - a review. *Int J Food Microb*. **2004**, 94, 223-253.
- Buschmann, H. J., Schollmayer, E. Application of ciclodextrins in cosmetic products: a review. *J Cosmet Sci*. **2002**, 53, 185-191.

- Cabral, M. H. M. A review on cyclodextrins encapsulation of essential oils and volatiles. *Flav Frag J.* **2010**, 25, 313-326.
- Caesar, G. V. Dextrins and dextrinisations. In: Radley, J.A. Ed., starch and its derivatives, 4th edn., Chapman & Hall, London. **1968**, 282-289.
- Carson, C. F., Hamner, K. A., Riley, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* **2006**, 19, 50-62.
- Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2002**, 46, 1914-1920.
- Carson, C. F., Riley, T. V. Antimicrobial activity of essential oil of *Melaleuca alternifolia* *Lett App Microbiol.* **1993**, 16, 49-55.
- Castillejos, L. Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis Doctoral. Universidad autónoma de Barcelona. Departamento de ciencia animal y de los alimentos. Barcelona, España. **2005**.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakni, A., Kalha-Nackbi, A. B., Rouabhia, M., Bakhrouf, T. The chemical composition biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* *Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*: A short review). *Phytoter resv.* **2007**, 21, 501-506.
- Chami, S. A., Chami, N., Bennis, S., Bouchikhi, T., Remmal, A. Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Sacharomyces cerevisiae*. **2005**.
- Chen, A. C. Ingredient technology by the sugar cocrystallization process. *Int sugar J.* **1994**, 96, 493-494.
- Choi, M. J., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S. G., Ruktanonchai, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. *Food Res Int.* **2009**, 42, 148-156.
- Comini, S., Mentink, L. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat Appl. EP 440539.* **1991**.

- Conner, D. E., Beuchat, L. R., Worthington, R. E., Hitchcock, H. L. Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *Inter J Food Microbiol.* **1984**, 1, 63-74.
- Connors, K. A. Binding Constants. Wiley: New York. **1987**, 103-108.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L. Interactions between components of the essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* **2001**, 36, 162-167.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warrington, J. R., Wyllie, S. G. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol.* **2000**, 88, 170-175.
- Cramer, F. Einschlussverbindungen. Berlin: Springer-Verlag, **1954**.
- Cravotto, G., Binello, A., Baranelli, E., Carrazo, P., Trotta, F. Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Curr Nut Food Sci.* **2006**, 2, 343-350.
- Cressy, H. K., Jerrett, A. R., Osborne, C. M., Bremer, P. J. A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *J Food protect.* **2003**, 66, 390-395.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. Natural products (secondary metabolites) en: Buchachan, B., Gruissem, W., Gruissem, W., Jones, R. (Eds), Biochemical and Molecular Biology of plants. *Am Soc Plants Physiol.* **2000**.
- Crouzet, J. Aromes alimentaires. In: Techniques de l'ingénieur, Agroalimentaire F. **1998**, pp.1-16.
- Cutter, C. N. Antimicrobial effect of herbs extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *J Food of Protect.* **2000**, 5, 601-607.
- Dalgleish, D. G. Adsorption of proteins and the stability of emulsions. **1997**.
- De Flora, S., Izzotti, A., Bennicelli, C. Mechanisms of antimutagenesis and genotoxicity assay of oil dispersants in bacteria (mutation, differential lethality, SOS DNA-repair) and yeast (mitotic crossing-over). *Mutat Res.* **1985**, 158, 19-30.
- De Flora, S., Ramel, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutat Res.* **1988**, 202, 285-306.

- De Logu, A., Loy, G., Pellerano, M. L., Bonsignore, L., Schivo, M. L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antivir Res.* **2000**, 48, 177–185.
- Deans, S. G., Ritchie, G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J of Food Microbiol.* **1987**, 5, 165–180.
- Deis, R. C., Spray Drying-innovative use of an old process. *Food product design.* **1997**, 797-113.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J of Food Microbiol.* **2002**, 74, 101–109.
- Denyer, S. P., Hugo, W. B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford. **1991a**. pp. 171–188.
- Denyer, S. P., Hugo, W.B. Mechanisms of antibacterial action—A summary. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.). *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. Blackwell, Oxford. **1991b**. pp. 331-334.
- De-Oliveira, A. C., Fidalgo-Neto, A. A., Paumgarten, F. J. In vitro inhibition of liver monooxygenases by β -ionone, 1,8-cineole, (α)-menthol and terpineol. *Toxicol.* **1999**, 135, 33–41.
- De-Oliveira, A. C., Ribeiro-Pinto, L. F., Paumgarten, F. J. R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol Lett.* **1997**, 92, 39–46.
- Desobry, S. A., Netto, F. M. Labuza, T. P. Comparison of spray drying, drum drying and freeze drying for beta-carotene encapsulation and preservation. *J Food Sci.* **1997**, 62, 1158-1162.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem.* **2007**, 55, 4863-4870.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J Agric Food Chem.* **2006**, 54, 2745-2749.

- Diario oficial de la Unión Europea. 5.6.2008.
<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav02-1.pdf>
- Dijoux, N., Guingand, Y., Bourgeois, C., Durand, S., Fromageot, C., Combe, C., Ferret, P. J. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay in vitro. *J Toxicol.* **2006**, 20, 480–489.
- Dickinson, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Interfaces.* **2001**, 20, 197-210.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J App Microbiol.* **2000**, 88, 308–316.
- Duan, S., Moeller, K. D. Anodic coupling reactions: probing the stereochemistry of tetrahydrofuran formation. A short, convenient synthesis of linalool oxide. *Organic Lett.* **2001**, 3, 2685-2688.
- Duarte, M. C., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., Delarmelina, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* **2005**, 97, 305–311.
- Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., Boury, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plants proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and surfaces A: Physico chemical Engineering Aspects.* **2004**, 232, 239-247.
- Dufosse, L., Souchon, I., Feron, G., Latrasse, 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.
- Dziezak, J. D. Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technol.* **1998**, 42, 136-151.
- Eastburn, S. D., Tao, B. Y. Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnol Adv.* **1994**, 12, 325-339.
- Ebrahimi, S. N., Hadian, J., Mirjalili, M. H., Sonboli, A., Yousefzadi, M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymes caramanicus* at different phonological stages. *Food Chem.* **2008**, 110, 927-931.
- El Hag, E. A., El Nadi, A. H., Zaiton, A. A. Toxic and growth retarding effects of three plants extracts against methicillim-resistant *Staphylococcus aureus*

- (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Phytother Res.* **1999**, 13, 388-392.
- Enzo, A. P., Susan, J. S. Antibacterial activity of Australian plant extracts against methicillin-resistant. **2002**.
- Escher, F. E., Nuesly, J., Conde Petit, B. Interactions of flavor release. In: Flavour release. ACS Symposium. Washington, DC: American Chemical Society. **2000**. pp. 230-245.
- Evandri, M. G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P., Mazzanti, G. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, 43, 1381-1387.
- EWG data base en <http://www.ewg.org/>
- Fadt, P., Bergenstahl, B. Spray-dried whey protein/ lactose/ soy-bean oil emulsions. 1. Surface composition and particle structure. *Food Hydrocolloids.* **1996**, 10, 421-429.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M., El-Baroty, G. S. A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Protect.* **1989**, 52, 665-667.
- Feres, M., Figueredo, L. C., Barreto, I. M., Coelho, M. N., Araujo, M. W., Cortelli, S. C. *In vitro* antimicrobial activity of plants extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *J Int Acad Periodontol.* **2005**, 7, 90-97.
- Fernandes, L.P., Éhen, Zs., Éhen, T. F., Moura, Cs., Novák, J., Szatatisz, J. Solid state studies on molecular inclusions of Lippia sidoides essential oil obtained by spray drying. *J Therm Anal Cal.* **2004**, 78, 557.
- Flores, R. J., Wall, M. D., Carnahan, D. W., Orofino, T. A. An investigation of internal phase losses during the microencapsulation of fragrances. *J microencap.* **1992**, 3, 287-307.
- Foley, P. R., Kaiser, C. E., Sadler, J. D., Burckhardt, E. E., Liu, Z. Detergent composition with cyclodextrin perfume complexes to mask malodours. *Patente WO 23516.* **2000**.
- Franzios, G., Mirotsoy, M., Hatzia Apostolou, E., Kral, J., Scouras, Z. G., Mavragani-Tsipidou, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J Agric Food Chem.* **1997**, 45, 2690-2694.

- French, D. The Schardinger dextrans. *Adv Carbohydr Chem.* **1957**, 12, 189-260.
- Freudenberg, K., Cramer, F., Plieninger, H. Verfahren zur Herstellung von Einschlussverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen. Knoll A.-G. Chemische Fabriken, Germany Patent 895769. **1953**.
- Frömming, K. H., Szejtli, J. Cyclodextrins in pharmacy. Topics in inclusion science. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. **1994**.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., Sakagami, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol related compounds and their toxicity. *Toxicology.* **2002**, 177, 39-54.
- Fujishima, N., Kusaka, K., Urmino, T., Urushinata, T., Terumi, K. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. *Japanese Patent JP 136898.* **2001**.
- Gao, S., Wang, L. Application of cyclodextrin in environmental science. *Huanjing Kexue Jinzhan.* **1998**, 6, 80-86.
- Garg, A., Gupta, B., Prakash, S. S. Preparation and characterization of hydroxypopyl- β -cyclodextrins (HP- β -CDs). *Chem Pharm Bull.* **2010**, 58, 1313-1319.
- Gautier, F., Kamel, C., Calsamiglia, Doane, P. Food additive for ruminant based on eugenol and cinamaldehyde. Patent US 0064864 **2001**.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Int.* **2007**, 40, 1107-1121.
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int J Food Microbiol.* **2002**, 73, 83-92.
- Glenn, G. M., Stern D. J. Starch-based Microcellular Forms. *US Patent 5958589, Washington, DC.* **1999**.
- Golovnya, R. V., Misharina, T. A., Terenina, M. B. GC evaluation of flavour compound sorption from water solutions by corn starch cryotextures obtained by freezing. *Nahrung.* **1998**, 42, 380-384.
- Gomes-Carneiro, M. R., Dias, D. M. M., De-Oliveira, A. X., Paumgartten, F. J. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat Res.* **2005**, 585, 105-112.

- Goubet, I., Le Quere, J. L., Voilley, A. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physical state. *J Agric Food Chem.* **1998**, 48, 1981-1990.
- Goudel, Y., Tonel, J. Flavoures Gelatin Capsules capable of containing various substances used in the food, animal feed, dietetic and pharmaceutical Sectors. French Patent Application. FR 280777 A1. **2001**.
- Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sci and Technol.* **2004**, 15, 330-347.
- Gould, G. W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection.* **1996**, 82-86.
- Grant, D. J., Higuchi, T. Solubility behaviour of organics compounds. Techniques of Chemistry, " Wiley Interscience Publication 21. **1990**.
- Green, B. K., Scheicher, L. Pressure Sensitive Record Materials. *US Patent* 2217 507. **1955**.
- Greenwald, C. D., King, C. J. The mechanism of particle expansion in spray-drying of foods. *AIChE symposium series.* **1982**, 218, 101-108.
- Guba, R. Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential. *Int J Aromather.* **2001**, 11, 76-83.
- Gülçin, I., Elmastas, M., Aboul-Enein, H. Y. Antioxidant activity of clove oil: a powerful antioxidant source. *Arab. J. Chem.* **2010**. In press.
- Guenther, E. The essential Oils. D. Van Nostrand, New York. **1948**.
- Guenther, E. The essentials Oils, Vol. I Robert. E., Krieger publishing company, NY. **1972**.
- Gulçin, I., Gungor, I., Beydenir, S. S., Elmastas, M., Kufrevioglu, I. Comparison of antioxidant activity of clove oil (*Eugenia caryophyllata Thunb*) buds and lavender (*Lavandulastoechas L.*). *Food Chem.* **2004**, 87, 393-400.
- Gunning, Y. M., Gunning, P. A., Kemsley, E. K. Factors affecting the release of flavours encapsulated in carbohydrate matrixes. *J Agric Food Chem.* **1999**, 47, 5198-5205.
- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L. Bell, H.C. 248 S. Burt. *Int J Food Microbiol.* **2004**, 94, 223-253.

- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L., Willey, S. G., Warmington, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Let. Appl. Microbiol.* **1998**, 26, 194-198.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Mill J Ethnopharmacol.* **2003**, 89-67-71.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 53, 1081-1085.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 50, 195-199.
- Hao, Y. Y., Brackett, R. E., Doyle, M. P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol.* **1998a**, 15, 367-378.
- Hara, H., Hashimoto, H. Antimicrobial and insect-repellent cyclodextrin films. *Kokai Patent JP 2002029901.* **2002**.
- 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.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J Food Protection.* **2003**, 66, 410-417.
- Harris, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int. J. Aromather.* **2002**, 12, 83-91.
- Hartman, P. E., Shankel, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol Mutagen.* **1990**, 15, 145-182.
- Hartmans, K. J., Diepenhorst, P., Bakker, W., Gorris, L. G. M. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plants diseases. *Industrial Crops and products.* **1995**, 4, 3-13.

- Haryani, S., A., Kunz, B. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules. *J Food Engin.* In Press.
- Hatae, S., Nakajima, K. Skin whitening cosmetics. *Jpn Kokai JP* 86109 705. **1986**.
- Hayashi, K., Kamiya, M., Hayashi, T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta Med.* **1995**, 61, 237–241.
- Hedges, R. A. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem Rev.* **1998**, 98, 2035–2044.
- Heelan, B. A., Corrigan, O. I. Preparation and evaluation of microspheres prepared from whey protein isolate. *J Microencap.* **1998**, 15, 93-105.
- Heinzelman, K., Franke, K. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloids and surfaces: Biointerfaces.* **1999**, 12, 223-229.
- Heinzen, C. Microencapsulation solve time dependent problems foodmakers. *Europ Food and drink rev.* **2002**, 3, 27-30.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Shandholm, T., Pol, I., Smid, E. J. Gorris, L. G. M., Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *J Agric Food Chem.* **1998**, 46, 3590-3595.
- Hidayat, T., Nurjannah, N. Racangan dan Pengujian prototype alata perontok bunga cengken Tipe axial. *Bull Litro.* **1992**, 2, 27-33.
- Higuchi, T., Connors, K. A. Phase solubility techniques. *Adv Anal Chem Instr.* **1965**, 4, 56-63.
- 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**.
- Hogan, S. A., Mc Namee, B. F., O’Riordan, E. D., O’Sullivan, M. Microencapsulating properties of whey protein concentrate. 75. *Food Engineering and Physical Properties.* **2001**, 66, 675-680.

- Holland, L., Rizzi, G., Malton, P. Cosmetic compositions comprising cyclic oligosaccharides and fragrance. *PCT Int Appl WO 67716*. **1999**.
- Hong, E. J., Na, K. J., Choi, I. G., Choi, K. C., Jeung, E. B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biol Pharm Bull*. **2004**, 27, 863–866.
- Hoskonen, P., Pirhonen, J. The effect of clove oil sedation on oxygen consumption of six temperate-zone fish species. *Aquacult Res*. **2004**, 35, 1002-1005.
- 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.
- Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K. Inhibitory effects of Sudanese medical plant extract on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytother Res*. **2000**, 14, 510-516.
- Iguchi, K., Sawai, H., Nishimura, H., Fujita, M., Yamori, T. New dolabellane-type diterpenoids from the Okinawan soft coral of the genus *Clavularia* *Bull Chem Soc Japan*. **2002**, 75, 131-136.
- Ilsey, S., Miller, H., Greathead, H., Kamel, C. Herbal sow diets boost pre-weaning growth. *Pig progress*. **2002**, 18, 4, 8-10.
- Imagi, J., Muraya, K., Yamashita, D., Adachi, S., Matsuno, R. Retarded oxidation of liquid lipids entrapped in matrixes of saccharides or protein. *Biosci Biotech and Biochem*. **1992**, 24, 289-297.
- Inane, Y., Kuan, F. H., Takahashi, Y., Ohújó, A., Structure and molecular dynamics of solid-state inclusion complexes of cyclodextrin and permethylated cyclodextrin with benzaldehyde studied by high-resolution CP/MAS ¹³C NMR. *J Incl Phen*. **1986**, 4, 281-290.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkcuoglu, M., Husnu Can Baser, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum oil* and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food Chem*. **2005**, 93, 551–556.
- 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.
- Ito, M., Murakami, K., Yoshino, M. Antioxidant action of eugenol compound: role of mental ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol.* **2005**, 43, 461-466.
- Jackson, L. S., Lee, K. Microencapsulation in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.* **1991**, 24, 289-297.
- Jacquot, M., Perneti, M. Spray drying coating processes. in: Cell Immobilization Biotechnology (edited by Nedovic and Willaert). Series: Focus on biotechnology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. **2003**, pp. 346-356.
- Jassim, S. A., Naji, M. A. A Review. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol.* **2003**, 95, 412-427.
- Jirovetz, L., Bunbauer, G., Stoyanova, A., Schmidt, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J Agric Food Chem.* **2006**, 54, 6303-6307.
- Jouen, E., Crouzet, J. Effect of pH on retention of aroma compounds by β -lactoglobulin. *J Agric Food Chem.* **2000**.
- Jouquand, C., Ducruet, V., Giampaoli, P. Partition coefficients of aroma compound in polysaccharide solution by the phase ratio variation method. *Food Chem.* **2004**, 85, 467-474.
- 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.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol.* **1994**, 76, 626-631.
- Kalab, M. Microstructure of dairy foods. 1. Milk products based on protein. *J dairy Sci.* **1979**, 62, 1352-1364.
- Kalembe, D., Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem.* **2003**, 10, 813-829.
- Karatsu, M. Antibacterial stretch packaging films for food. *Jpn Kokai JP* 04359029. **1992**.

- Karatzas, A. K., Kets, E. P. W., Smid, E. J., Bennik, M. H. J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol.* **2001**, 90, 463–469.
- Karoui, H., Tordo, P. ESR-spin trapping in the presence of cyclodextrins. Detection of PBN-superoxide spin adduct. *Tetra Lett.* **2004**, 45, 1043–1045.
- Kawashima, K. Prevention of discoloration of food colorants. *Jpn. Kokai JP 8071464*. **1980**.
- Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., Soto, C. G. The efficacy of clove oil as anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult Res.* **1998**, 29, 89–101.
- Keith, A. Factors governing surface morphology in spray-drying of foods. PhD thesis, University of California, Berkeley, CA. **1983**.
- Kenyon, M. M. Modified starch, maltodextrins, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food ingredients* (edited by S.J. Risch and G.A. Reineccius) ASC Symposium Series 590. Washington, DC: American Chemical Society. **1995**. pp. 43–50.
- Kenyon, M. M., Anderson, R. J. Maltodextrins and low-dextrose-equivalence corn syrup solid: production and technology for the flavour industry. *Flavour encapsulation* (edited by S.J. Risch and G. A. Reineccius). **1988**.
- Kerhof, P. J. A. M. The role of theoretical and mathematical modeling in scale-up. *Drying technol.* **1994**, 12, 1–46.
- Kim, B., Kim, J., Heo, M. Biological screening of 100 plants for cosmetic use. II. Antioxidant activity and free radical scavenging activity. *Int J Cosmet Sci.* **1997**, 19, 299–307.
- Kim, H. M., Lee, E. H., Hong, S. H. Purification and characterization of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **1998**, 284, 728–735.
- Kim, H. O., Hill, R. D. Modification of wheat flour dough characteristics with cyclodextrins. *Cereal Chem.* **1984**, 61, 406–407.
- Kim, Y. D., Morr, C. V. Microencapsulation properties of gum Arabic and several food proteins: spray dried orange oil emulsion particles. *J Agric Food Chem.* **1996**, 44, 1314–1320.

- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oils components. *Journal of essential Oil Research*. **1989**, 1, 119-128.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H. M., Vogenschow, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin. **1986**, pp. 429-445.
- Koedam, A. Antimikrobielle Wirksamkeit a therischer: Eine Literaturarbeit 1960-1976. Fortsetzung und Schluss. Riechstoffe, Aromen, Kosmetica. **1977a**, 27, 36-41.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Kustrak, D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*). *Acta Pharm*. **2005**, 55, 377-385.
- Kouidi, B., Zmantar, T., Backhrouf, A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. *Ann Microbiol*. **2010**, 10, 92-96.
- 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.
- Kuge, T., Takeo, K. Complexes of starchy materials with organics compounds: Part I. Affinity observed by gas chromatography. *Agricultural and biological Chemistry*. **1968**, 32, 753-758.
- Kuo, M. L., Lee, K. C., Lin, J. K. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3- carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. *Mutat Res*. **1992**, 270, 87-95.
- Kurokawa, M., Hozumi, T., Basnet, P. Purification and characterization of eugenin as an antiherpesvirus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *J Pharmacol Exp ther*. **1998**, 284, 728-735.
- 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.
- Labell, F. Co-crystalization process aids dispersion and solubility. *Food processing*. **1991**, 52, 60-63.

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., Nychas, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microb.* **2001**, 91, 453-462.
- Larshini, M., Oumoulid, L., Lazreck, H. B., Wataleb S., Bousaod, M., Bekkouche, K., Jana M. Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother Res.* **2001**, 15, 250-252.
- 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.
- Lazutka, J. R., Mierauskien, J., Slap, G., Dedonyt, V. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol.* **2001**, 39, 485-492.
- Lee, S. L., Kim, M. H., Kim, C. K. Encapsulation of ethanol by spray-drying technique: effects of sodium lauryl sulfate. *Int J Pharmac.* **1999**, 187, 193-198.
- Lemay, M. J., Choquette, J., Delaquis, P. J., Garie'py, C., Rodrigue, N., Saucier, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology.* **2002**, 78, 217-226.
- Liu, C. J., Chen, C. L., Chang, K. W., Chu, C. H., Liu, T. Y. Safrole in betel quid may be a risk factor for hepatocellular carcinoma: case report. *Can Med Ass J.* **2000**, 162, 359-360.
- Loewenfeld, C. Back, P. Guía de las hierbas y especias. Eds. Omega. Barcelona. **1980**.
- 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 tridosan 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., Stefánsson, E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug Devel Ind Pharm.* **1997**, 23, 473–481.
- Loh, Z. H., Liew, C.V., Lee, C. C, Heng, P. W. S. Microwave-assisted drying of pharmaceutical granules and its impact on drug stability. *Int J Pharm.* **2008**, 359, 53–62.
- Longmore, A. P. Advances in vacuum and freezing drying. *Food process Industry.* **1971**, 40, 46–49.
- 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.
- Lubbers, S., Landy, P., Voilley, A. Retention and release of aroma compounds in food containing proteins. *J Food Technol.* **1998**, 52, 68–74.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón-Hernández, J. A., Núñez-Delicado, E. Encapsulation of quercetina and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *J. Agric Food Chem.* **2008a**, 56, 255–259.
- 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.
- Maji, T. I., Baruah, I., Dube, S., Hussain, M. Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology.* **2007**, 98, 840–844.
- Manabe, A., Nakayama, S., Sakamoto, K. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *Japanese J Pharmacol.* **1987**, 44, 77–84.
- Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Baqchi, D., Preuss, H. G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol Cel Biochem.* **2001**, 228, 111–117.

- Maralhas, A., Monteiro, A., Martins, C., Kranendonk, M., Laires, A., Rueff, J., Rodrigues, A. S. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. *Mutagen*. **2006**, 21, 199–204.
- Marino, M., Bersani, C., Corni, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int J Food Microbiol*. **2001**, 67, 187–195.
- Markowitz, K., Moynihan, M., Liu, M., Kim, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. **1998**, 73, 729–737.
- 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 Chem Acta*. **1985**, 170, 95–100.
- Martins, A., Craveiro, A., Machado, M., Raffin, F., Moura, T., Novák, C., Éhen, Z. Preparation and characterization of *Mentha x villosa* Hudson oil- β -cyclodextrin complex. *J Thermal Anal Calorim*. **2007**, 88, 363–371.
- 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.
- Massoti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., Viano, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem*. **2003**, 51, 7115–7121.
- Mc Namee, B. F., O'Riordan, E. D., O'Sullivan, M. Emulsification and microencapsulation properties of gum Arabic. *J Agric Food Chem*. **1998**, 46, 4551–4555.
- Mc Mahon, M. A., Blair, I. S., Moore, J. E., McDowell, D. A. Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. *J Antimicrob Chemother*. **2007**, 59, 125–127.
- Mejlholm, O., Dalgaard, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. **2002**, 34, 27–31.

- Mendoza-Yepes, M. J., Sanchez-Hidalgo, L. E., Maertens, G., Marin-Iniesta, F. Inhibition of *Listeria Monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *J Food Safety*. **1997**, 17, 47-55.
- Mercader-Ros, M. T., Lucas-Abellán, C., Gabaldón, J. A., Fortea, M. I. Matínez-Cachá, A., Núñez-Delicado, E. Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH. *J Agric Food Chem*. **2010**, 58, 4675-4680.
- Mihara, S., Shibamoto, T. Photochemical reactions of eugenol and related compounds: Synthesis of the new flavor chemicals. *J Agric Chem*. **1982**, 30, 1215-1218.
- Milind, P., Deepa K. Clove: a champion spice. **2011**, 45-47.
<http://www.ijrap.net/issue-three/47-54.pdf>
- Miller, E. C., Swanson, A. B., Phillips, D. H., Fletcher, T. L., Liem, A., Miller, J. A. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res*. **1983**, 43, 1124-1134.
- Minemoto, Y., Adachi, S., Matsumo, R. Comparison of oxidation of menthyl linoleate encapsulated with gum arabic by hot air drying and freeze drying. *J Agric Food Chem*. **1997**, 45, 4530-4534.
- Minemoto, Y., Adachi, S., Matsuno, R. Autoxidation of linoleic acid encapsulated with polysaccharides of differing weight ratio. *Biosci Biotech and Biochem*. **1999**, 63, 4530-4534.
- Minemoto, Y., Adachi, S., Matsuno, R. Comparison of oxidation of menthyl linoleate encapsulated with gum arabic by hot air-drying and freeze drying. *J Agric Food Chem*. **1997**, 45, 4530-4534.
- Mistry, V. V., Hassan, H. N., Robinson, D. J. Effect of lactose and protein on microstructure of dried milk. *Food structure*. **1992**, 11, 73-82.
- Mizawaya, M., Hisama, M. Suppression of chemical mutagen induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002 umu test. *J Agric Food Chem*. **2001**, 49, 4019-4025.
- Mohit, V., Harshal, G., Neha, D., Vilasraro, K., Rajashree, H. A comparative study of complexation methods for cefdinir-hydroxypropyl- β -cyclodextrins system. *J Incl Phenom Macrocyclic Chem*. **2010**, DOI 10.1007/s 10847-010-9901-6.

- Moleyar, V., Narasimham, P. Antibacterial activity of essential oil components. *Int J of Food Microbiol.* **1992**, 16, 337–342.
- Moreau, D. L., Rosenberg, M. Porosity of whey protein based microcapsules consisting of whey protein and lactose measured by gas displacement pycnometry. *J Food Sci.* **1999**, 64, 405–409.
- Moreau, D. L., Rosenberg, M. Microstructure and fat extractability in microcapsules based on whey proteins or mixtures of whey proteins and lactose. *Food Struct.* **1993**, 12, 457–468.
- Moreau, D. L., Rosenberg, M. Oxidative stability of anhydrous milkfat microencapsulated in whey proteins. *J Food Sci.* **1996**, 61, 39–43.
- Moreau, D. L., Rosenberg, M. Porosity of whey protein based microcapsules containing anhydrous milkfat measured by gas displacement pycnometry. *J Food Sci.* **1998**, 63, 819–823.
- Mouchrek, V. Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dióica Lindl, PhD Thesis. Universidad de São Paulo, Brazil. **2000**.
- Mourey, A., Canillac, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control.* **2002**, 13, 289–292.
- 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.
- Muñoz-Botella, S., Del Castillo, B., Martín, M. A. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars Pharm.* **1995**, 36, 187–198.
- Mutka, J. R., Nelson, D. B. Preparation of encapsulated flavors with high flavors. *Food Tech.* **1998**, 45, 144–147.
- Mytle, N., Anderson, G. L., Doyle, M. P., Smith, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control.* **2006**, 17, 103–107.

- Nacsá, A., Ambrus, R., Berkesi, O., Szabo-Révesz, P., Aigner, Z. Water-soluble loratadine inclusion complex: Analytical control of the preparation by microwave irradiation. *J Pharm Biom Anal.* **2008**, 48, 1020-1023.
- Nagata, T. Techniques of application of electron microscopic radioautography. *J Electron Microsc.* **1996**, 45, 258-274.
- Nakagawa, K., Iwamoto, S., Nakajima, M., Shono, A., Satoh, K. Icrochannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. *J colloids and Interface Sci.* **2004**, 278, 198-205.
- 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.
- Namiki, M. Antimutagen and anticarcinogen research in Japan. Food phytochemical for cancer prevention III. Rosen RT (eds) Maple Press: York. **1994**. pp 64-68.
- Neely, A. N., Maley, M. P. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *J Clin microbiol.* **2000**, 38, 724-726.
- Novgorodov, S. A., Gudź, T. I. Permeability transmission pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J Bioenerg Biomembr.* **1996**, 28, 134-146.
- Núñez, L., D'Aquino, M., Chirife, J. Antifungal properties of essential clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. *Braz J Microbiol.* **2001**, 32, 123-126.
- Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A. J., López-Nicolás, J. M. Polyphenol oxidase from dominga table grape. *J Agric 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. Hidroperoxidase activity of lipoxigenase in the presence of cyclodextrins. *Arch Biochem Biophys.* **1999b**, 367, 274-280.
- Nurdjanaah, N., Bermawie, N. Handbook of herbs and spices Cambridge. **2000**.

- Nychas, G. J. E. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.). *New Methods of Food Preservation*. Blackie. Academic and Professional, London. **1995**, pp. 58–89.
- O'Brien, D. J. Treatment of psoroptic mange with reference to epidemiology and history. *Veter Parasitol.* **1999**, 83, 177–185.
- Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., Endo, T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem Pharm Bull.* **2000**, 48, 1467–1469.
- Ogunwande, I. A., Olawore, N. O., Ekundayo, O., Wlaker, T. M., Schmidt, J. M., Setzer, W. N. Studies on the essentials oils compositions, antibacterial and citotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *Int J Aromather.* **2005**, 15, 147–152.
- 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.
- Ota, T., Takeda, F. Cyclodextrins as cheese additives. *Patent Kokai JP* 8175060. **1981**.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., Bégin, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int J Food Microbiol.* **1997**, 37, 155–162.
- Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* **2006**, 69, 1046–1055.
- Ozturk, A., Ozbek, H. The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oils: an animal model of anti-inflammatory activity. *Eur J Gen Med.* **2005**, 2, 159–163.
- Pagington, J. S. Beta-cyclodextrins. *Perfumer Flavorist.* **1986**, 11, 49–58.
- Pandit, V. A., Shelef, L. A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiol.* **1994**, 11, 57–63.
- Park, I. K., Shin, S. C. Fumigant activity of plants essentials oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove oil bud (*Eugenia caryophyllata*) oils

- against the japanese termite (*Reticulitermes speratus*). *J Agric Food Chem.* **2005**, 53, 4388-4392.
- Pauli, A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med Res Rev.* **2006**, 26, 223-268.
- Pawar, V. C., Thaker, V. S. *In vitro* efficacy of 75 essentials oils against *Aspergillus Niger* Micoses. **2006**, 49, 316-323.
- Periago, P. M., Moezelaar, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the variability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol.* **2001**, 68, 141-148.
- Periago, P. M., Palop, A., Fernandez, P. S. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Sci and Technol Int.* **2001**, 7, 487-492.
- Perry, N. S., Bollen, C., Perry, E. K., Ballard, C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol Biochem Behav.* **2003**, 75, 651-659.
- Pédrovic, G.M., Stojanovic, G. S., Radulovic, N. Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. *J Med Plants Res.* **2010**, 4, 1382-1390.
- Pichersky, E., Noel, J. P., Dudareva, N. Biosynthesis of plants volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science.* **2006**, 311, 808-811.
- Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N., Tzakou, O. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J Agric Food Chem.* **2002**, 50, 6688-6691.
- 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.
- Plackett, D., Holm, V., Johansen, P., Ndoni, S., Nielsen, P., Sipilainenmalm, A., Sodergard, A., Vertichel. Characterization of l-poly lactide and l-poly lactide-polycaprolactone co-polymer films for use in cheese-packaging application. *J Appl Polymer Sci.* **2006**, 19, 1-24.
- Pol, I. E., Mastwijk, H. C., Slump, R. A., Popa, M. E., Smid, E. J. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *J Food Protection.* **2001**, 64, 1012-1018.

- Porter, J. W., Spurgeon, S.L., Byosynthesis of isoprenoid compounds. Wiley Interscience. Vol. I, N.Y. **1981**.
- Prasad, N., Strauss, D., Reichart, G. Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals. *European Patent*. 1084625. **1999**.
- Prasad, R. C., Herzog, B., Boone, B., Sims, L., Waltner-Law, L. An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *J Ethnopharmacol*. **2005**, 96, 295-301.
- Purseglove, J. W., Brown, E. G., Green, C. L., Robins, S. R. J. Spices, Longman and New York. **1991**, 1, 229-285.
- Qi, Z. H., Xu, A. Starch-based ingredients for flavour encapsulation. *Cereal Foods World*. **1999**, 44, 460-465.
- Quellet, C., Schudel, M., Rinngerberg, R. Flavours and fragrance delivery systems. *Chimia*. **2001**, 55,421-428.
- Qui, Z. H., Hedges, A. R. Use of cyclodextrins for flavors. In: Flavor technology: physical chemistry, Modification and Process (edited by C. T. Ho and C. H. Tong) pp. 231-243. ACS Symposium Series 610. Washington DC: American Chemical Society. **1995**.
- Rafii, F., Shahverdi, A. R. Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantoin against enterobacteria. *Chemotherapy*. **2007**, 53, 21-25.
- Ramel, C., Alekperov, U. K., Ames, B. N., Kada, T., Wattenberg, L. W. International Commission for Protection against environmental mutagens and carcinogens. ICPEMC Publication N_ 12. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutat Res*. **1986**, 168, 47-65.
- Rao, B. P., Zurréis, S., Balasangameshwer, C. N. Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- β -cidodextrina y β -ciclodextrina de rifampicina. *Ars Pharm*, 2006, 47, 37-59.
- Rao, B. P., Zurréis, S., Balasangameshwer, C. N. Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- β -cidodextrina y β -ciclodextrina de rifampicina. *Ars Pharm*, **2006**, 47, 37-59.

- Ratledge, C., Wilkinson, S. G. An overview of microbial lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S. G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, London. **1988**, pp 3-22
- Reichling, J., Koch, C., Stahl-Biskup, E., Sojka, C., Schnitzler, P. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Med.* **2005**, 71, 1123-1127
- Reineccius, G. A., Flavour encapsulation. *Food rev int.* **1989**, 5, 147-176.
- Reineccius, G. Natural Flavouring Materials. Sourcebooks of flavours, Champman and Hall, New York. **1994**, 2, 286.
- Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., Peppard, T. L. Flavour release from cyclodextrins complex: comparison of alpha, beta and gamma types. *J Food Sci.* **2003**, 68, 1234-1239.
- Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., Peppard, T. L. The effect of solvent interactions on α -, β - and γ -cyclodextrins/flavour molecular inclusion complexes. *J Agric Food Chem.* **2005**, 53, 388-392
- Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., Peppard, T. L. Encapsulation of flavours using cyclodextrins: comparison of flavour retention in alpha, beta and gamma types. *J Food Sci.* **2002**, 67, 3271-3279.
- Reineccius, T. A., Risch, S. J. Encapsulation of artificial flavours by β -cyclodextrin. *Perfumer of flavorist.* **1986**, 11, 1-11.
- Reineccius, G. A., Coulter, S. T. Flavour retention during drying. *J Dairy Sci.* **1969**, 25, 1219-1224.
- Reineccius, G. A. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Tech.* **1991**, 45, 144-147.
- Risch, S. J., Reineccius, G. A. Spray Dried orange oil effect of emulsion size on flavour retention and shelf life. S. J. Risch, G. A. ACS Symp. Ser. *Flavor encapsul.* **1998**, 70, 67-77.
- Ritcher, C., Schlegel, J. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Toxicol Lett.* **1993**, 67, 119-127.
- Roller, S., Seedhar, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwi fruit at 4 °C and 8 °C. *Letters in Applied Microbiology.* **2002**, 35, 390-394.

- Rosenberg, M. Milk derived whey protein-based microencapsulating agent and a method of use. *US Patent 5601760*. California Corporation, Oakland, CA. **1997**.
- Rosenberg, M., Kopelman, I. J., Talmon, Y. Factors affecting retention in spray drying encapsulation of volatile material. *J Agric Food Chem.* **1990**, 38, 1288-1294.
- Rosenberg, M., Lee, S. Y. Microstructure of anhydrous milkfat/ whey proteins emulsions. *Foodstructure.* **1993**, 12, 267-274.
- Rosenberg, M., Sheu T. H. Microencapsulation of volatiles by spray drying in whey-protein wall system. *Int Dairy J.* **1996**, 6, 273-284.
- Rosenberg, M., Young, S. L. Whey protein as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat structure evaluation. *Food struct.* **1993**, 12, 31-41.
- Rota, C., Carraminana, J. J., Burillo, J., Herrera, A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J Food Prot.* **2004**, 67, 1252-1256.
- Roubach, R., Gómez, L. C., Fonesca, F. A., Val, A. L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colosoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult Res.* **2005**, 36, 1056-1061.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem.* **2005**, 91, 621-632.
- Saenger, W. Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. In *Inclusion Compounds*, edited by Atwood, U. L., Davies, J. E., McNicol, D. D. **1984**, 2, 231-259.
- Saitô, H., Izumi, G., Mamizuka, Suzuki, S., Tabeta, R. A ^{13}C cross polarization-magic angle spinning (CP-MAS) NMR study of crystalline cyclohexa-amylose inclusion complexes. Conformation-dependent ^{13}C chemical shifts are related to the dihedral angles of glycosidic linkages. *J Chem Soc Chem Commun.* **1982**, 1386-1388.
- Sallie, R., Tredger, J. M., William, R. Drugs and the liver. Biopharmaceutics and drugs disposition. **1991**, 12, 251-259.

- Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimaraes, L. G., Mendonca, L. Z., Soares, M. J. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **2007a**, 116, 283–290.
- Santoro, G. F., Das Gracas-Cardoso, M., Guimaraes, L. G., Salgado, A. P., Menna-Barreto, R. F., Soares, M. J. Effect of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on Trypanosoma cruzi (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res.* **2007b**, 100, 783–790.
- 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.
- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad Sci.* **1949**, 51, 660–672.
- Schardinger, F. Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Microben. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Abt. II.* **1911**, 29, 188–197.
- Schardinger, F. Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Z. Untersuch Nahr Genussm.* **1903**, 6, 865–880.
- Schardinger, F., *Wien. Klin. Wochenschr.* **1904**, 17, 207–209.
- Schiest, F. P., Ayase, M., Paulus, H. F., Löfstedt, C., Hasson, B. S., Ibarra, F., Franke, W. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*). *J compare Physiol A.* **2000**, 186, 567–574.
- Schmid, G. Cyclodextrin glucanotransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* **1989**, 7, 244–248.
- Schmid, R. A resolution of the *Eugenia-Syzygium* controversy (*Myrtaceae*). *Am J Botany.* **1972**, 59, 423–436.
- Schneiderman, E., Stalcup, A. M. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J Chromatogr B.* **2000**, 745, 83–102.
- Schrooyen, P., Meer, P., Kruif, C. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society.* **2001**, 4, 475–479.

- Shahidi, F., Han, X. Q. Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci and Nutrit.* **1993**, 33, 501-547.
- Sharma, N., Trikha, P., Athar, M., Raisuddin, S. Inhibition of benzo (a) pyrene- and cyclophosphamide-induced mutagenicity by Cinnamomum cassia. *Mutat. Res.* **2001**, 179-188.
- Shaw, P. E., Wilson, C. W. Debittering of citrus juices with cyclodextrin polymer. *J Food Sci.* **1983**, 48, 646-647.
- Shelef, L. A. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Saf.* **1983**, 6, 29-44.
- Shen Y., Yang, S., Wu, L., Ma, X. Study on the structure and characterization of inclusion complex of gossypol/beta cyclodextrin. *Spectrochem Acta.* **2005**, 61, 1025-1028.
- Sheu T.H., Rosenberg, M. Microencapsulation by Spray Drying Ethyl Caprylate in Whey Protein and Carbohydrates wall Systems. *J Food Sci.* **1995**, 60, 98-103.
- Sheu, T. Y., Rosenberg, M. Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *J Food Sci.* **1998**, 63, 491-494.
- Shukri, R., Mohamed, S., Mustapha, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. *Food Chem.* **2010**, 122, 1116-1121.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R., Du, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J Appl Microbiol.* **2006**, 100, 296-305.
- 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.
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., Poolman, B. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem.* **1994**, 269, 8022-8028.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., Matos, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essentials oils of Eucalyptus. *J Ethnopharmacol.* **2003**, 89, 277-283.
- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv.* **2002**, 20, 341-359.

- Sirisoma, N. S., Hold, K. M., Casida, J. E. Alpha and beta thujones (herbal medicines and food additives): synthesis and analysis of hydroxy and dehydro metabolites. *J Agric Food Chem.* **2001**, 49, 1915-1921.
- Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *J Appl and Environ Microb.* **2000**, 66, 1646–1653.
- Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J Appl Microbiol.* **2001**, 91, 1011–1022.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology.* **1998**, 26, 118–122.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* **2001**, 18, 463–470.
- Sojo, M. M., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem.* **1999**, 47, 518-523.
- Solms, J. Interaction of non-volatile and volatile substances in food. In: interactions of food components (edited by G.G. Birch M. F. Lindley). London: Elsevier. **1986**. pp. 189-210.
- Somaatmadja, D. Prospek Pengembangan Industri Oleoresin di Indonesia. BBIHP. **1981**.
- Sonboli, A., Babakhani, B., Mehrabian, A. R. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z. Naturforsch.* **2006b**, 61, 160–164.
- Sonboli, A., Eftekhari, F., Yousefzadi, M., Kanani, M.R. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. from Iran. *Z. Naturforsch.* **2005**, 60c, 30–34.
- Sonboli, A., Mirjalili, M. H., Hadian, J., Ebrahimi, S. N., Yousefzadi, M. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz.) Rech. *Z. Naturforsch.* **2006a**, 61c, 677–680.

- Soottitantawat, A., Takayama, K., Okamura, K., Muranaka, D., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M., Linko, P. Microencapsulation of l-menthol by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **2005**, 6 (2), 163-170.
- Soper, J. C. Utilization of coacervated Flavors. ACS Symposium Series 590. Washington, DC. American Chemical Society. **1995**, 104-112.
- Soto, C. G., Burhanuddin, S. Clove oil as a fish anesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquacult.* **1995**, 136, 149-152.
- Souto, A. Resveratrol Complex and process for preparation. *Patent WO 012551*. **2009**.
- Srivastva, K. V. Antiplatelet principles from a food spice clove (*Syzgium aromaticum* L). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **1993**, 48, 362-372.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H. L., Von Wright, A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem Toxicol* **1999**, 37, 813-823.
- Stecchini, M. L., Sarais, I., Giavedoni, P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection*. **1993**, 56 (5), 406-409.
- Summerfelt, R. C., Smith, L. C. Anesthesia, surgery and related techniques. In schreck, C. B. and P. B: Moyle eds. *Methods for Fish Biology*. American fisheries society, Bethesda, M.D. **1990**, 213-272.
- 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. **1985**, 213-214.
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chem Rev* **1998**, 98, 1743-1753.
- 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. *J 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.
- Szepes, A., Hasznos-Nezdei, M., Kovács, J., Funke, Z., Szabó-Révész, P., Ulrich, J. Microwave processing of natural biopolymers-studies on the properties of different starches. *Int J Pharm.* **2005**, 302, 166-171.
- Tampieri, M. P., Galuppi, R., Macchioni, F. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycophatolog.* **2005**, 159, 339-345.
- Tari, T. A., Singhal, R. S. Starch based spherical aggregates: reconfirmation of the role of amylase on the stability of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrates Polymers.* **2002**, 50, 279-282.
- Tassou, C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *J App Bacteriol.* **1995**, 78, 593–600.
- Tatsuya, S. Stabilisation of fragrance in bathing preparations. *Japanese Patent 11209787.* **1999**.
- Teixera, M. I., Andrade, L. L. R., Farina, M., Rocha-Leao, M. H. M. Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. *Mat Sci Engineering.* **2004**, 24, 653-658.
- Tomas, D. J., Atwell, W. A. Starches. St Paul. MN: Eagan Press. **1999**.
- Torres, L. M. E., Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M. J., Gil Pinilla, M. Volatile constituents of two *Salvia* species grown wild in Spain. *J Ess Oil Res.* **1997**, 9, 27-33.
- Torres-Labandeira, J. J., Davignon, P., Pitha, J. Oversaturated solutions of drug in hydroxypropylcyclodextrins: parenteral preparation of pancratistatin. *J Pharm Sci.* **1990**, 80, 384–386.
- Trayler, R. J. Nucleosynthesis and the origin of the elements. *Phil Trans R Soc Lond.* **1988**, 325, 391-403.
- Trinh, J., Dodd, T. M., Bartolo, R., Lucas, J. M. Cyclodextrin based compositions for reducing body odour. *US Patent 5,897,855.* **1999**.

- Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Apiwathnasorn, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytoter Res.* **2005**, 19, 303-309.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G. J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *J Appl Microbiol.* **2000**, 89, 901-909.
- Tuley, L. Breaking free update on controlled flavour release. *International Food Ingredients.* **1996**, 3, 14-18.
- Turina, A. V., Nolan, M. V., Zygodlo, J. A., Perillo, M. A., Natural Terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem.* **2006**, 122, 101-113.
- Uekama, K., Adachi, H., Irie, T., Yano, T., Saita, M. Improved transdermal delivery of prostaglandin E1 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.
- Ultee, A., Bennik, M. H., Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* **2002**, 68, 1565-1568.

- Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoeskstra, F. A., Smid, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Appl Environ Microbiol.* **2000a**, 174, 233-238.
- Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., Smid, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J Food Protection.* **2000b**, 63, 620-624.
- Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews.* **1992**, 56, 395-411.
- Valero, D., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Serrano, M. The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety, and functional properties of table grapes. *Postharv Biol Technol.* **2006**, 41, 317-327.
- Van de Braak, S. A. J., Leijten, G. C. J. J. Essentials oils and oleoresins: A survey in Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam. **1999**. pp 116.
- Van Krimpen, M. M., Binnendijk, G. P. Rodapiar® as native for antimicrobial growth promoter in diets of weanling pigs. Lelystad, Praktijkonderzoek Veehouderij. ISSN 0169-3689. **2001**. pp 14.
- Van Wellie, R. T. H. Alle cosmetic ingredienten en hun functies. Nederlandse Cosmetica Vereniging, Nieuwegein. **1997**. pp. 126.
- Vargas, A. P., Bottia, E. J. S. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies cultivadas en los municipios de Bolívar y el Peñón-Santander, Colombia. Tesis Doctoral. Universidad Industrial de Santander. Colombia. **2008**.
- Vercesi, A. E., Kowaltowski, A. J., Grijalba, M. T., Meinicke, A. R., Castilho, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep.* **1997**, 17, 43-52.
- Versic, R. J. Flavor encapsulation: an overview. In: Flavour Encapsulation (edited by Risch, S. J. and Reineccius, G. A.). ACS Symposium Series 370. Washington, DC: American Chemical Society. **1988**, pp. 1-6.
- Villiers A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend Acad Sci.* **1891**, 112, 536-538.

- Vrinda K., Garg S. R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microb.* **2001**, 18-647-650.
- Wagner, B. D., Fitzpatrick, S. J. A comparison of the host-guest inclusion complexes of 1, 8,-ANS in parent and modified cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocyclic Chem.* **2000**, 38, 467-478.
- Wagner, C. W., Wilson, C. W., Shaw, P. E. Reduction of grape fruit bitter components by cyclodextrin polymers. *J Food Sci.* **1988**, 53, 516-518.
- Wagner, E., Arndt, R., Hilton, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methasulfonate or carbon dioxide. *Aquacult.* **2002**, 211, 353-366.
- Wagner, G. N., Singer, T. D., McKinley, R. S. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult Res.* **2003**, 34, 1139-1146.
- Waleczek, K. J., Cabral-Marques, H. M., Hempel, B., Schmidt, P. C. Phase solubility studies of pure α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrins. *Europ J Pharmac Biopharmac.* **2002**, 55, 247-251.
- Wampler, D. J. Flavor encapsulation: a method for providing maximum stability for dry flavor systems. *Cereal Foods World.* **1992**, 37, 817-820.
- Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Appl Microbiol.* **1998**, 84, 152-158.
- Wang, S. Y., Chen, P. F., Chang, S. T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Biores Technol.* **2005**, 96, 813-818.
- Watanabe, Y., Fang, X., Minemoto, Y., Adachi, S. Matsuno, R. Supressive effect of saturated L-ascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated with maltodextrins or gum Arabic by spray drying. *J Agric Food Chem.* **2002**, 27, 3984-3987.
- Waters, M. D., Stack, H. F., Jackson, M. A., Brockman, H. E., De Flora, S. Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. *Mutat Res.* **1996**, 350, 109-129.

- Waterstrat, P. R. Induction and recovery from anaesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. *J World Aquacult Soc.* **1999**, 30, 250-255.
- Weissinger, W. R., Mc Watters, K. H., Beuchat, L. R. Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. *J Food Protect.* **2001**, 64, 442-450.
- Wen X., Tan, F., Jing, Z., Liu, Z. Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvediol with β -cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal.* **2004**, 34, 517-523.
- Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M. Inhibition of amino acid de-carboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Protect.* **1995**, 58, 280-283.
- Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., Cavanagh, H. M. A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *J Agricult and Food Chem.* **2003**, 51, 76-81.
- William, P. A., Philips, G. O. Gum Arabic . *Handbook of hydrocolloids* (edited by G. O. Phillips and P. A. Williams Cambridge). **2000**. pp 155-168.
- Williams, L. R., Stockley, J. K., Yan, W., Home, V. N. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. *Int J Aromather.* **1998**, 8, 30-40.
- 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 5942217*. **1999**.
- Wyllie, S. G., Warmington, J. R., Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology.* **1998**, 26, 194-198.
- Yang, Y. C., Lee, S. H., Lee, W. J., Choi, D. H., Ahn, Y. J. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. *J Agric Food Chem.* **2003**, 51, 84-88.
- Yang, Y., Song, L. X. Study on the inclusion compounds of eugenol with α -, β -, γ and heptakis (2, 6-di-O-methyl) β -cyclodextrins. *J Incl Phenom Macroc Chem.* **2005**, 53, 27-33.
- Yoo, C. B., Han, K. T., Cho K. S., Ha J., Park, H. J., Nam, J. H., Kij, U. H., Lee, K. T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a

- reactive oxygen-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer let.* **2005**, 225, 41-52.
- Yoon, H. S., Moon, S. C., Kim, N. D., Park, B. S., Jeong, M. H., Yoo, Y. H. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 276, 151-156.
- Yoshii, H., Furuta, T., Okita, E., Toyomi, A., Linko, Y-Y, Linko P. The increased effect of kneading on the formation of inclusion complexes between α -limonene and β -cyclodextrins at low water content. *Biosci Biotech Biochem.* **1998a**, 62, 464-468.
- Yoshii, H., Sootitawat, A., Liu, X. D., Atarashi, Furuta, T., Aishima, M. O., Linko, P. Flavor release from spray-dried maltodextrins/gum Arabic or soy matrices as a function of storage. *Innov Food Sci Emerg Technol.* **2001**, 55-61.
- Young S. L., Sarda, X., Rosenberg, M. Microencapsulating properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *J Dairy Sci.* **1993a**, 76, 2868-2877.
- Young, S. L., Sarda, X., Rosenberg, M. Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey protein with carbohydrates. *J Dairy Sci.* **1993b**, 76, 2868-2877.
- Yu, E. K. Novel decaffeination process. *Appl Microbiol Biotechnol.* **1988**, 28, 546-552.
- Zani, F., Massino, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M., Vampa, G., Bellotti, A., Mazza, P. Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta Med* **1991**, 57, 237-241.
- Zeller, B. L., Salleb, F. Z. Production of microporous sugars for adsorption of volatile flavours. *J Food Sci.* **1996**, 61-749-759.
- Zhan, H., Jiang, Z., Wang, Y. R., Dong, T. Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with β -cyclodextrins and its derivatives. *Europ Food Res Tech.* **2008**, 227, 1507-1513.
- Zhao, D., Liao, K., Ma, X., Yan, N. Study of supramolecular inclusion of β -cyclodextrins with andrographolide. *J Incl Phenom Macroc Chem.* **2002**, 43, 259-264.

- Zhao, D., Yang, S. G., Ma, X., Yan, N. Structural of supramolecular inclusion complex of andrographolide with β -cyclodextrins prepared under microwave irradiation. *Chi Che Lett.* **2003**, 14, 155-158.
- Zhou, S., Koh, H. L., Gao, Y., Gong, Z. Y., Lee, E. J. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci.* **2004**, 74, 935-968.

