



UNIVERSIDAD CATÓLICA  
SAN ANTONIO  
**UCAM**

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

Departamento de Tecnología de la  
Alimentación y Nutrición

Estudio de la complejación del resveratrol por  
diferentes tipos de ciclodextrinas

Carmen Lucas Abellán

Directores: Dra. Estrella Núñez Delicado  
Dr. José Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, noviembre 2009





## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

La Dra. D<sup>a</sup>. Estrella Núñez Delicado y el Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández como Directores<sup>(1)</sup> de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de la complejación del resveratrol por diferentes tipos de ciclodextrinas**” realizada por D<sup>a</sup>. Carmen Lucas Abellán en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite como compendio de publicaciones** 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 2 de Noviembre de 2009.

Dra. D<sup>a</sup>. Estrella Núñez Delicado

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

<sup>(1)</sup> Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.

Vº Bº Comisión de Doctorado





Los trabajos de investigación recogidos en la presente memoria han sido financiados por los siguientes proyectos:

- Desarrollo de la metodología básica de encapsulación en ciclodextrinas de compuestos polifenólicos para el diseño y formulación de alimentos funcionales (03025/PPC/05), financiado por la Fundación Séneca.
- Ciclodextrinas como agentes complejantes de compuestos bioactivos (AGL2006-08702/ALI), financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia.

El firmante de esta memoria ha disfrutado de una Beca predoctoral de Formación de Personal investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia (Bes-2007-16082).

Murcia 26 de Noviembre de 2009-11-30

Fdo. Carmen Lucas Abellán

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](mailto:tercerciclo@pdi.ucam.edu)



*A Jesúaldo, el pilar de mi vida,  
gracias a ti mi vida tiene sentido.*

*A mis padres, que siempre han confiado en mi.  
gracias ha vosotros he conseguido  
ser la persona que soy.*



Llegado este momento hay muchas personas a las que debo agradecer que esta Tesis Doctoral haya podido realizarse.

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral, la Dra. Estrella Núñez Delicado y el Dr. José Antonio Gabaldón Hernández, por la confianza que siempre han depositado en mí y por su total dedicación para que fuera posible el desarrollo de esta tesis.

A Estrella, mi máximo referente en el trabajo, gracias a ella he conseguido llegar hasta aquí. Ella fue quien despertó mi interés por la investigación y apostó por mi formación. Gracias por confiar en mí y por ser mi amiga y mi mentora.

A José Antonio Gabaldón, gracias por todos los consejos, por trasmitirme tus conocimientos, por tu esfuerzo para que siempre estemos bien.

A mi Anica, mi máximo apoyo, mi gran amiga, una persona que lo deja todo por ayudarte o simplemente escucharte sin esperar nada a cambio. Por esos momentos que hemos pasado juntas, que han sido muchos, y se que siempre podré contar con tu amistad y ayuda.

A mi Isabelita, por su amistad incondicional, por sus consejos, ayuda en el trabajo, por esas risas que nos hemos echado en le laboratorio. Gracias a ti he aprendido a ser mejor persona en muchos sentidos.

A Maite, mi compañera y amiga, gracias por estar siempre de buen humor, por el apoyo y ayuda en la investigación y la complicidad en los buenos y malos momentos.

A Santiago, por su complicidad, ayuda y apoyo incondicional, gracias a el solucionamos muchos problemas que se nos plantean a lo largo del día.

A Pilar y Patricia, por su alegría y compañerismo en el día a día, por el apoyo mostrado en todo momento.

A Gabi por su ayuda en el laboratorio, por esos momentos que hemos pasado, por tu sustos y chaparrones de agua destilada, gracias por esos momentos.

A Antonio José y Antonio Soler, por su apoyo en la realización de la tesis.

A Ginés, por su alegría, por las bromas que nos gastas todos los días cuando entramos por la puerta que hace que el día comience bien.

Al departamento de nutrición que de una forma u otra me ha apoyado para la realización de la tesis.

A mis amigas, Tanta, María, M<sup>o</sup> Dolores y Cristina, por haberme apoyado en todo momento, haberme prestado su amistad incondicional en los momentos más duros, y creer que era capaz de llegar hasta aquí.

A Jesu, mi máximo apoyo, la persona que siempre me ha apoyado y me ha animado para seguir adelante, sin él no habría llegado hasta aquí, y no sería la persona que ahora soy. Gracias por quererme tanto.

A mis padres por creer en mí en todo momento y darme la posibilidad de estudiar en esta universidad para llegar donde he llegado. Gracias por dármelo todo sin pedir nada a cambio.

A la Universidad Católica San Antonio de Murcia por haberme acogido y haberme dado la posibilidad de realizar aquí la tesis doctoral.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- .AAPH: 2,2-azobis-[2-metilpropionamida]dihidroclorido.  
ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.  
ADN: ácido desoxiribonucleico.  
CDs: ciclodextrinas.  
CGTasa: enzima ciclodextrina glucogenotransferasa.  
CHA: charcona-sintetasa.  
CURRAC: Reducción del cobre - poder antioxidante.  
CV: coeficiente de variación.  
DES: dietilestilbestrol.  
DIME- $\beta$ -CDs: 2,6 dimetil- $\beta$ -ciclodextrinas.  
DPPH: 2,2-difenil-picril-hidracil.  
DSC: calorimetría diferencial de barrido.  
DTA: análisis térmico diferencial.  
E.E.U.U.: Estados Unidos.  
eNO: oxido nítrico sintetasa endotelial.  
EPA: agencia de protección ambiental.  
FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas.  
FDA: American Food and Drug Administration.  
FL: fluoresceína.  
FRAP: Reducción del hierro - poder antioxidante.  
GC: cromatografía de gases.  
GRAS: En general reconocido como seguros.  
HP- $\beta$ -CDs: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas.  
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.  
HSU virus del herpes simple.  
IDA: ingesta diaria recomendada.  
iNO: oxido nítrico sintetasa inducible.  
IR: espectroscopia de absorción infrarroja.  
JECFA: Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios.

Kc: constante de complejación.  
LDL: lipoproteínas de baja densidad.  
LOD: límite de detección.  
LOQ: límite de cuantificación.  
LOX: lipoxigenasa.  
MPE- $\beta$ -CDs: hidroetil- $\beta$ -ciclodextrinas.  
Net AUV: área neta.  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
ORAC: capacidad de absorción del radical de oxígeno.  
ORAC-FL: ORAC-fluoresceína.  
OTGL: termogravimetría diferencial.  
P: producto.  
PCD: muerte celular programada.  
PI3K: fosfatidilinositol-3 cinasa.  
RMN: resonancia magnética nuclear.  
ROS: especie reactiva de oxígeno.  
SD: desviación estándar.  
SDS: dodecil sulfato sódico.  
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.  
Sir2: sirtuinas en microorganismos.  
SIRT1: sirtuinas en mamíferos.  
STS: estilbeno-sintetasa.  
S: sustrato.  
T: temperatura.  
TG: termogravimetría  
TRAP: potencial antioxidante total.  
Trime- $\beta$ -CDs: 2, 3, 6 trimetil- $\beta$ -ciclodextrinas.  
USDA: United State Departamento f Agricultural  
UV: ultravioleta.  
VIS: visible.

## ÍNDICE GENERAL



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	7
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Compuestos Fenólicos .....</b>	<b>15</b>
1.1. POLIFENOLES Y SALUD .....	15
1.2. RESVERATROL .....	18
1.2.1. Características del resveratrol .....	18
1.2.2. Propiedades beneficiosas del resveratrol para la salud .....	26
1.2.3. Farmacocinética y biodisponibilidad del resveratrol .....	32
1.2.4. Estabilidad del resveratrol .....	33
<b>2. Ciclodextrinas (CDs) .....</b>	<b>35</b>
2.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN .....	35
2.2. PROPIEDADES .....	37
2.3. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS .....	40
2.3.1. $\alpha$ -CDs .....	40
2.3.2. $\beta$ -CDs .....	40
2.3.3. $\gamma$ -CDs .....	41
2.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN .....	41
2.4.1. Equilibrio de los complejos de inclusión .....	45
2.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS .....	46
2.5.1. Solución Dinámica .....	46
2.5.1.1. Efecto de la temperatura .....	46
2.5.1.2. Empleo de disolventes .....	46
2.5.1.3. Efecto del agua .....	47
2.5.1.4. Analitos volátiles .....	47
2.5.2. Co-precipitación .....	47
2.5.3. Complejación por método “slurry” .....	48
2.5.4. Complejación por pasta .....	48
2.5.5. Mezcla húmeda y calefacción .....	49

---

2.5.6. Método de extrusión .....	49
2.5.7. Mezcla en seco .....	49
2.6. MÉTODO DE SECADO DE LOS COMPLEJOS FORMADOS .....	50
2.6.1. Analitos altamente volátiles .....	50
2.6.2. Secado por atomización .....	50
2.6.3. Secado a baja temperatura .....	50
2.7. LIBERACIÓN .....	51
2.8. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN ... CON CDS.....	51
2.8.1. Métodos de detección de complejos sólidos .....	51
2.8.1.1. Difracción de rayos-X .....	51
2.8.1.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear .....	52
2.8.1.3. Espectroscopía de absorción infrarroja .....	52
2.8.1.4. Espectroscopía Raman .....	52
2.8.1.5. Métodos térmicos .....	53
2.8.2. Métodos de detección de complejos en solución .....	53
2.8.2.1. Métodos de variación de la solubilidad .....	54
2.8.2.2. Métodos cinéticos .....	56
2.8.2.3. Métodos instrumentales .....	57
2.8.2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-vis .....	57
2.8.2.3.2. Espectroscopía de luminiscencia .....	58
2.8.2.3.3. Dicroísmo circular .....	58
2.8.2.3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear .....	59
2.8.2.3.5. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico .....	59
2.8.2.3.6. Métodos voltamétricos .....	60
2.8.2.3.7. Conductimetría .....	60
2.8.2.3.8. Cromatografía .....	60
2.9. APLICACIONES DE LA CDS .....	61
2.9.1. Cosmética y aseo personal .....	61
2.9.2. Industria alimentaria .....	62

2.9.2.1. CDs como agentes atrapadores de sabores.....	63
2.9.2.2. CDs como agentes protectores frente a la oxidación por oxígeno.....	63
2.9.2.3. CDs como agentes protectores frente a la luz .....	63
2.9.2.4. CDs como agentes protectores frente a la temperatura .....	64
2.9.2.5. CDs para mejorar la vida útil de los alimentos.....	64
2.9.2.6. Aplicaciones de las CDs vacías .....	64
2.9.2.7. Aplicaciones especiales de las CDs en alimentos .....	66
2.9.3. Industria farmacéutica .....	67
2.9.4. Agricultura e industria química .....	68
2.10. REGULACIÓN DE LAS CDS .....	69
<b>3. Capacidad antioxidante .....</b>	<b>70</b>
<b>4. Justificación de la unidad temática de la tesis .....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO II. CYCLODEXTRINS AS RESVERATROL CARRIER SYSTEM.....</b>	<b>75</b>
<b>CAPÍTULO III. COMPLEXATION OF RESVERATROL BY NATIVE AND MODIFIED CYCLODEXTRINS: DETERMINATION OF COMPLEXATION CONSTANT BY ENZIMATIC, SOLUBILITY AND FLUORIMETRIC ASSAYS .....</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO IV. COMPARATIVE STUDY OF DIFERENT METHODS TO MEASURE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF RESVERATROL IN THE PRESENCE OF CYCLODEXTRINS .....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO V. ORAC-FLUORESCHEIN ASSAY TO DETERMINE THE OXIGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY OF RESVERATROL COMPLEXED IN CYCLODEXTRINS. ....</b>	<b>111</b>
<b>CAPÍTULO VI. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS .....</b>	<b>117</b>
1. Estudio de la complejación de resveratol con diferentes tipos de ciclodextrinas. Cálculo de la $K_c$ por diferentes métodos .....	119
2. Determinación de la capacidad antioxidante del resveratrol complejado en CDs por diferentes métodos.....	126

3. Conclusiones .....	129
<b>CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>131</b>
<b>1. Bibliografía .....</b>	<b>133</b>
<b>CAPÍTULO VIII. APÉNDICE .....</b>	<b>157</b>
<b>1. Calidad de las publicaciones incluidas .....</b>	<b>159</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS



## CAPÍTULO I

<b>Tabla I.1.a.</b> <i>Clasificación de polifenoles flavonoides</i> .....	16
<b>Tabla I.1.b.</b> <i>Clasificación de polifenoles no flavonoides</i> .....	17
<b>Tabla I.2.</b> <i>Principales fuentes de resveratrol en la dieta y contenido medio</i> .....	25
<b>Tabla I.3.</b> <i>Suplementos dietéticos en el mercado que contienen resveratrol</i> .....	26
<b>Tabla I.4.</b> <i>Principales actividades cardioprotectoras del resveratrol</i> .....	31
<b>Tabla I.5.</b> <i>Propiedades de las CDs.</i> .....	38
<b>Figura I.1.</b> <i>Estructura de los estilbenos más representativos encontrados en uva</i> .....	19
<b>Figura I.2.</b> <i>Ruta de fenilalanina a p-cumaril-CoA</i> .....	21
<b>Figura I.3.</b> <i>Ruta biosintética desde p-cumaril-CoA hasta trans-resveratrol</i> .....	23
<b>Figura I.4.</b> <i>Estructura de <math>\beta</math>-CDs</i> .....	37
<b>Figura I.5.</b> <i>Tipos de CDs modificadas</i> .....	39
<b>Figura I.6.</b> <i>Hilos supramoleculares</i> .....	39
<b>Figura I.7.</b> <i>Formación del complejo huésped-CDs</i> .....	43
<b>Figura I.8.</b> <i>Diámetro externo e interno de las diferentes CDs</i> .....	44
<b>Figura I.9.</b> <i>Tipos de diagramas de fases con CDs</i> .....	55
<b>Figura I.10.</b> <i>Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres</i> .....	72

## CAPÍTULO II

<b>Table II.1.</b> <i>Cyclodextrin assay</i> .....	81
<b>Figure II.1.</b> <i>Oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of <math>H_2O_2</math></i> .....	79
<b>Figure II.2.</b> <i>Effect of cyclodextrin on the oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of <math>H_2O_2</math></i> .....	79

<b>Figure II.3.</b> <i>Effect of G<sub>2</sub>-β-CDs on the oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</i>	79
<b>Figure II.4.</b> <i>Effect of free resveratrol concentration on lipoxygenase activity.....</i>	80
<b>Figure II.5.</b> <i>Effect of resveratrol-G<sub>2</sub>-β-CDs complex concentration on lipoxygenase activity... .....</i>	81
<b>Figure II.6.</b> <i>Cyclodextrin assay.....</i>	81

### CAPÍTULO III

<b>Table III.1.</b> <i>Complexation constant (K<sub>C</sub>) for complexes formed between native and modified cyclodextrins and resveratrol calculated by the enzymatic, solubility and fluorimetric methods .....</i>	88
<b>Figure III.1.</b> <i>Effect of native CDs on the oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</i>	86
<b>Figure III.2.</b> <i>Phase of solubility diagram of resveratrol .....</i>	88
<b>Figure III.3.</b> <i>Fluorescence intensities of resveratrol .....</i>	88
<b>Figure III.4.</b> <i>(A) Benesi-Hildebrand plot for resveratrol-CDs, (B) Scatchard plot for resveratrol-CDs .....</i>	89
<b>Figure III.5.</b> <i>Cyclodextrin assay .....</i>	89

### CAPÍTULO IV

<b>Table IV.1.</b> <i>Values of more representative validation parameters.....</i>	103
<b>Table IV.2.</b> <i>Antioxidant activity values obtained with ORAC, ABTS and DPPH assays .....</i> .....	104

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---

<b>Figure IV.1.</b> Regression of Trolox C on different concentrations of Trolox C in ORAC (A), ABTS (B), and DPPH (C) assays .....	101
<b>Figure IV.2.</b> Regression of $\mu\text{M}$ Trolox .....	102
<b>Figure IV.3.</b> Effect of HP- $\beta$ -CDs concentration on the $\mu\text{M}$ Trolox equivalents of resveratrol .....	105

## CAPÍTULO V

<b>Table V.1.</b> Values of more representative validation parameters .....	115
<b>Figure V.1.</b> FL fluorescence decay curves induced by AAPH in the presence of resveratrol at different concentrations.....	114
<b>Figure V.2.</b> (A) Regression of net AUC of Trolox C, (B) Regression of net AUC of resveratrol .....	115
<b>Figure V.3.</b> (A) FL fluorescence decay curves induced by AAPH in the presence of resveratrol alone, and with HP- $\beta$ -CDs, (B) Effect of HP- $\beta$ -CDs concentration on the net AUC of resveratrol .....	115
<b>Figure V.4.</b> Phase solubility diagram of resveratrol with HP- $\beta$ -CDs .....	116
<b>Figure V.5.</b> Effect of increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs on free resveratrol concentration.....	116
<b>Figure V.6.</b> Effect of resveratrol concentration on the net AUC at fixed HP- $\beta$ -CDs concentration.....	117
<b>Figure V.7.</b> FL fluorescence decay curves induced by AAPH in the presence of HP- $\beta$ -CDs at different concentrations.....	117

**CAPÍTULO VI**

<b>Tabla VI.1.</b> <i>K<sub>C</sub> de los diferentes tipos de CDs por método enzimático y de solubilidad</i> .....	123
<b>Tabla VI.2.</b> <i>K<sub>C</sub> calculadas mediante el método fluorimétrico</i> .....	125
<b>Tabla VI.2.</b> <i>Valores más representativos de los parámetros validados</i> .....	126
<b>Figura VI.1.</b> <i>Efecto de G<sub>2</sub>-β-CDs en la oxidación del resveratrol por LOX en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....	121
<b>Figura VI.2.</b> <i>Efecto de la concentración de resveratrol libre con LOX</i> .....	121
<b>Figura VI.3.</b> <i>Ensayo de CDs</i> .....	122
<b>Figura VI.4.</b> <i>Diagrama de fases del resveratrol con β, HP-β y G<sub>2</sub>-β-CDs</i> .....	123
<b>Figura VI.5.</b> <i>Intensidad de fluorescencia del resveratrol en presencia de concentraciones crecientes de β, HP-β y G<sub>2</sub>-β-CDs</i> .....	124
<b>Figura VI.6.</b> <i>Representación de Benesi-Hildebrand para resveratrol con CDs</i> .....	125
<b>Figura VI.7.</b> <i>Efecto de HP-β-CDs en el Net AUC del resveratrol</i> .....	128
<b>Figura VI.8.</b> <i>Capacidad antioxidante de concentraciones crecientes de resveratrol en presencia de una concentración fija de HP-β-CDs</i> .....	128

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**



# 1. COMPUESTOS FENÓLICOS

## 1.1. POLIFENOLES Y SALUD

En los últimos años se han desarrollado numerosos estudios epidemiológicos que apoyan la relación existente entre alimentación y salud. Estos estudios demuestran los efectos beneficiosos para la salud de los alimentos de origen vegetal, ya que ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hertog y col., 1993, 1995, 1997a, 1997b; Knekt y col., 1996; Rimm y col., 1996; Bazzano y col., 2002; Flood y col., 2002). Esta actividad se atribuye a unos constituyentes no esenciales de los alimentos, conocidos como sustancias bioactivas, fitoquímicas o fitonutrientes, entre las que se encuentran los polifenoles, cuyo consumo prolongado, como parte de un hábito alimentario sano, produce este efecto beneficioso para la salud (Steinmetzt y Potter, 1996).

Los polifenoles engloban a un amplio grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se encuentran en los frutos y órganos aéreos jóvenes de las plantas superiores. El consumo de estos compuestos a través de la dieta del hombre es significativo (Gerber y col., 2002), y por ello, sus propiedades han sido ampliamente estudiadas.

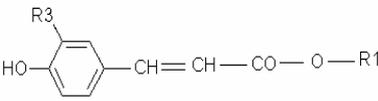
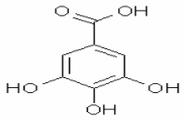
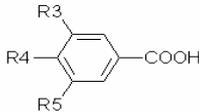
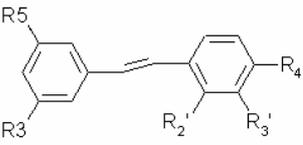
Los compuestos fenólicos poseen una elevada capacidad antioxidante (Wang y col., 1996; Cao y col., 1996; Eastwood, 1999), inhiben la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) reduciendo así la formación de placas de ateroma y por tanto, el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Frankel y col., 1993; Teissedre y col., 1996; Das y col., 1999; Serafini y col., 2000; Covas y col., 2000; Gimeno y col., 2002). Otra de las propiedades ampliamente estudiada de los polifenoles es su carácter antiinflamatorio tanto *in vitro* (Landolfi y col., 1984), como *in vivo* (Middleton., 1998). Interfieren en la ruta de degradación del ácido araquidónico, implicada en la síntesis de eicosanoides (sustancias responsables de la inflamación y agregación plaquetaria) (Van Wauwe y Gossenc, 1983), y en la liberación de histamina de forma dosis-dependiente (Konturek y col., 1986) sin provocar efectos

secundarios de tipo ulceroso, como ocurre en la mayoría de antiinflamatorios no esteroideos.

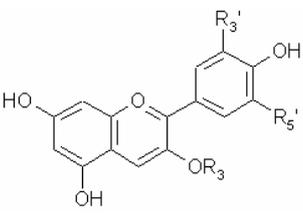
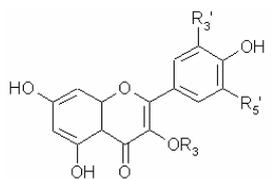
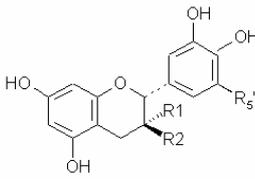
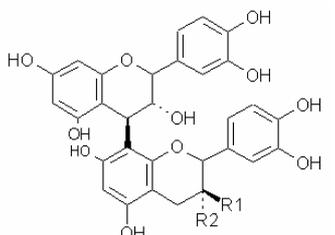
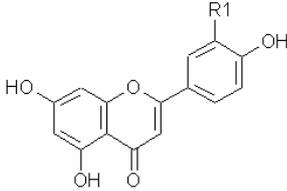
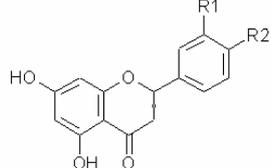
Muchos de estos compuestos fenólicos son, además, responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y por tanto, influyen directamente en la calidad de algunos de ellos (Tomás-Barberán y Espin, 2001). Entre los compuestos fenólicos encontramos pigmentos como los antocianos, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos característicos de muchas frutas, hortalizas y del vino tinto; o los flavonoles presentes principalmente en frutas y hortalizas que dan un color crema-amarillento. Algunos polifenoles como las flavononas de los cítricos (naringina), aportan un sabor amargo, otros en cambio confieren astringencia a los frutos, como los taninos hidrolizables, etc.

Los polifenoles se pueden clasificar en dos grandes grupos: flavonoides (antocianos, flavonoles, flavan-3-oles, proantocianidinas, flavonas y flavononas) y no flavonoides (ácidos hidroxicinámicos, taninos hidrolizables, ácidos hidroxibenzoicos y estilbenos) (Waterhouse, 2002) (Tabla I.1.a. y b.).

**Tabla I.1.a.** Clasificación de polifenoles no flavonoides.

Tipos	Estructura química	Subtipos
Ácidos Hidroxicinámicos		Ácido cafeoil tartárico
		Ácido feruloil tartárico
Taninos Hidrolizables		Galotanino
		Elagitaninos
		Epigalotanino
Ácidos Hidroxibenzoicos		Ácido gálico Ácido vanílico Ácido siríngico
Estilbenos		Resveratrol Piceido Piceatanol $\delta$ -viniferina $\epsilon$ -viniferina $\alpha$ -viniferina

**Tabla I.1.b. Clasificación de polifenoles flavonoides.**

Tipos	Estructura química	Subtipos
Antocianos		Pelargonidina Cianidina Delfinidina Peonidina Petunidina Malvidina
Flavonoles		Kaempferol Quercetina Miricetina Isoramnetina
Flavan-3-oles		Catequina Epicatequina Galocatequina Epigalocatequina
Proantocianidinas		Epicatequina-catequina Epicatequina-epicatequina Catequina-epicatequina
Flavonas		Apigenina Luteína
Flavanonas		Naringina Hesperidina Naringenina

## 1.2. RESVERATROL

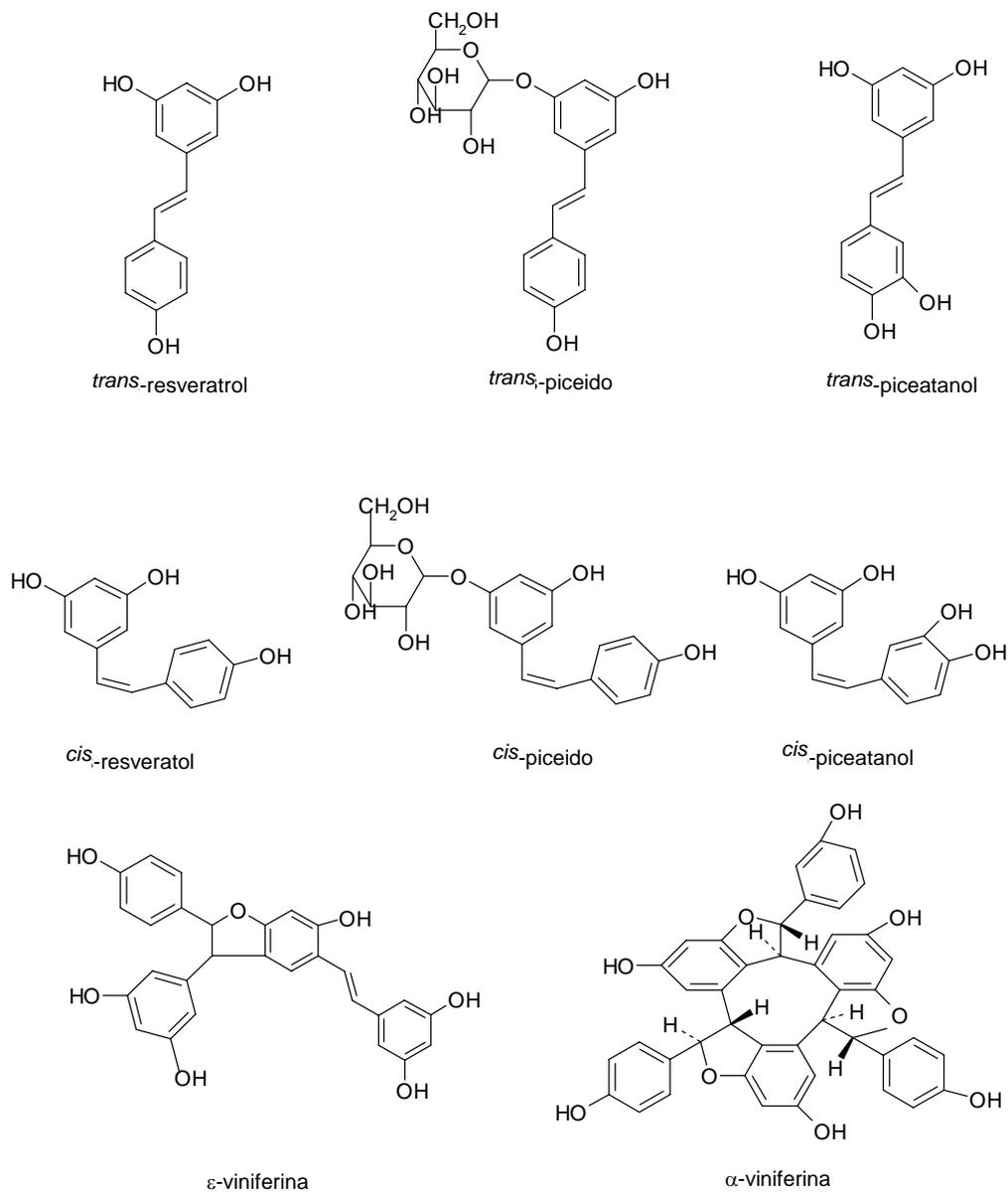
### 1.2.1. Características del resveratrol

Entre los polifenoles más estudiados en los últimos años destacan los estilbenos. En la actualidad se conocen hasta 30 estilbenoides y estilben-glucósidos, que se encuentran distribuidos en diversas especies del reino vegetal (Gorham, 1980). El esqueleto estructural de los estilbenos consta de un puente vinílico, que sirve de unión a dos anillos aromáticos (esqueleto estilbenoide) (**Tabla I.1.a.**). A partir de esta estructura química, relativamente sencilla, la naturaleza ha sido capaz de modelar una gran variedad de compuestos, en los cuales varía: tanto el número como la posición de los grupos hidroxilo, la forma en la que dichos grupos se encuentran a su vez sustituidos por moléculas de azúcar, grupos metilo, metoxi u otros radicales y la configuración estérica de moléculas químicamente idénticas. Otra causa que incrementa el número de sustancias incluidas en esta familia es su capacidad de polimerización para formar dímeros, trímeros o polímeros mayores (**Figura I.1.**).

Los compuestos más conocidos dentro de este grupo de estilbenoides son: *trans*- y *cis*-resveratrol (3, 5, 4'- trihidroxiestilbeno), *trans*- y *cis*-piceido (*trans* resveratrol-3-O- $\beta$ -glucósido), *trans*- y *cis*- piceanol (3', 4', 3, 5-tetrahidroxiestilbeno), así como diferentes dímeros y trímeros de resveratrol que dan lugar a las  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -viniferinas, respectivamente (**Figura I.1.**).

Los estilbenos son producidos por las plantas como respuesta al estrés biótico y abiótico, como puede ser: tratamientos químicos, infecciones fúngicas o exposición a luz ultravioleta, confiriéndole a la planta una mayor resistencia.

Uno de los estilbenos más abundante en vegetales es el *trans*-resveratrol. Este compuesto fue identificado por primera vez en 1940 en la raíz del eléboro blanco (*Veratrum Grandiflorum* O. Loes) y más tarde en raíces secas de *Poligonum Cuspidatum*, siendo ésta una de las fuentes más ricas de resveratrol. Esta planta es ampliamente utilizada en medicina tradicional china y japonesa en el tratamiento de enfermedades tales como dermatitis supurativa, gonorrea, tiña favosa, y pie de atleta (Takaoka, 1940; Vastano y col., 2000; Lee y col., 1998; Cichewicz y Kouzi, 2002). En 1976 se descubrió su existencia en la vid (*Vitis vinifera*) (Langcake y Pryce, 1976).



**Figura I.1.** Estructura de los estilbenos más representativos encontrados en uva.

El *trans*-resveratrol es un anabolito, generado por las células vegetales para actuar como un plaguicida natural, que junto con otros anabolitos de la planta, constituyen el mecanismo de defensa de la misma frente a agresiones externas. Tras la infección de una planta por un agente patógeno, la primera respuesta se localiza en

las células con las que dicho agente entra en contacto directo. Estas células reconocen la estructura del patógeno, o alguna de las moléculas fundamentales para el desarrollo de su actividad, y la respuesta primaria más frecuente de la planta es la reacción por necrosis, en la que las células infectadas por el patógeno mueren. Este fenómeno es conocido como muerte celular programada (PCD). Además, estas células directamente afectadas por el patógeno, producen una serie de moléculas que alertan a las células adyacentes de la infección, y que reciben el nombre de moléculas elicitoras (Hahn, 1996). Estas moléculas son las responsables de que en dichas células adyacentes se desarrolle la conocida como respuesta secundaria, al reconocer a las moléculas elicitoras producidas en la interacción primaria. Estas vías de defensa indican que las células vegetales poseen sistemas de vigilancia, capaces de detectar los estímulos generados por el agente patógeno, elicitando de este modo la respuesta defensiva en la planta. El tercer tipo de respuesta defensiva es inducida hormonalmente en la planta, y en ella se sintetizan los compuestos conocidos con el nombre de fitoalexinas, que tratarán de frenar la actividad infectiva del patógeno.

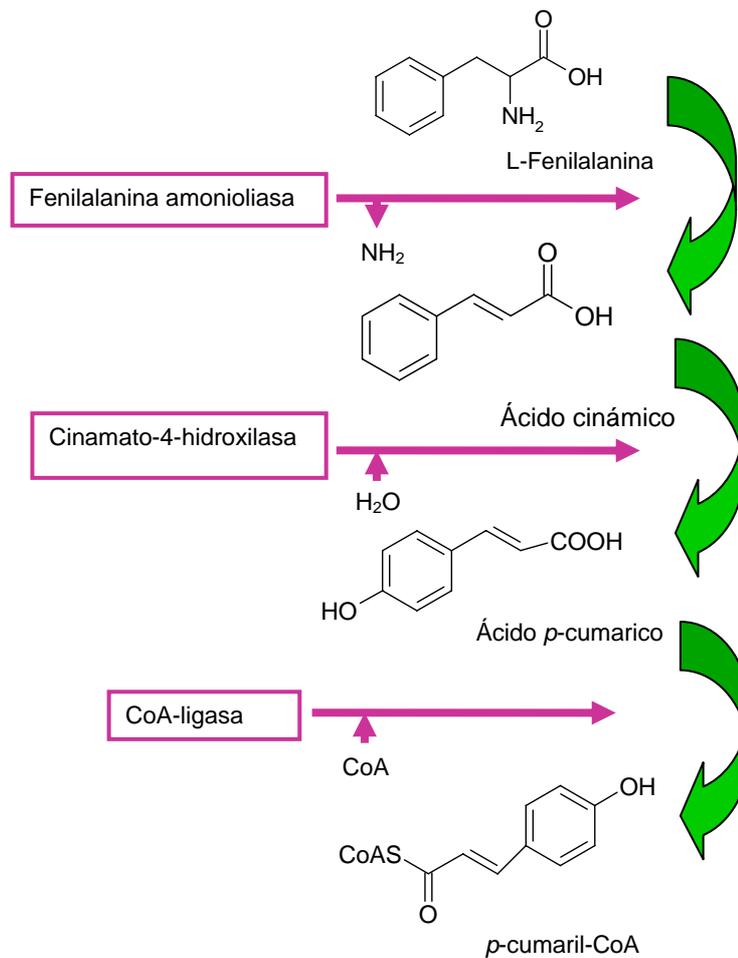
Muchas plantas producen metabolitos secundarios (no implicados en las reacciones metabólicas vitales para la planta) con actividad antifúngica, antivírica y antibacteriana. Estos compuestos antimicrobianos pueden encontrarse en plantas que no han sufrido infección alguna, actuando como barrera frente a las mismas y recibiendo, en este caso, el nombre de fitoancipinas. Se reserva la denominación de fitoalexinas para los metabolitos secundarios antimicrobianos que son sintetizados en respuesta al ataque patógeno, con el fin de cesar su invasión (Osbourn, 1999). En general, las fitoalexinas pueden definirse como moléculas antimicrobianas de bajo peso molecular, acumuladas en las plantas como resultado de una infección patógena o tras haber sido sometidas a condiciones de estrés (Kuc, 1995).

Entre los efectos desencadenantes de la producción de *trans*-resveratrol en plantas, se pueden citar los siguientes:

- Infecciones fúngicas producidas por *Botrytis Cinerea* (Stein, 1984) *Plasmopara Vitícola* (Dercks y Greosy, 1989), *Phomopsis Vitícola* (Hoos y Blaich, 1990) o *Rhizopus Stonifer*.
- Daño de la planta.
- Tratamiento con sales como tricloruro de aluminio (Adrian y col., 1996).
- Tratamiento con ozono (Schubert y col., 1997).
- Radiación Ultravioleta (Cantos y col., 2000).

## INTRODUCCIÓN

A nivel celular, se ha descrito un mecanismo que explica qué moléculas están implicadas en la ruta sintética de esta fitoalexina. Como se puede observar en la **Figura I.2.**, los precursores inmediatos de resveratrol son el *p*-cumaril-CoA y el malonil-CoA, en una relación molar 1:3.



**Figura I.2.** Ruta de fenilalanina a *p*-cumaril-CoA.

La mayoría de las especies de la familia *Vitaceae* poseen ambas enzimas. Hain y col. en 1993 aislaron el gen de la STS de la vid, y lo expresaron en células de tabaco, encontrando que las plantas de tabaco transgénicas resultantes eran mucho más resistentes a la infección por *Botrytis cinerea*.

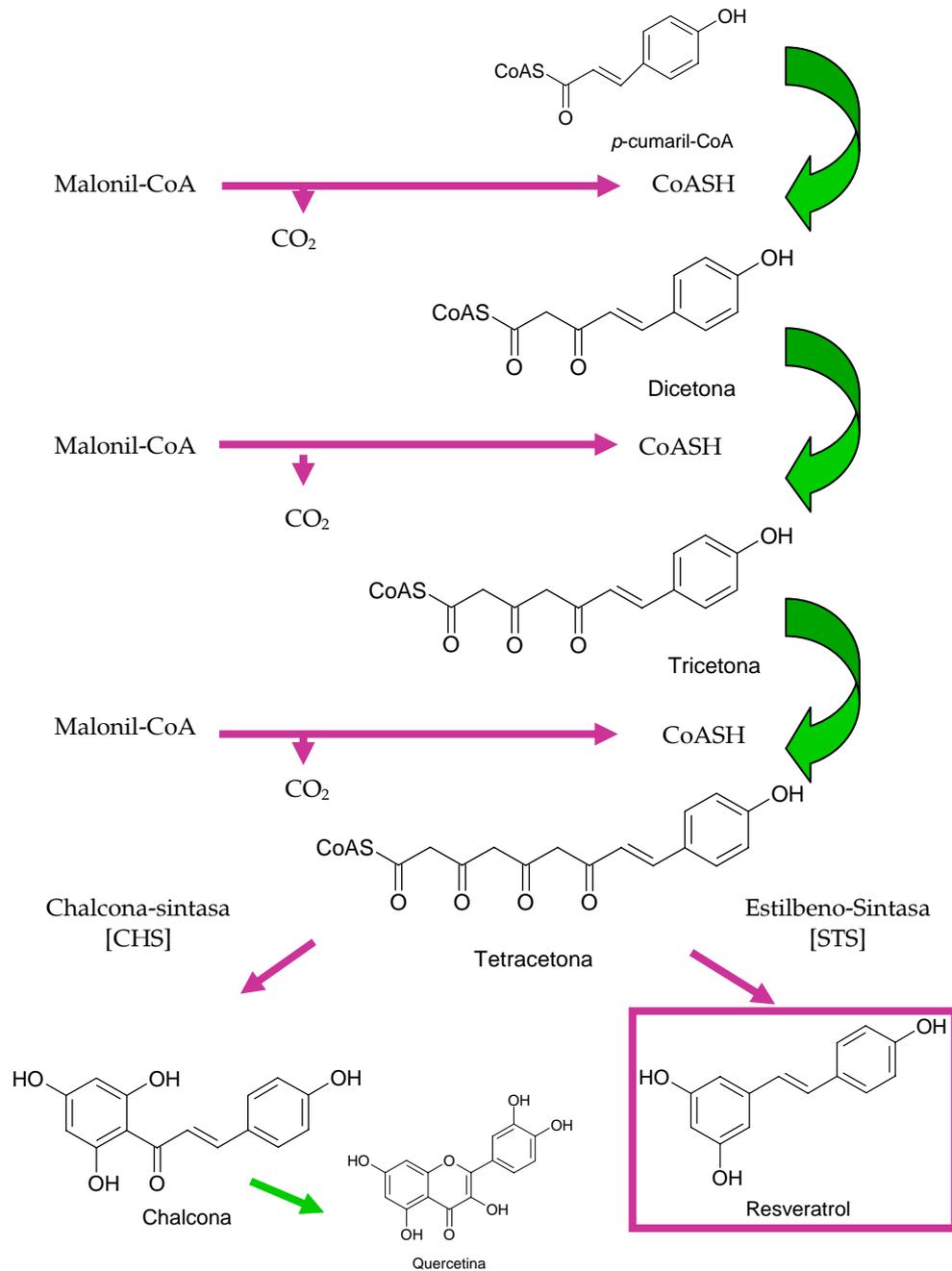
El *p*-cumaril-CoA se genera a partir de la fenilalanina, sintetizada en plantas a partir de azúcares siguiendo la ruta del ácido shikímico (Hrazdina y col., 1984). En primer lugar, se produce la pérdida del grupo amino de la fenilalanina mediante deaminación oxidativa, reacción catalizada por la enzima fenilalanina-amonioliasa, dando lugar a ácido cinámico. Éste es hidroxilado a ácido *p*-cumárico por acción de la enzima cinamato-4-hidroxilasa, transformándose finalmente en *p*-cumaril-CoA, por acción de una CoA-ligasa.

Sobre este sustrato (*p*-cumaril-CoA), pueden actuar dos enzimas clave: la chalcona-sintasa (CHS) o bien la estilbena-sintasa (STS). En ambos casos, tal y como se indica en la ruta biosintética representada en la **Figura I.3.**, se produce la condensación de *p*-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA, dando lugar a una tetracetona. Hasta este punto, ambas enzimas actúan de manera idéntica.

A continuación se produce la ciclación de la tetracetona lineal, y es precisamente el mecanismo por el cuál esta ciclación se lleva a cabo, la principal diferencia entre ambas enzimas. En el caso de la CHS, se liberan 3 moléculas de CO<sub>2</sub> y el producto final de la ruta es la chalcona, precursor común de la familia de los flavonoides a la que pertenece la quercetina. Cuando la enzima que actúa es la STS, el producto final de la reacción es el *trans*-resveratrol, liberándose cuatro moles de CO<sub>2</sub> por mol de resveratrol formado (**Figura I.3.**).

Dado su carácter antifúngico, las fitoalexinas son candidatos idóneos para ser utilizadas como pesticidas naturales. Dichos pesticidas naturales se plantean como una buena alternativa a los sintéticos. La toxicidad y persistencia en el medio ambiente de la mayoría de ellos, unido a la resistencia desarrollada por ciertas especies patógenas, obliga a cambiar de pesticidas o bien a utilizar una combinación de ellos para conseguir un efecto sinérgico.

El tratamiento post-cosecha de la uva con luz ultravioleta le provoca un estrés que hace que ésta, en respuesta a dicho daño, induzca la síntesis de resveratrol. Esta misma tecnología se está aplicando actualmente a uvas de mesa y de vinificación para obtener nuevas frutas "funcionales" (Cantos y col., 2001; Cantos y col., 2002) y vinos enriquecidos en resveratrol (Cantos y col., 2003).



**Figura I.3.** Ruta biosintética desde *p*-cumaril-CoA hasta *trans*-resveratrol.

Las fuentes de resveratrol en la naturaleza no son muchas, y menos aún las plantas y vegetales de consumo humano que contienen este compuesto. La **Tabla I.2.**

muestra las fuentes naturales más importantes de resveratrol, siendo la uva y el vino los alimentos que más contribuyen al aporte de resveratrol en la dieta humana (Celotti y col., 1996).

Con respecto a la localización del resveratrol, en uva se encuentra, principalmente, en pepitas y piel, y por tanto en zumo de uva (mosto) y vino su concentración no es muy alta. La piel de uva fresca tiene de 50 a 100 µg/g de *trans*-resveratrol (Hendler y Rorvick, 2001). Durante la maceración de la uva en la elaboración del vino, el resveratrol es liberado de la piel de la uva, pasando a estar presente en el vino. En el proceso de la maceración se produce mayor concentración de *trans*-resveratrol que *cis*-resveratrol, teniendo lugar una conversión de *trans* a *cis* cuando el vino es expuesto a la luz y al oxígeno (Cantos y col., 2000). Obviamente, su concentración es mayor en vino tinto que en vino blanco, debido al tiempo de contacto entre mosto-hollejo en el proceso de fermentación durante el proceso de vinificación. Por la misma razón, la concentración de resveratrol en vinos rosados es intermedia a la encontrada en blancos y tintos (Tabla I.2).

La concentración de resveratrol en vinos es enormemente variable dependiendo de la variedad de uva, región geográfica, tipo de suelo, condiciones climáticas, prácticas enológicas, etc. (Bavaresco, 2003; Vrhovsek y col., 1997). Así, las concentraciones de resveratrol detectadas en los vinos oscilan desde cantidades indetectables a 14,3 mg/L (Stervbo y col., 2007; Frémon, 2000). En 1996, Goldberg y col. determinaron la concentración de resveratrol en más de 700 vinos comerciales procedentes de todas las áreas vitivinícolas del mundo y corroboraron esta enorme variabilidad en la concentración de resveratrol, y en general del resto de estilbenos.

El resveratrol también puede ser ingerido como suplemento dietético. La dosis en suplementos dietéticos oscila entre 8 mg y 1 g por gragea (Tabla I.3.). Como suplemento nutricional lo podemos encontrar como extracto de *Polygonum cuspidatum*. En la actualidad están en proceso de desarrollo alimentos funcionales que contengan resveratrol.

**Tabla I.2.** Principales fuentes de resveratrol en la dieta y contenido medio.

Fuente dietética	<i>trans</i> -resveratrol* (mg/kg)	Referencias
Arándanos	0,02	Lyons y col., 2003
Zumo de arándano rojo	0,2	Wang y col., 2002
Mantequilla de cacahuète	0,3	Burns y col., 2002
Cacahuète	0,3	Burns y col., 2002
Pistacho	1,7	Tokusoglu y col., 2005
Chocolate negro	2	Counet y col., 2006
Uva de mesa	0,7	Cantos y col., 2000
Zumo de uva	0,5	Romero-Pérez y col., 1999
Vino blanco	0,13	Romero-Pérez y col., 1996; Carando y col., 1999
Vino rosado	0,4	Romero-Pérez y col., 1996; Carando y col., 1999 ; Carando y col., 1999 ;
Vino tinto	1,9	Lamuela-Raventós y col., 1995; Landrault y col., 2002; Stervbo y col., 2007)

Desde el punto de vista comercial, el resveratrol es producido por tratamiento de plantas de uva con cloruro o sulfato de aluminio, por irradiación con luz ultravioleta (Cantos y col., 2000) y a partir de cultivos celulares de vid en respuesta a la exposición de las células a diferentes inductores (Bru-Martínez y Pedreño-García, 2006). Mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética, también es posible producir cantidades mucho mayores de resveratrol, ya que el gen que codifica la enzima resveratrol sintasa, ha sido aislado, clonado e insertado en plantas de patata, arroz, tomate, alfalfa y tabaco (Stark-Lorenzen y col., 1997).

**Tabla I.3.** Suplementos dietéticos en el mercado que contienen resveratrol.

Nombre del suplemento dietético	mg de resveratrol
ResVmax	80
Natural resveratrol	50
Acta-Resveratrol	100
Smart city Resveratrol	20
Nature´s way Resveratrol	37,5
Revidox	8
Grape seed	50
Newlight resveratrol	50
Rezactiv	100
Nature´s bloon	50
TruNature	30
NutraceuticalsRX	100
ReuGenetics X 1000	1000

### 1.2.2. Propiedades beneficiosas del resveratrol para la salud

El resveratrol es uno de los polifenoles más estudiados en los últimos años debido al creciente interés por sus propiedades beneficiosas para la salud. Se ha demostrado que este estilbeno tiene una gran capacidad antioxidante *in vitro* (Espin y Wichers, 2000) y en cultivos celulares, donde actúa como un potente inhibidor de la formación de radicales implicados en enfermedades cardiovasculares, carcinógenas y degenerativas (Jang y Pezzuto, 1999; Martínez y Moreno, 2000). Es un inhibidor de forma dosis-dependiente del proceso de carcinogénesis en sus tres etapas: iniciación, promoción y prolongación del tumor (Jang y col., 1997). Posee efectos antiproliferativos y proapoptóticos en numerosas líneas celulares anticancerígenas así como en modelos *in vivo* (Baur y Sinclair, 2006). El resveratrol resulta activo frente al cáncer de pulmón, colon, mama, estómago, próstata, piel, esófago, tiroides, páncreas, ovario, hígado y leucemia. Las investigaciones al respecto son numerosas y, según el tipo de cáncer, se encuentran en distintas fases de desarrollo. La más avanzada es la

## INTRODUCCIÓN

---

llevada a cabo sobre cáncer de colon, cuyos estudios están en fase II de ensayos clínicos (<http://www.cancer>; <http://www.clinicaltrials>).

También, se ha demostrado que el resveratrol mejora la resistencia del organismo frente al estrés, tiene efecto antienvjecimiento y prolonga el tiempo de vida en numerosos organismos, desde levaduras (Howitz y col., 2003) a vertebrados (Valenzano y col., 2006). Investigaciones recientes han demostrado que ratones obesos cuya dieta es suplementada con resveratrol no solo son más longevos, sino que además, son más activos, presentando en menor medida los efectos adversos de una dieta hipercalórica (Baur y Sinclair, 2006).

El interés por el carácter cardioprotector del resveratrol surgió a partir de un estudio llevado a cabo en 1992, en el que se comparó la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) y el nivel de colesterol sérico en distintas poblaciones del mundo (Renaud y De Lorgeril, 1992). La correlación fue altamente positiva para las poblaciones estudiadas, excepto para Toulouse, la cual mostraba los mismos niveles de colesterol en sangre que Glasgow, pero una tasa de mortalidad por ECV mucho menor. Esta aparente discrepancia entre el riesgo de sufrir ECV (alto colesterol en sangre) y muerte por ECV, se denominó "Paradoja Francesa". Tras el estudio minucioso de las variables que podrían contribuir a esta discrepancia, se encontró el elevado consumo de vino tinto en Toulouse como presunto responsable de dicha evidencia. Posteriormente, numerosos estudios han corroborado que el elevado contenido polifenólico del vino tinto, le confiere carácter cardioprotector (Wollin y Jones, 2001; De Gaetano y Cerletti, 2001; De Gaetano y col., 2002), y otros muchos señalan al resveratrol como principal agente responsable (Renaud y Gueguen, 1998; Vidavalur y col., 2006; Das y Das, 2007; Wang y col., 2005). El resveratrol actúa a distintos niveles en el organismo, de ahí su demostrada efectividad (De Gaetano y col., 2002). Uno de los puntos más importantes es que inhibe la apoptosis celular a dosis muy bajas, previniendo varias enfermedades entre las que se incluye: daño miocárdico por isquemia-reperusión, aterosclerosis y arritmias ventriculares. A dosis altas, es capaz de inducir apoptosis, actuando como agente quimiopreventivo (Das y Das, 2007).

La agregación plaquetaria es uno de los factores que más afecta al proceso de aterosclerosis. Las plaquetas pueden activar la formación de trombos y su agregación produciendo oclusión vascular. En 1995, Bertelli y col. demostraron que el resveratrol es capaz de inhibir, *in Vitro*, la agregación plaquetaria. Años después se demostró

esta actividad del resveratrol también *in vivo*, concretamente en conejos sometidos a una dieta hipercolesterolémica (Wang y col., 2005). Además, en ratones genéticamente hipercolesterolémicos, el resveratrol reduce el área aterosclerótica y el tamaño del trombo inducido por láser (Zini y col., 1999). Los mecanismos por los cuales el resveratrol ejerce este efecto protector son complejos y, hasta la fecha, no han sido completamente explicados (Baur y Sinclair, 2006). Un posible mecanismo propuesto se basa en la inhibición preferencial de COX1 sobre COX2, ya que el balance de prostaglandinas sintetizadas por las dos isoformas de la enzima COX regula la homeostasis vascular (Jang y col., 1997). El tromboxano A2, el cual es sintetizado por COX1 en las plaquetas, es un potente inductor de la agregación plaquetaria y un vasoconstrictor (Hamberg y col., 1974; Hamberg y col., 1975); mientras que la prostaciclina, que es sintetizada por COX2 en células endoteliales vasculares, es un antiagregante plaquetario y un vasodilatador (Moncada y col., 1976). Así, la inhibición selectiva de COX1 promueve el flujo sanguíneo y disminuye el riesgo de trombos, mientras que la inhibición de COX2, conlleva una mayor formación de trombos e incrementa el riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares (Mukherjee y col., 2001; Davies y Jamali, 2004). Bajo determinadas condiciones, la inactivación de COX1 por resveratrol es irreversible (Szewczuk y col., 2004), y las plaquetas son incapaces de sintetizar nuevas proteínas, lo que implica que una exposición eventual a resveratrol podría tener efectos *in vivo*. Este es el mecanismo a través del cual el ácido acetilsalicílico (aspirina®) ejerce su acción cardioprotectora (Vane, 1971; Mitchell y col., 1993; Williams y Hennekens, 2004).

La capacidad vasodilatadora del resveratrol ha sido atribuida a su capacidad de estimular los canales  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , y a la mejora de la señalización del óxido nítrico (NO) en el endotelio. Esta última actividad fue atribuida a la inhibición de la actividad NADH/NADPH oxidasa, permitiendo una reducción de la producción basal de superóxido, y consecuentemente un descenso en la inactivación del óxido nítrico (Orallo y col., 2002; Li y col., 2000). *In vivo*, el resveratrol aumenta la expresión de óxido nítrico sintetasa, tanto la endotelial (eNOS) como la inducible (iNOS) (Das y col., 2005). En arterias de enfermos cardiovasculares, la vasodilatación a través del mecanismo del NO activado por resveratrol no se observa, aunque sí existen otros mecanismos independientes del NO, lo que sugiere que la acción vasodilatadora del resveratrol ocurre a través de distintas rutas bioquímicas (Cruz y col., 2006).

## INTRODUCCIÓN

---

La oxidación de proteínas de baja densidad (LDL) está directamente asociada a la probabilidad de sufrir enfermedades coronarias e infarto de miocardio (Holvoet, 2004). Se ha demostrado que el resveratrol inhibe la peroxidación de las LDL más que un extracto de vino tinto administrado a voluntarios sanos (Frankel y col., 1993). Así, recientemente se ha descrito que tras la ingestión de vino tinto es posible detectar resveratrol en las LDL (Urpí-Sarda y col., 2005). Experimentos *in vivo* realizados en ratas sometidas espontáneamente a hipertensión, propensas a infartos de miocardio, demuestran que el resveratrol disminuye los marcadores de estrés oxidativo como albúmina glicosilada en suero y 8-hidroxiguanosina en orina (Mizutani y col., 2001). Éstas y otras investigaciones sugieren que el resveratrol puede inhibir la oxidación de LDL entre otras macromoléculas *in vivo*; sin embargo, si el mecanismo de acción es directo o indirecto está aún por determinar.

Por otro lado, el resveratrol interfiere en el metabolismo de lípidos, inhibiendo la lipogénesis a nivel hepático (Arichi y col., 1982).

El resveratrol podría actuar contra el daño isquémico en infartos de miocardio. En ratas, la perfusión del corazón con resveratrol (10  $\mu$ M) antes de un daño isquémico provoca una mejora en la recuperación de la presión y el flujo aórtico, reduciendo tanto la concentración de malonaldehído como el tamaño del infarto (Ray y col., 1999). Este efecto podría deberse, al menos en parte, a la capacidad antioxidante del resveratrol. Esta hipótesis cobra fuerza al observar que el piceatanol, estilbeno similar al resveratrol pero con un grupo hidroxilo más en posición 3', y por tanto con mayor capacidad captadora de radicales libres, mejora aún más la protección frente al daño isquémico (Hung y col., 2000). De nuevo, el mecanismo propuesto se basa en el aumento de eNOS e iNOS, y por tanto, de la concentración de NO en suero (Hung y col., 2000).

En un estudio realizado en ratas, a las que se había adicionado resveratrol en el agua de bebida durante 15 días (1 mg/kg de peso), se observó una mejor recuperación de la funcionalidad cardíaca tras la inducción experimental de un daño por isquemia-reperfusión (Bradamante y col., 2003). En otro estudio realizado en cobayas, se observó un aumento significativo de la NADPH-quinona reductasa y de catalasa, o lo que es lo mismo, de la capacidad de eliminar oxidantes del músculo cardíaco cuando se les dio para beber agua enriquecida con resveratrol (14 mg/kg de peso) durante 16 días (Floreani y col., 2003).

El resveratrol podría, por tanto, aumentar la concentración de NO mediante un aumento de expresión de la NO sintetasa y disminuir su inactivación por radicales libres. Esto sugiere que podría ser un potente protector *in vivo* contra el daño isquémico durante infartos de miocardio.

En la **Tabla I.4.** se resumen las actividades y las concentraciones a las cuales el resveratrol presenta actividad cardioprotectora (Bertelli, 2007).

También se ha estudiado la actividad neuroprotectora del resveratrol, demostrando que disminuye el estrés oxidativo en células neuronales, reduciendo por tanto la toxicidad de los radicales libres (Tredici y col., 1999).

Las sirtuinas son una familia de deacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup>, descubiertas en levaduras (Sir2), que han sido asociadas con un alargamiento de la vida en levaduras, gusanos y moscas (Kaeberlein y col., 1999; Regina y Helfand, 2004). Actúan eliminando grupos acetilo de proteínas en presencia de NAD<sup>+</sup>. En *Saccharomyces cerevisiae* la sobreexpresión de Sir2 provoca un alargamiento de la vida de la levadura de un 30%. Esto es debido a que la eliminación de grupos acetilo de histonas provoca un menor empaquetamiento y un menor nivel de transcripción del ADN celular (Sir2 está clasificada como una histona deacetilasa). Una reducción de la alimentación de la levadura provoca un efecto similar a este, ya que produce un incremento de la actividad de Sir2. Por otra parte, eliminando el gen de Sir2, se anula el alargamiento de la vida provocado por la restricción calórica (Howitz y col., 2003). Este efecto también se ha observado en estudios llevados a cabo con *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Wood y col., 2004).

Estos resultados obtenidos en organismos inferiores han provocado intensas investigaciones sobre el papel de las sirtuinas en mamíferos. Un barrido *in vitro* de activadores de sirtuinas de mamíferos (SIRT1) indicó que el resveratrol era el activador más potente de la actividad deacetilasa de los 18 estudiados (Howitz y col., 2003). Estudios posteriores han demostrado que el resveratrol alarga la vida de *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, pero solo cuando el gen SIR2 está presente en estos organismos (Howitz y col., 2003; Wood y col., 2004).

Además, varios estudios en modelos animales sugieren que el resveratrol, al activar SIRT1, puede reducir la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Anekonda y Reddy, 2006). Igualmente se ha observado *in vitro* que el resveratrol puede activar algunas de las enzimas neuronales (AMP-kinasa) que se estimulan bajo la restricción

## INTRODUCCIÓN

---

calórica, proporcionando un efecto neuroprotector (Rasouri y col., 2007; Dasgupta y Milbrandt, 2007).

**Tabla I.4.** Principales actividades cardioprotectoras del resveratrol.

Actividad	Concentración	Referencia
Inhibición de la expresión de moléculas de adhesión	0,1-1µM	Ferrero y col., 1998
Inhibición citocromo P450	< 1 µM	Teel y Huynh, 1998
Aumento de eNOS en células endoteliales humanas	1 µM	Leikert y col., 2002; Gu y col., 2006
Estabilización de la membrana mitocondrial	0,1-1µM	Zini y col., 2002
Actividad antiplaquetaria	1 µM	Bertelli y col., 1996
Inhibición del canal Ca <sup>2+</sup> en plaquetas	1 µM	Dobrydneva y col., 1999
Antagonismo del canal Ca <sup>2+</sup> en miocitos ventriculares	1 µM	Liew y col., 2005
Efecto antiarrítmico en ratas	1 µM	Zhang y col., 2006
Protección frente al daño por isquemia-reperusión	1 µM	Plin y col., 2005.
Supresión de angiogénesis <i>in vivo</i>	< 1µM	Brakenhielm y col., 2001
Acción sobre NFκB en células endoteliales humanas	0,1-1µM	Pellegatta y col., 2003
Supresión de la transcripción de IL-8	0,1-1µM	Shen y col., 2003
Mejora de la expresión de NOS en células de músculo liso vascular	0,1-1µM	Cignarella y col., 2006

Por otra parte, el resveratrol también tiene efecto antiinflamatorio, ya que inhibe enzimas que son claves en las rutas biosintéticas de prostaglandinas y eicosanoides, compuestos responsables de la respuesta inflamatoria (Jang y col., 1997; Martínez y Moreno, 2000).

Otra de las funciones del resveratrol es la estrogénica, ya que es un análogo estructural del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), pudiendo actuar de forma dosis-dependiente, como agonista estrogénico o antagonista en presencia de estrógenos, lo que permite la inhibición de células cancerígenas de mama (Lu y Serrero, 1999).

También se ha descrito en la literatura que el resveratrol presenta actividad antibacteriana y antivírica. Inhibe el crecimiento de bacterias de forma selectiva no siendo efectivo frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori* (responsable de numerosos trastornos gástricos), *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (causantes de la gonorrea y de la meningitis, respectivamente) (Mahady y Pendland, 2000; Docherty y col., 2001). En cuanto a su actividad antivírica, inhibe de forma reversible y dosis-dependiente la replicación de los virus herpes simple (HSV-1 y HSV-2) (Docherty y col., 1999) y potencia la acción de algunos fármacos usados contra el virus del SIDA (VIH-1) sin mostrar efectos tóxicos para las células (Heredia col., 2000).

### 1.2.3. Farmacocinética y biodisponibilidad del resveratrol

La biodisponibilidad del resveratrol es muy baja. Una vez absorbido, al menos un 70% es metabolizado en forma de glucurónido y sulfato. Los metabolitos del resveratrol alcanzan su máxima concentración en plasma a los 30 minutos tras su consumo, siendo su vida media 9,2 horas (Walle y col., 2004). Tras la ingesta de vino tinto, se han identificado en orina cinco metabolitos distintos: resveratrol monosulfato, dos isómeros del resveratrol monoglucurónido, dehidroresveratrol monoglucurónido, dehidroresveratrol monosulfato y dehidroresveratrol (Vitaglione y col., 2005). En otro estudio, se identificaron hasta seis metabolitos distintos adheridos a la estructura de las LDL de voluntarios, tras la ingestión de 250 mL de vino tinto: *trans*-resveratrol-3-O-glucurónido, *cis*-resveratrol-3-O-glucurónido, *cis*-resveratrol-3-O-glucósido, *trans*-resveratrol libre, resveratrol-4'-O-glucurónido y *trans*-resveratrol-4-O-glucósido (Urpí-Sarda y col., 2005). Dado que la concentración de los metabolitos del resveratrol puede ser más alta que el resveratrol en sí, se hace necesario determinar la actividad de dichos metabolitos (estudios que se están llevando a cabo actualmente).

## INTRODUCCIÓN

---

Por otro lado, la acumulación de resveratrol en estómago, duodeno, hígado, corazón, pulmón y riñones podría explicar los efectos encontrados sobre estos órganos (Shen y col., 2003; Cignarella y col., 2006; Asensi y col., 2002; Baur y Sinclair, 2006; Howitz y col., 2003; Valenzano y col., 2006; Bertelli y col., 1998; Walle y col., 2004; Vitaglione y col., 2005; Bertelli y col., 1996; Vitrac y col., 2003; El-Mohsen y col., 2006).

Otra posible explicación a su gran bioactividad, a pesar de su relativamente baja concentración en la dieta, es su efecto sinérgico cuando se encuentra con otros polifenoles bioactivos. Por ejemplo, se ha estudiado la eficiencia del resveratrol junto a catequina y quercetina en distintas matrices, observándose efectos sinérgicos entre dichos compuestos (Goldberg y col., 2003).

Conviene destacar que la toxicidad del resveratrol resulta prácticamente nula, no observándose ningún efecto adverso en casos de ingesta alta y prolongada de este compuesto (Juan y col., 2002).

Recientemente, se ha publicado un estudio sobre población adulta española (40.885 individuos con edades comprendidas entre los 35-64 años) donde se evalúa el consumo de resveratrol y sus derivados (Zamora-Ros y col., 2008). En él se concluye que el 32% de la población no consume estos compuestos, y que el vino es la fuente principal de estilbenos en la dieta. Sin embargo, el resveratrol sólo supone el 21% del consumo de estilbenos, concretamente 31 µg/día, mientras que el piceido supone un 54% de la ingesta. Esto se debe a que los vinos tenidos en cuenta en este estudio, presentaban un mayor contenido en piceido que en resveratrol (la concentración y distribución de estos compuestos es muy variable y depende de muchos factores). En cualquier caso, aunque el piceido presenta también actividad antioxidante, cardioprotectora y anticancerígena (Arichi y col., 1982; Waffo-Teguo y col., 1998), al estar glucosilado su biodisponibilidad es menor (Urpí-Sarda y col., 2005; Meng y col., 2004).

### 1.2.4. Estabilidad del resveratrol

En general, los polifenoles son muy fotosensibles a la luz solar, se oxidan fácilmente en presencia de oxígeno, se descomponen a altas temperaturas y no son muy estables frente a variaciones de pH. Por todo esto es difícil mantener las concentraciones de polifenoles en los alimentos durante el almacenamiento de los

mismos, por lo que se hacen imprescindibles estudios de estabilidad para determinar las condiciones idóneas de almacenamiento del alimento.

Se han realizado numerosos estudios sobre la estabilidad de los polifenoles y en concreto, sobre la estabilidad del resveratrol en diferentes condiciones. El resveratrol es muy sensible a la luz solar. Cuando se protege la forma *trans* de la luz puede durar hasta un mes de forma estable, sin embargo, la forma *cis* del resveratrol no es estable aún protegiéndolo de la luz, a no ser que se encuentra a un pH neutro (Romero-Pérez y col., 1996; Trela y Waterhouse, 1996). Cuando se expone a la luz solar a temperatura ambiente, sólo el 70% del resveratrol permanece estable tras 4 h de exposición (Wang, y col., 2002). Durante el proceso de conversión de la forma *trans* a la forma *cis*, la intensidad de fluorescencia de *cis*-resveratrol aumenta un 8 % por minuto a temperatura ambiente (Lin y Chen., 2001). Kolouchová-Hanzlíková y col. en 2004, detectaron que en una disolución de *trans*-resveratrol expuesta a luz solar durante 3,5 h, había otras dos sustancias no conocidas, además de los dos isómeros de resveratrol, *trans* y *cis*.

La exposición del *trans*-resveratrol a luz UV, a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno, produce una transformación muy rápida de *trans*- a *cis*-resveratrol. La velocidad del aumento de *cis*-resveratrol en la primera hora de exposición es del 0,5 % al 1% por minuto. La tasa de disminución de *trans*-resveratrol es similar a la expuesta por Kolouchová-Hanzlíková, pero la tasa de aumento de *cis*-resveratrol es mucho menor, lo que puede ser debido a que este isómero es sensible a la oxidación atmosférica. Todos estos estudios de estabilidad indican que el resveratrol es muy inestable, ya que tiende a actuar como un agente reductor cuando se expone a la luz, y se oxida en presencia de oxígeno. En ocasiones la oxidación del mismo, puede llevar a su degradación, dando lugar a sustancias que no tienen actividad biológica. Por tanto, es necesario proteger el resveratrol de la luz UV, evitando su exposición directa a la luz solar.

También se han realizado estudios de estabilidad del resveratrol a diferentes temperaturas de almacenamiento. Cuando se conservó el resveratrol a 4 °C éste se mantuvo estable durante los primeros 5 días. Cuando las muestras de resveratrol disueltas fueron almacenadas a temperatura ambiente y en oscuridad, la concentración de resveratrol disminuyó un 88% (Bertacche y col., 2006).

Otras condiciones que afectan a la estabilidad del resveratrol es el pH de la disolución (Chan, 2002). Se ha demostrado que el *cis*-resveratrol es inestable a pH 10

## INTRODUCCIÓN

---

y estable a pH 7,0 mientras que el *trans*-resveratrol es estable en un intervalo de pH comprendido entre pH 8,0 y 9,0 (Bertacche y col., 2006).

Todos estos estudios se han realizado tanto con resveratrol sólido como en disolución, observándose que el resveratrol sólido es mucho más estable que el resveratrol en disolución (Fan y col., 2005). En aquellos alimentos en los que el resveratrol se encuentra disuelto, hay que tener especial cuidado con las condiciones de almacenamiento, ya que es muy sensible a la luz, oxígeno, temperatura y pH ácido, haciendo difícil también la elaboración de alimentos funcionales que lo contengan, ya que en el procesado de los mismos se puede perder parte del resveratrol adicionado.

## 2. CICLODEXTRINAS (CDs)

### 2.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN

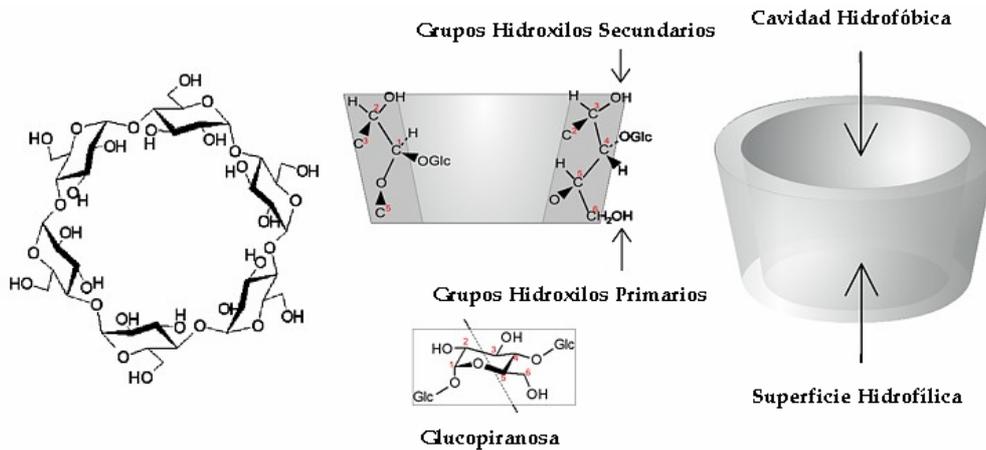
Las ciclodextrinas (CDs) son azúcares cíclicos naturales de seis ( $\alpha$ -CDs), siete ( $\beta$ -CDs) u ocho ( $\gamma$ -CDs) unidades de glucosa, unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4) (**Figura I.4**). También son conocidas como cicloamilosa, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger (Villiers, 1891; 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).

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  $(C_6H_{10}O_5)_3 \cdot 3 H_2O$ . 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  $\alpha$  y dextrina cristalina  $\beta$ . La dextrina cristalina  $\gamma$  no fue aislada hasta 1935. En 1942 se observó la estructura de  $\alpha$ - y  $\beta$ -CDs por cristalografía de rayos X, corroborando así las estructuras propuestas con anterioridad. En 1948, se elucidó la estructura de  $\gamma$ -CDs por rayos X y se reconoció que las CDs pueden formar complejos de inclusión. Se observó que 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 C-2 y C-3 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  $-CH_2OH$  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 I.4**). 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 French en 1957 y Cramer en 1954, 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  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\xi$ - y  $\eta$ -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, Cramer y Plieninger 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.** Estructura de  $\beta$ -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.

## 2.2. PROPIEDADES

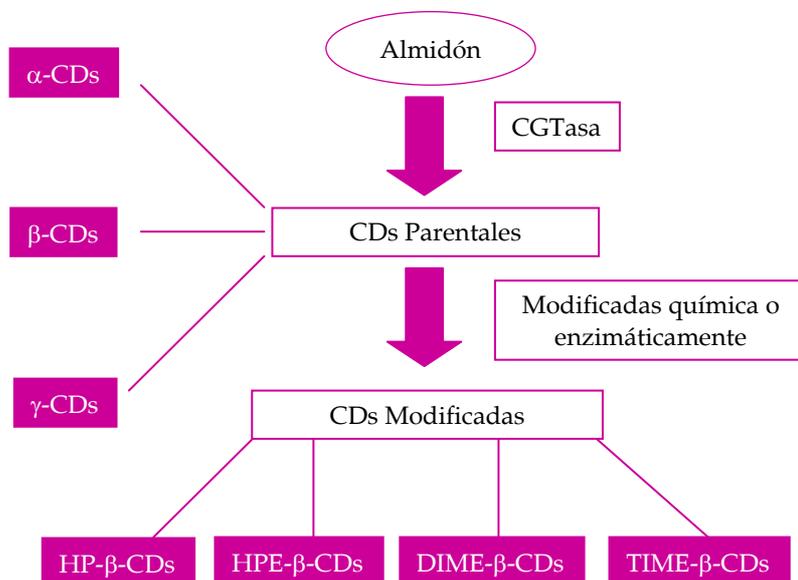
Hay tres tipos de CDs denominadas de primera generación, parentales o naturales:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs.  $\beta$ -CDs es el tipo más utilizado debido a su bajo coste. Las principales características de las CDs naturales se describen en la **Tabla I.5**.

**Tabla I.5.** *Propiedades de las CDs.*

Propiedades	$\alpha$ -CDs	$\beta$ -CDs	$\gamma$ -CDs
Número de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25 °C	14,5	1,85	23,2
Diámetro exterior	14,6	15,4	17,5
Diámetro de la cavidad	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura de la cavidad	7,9	7,9	7,9
Volumen de la cavidad	174	262	427

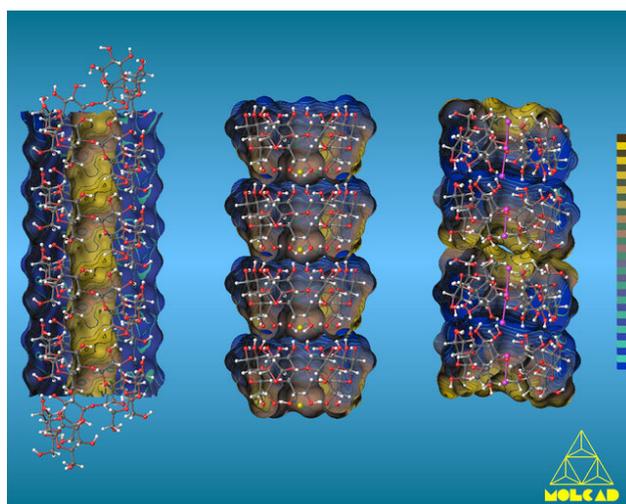
A partir de las CDs naturales se han sintetizado otros tipos de CDs llamadas derivadas o modificadas, que son obtenidas por acilaciones, esterificaciones o eterificaciones de los OH de los carbonos primarios y secundarios de las CDs naturales. Dependiendo del sustituyente adicionado, la solubilidad de 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, 1981). La síntesis de CDs modificadas requiere la selección de reactivos, optimización de las condiciones de reacción y una buena separación de los productos. Las  $\beta$ -CDs han sido modificadas con más de 20 sustituyentes diferentes en una región específica de manera selectiva (**Figura I.5.**).

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.6.**). Estos bloques de construcción, que no se pueden obtener por otros métodos, se emplean para la separación de mezclas complejas de moléculas y enantiómeros (Szetjili, 1998).



- 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.5.** Tipos de CDs modificadas.



**Figura I.6.** Hilos supramoleculares.

### 2.3. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS

Recientemente han sido revisados los perfiles de seguridad de las CDs naturales y algunas modificadas (Irie y Uekama, 1997; Thompson, 1997). 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  $\gamma$ -, 2-hidroxipropil- $\beta$ -, sulfobutiléter- $\beta$ -, sulfatada- $\beta$ - y maltosil- $\beta$ -CDs son seguras, incluso administradas de forma parenteral. Sin embargo, otros estudios toxicológicos revelan que las parentales  $\alpha$ - y  $\beta$ -CDs y las modificadas metil- $\beta$ -CDs no deben de ser administradas por vía parenteral (Martín del Valle, 2004).

#### 2.3.1. $\alpha$ -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).

#### 2.3.2. $\beta$ -CDs

Son menos irritantes que las  $\alpha$ -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  $\alpha$ -CDs no son metabolizadas en el tracto intestinal superior, pero sí son degradadas por las bacterias de ciego y colon. 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).

### 2.3.3. $\gamma$ -CDs

De los tres tipos de CDs naturales, es para las que menos efectos adversos se han descrito (Szente y col., 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  $\beta$ -CDs y sus modificadas. Con frecuencia, sus complejos tienen una solubilidad limitada en soluciones acuosas, tendiendo a precipitar generando soluciones opalescentes (Szente y col., 1998).

### 2.4. 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, 1981). 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 y col., 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 (Szetjli, 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 ( $\Delta G_T$ ) 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<sup>2</sup> 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

## INTRODUCCIÓN

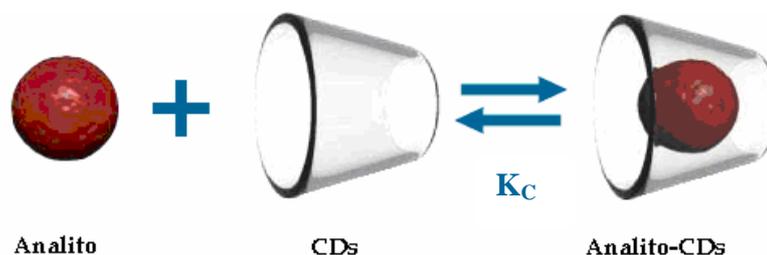
---

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.7.**).



**Figura I.7.** Formación del complejo huésped-CDs.

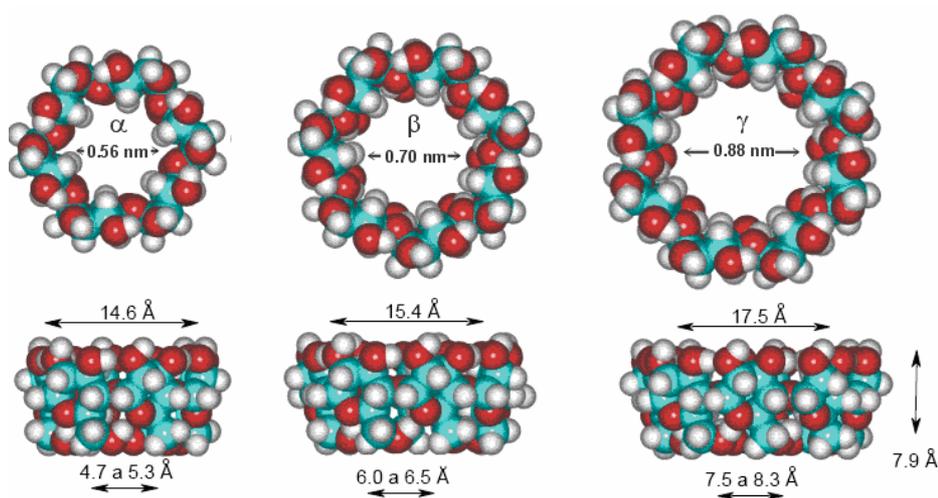
Los complejos de inclusión se pueden formar en estado cristalino o en disolución, siendo el agua el disolvente más utilizado en este caso. La formación de complejos de inclusión se puede llevar a cabo en un sistema de co-solventes y en presencia de cualquier disolvente no acuoso.

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 y col., 2001), farmacia (Bhardwaj y col., 2000), cosmética (Holland y col., 1999), protección del medio ambiente (Bhardwaj y col., 2000), bioconversión (Dufosse y col., 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 nativas, el número de unidades de glucosas de cada una de ellas determina el diámetro interior de la cavidad y su volumen (**Figura I.8.**). En base a estas dimensiones, las  $\alpha$ -CDs pueden complejar moléculas de bajo peso molecular o compuestos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos; las  $\beta$ -CDs pueden complejar moléculas aromáticas y heterociclos; y las  $\gamma$ -CDs pueden acomodar moléculas más grandes, tales como macrociclos y esteroides (Martín del Valle, 2004).



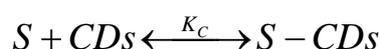
**Figura I.8.** Diámetro externo e interno de las diferentes CDs.

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.

### 2.4.1. 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 y col., 1993); oxidación enzimática (Núñez-Delicado y col., 1999); reactividad química (Loftsson, 1995; Másón y col., 1998); fluorescencia (Muñoz de la Peña y col., 2007), resonancia magnética nuclear (Harabagiu y col., 2004); pKa de grupos funcionales; cambios calorimétricos (Uekama, 1979); descenso del punto de congelación (Suzuki y col., 1993) y cambios en los tiempos de retención cromatográfica (López-Nicolás, y col., 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:

$$K_C = \frac{S - CDs}{[S]_L [CDs]_L} \quad (1)$$

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.

## 2.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS

### 2.5.1. 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.

#### 2.5.1.1. 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.

#### 2.5.1.2 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.

### 2.5.1.3. 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, utiliza más agua y una buena mezcla permite una mejor dispersión, dando lugar a la separación y aislamiento de las moléculas del aceite.

### 2.5.1.4. 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.

## 2.5.2. Co-precipitación

Las CDs se disuelven en agua caliente y el analito se añade a la mezcla en agitación. La concentración de  $\beta$ -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 y col., 1993; Pitha y col., 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- $\beta$ -CDs se optimizó tras la adición de hidróxido de amonio (Torres-Labandeira y col., 1990).

### **2.5.3. 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 coprecipitación.

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.

### **2.5.4. 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.

### **2.5.5. 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.

### **2.5.6. 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 se pueden controlar en el panel situado en el barril de la extrusora. 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 utiliza 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.

### **2.5.7. 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.

## 2.6. 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.

### 2.6.1. 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.

### 2.6.2. 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 en lo más posible las posibles pérdidas. El secado por atomización no es viable para el secado de compuestos altamente volátiles o sensibles al calor.

### 2.6.3. 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.

### 2.7. 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.

### 2.8. 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).

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

##### 2.8.1.1. 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.

#### *2.8.1.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear*

La espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  aplicada a sólidos, es una técnica que permite el estudio de las propiedades dinámicas de los complejos de inclusión en estado sólido (Saitô y col., 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  $\text{C}_1$  y  $\text{C}_4$  de las CDs se relacionan con los cambios de conformación que se producen debido a la formación de complejos de inclusión (Inane y col., 1986).

#### *2.8.1.3. Espectroscopía de absorción infrarroja*

En el espectro de absorción (IR), se pueden apreciar desplazamientos de aproximadamente 40  $\text{cm}^{-1}$  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  $-\text{OH}$ , 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 y col., 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.

#### *2.8.1.4. Espectroscopía 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 y col., 2006).

### 2.8.1.5. 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).

### 2.8.2. 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.

### 2.8.2.1. 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.9.**).

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<sub>s</sub>, que indica la presencia de complejos con una solubilidad limitada y tipo B<sub>i</sub>, que indica la presencia de complejos totalmente insolubles. Los diagramas tipo A se subdividen en tres grupos: tipo A<sub>L</sub>, la solubilidad del complejo aumenta de forma lineal conforme aumenta la concentración de CDs, tipo A<sub>P</sub>, isoterma de desviación positiva y tipo A<sub>N</sub> isoterma de desviación negativa (**Figura I.9.**).

Los diagramas de tipo A<sub>L</sub> 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, S<sub>2</sub>L, S<sub>3</sub>L, ..., S<sub>m</sub>L. Si la pendiente del sistema tipo A<sub>L</sub> es mayor que uno, indica que los complejos son de orden superior a uno para el analito. Una pendiente menor de uno no excluye necesariamente los complejos de orden superior, sino que se supone que los complejos son 1:1, en ausencia de otra información. El tipo A<sub>P</sub> sugiere la formación de complejos de orden superior a uno respecto a las CDs, es decir, SL<sub>2</sub>, SL<sub>3</sub>, ..., SL<sub>n</sub>. La estequiometría del

tipo  $A_P$  se puede calcular al ajustar las curvas. Los diagramas de tipo  $A_N$  son sistemas difíciles de interpretar.

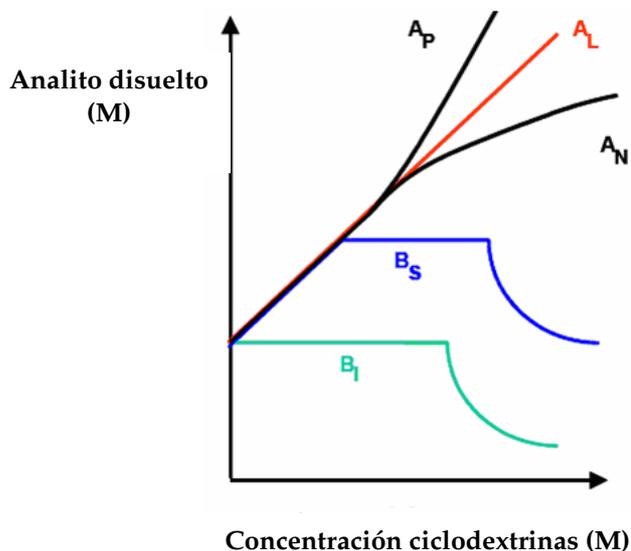


Figura I.9. Tipos de diagramas de fases con CDs.

A menudo, las  $\beta$ -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:

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

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:

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

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

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

$$[S]_r = S_0 + m[S_m - L_n] \quad (4)$$

$$[L]_r = [L] + n[S_u - L_n] \quad (5)$$

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

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

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

$$[L] = [L]_r - n[S_m L_n] \quad (8)$$

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

#### 2.8.2.2. Métodos cinéticos

Las CDs aceleran determinadas reacciones gracias a un efecto catalítico (Breslow y col., 1980; Sojo y col., 1999), aunque a veces pueden ralentizarlas al proteger a los sustratos de especies reactivas externas tales como oxígeno (Uekama y col 1983; Núñez-Delicado y col., 1999; Lucas-Abellán y col., 2008a) y luz ambiental (Uekama y col., 1978), 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 y col., 1978).

### 2.8.2.3. 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.

#### 2.8.2.3.1. 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  $K$ . 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.

#### 2.8.2.3.2. 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.

#### 2.8.2.3.3. 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.

### 2.8.2.3.4. 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 y col., 2004).

Aunque se pueden realizar distintos tipos de RMN, los más difundidos son de  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . La  $^1\text{H}$ -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  $\text{D}_2\text{O}$  muy baja, lo que dificulta la obtención de los mismos al tener que trabajar a bajas concentraciones de CDs. Por el contrario, la  $^{13}\text{C}$ -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 ( $\delta$ ) de las CDs o de la molécula complejada.

### 2.8.2.3.5. 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).

#### 2.8.2.3.6. 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 y col., 2008).

#### 2.8.2.3.7. 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).

#### 2.8.2.3.8. 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 y col., 1978). La modificación de estos parámetros cromatográficos se ha empleado con fines analíticos (Muñoz de la Peña y col., 1991)

### 2.9. 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 y col., 2002).

#### 2.9.1. 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 y col., 1999). En la preparación de productos de baño, las CDs regulan la salida de la fragancia al formar complejos de inclusión con éstas y con fosfato de

calcio (Tatsuya, 1999). En 1999 Holland y col. prepararon composiciones (en cosmética) que contenían CDs para prolongar la duración de la fragancia, pero las CDs también se utilizan para secuestrar y así reducir los olores corporales (Trinh y col., 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  $\mu\text{m}$ , 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- $\beta$ -CDs son el tipo de CDs que proporcionan una mayor protección antimicrobiana (Woo y col., 1999).

Las CDs también se utilizan en detergentes de lavavajillas y de ropa para enmascarar los olores en el punto de lavado (Foley y col., 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 y col., 1999). También se utilizan en la preparación de lociones de protección solar en una proporción 1:1 (pantalla solar/HP- $\beta$ -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 y col., 1999).

### **2.9.2. 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

## INTRODUCCIÓN

---

tecnología convencional de encapsulación usada para la protección de sabores (Reineccius y col., 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 y col., 2004; Jung y col., 2008).

### *2.9.2.1. 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.

### *2.9.2.2. 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<sub>2</sub> 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).

### *2.9.2.3. 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  $\beta$ -CDs, no se observan productos de descomposición en las 6 primeras horas de exposición del alimento a la luz (Szejtli y col 1979). Resultados similares se obtuvieron al complejar el cinamaldehído con  $\beta$ -CDs, estabilizándolo frente a la luz UV (Szente y Szejtli 1987, 2004).

#### 2.9.2.4. *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).

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

#### 2.9.2.6. *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  $\beta$ -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 minimamente procesados. (Núñez-Delicado y col., 2005).

## INTRODUCCIÓN

---

La gelatinización es una característica importante de almidones y los alimentos que lo contengan, como las harinas. La presencia de  $\beta$ -CDs modifica considerablemente la gelatinización de la harina de trigo (Kim y Hill, 1984). La presencia del 1,5% de  $\beta$ -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 complejado que se libera al medio acuoso en una disolución, depende de diferentes factores, como la temperatura, la constante de complejación y las concentraciones relativas de ambos componentes. 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  $\beta$ -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  $\beta$ -CDs, el sabor amargo puede ser enmascarados (Specht y col., 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  $\beta$ -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  $\beta$ -CDs antes del tratamiento térmico. Esto es debido a que naringina y limonina (compuestos responsables del sabor amargo) forman complejos estables con  $\beta$ -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 y col., 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  $\beta$ -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  $\beta$ -CDs para elaborar mantequilla baja en colesterol, que se comercializa en Bélgica, con el nombre de Balade™, desde 1992 (Comini y Mentink, 1991). Para conseguirlo, se mezcla la mantequilla con  $\beta$ -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).

#### 2.9.2.7. *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).

### 2.9.3. 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 y col., 1994, Rajewski y Tella, 1996). 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 y col., 1992), en soluciones acuosas de enjuague bucal (Kristmundsdóttir y col 1996), sistemas de administración nasal de drogas (Kublik y col., 1996) y en soluciones oculares (Lofsson y Stefánsson, 1997; van Dorne, 1993; Jarho y col., 1996).

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; Zhao y col., 1995).

Hay numerosas aplicaciones de CDs en el ámbito de los productos farmacéuticos. Por ejemplo, la adición de  $\alpha$ - o  $\beta$ -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  $\alpha$ -amilasas. Las CDs no pueden ser degradadas por las amilasas salivares y pancreáticas pero sí por las  $\alpha$ -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).

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

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

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.

Las CDs, además de modificarse para las reacciones de catálisis también se modifican para reacciones de hidrólisis selectiva y en la hidroximetilación de fenoles. Estas modificaciones químicas de las CDs, les confiere una gran actividad catalítica, ya que aumentan la velocidad de reacción en la conversión 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

## INTRODUCCIÓN

---

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

### 2.10. 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,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -CDs están consideradas como GRAS (lista de la FDA de los aditivos alimentarios que son "generalmente reconocidos como seguros") y pueden ser comercializadas como tal. En Japón,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -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  $\alpha$ -y  $\gamma$ -CDs están clasificados como nuevos alimentos a partir de 2004 y 2003, respectivamente (Cravotto y col., 2006).

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

### 3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

El estudio de la capacidad antioxidante en productos alimenticios se ha llevado a cabo mediante numerosos ensayos *in vitro*.

Las especies de oxígeno (ROS) se comportan como agentes oxidantes, ya que son muy reactivas y bastante inestables. Las ROS pueden tener en nuestro organismo un origen endógeno, relacionado con el metabolismo del oxígeno y con distintas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunológico, o pueden provenir de fuentes externas como el tabaco, la contaminación dietas desequilibradas, ejercicio intenso, la radiación ultravioleta, el ozono o ciertos medicamentos. Nuestro organismo dispone de mecanismos de defensa antioxidante frente a ROS que comprenden sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Halliwell y Gutteridge, 1990). Ciertas enzimas, como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa, neutralizan estas especies.

Los sistemas defensivos no enzimáticos abarcan una serie de compuestos antioxidantes como albúmina, ceruloplasmina, transferrina, glutatión, bilirrubina, ácido úrico, ubiquinona o melatonina. En ciertas situaciones extremas, estas defensas no son suficientes y las especies reactivas producen daño oxidativo, tanto en biomoléculas como en componentes celulares (Sies, 1991; Halliwell, 1996).

El daño o estrés oxidativo se define como un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, se da una situación en la que aumenta la velocidad de generación de ROS y una disminución en

## INTRODUCCIÓN

---

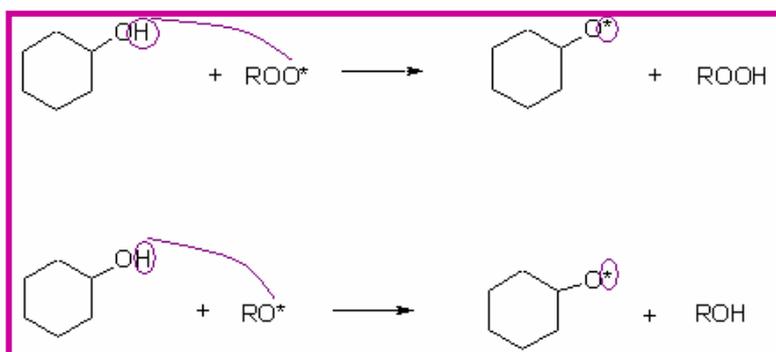
los mecanismos de defensa. En esta situación de estrés oxidativo, se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres al reaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos, ADN y componentes de la matriz extracelular, desencadenando un daño irreversible que puede llevar incluso a la muerte celular. Por ello, este fenómeno se relaciona con el origen y desarrollo de ciertas enfermedades multifactoriales de carácter crónico, como la oxidación de las LDL y la enfermedad cardiovascular (Berliner y Heinecke, 1996); el daño oxidativo al ADN y el cáncer (Bagchi y col., 2000; Diplock y col. 1998); la oxidación de las proteínas de las lentes oculares y la alteración de la visión (Dean y col., 1997; Taylor y Cataract, 1993).

La ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos fenólicos, previene o disminuye el desarrollo de estas enfermedades (Gerster, 1995; Park y col., 2003; Le Core y col., 2004; Jampol, L.M., Ferris, 2001). En consecuencia, se ha hipotetizado que una dieta rica en fruta y verdura puede aumentar la defensa antioxidante del organismo contrarestando la producción de radicales libres, minimizando el daño oxidativo y el riesgo de contraer enfermedades.

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Son metabolitos secundarios que se sintetizan como mecanismo de defensa y son, en gran medida, responsables de las propiedades del color, astringencia y flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Se encuentran en frutas y verduras así como en sus productos derivados, como el vino o la cerveza.

Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo (Bravo, 1998). Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado (**Figura I.10.**) (Pannala, 2001).

La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo presentes en su estructura (Cao y col., 1996).



**Figura I.10.** Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres.

La actividad antioxidante, *in vitro* (Cao y Prior., 2001; Dávalvos y col., 2004) puede ser determinada por varios métodos:

- Potencial Antioxidante Total (TRAP)
- 2,2 - difenil - picril - hidracil (DPPH)
- ácido 2,2'- azino-bis(3-etilbenzotiazolina) - 6-sulfónico (ABTS)
- Reducción del Hierro - Poder Antioxidante (FRAP)
- Capacidad de Absorción del Radical de Oxígeno (ORAC)

El fundamento de todos ellos se basa en determinar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es directamente proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra.

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH (Arnao, 1999; Cao y Prior., 2001). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que no necesita preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio) (Arnao, 1999), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o bien electroquímica. Usando ABTS se puede medir la actividad antioxidante de compuestos tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica, mientras que el DPPH, como solo puede disolverse en medio orgánico, se utiliza para medir la capacidad antioxidante de compuestos de naturaleza lipofílica (Arnao, 1999). El radical ABTS<sup>•+</sup> tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia en medio alcohólico a 414, 654, 754 y 815 nm, lo que permite

medir su desaparición a varias longitudes de onda, mientras que el DPPH presenta un solo pico de absorbancia a 515 nm.

El método ORAC fue desarrollado por los investigadores de *Nacional Institute on Aging del National Institute of Health de EE.UU.* En el año 2007, el Departamento de Agricultura estadounidense -United State Department of Agriculture (USDA)- emitió una lista sobre el valor ORAC de varios vegetales. Es el único método que combina en un solo valor el tiempo y velocidad de inhibición del daño oxidativo. Y aunque los expertos insisten en que no tiene suficiente evidencia científica, sí proporciona una orientación aproximada de la capacidad antioxidante de los alimentos en el organismo.

#### 4. JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA DE LA TESIS

En la presente Tesis Doctoral se plantea el estudio de la complejación del resveratrol con diferentes tipos de CDs. Por los beneficios que puede aportar el resveratrol a la salud, y las escasas cantidades y fuentes en las que se encuentra, sería interesante poder elaborar alimentos funcionales que lo contengan. Así, para el desarrollo de bebidas enriquecidas con resveratrol, el principal obstáculo que debemos solventar es su escasa solubilidad en agua, unido a su inestabilidad frente al calor, luz y el oxígeno; parámetros importantes para el procesado y conservación de alimentos. Estos inconvenientes podrían solventarse mediante la complejación del resveratrol con CDs, ya que dicho proceso aumenta su solubilidad acuosa y lo protege de la degradación por diferentes factores. Además, también es interesante estudiar el efecto de la complejación en su capacidad antioxidante por diferentes métodos. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

- Estudio de la complejación del resveratrol con diferentes tipos de CDs.
- Cálculo de las constantes de complejación por diferentes métodos.
- Estudio del efecto de la complejación sobre la actividad antioxidante del resveratrol por diferentes métodos.



**CAPÍTULO II. CYCLODEXTRINS AS RESVERATROL  
CARRIER SYSTEM**





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Food Chemistry 104 (2007) 39–44

Food  
Chemistry

[www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Cyclodextrins as resveratrol carrier system

Carmen Lucas-Abellán, Isabel Fortea, José Manuel López-Nicolás,  
Estrella Núñez-Delicado \*

*Dipartimento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM),  
Avenida de los Jerónimos s/n., 30107 Guadalupe, Murcia, Spain*

Received 26 June 2006; received in revised form 24 October 2006; accepted 26 October 2006

### Abstract

The formation of resveratrol–cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solutions has been characterized using the hydroperoxidase activity of lipoxygenase as the enzymatic system. The addition of cyclodextrins to the reaction medium had an inhibitory effect on resveratrol oxidation by lipoxygenase due to the complexation of phytoalexin into the cyclodextrin cavity, which is in equilibrium with free cyclodextrins and free resveratrol, the only effective substrate for lipoxygenase. This inhibitory effect depends on the complexation constant  $K_c$  between resveratrol and the type of cyclodextrins used. In the present work  $\beta$ - and  $G_2$ - $\beta$ -cyclodextrins were used and their  $K_c$  were calculated by nonlinear regression of the inhibition curves obtained in the presence of cyclodextrins. The values obtained were 4317 and 5130  $M^{-1}$  for  $\beta$ - and  $G_2$ - $\beta$ -cyclodextrin, respectively, values which were checked and confirmed by the “cyclodextrin assay”. © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Resveratrol; Cyclodextrins; Encapsulation; Lipoxygenase; Enzymatic method

### 1. Introduction

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a triphenolic phytoalexin found in a variety of plant species (Frémont, 2000; Sanders, McMichael, & Hendrix, 2000), such as grapevines, mulberries and peanuts. Its synthesis is triggered by plant stress conditions such as fungal infection, UV irradiation and exposure to ozone or heavy metal ions (Frémont, 2000).

Because of its high concentration in grape skin, but not in grape flesh, white wine contains small amounts of resveratrol compared with red wine. It has been suggested that the significant amounts of resveratrol present in red wine (Goldberg, Hahn, & Parkes, 1995) might explain, at least in part, the so-called “French paradox”, the apparent ability of moderate consumption of red wine to reduce the risk of cardiovascular disease (Bertelli et al., 1995; Frankel, Waterhouse, & Kinsella, 1993; Goldberg et al., 1995; Pace-Asciak, Hahn, Diamandis, Soleas, & Goldberg, 1995).

The phenolic nature of resveratrol explains its antioxidant activity. It has been shown to provide health-promoting benefits such as lowering the incidence of coronary heart disease (Frankel et al., 1993), and to possess cancer chemoprotective activity (Jang et al., 1997) and estrogenic activity with varying degrees of estrogen receptor agonism (Ghem, McAndrews, Chien, & Jameson, 1997) due to its similarity in structure with the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES) (Ghem et al., 1997).

Resveratrol also interferes with the arachidonate metabolism by reducing the levels of leukotrienes generated by the lipoxygenase pathway and prostaglandins generated by the cyclooxygenase (COX) pathway (Jang et al., 1997; Kimura, Okuda, & Arichi, 1985; Subbaramaiah et al., 1998). It has been described as a potent competitive inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase (LOX) (Pinto, García-Barrado, & Macías, 1999).

Recently it has been concluded that resveratrol blocks the activation of the COX-2 gene (the gene that activates the COX-2 enzyme). This ingredient of functional foods was the first compound identified to both block the COX-2 gene and to inactivate the enzyme created by this

\* Corresponding author. Fax: +34 968 278620.

E-mail address: [enunez@pdi.ucam.edu](mailto:enunez@pdi.ucam.edu) (E. Núñez-Delicado).

gene (Martin, Villegas, La Casa, & De La Lastra, 2004). Some researchers believe that resveratrol may some day be viewed as an improvement over acetylsalicylic acid in fighting diseases associated with COX-2 activity, while to gain such benefits, it is either necessary to eat a few red grapes every day or take a supplement containing resveratrol.

The high hydrophobicity of resveratrol and its sensitivity to external agents such as air, light and oxidative enzymes may constitute a serious problem for its bioavailability, formulation and manipulation in the elaboration of functional foods.

Cyclodextrins (CDs) are a group of naturally occurring cyclic oligosaccharides derived from starch with six, seven or eight glucose residues linked by  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  glycosidic bonds in a cylinder-shaped structure, and denominated  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins, respectively. The central cavity of these molecules is hydrophobic, while the rims of the surrounding walls are hydrophilic. This hydrophobic cavity forms inclusion complexes with a wide range of organic and inorganic guest molecules (Cai et al., 1990), altering their physicochemical behaviour and reducing their undesirable effects. In the pharmaceutical, cosmetics and food industries, cyclodextrins have been used as complexing agents to increase the water solubility of various compounds, such as drugs, vitamins and food colorants (Buschmann & Schollmayer, 2002; Loftsson & Brewster, 1996; Szejtli, 1988). It was demonstrated that complexation can considerably increase the solubility, stability and bioavailability of the guest molecule.

Given resveratrol's many health-promoting activities, it is necessary to develop a method for increasing its bioavailability and stability.

In this paper, the *in vitro* formation of resveratrol–cyclodextrin inclusion complexes was characterized using the enzymatic system, lipoxygenase, which oxidizes resveratrol in the presence of  $H_2O_2$ . A study of this oxidation in the presence of cyclodextrins permits determination of the complexation constant between resveratrol and cyclodextrins.

## 2. Materials and methods

Electrophoretically pure (Kulkarni & Cook, 1988) soybean lipoxygenase (EC 1.13.11.12) Type V (701,000 Sigma units/mg protein) prepared by affinity chromatography and *trans*-resveratrol were purchased from Sigma (Madrid, Spain). Hydrogen peroxide was purchased from Aldrich (Madrid, Spain). Cyclodextrins were kindly supplied by Amaizo, American Maize-Products Company, Hammond, Indiana. All other chemicals used were of analytical grade.

The hydrogen peroxide, lipoxygenase and resveratrol solutions were freshly prepared every day, and their concentrations were calculated using  $\epsilon_{240} = 39.4 M^{-1} cm^{-1}$  (Nelson & Kiesow, 1972),  $\epsilon_{280} = 160,000 M^{-1} cm^{-1}$  (Spaapen, Veldink, Liefkens, Vliegthart, & Kay, 1979) and  $\epsilon_{312} = 33,400 M^{-1} cm^{-1}$  (Pinto et al., 1999), respectively.

The activity was followed spectrophotometrically in a Shimadzu model S33 spectrophotometer at the absorption maximum of the oxidation product of resveratrol (250 nm).

Differences between the extinction coefficients ( $\Delta\epsilon$ ) corresponding to the difference between absorption due to substrate and reaction products were calculated for the oxidation process. The  $\Delta\epsilon$  values were calculated from a calibration curve of resveratrol (0–30  $\mu M$ ) quantitatively oxidized in the presence of an excess of sodium periodate, by plotting the increase in absorbance at 250 nm (from  $t = 0$  to constant absorbance values) against resveratrol concentration. Taking into account the reaction stoichiometry, in which two resveratrol molecules generate one product molecule (a resveratrol dihydrodimer), the value obtained at pH 9.0 was  $\Delta\epsilon_{250} = 29,600 M^{-1} cm^{-1}$ .

Unless otherwise stated, the standard reaction medium at 25 °C contained 100 mM sodium borate buffer (pH 9.0), 400  $\mu M H_2O_2$ , 30  $\mu M$  resveratrol and 50 nM of soybean lipoxygenase in a final volume of 1 mL. The steady state was calculated from the linear zone of the product accumulation curve. A reference cuvette containing all the components of the reaction medium except the enzyme served as the control.

## 3. Results and discussion

LOX (linoleate: oxygen oxidoreductase; EC 1.13.11.12) is a non-heme iron-containing enzyme that has a dual function: dioxygenase and hydroperoxidase (Joseph, Srinivasan, & Kulkarni, 1993; Kulkarni & Cook, 1998; Naidu & Kulkarni, 1994). This enzyme catalyzes the oxidation of resveratrol to its oxidized form in the presence of  $H_2O_2$  in the reaction medium (Pinto et al., 1999; Pinto, García-Barrado, & Macías, 2003) (Fig. 1a). This enzyme also catalyzes the oxidation of resveratrol in the presence of cyclodextrins, producing a characteristic decrease in the resveratrol maximum at 312 nm, with a concomitant increase in absorbance at 250 nm, which can be attributed to the production of  $\delta$ -viniferin (Fig. 1b). The formation of three isosbestic points at 240, 280 and 360 nm indicated that resveratrol was transformed into its oxidized form at a constant ratio in both cases (Fig. 1a and b). However, as can be seen from Fig. 1 inset, the oxidation rate decreased in the presence of cyclodextrins.

The fact that the oxidation of resveratrol by the hydroperoxidase activity of LOX decreased in the presence of cyclodextrins can be used to determine the complexation constant by means of the enzymatic method developed by our group (López-Nicolás, Bru, & García-Carmona, 1997; Núñez-Delgado, Sojo, Sánchez-Ferrer, & García-Carmona, 1999a, Núñez-Delgado, Sojo, Sánchez-Ferrer, & García-Carmona, 1999b).

The oxidation of resveratrol by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase was carried out in the presence of two different types of cyclodextrins,  $\beta$ - and maltosyl- $\beta$  cyclodextrins ( $\beta$ -CDs and G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs), to determine the

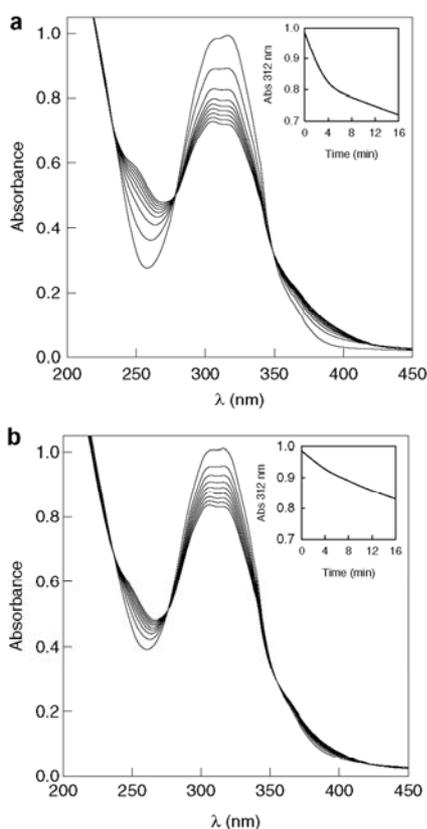


Fig. 1. Oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of  $H_2O_2$ . The reaction medium at 25 °C contained 100 mM sodium borate buffer, pH 9.0, 30  $\mu$ M resveratrol, 400  $\mu$ M  $H_2O_2$ , and 50 nM lipoxygenase. (a) In the absence of CDs. (Inset) Time course of the oxidation of resveratrol in the absence of CDs. (b) In the presence of  $G_2$ - $\beta$ -CDs 1 mM. The scans were obtained every 2 min. (Inset) Time course of the oxidation of resveratrol in the presence of CDs.

complexation constant between resveratrol and each type of cyclodextrins.

An experiment was performed in which LOX activity was determined in the presence of increasing concentrations of  $\beta$ -CDs or  $G_2$ - $\beta$ -CDs, while the resveratrol concentration was kept constant. As can be seen in Fig. 2, LOX activity decreased as the cyclodextrin concentration increased, depending on the type of cyclodextrin used, the inhibition being greater in the case of  $G_2$ - $\beta$ -CDs than in the case of  $\beta$ -CDs.

These results indicated that resveratrol, a phytoalexin with three hydroxyl groups in its structure, may enter in the hydrophobic cavity of both  $\beta$ -CDs and  $G_2$ - $\beta$ -CDs to form inclusion complexes.

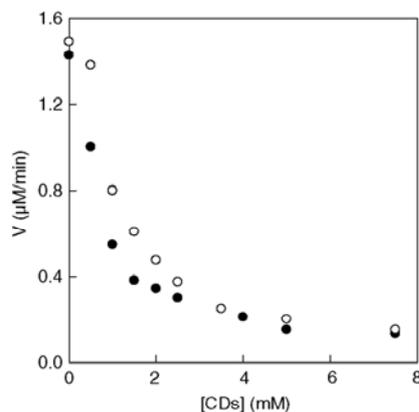


Fig. 2. Effect of cyclodextrin on the oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of  $H_2O_2$ . The reaction medium at 25 °C contained 100 mM sodium borate buffer, pH 9.0, 30  $\mu$ M resveratrol, 400  $\mu$ M  $H_2O_2$ , 50 nM lipoxygenase and increasing concentrations of  $G_2$ - $\beta$ -CDs (●) or  $\beta$ -CDs (○).

When increasing concentrations of  $G_2$ - $\beta$ -CDs were added to the reaction medium at different resveratrol concentrations, a clear decrease in LOX activity was observed in all cases (Fig. 3). Assuming that this inhibitory effect was due to the formation of the inclusion complexes and that free resveratrol is the only form of substrate which LOX can use, the Michaelis-Menten velocity equation could be expressed as a function of free resveratrol concentration ( $[resv]_f$ ):

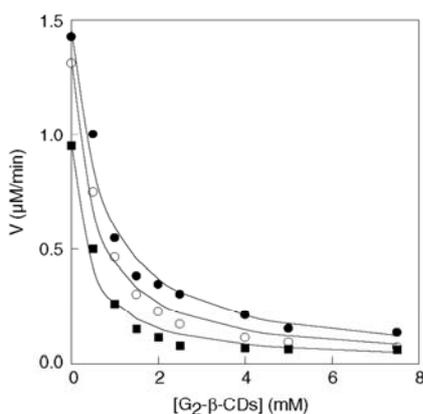


Fig. 3. Effect of  $G_2$ - $\beta$ -CDs on the oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of  $H_2O_2$ . The reaction medium at 25 °C contained 100 mM sodium borate buffer, pH 9.0, 30  $\mu$ M resveratrol, 400  $\mu$ M  $H_2O_2$ , 50 nM lipoxygenase and increasing concentrations of  $G_2$ - $\beta$ -CDs. (●) 10  $\mu$ M resveratrol, (○) 20  $\mu$ M resveratrol, (■) 30  $\mu$ M resveratrol.

$$v = \frac{V_m [\text{resv}]_f}{K_M + [\text{resv}]_f} \quad (1)$$

This  $[\text{resv}]_f$  could be expressed as a function of the only two known parameters  $[\text{resv}]_t$  and  $[\text{CD}]_t$ , where the subscript t stands for overall compound concentration. Assuming that only one molecule of resveratrol can enter a cyclodextrin molecule (stoichiometry 1:1), the equilibrium may be expressed as:



where the complexation constant,  $K_c$ , is defined as:

$$K_c = \frac{[\text{resv-CD}]}{[\text{resv}]_f [\text{CD}]_f} \quad (3)$$

Taking into account the mass balance

$$[\text{resv}]_t = [\text{resv}]_f + [\text{resv-CD}] \quad (4)$$

$$[\text{CD}]_t = [\text{CD}]_f + [\text{resv-CD}] \quad (5)$$

and Eq. (3),  $[\text{CD}]_f$  and  $[\text{resv-CD}]$  can be expressed as:

$$[\text{CD}]_f = \frac{[\text{resv}]_t - [\text{resv}]_f}{K_c [\text{resv}]_f} \quad (6)$$

$$[\text{resv-CD}] = K_c [\text{resv}]_f [\text{CD}]_f \quad (7)$$

Then, substituting these two later equations into Eq. (4), the following quadratic relationship is obtained:

$$K_c [\text{resv}]_f^2 + ([\text{CD}]_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1) [\text{resv}]_f - [\text{resv}]_t = 0 \quad (8)$$

From this,  $[\text{resv}]_f$  can be obtained:

$$[\text{resv}]_f = \frac{-([\text{CD}]_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{resv}]_t}}{2K_c} \quad (9)$$

and substituting into Eq. (1), to give:

$$v = \frac{V_m \left[ \frac{-([\text{CD}]_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{resv}]_t}}{2K_c} \right]}{K_M + \left[ \frac{-([\text{CD}]_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{resv}]_t}}{2K_c} \right]} \quad (10)$$

This Eq. (10) shows a nonlinear relationship between  $v$  and  $[\text{CD}]_t$  as in Fig. 3. Fitting the data by nonlinear regression using Sigma Plot (Jandel Scientific), a value of  $5130 \pm 421 \text{ M}^{-1}$  was obtained for  $K_c$  between resveratrol and  $\text{G}_2\text{-}\beta\text{-CDs}$ . This  $K_c$  value was similar to that determined by Morales, Bru, García-Carmona, Ros Barceló, and Pedreño (1998) between resveratrol and dimethyl- $\beta\text{-CDs}$  ( $6933 \text{ M}^{-1}$ ) using the physical method described by Higuchi and Connors (1965). In order to clarify whether LOX was only working with free resveratrol, the data in Fig. 3 were replotted in Fig. 4 as a

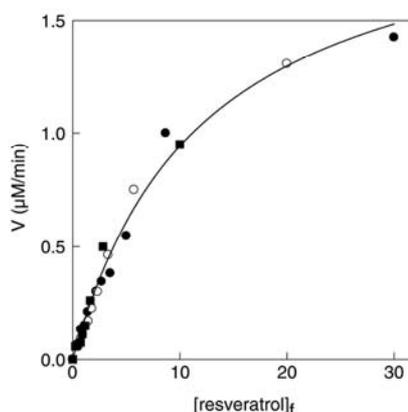


Fig. 4. Effect of free resveratrol concentration on lipoxigenase activity. The free resveratrol concentrations were calculated from data shown in Fig. 3, using Eq. (9) (see text for details). (●) 10  $\mu\text{M}$  total resveratrol, (○) 20  $\mu\text{M}$  total resveratrol, (■) 30  $\mu\text{M}$  total resveratrol.

function of free resveratrol, using Eq. (9). The new plot showed that the points of the different curves in Fig. 3 which represent the same activities also have the same  $[\text{resv}]_f$  in Fig. 4. This clearly indicates that the enzyme was only sensitive to free resveratrol, as has been previously described for other LOX substrates included in CDs (Núñez-Delgado et al., 1999a, 1999b; Núñez-Delgado, Sánchez-Ferrer, & García-Carmona, 1997). To confirm that LOX works only with free resveratrol and not with the resveratrol-CD complex ( $[\text{resv-CD}]$ ) as well, as has been described for persimmon PPO (persimmon), the data of Fig. 3 were replotted as a function of the complexed resveratrol (Fig. 5):

$$[\text{resv-CD}] = [\text{resv}]_t - [\text{resv}]_f \quad (11)$$

This clearly shows that the enzymatic activity responded to free resveratrol concentrations (Fig. 4) and not to complexed resveratrol (Fig. 5), because Fig. 4 gives a similar Michaelis-Menten representation of the data with a  $K_M$  value equal to that found in the absence of cyclodextrins (13.5  $\mu\text{M}$ ).

Knowing the complexation constant  $K_c$  between resveratrol and  $\text{G}_2\text{-}\beta\text{-CDs}$ , it is possible to control the concentration of free resveratrol and therefore the enzymatic

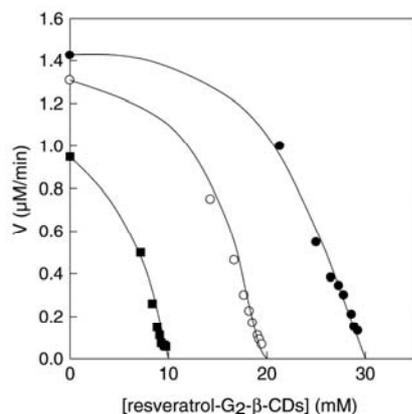


Fig. 5. Effect of resveratrol- $G_2$ - $\beta$ -CDs complex concentration on lipoxigenase activity. (●) 10  $\mu$ M total resveratrol, (○) 20  $\mu$ M total resveratrol, (■) 30  $\mu$ M total resveratrol.

activity, by setting the appropriate concentrations of both total  $G_2$ - $\beta$ -CDs and total resveratrol. To confirm this, the so-called cyclodextrin assay (López-Nicolás et al., 1997), was carried out, in which, by using the complexation constant  $K_c$  determined enzymatically ( $5130 \pm 421 \text{ M}^{-1}$ ) and Eq. (9), total resveratrol is calculated so that free resveratrol remains constant, independent of the  $G_2$ - $\beta$ -CDs concentration used. As shown in Fig. 6, LOX activity was independent of the total resveratrol concentration or total  $G_2$ - $\beta$ -CDs concentration.

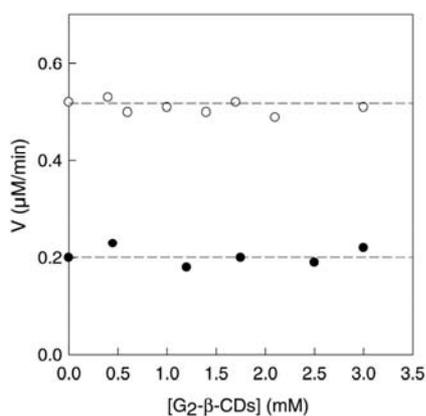


Fig. 6. Cyclodextrin assay. Lipoxigenase-catalyzed oxidation of resveratrol reaction rates at two different free resveratrol concentrations. (●) 1.5  $\mu$ M resveratrol, (○) 5  $\mu$ M resveratrol. The  $G_2$ - $\beta$ -CDs and resveratrol concentrations were calculated using the  $K_c$  value obtained by the enzymatic method and Eq. (9) (see text for details).

Table 1  
Cyclodextrin assay

[resveratrol] <sub>0</sub> ( $\mu$ M)	[ $\beta$ -CDs] <sub>0</sub> (mM)	$V$ ( $\mu$ M/min)
15	0	$1.25 \pm 0.025$
30	0.25	$1.15 \pm 0.125$
60	0.7	$1.32 \pm 0.025$
120	1.7	$1.26 \pm 0.015$
250	4	$1.21 \pm 0.135$
500	8	$1.26 \pm 0.015$

The  $\beta$ -CDs and resveratrol concentrations were calculated to yield 15  $\mu$ M free resveratrol using the  $K_c$  value ( $4317 \text{ M}^{-1}$ ) determined enzymatically.

All the above experiments were also performed with  $\beta$ -CDs (data not shown), in which case a complexation constant  $K_c$  value of  $4317 \pm 338 \text{ M}^{-1}$  was obtained. This  $K_c$  value was slightly lower than that described for  $G_2$ - $\beta$ -CDs, indicating that the affinity of this natural  $\beta$ -cyclodextrins for resveratrol was slightly lower than that shown for the modified  $G_2$ - $\beta$ -CDs. These results agree with the experimental data depicted in Fig. 2, in which the inhibition presented by  $G_2$ - $\beta$ -CDs was slightly higher than that presented by  $\beta$ -CDs.

The cyclodextrin assay was carried out using this  $K_c$  value between resveratrol and  $\beta$ -CDs. In this case, as can be seen in Table 1, LOX activity remained constant, regardless of the total resveratrol concentration or total  $\beta$ -CDs concentration. These results were similar to those obtained in the case of  $G_2$ - $\beta$ -CDs, indicating that LOX works only with free resveratrol concentration in both cases,  $\beta$ -CDs and  $G_2$ - $\beta$ -CDs.

In conclusion, the present study demonstrates that CDs can be used as resveratrol complexation agent, to increase total resveratrol concentration in aqueous solution, while free resveratrol concentration remains constant, as do its biological activities. The delay in the resveratrol oxidation was caused by its entrapment in the internal cavity of cyclodextrins, which act as substrate reservoir in a dosage-controlled manner. Moreover, we have characterized the complexation process and demonstrated that both  $\beta$ -CDs and  $G_2$ - $\beta$ -CDs served as resveratrol carrier systems, with similar  $K_c$  values. The cyclodextrin assay served to demonstrate that the  $K_c$  values obtained by the enzymatic method using LOX activity on resveratrol were correct for both cases,  $\beta$ -CDs and  $G_2$ - $\beta$ -CDs.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by the San Antonio Catholic University of Murcia (Spain) (PMAFI-PI-03/1C/05), Fundación Séneca (03025/PPC/05) and Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-08702/ALI).

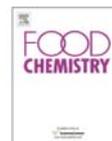
#### References

- Bertelli, A. A., Giovannini, L., Giannesi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M., et al. (1995). Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International Journal of Tissue Reactions*, 17, 1–3.

- Buschmann, H. J., & Schollmayer, E. (2002). Application of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *Journal of Cosmetic Science*, 53, 185–191.
- Cai, Y., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C. M., et al. (1990). Polyphenol interactions. Part. 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions*, 2, 2197–2209.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341, 1103–1104.
- Frémont, L. (2000). Minireview: biological effects of resveratrol. *Life Science*, 66, 663–673.
- Ghem, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P. Y., & Jameson, J. L. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academic Science*, 94, 14138–14143.
- Goldberg, D. M., Hahn, S. E., & Parkes, J. G. (1995). Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clinica Chimica Acta*, 237, 155–187.
- Higuchi, T., & Connors, K. A. (1965). Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, 4, 56–63.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., et al. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218–220.
- Joseph, P., Srinivasan, S. N., & Kulkarni, A. P. (1993). Purification and partial characterization of lipoxygenase with dual catalytic activities from human term placenta. *Biochemical Journal*, 293, 83–91.
- Kimura, Y., Okuda, H., & Arichi, S. (1985). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 834, 275–278.
- Kulkarni, A. P., & Cook, D. C. (1988). Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: hydrogen peroxide-dependent oxidation of xenobiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 155, 1075–1081.
- Kulkarni, A. P., & Cook, D. C. (1998). Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: a potential pathway for xenobiotic metabolism in the presence of linoleic acid. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 61, 305–314.
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical application of cyclodextrins. Drug solubilisation and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1017–1025.
- López-Nicolás, J. M., Bru, R., & García-Carmona, F. (1997). Enzymatic oxidation of linoleic acid by lipoxygenase forming inclusion complexes with cyclodextrins as starch model molecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1144–1148.
- Martin, A. R., Villegas, I., La Casa, C., & De La Lastra, C. A. (2004). Resveratrol, a polyphenol grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochemical Pharmacology*, 67, 1399–1410.
- Morales, M., Bru, R., García-Carmona, F., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (1998). Effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus Ampelinus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 53, 179–187.
- Naidu, K. A., & Kulkarni, A. P. (1994). Lipoxygenase: a non-specific oxidative pathway for xenobiotic metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 50, 155–159.
- Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, 49, 474–478.
- Núñez-Delgado, E., Sojo, M., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F. (1999a). Cyclodextrins as diethylstilbestrol carrier system: characterization of diethylstilbestrol–cyclodextrins complexes. *Pharmaceutical Research*, 16, 854–858.
- Núñez-Delgado, E., Sojo, M., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F. (1999b). Hydroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367, 274–280.
- Núñez-Delgado, E., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F. (1997). Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2830–2835.
- Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G., & Goldberg, D. M. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 235, 207–219.
- Pinto, M. C., García-Barrado, J. A., & Macías, P. (1999). Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4842–4846.
- Pinto, M. C., García-Barrado, J. A., & Macías, P. (2003). Oxidation of resveratrol catalyzed by soybean lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1653–1657.
- Sanders, T. H., McMichael, R. W., & Hendrix, K. W. (2000). Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1243–1246.
- Spaapen, L. J., Veldink, G. A., Liefkens, T. J., Vliegthart, J. F., & Kay, C. M. (1979). Circular dichroism of lipoxygenase-I from soybeans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 574, 301–311.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. L., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., et al. (1998). Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 21875–21882.
- Szejtli, J. (1988). *Cyclodextrin technology*. Dordrecht: Kluwer Academic.

**CAPÍTULO III. COMPLEXATION OF RESVERATROL BY  
NATIVE AND MODIFIED CYCLODEXTRINS:  
DETERMINATION OF COMPLEXATION CONSTANT  
BY ENZIMATIC, SOLUBILITY AND FLUORIMETRIC  
ASSAYS**





## Analytical Methods

## Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays

C. Lucas-Abellán, M.I. Fortea, J.A. Gabaldón, E. Núñez-Delicado\*

Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Católica San Antonio de Murcia, Avenida de los Jerónimos s/n. 30107 Guadalupe, Murcia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 November 2007

Received in revised form 24 March 2008

Accepted 25 March 2008

## Keywords:

Stilbene

Cyclic oligosaccharides

Fluorescence

Encapsulation

Enzymatic method

Physical method

## ABSTRACT

The complexation of resveratrol with native  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins (CDs) and modified CDs (hydroxypropyl- $\beta$ - (HP- $\beta$ -CDs), maltosyl- $\beta$ - (G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs), methyl- $\beta$ -, carboxymethyl- $\beta$ - and acetyl- $\beta$ -cyclodextrins) was studied, and the complexation constants ( $K_c$ ) were compared. The complexation constant between resveratrol and each type of CD was calculated using three different methods: enzymatic, solubility and fluorimetric. The  $K_c$  values obtained showed that HP- $\beta$ -CDs with their very high  $K_c$  of  $18,048 \pm 625 \text{ M}^{-1}$ , were the most effective for complexing resveratrol. Moreover, comparison of the results obtained by the three methods revealed that the fluorimetric method undervalued the  $K_c$  between resveratrol and all cyclodextrins, while the enzymatic and solubility methods were more precise for calculating the  $K_c$  between resveratrol and CDs, as demonstrated by the cyclodextrin-assay.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene), a phytoalexin belonging to the stilbene class of polyphenolic compounds, is found both in the free and conjugated forms in high concentrations in a number of plant species (Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997), including grapevine (*Vitis vinifera*) (Langcake & Pryce, 1976; Lamuela-Raventos, Romero-Pérez, Waterhouse, & De la Torre-Boronat, 1995), peanut, mulberry and pistachios (Tokusoglu, Ünal, & Yemis, 2005). It is produced by plants in response to stress conditions, including infection by microorganisms, the application of chemicals, injury from light exposure and change in temperature (Agrios, 1998; Bailey & Mansfield, 1982).

Resveratrol has been shown to provide health-promoting activities such as lowering the incidence of coronary heart disease (Frankel, Waterhouse, & Kinsella, 1993) and cancer chemopreventive activity (Jang et al., 1997).

The high hydrophobicity and sensitivity of resveratrol to external agents such as air, light and oxidative enzymes constitutes a serious problem for its bioavailability, formulation and manipulation in the manufacture of functional foods. In order to avoid this limitation, inclusion of resveratrol in cyclodextrins has recently been suggested by our group (Lucas-Abellán, Fortea, López-Nicolas, & Núñez-Delicado, 2007).

Cyclodextrins (CDs) are a group of naturally occurring cyclic oligosaccharides derived from starch with six, seven or eight glucose residues linked by  $\alpha$  (1 → 4) glycosidic bonds in a cylinder-shaped structure, and named as  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs, respectively. The central cavity of these molecules is hydrophobic, while the rims of the surrounding walls are hydrophilic (Martín Del Valle, 2004). This hydrophobic cavity forms inclusion complexes with a wide range of organic and inorganic guest molecules (Cai et al., 1990). It has been demonstrated that complexation can considerably increase the solubility, stability and bioavailability of the guest molecule (Martín Del Valle, 2004).

To improve the complex-forming abilities of CDs, a wide variety of chemically modified CDs have been designed and prepared by introducing various functional groups into the macrocyclic ring (Kahn, Forgo, Stine, & D'Souza, 1988). The inclusion complexes of some chemically modified CDs are even more soluble than those from natural CDs (Luong, Male, & Zhao, 1993).

There are many studies in the literature about the calculation of  $K_c$  between CD and different compounds, using different methods, such as fluorescence, nuclear magnetic resonance (RMN), enzymatic, solubility, equilibrium dialysis, conductometry and affinity capillary electrophoresis (Álvarez-Parrilla, De la Rosa, Torres-Rivas, Rodrigo-García, & González-Aguilar, 2005; Bertacche, Lorenzi, Nava, Pini, & Cínico, 2006; Lucas-Abellán et al., 2007; Platzer, Schward, & Neubert, 1999; Polyakov, Leshina, Konvalova, Hand, & Kispert, 2004; Sheehy & Ramstad, 2005; Ugwu, Alcalá, Bhardwaj, & Blanchard, 1996). However, this variance in the calculation methods complicates the comparison of  $K_c$  values obtained for

\* Corresponding author. Fax: +34 968 278620.  
E-mail address: [enunez@pdi.ucam.edu](mailto:enunez@pdi.ucam.edu) (E. Núñez-Delicado).

different compounds. There is not a reference method to calculate the  $K_c$ .

The complexation of resveratrol in CDs has been described previously not only by our group (Lucas-Abellán et al., 2007) but also by Bertacche, Lorenzi, Nava, Pini, and Cínico (2006). However, no comparative studies exist in which a wide range of natural and modified CDs are used to complex resveratrol and the respective  $K_c$  values calculated by different methods are compared.

In this paper, the complexation of resveratrol with native CDs ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs) and modified CDs (hydroxypropyl- $\beta$ - (HP- $\beta$ -CDs), maltosyl- $\beta$ - (G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs), methyl- $\beta$ -, carboxymethyl- $\beta$ - and acetyl- $\beta$ -CDs) was studied, in order to establish which type of CDs would produce the most stable complex.

Moreover, in this contribution comparison of three different methods to calculate  $K_c$ , namely enzymatic, solubility and fluorimetric were compared using the model system of resveratrol-CD to determine which of them offers the most precise results.

## 2. Materials and methods

Electrophoretically pure (Cook & Kulkarni, 1988) soybean lipoxygenase (LOX) (EC 1.13.11.12) Type V (701,000 Sigma units/mg protein) (one unit will cause an increase in  $A_{234}$  of 0.001 per min at pH 9.0 at 25 °C when linoleic acid is the substrate in 3.0 mL volume) prepared by affinity chromatography and *trans*-resveratrol, were obtained from Sigma (Madrid, Spain). Hydrogen peroxide was supplied from Aldrich (Madrid, Spain). HP- $\beta$ -,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -CDs were purchased from TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Belgium). Carboxymethyl-, acetyl- and methyl- $\beta$ -CDs were supplied for Sigma (Madrid, Spain). G<sub>2</sub>- $\beta$  and  $\beta$ -CDs were kindly supplied by Amaizo, American Maize-Products Company, Hammond, IN. All other chemicals used were of analytical grade.

The hydrogen peroxide, LOX and resveratrol solutions were freshly prepared each day, and their concentrations calculated using  $\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nelson & Kiesow, 1972),  $\epsilon_{280} = 1600,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Spaapen, Veldink, Liefkens, Vliegthart, & Kay, 1979) and  $\epsilon_{312} = 33,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Pinto, García-Barrado, & Macías, 1999), respectively.

The calculations of  $K_c$  by each method were made in triplicate and SD was calculated in each case.

### 2.1. Enzymatic method

The enzymatic oxidation of resveratrol was followed spectrophotometrically using a Shimadzu (Kyoto, Japan) model UV-1063 spectrophotometer at the absorption maximum of the resveratrol oxidation product (250 nm), using  $\Delta\epsilon_{250} = 29,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Lucas-Abellán et al., 2007). Unless otherwise stated, the standard reaction medium at 25 °C contained 100 mM sodium borate buffer (pH 9.0), 400  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30  $\mu\text{M}$  resveratrol, 50 nM of LOX and increasing concentrations of CDs in a final volume of 1 mL. The steady state was calculated from the linear zone of the product accumulation curve. A reference cuvette containing all the components of the reaction medium except the enzyme served as the control.

Free resveratrol is the only form of substrate which LOX can oxidise. So, the formation of 1:1 inclusion complexes by the addition of increasing concentrations of CDs leads to an inhibitory effect in the oxidation of resveratrol by LOX (Fig. 1A). The complexation constant ( $K_c$ ) can be calculated using the equations previously described by our group, in which a Michaelis–Menten

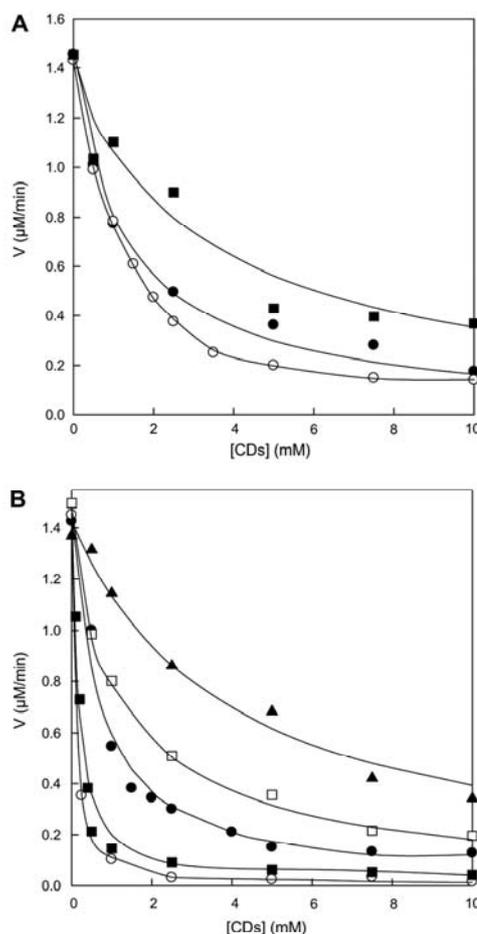


Fig. 1. Effect of native CDs on the oxidation of resveratrol by lipoxygenase in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction medium at 25 °C contained 100 mM sodium borate buffer, pH 9.0, 30  $\mu\text{M}$  resveratrol, 400  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50 nM lipoxygenase and increasing concentrations of CDs. (A) native CDs: (●)  $\alpha$ -CDs, (○)  $\beta$ -CDs, (■)  $\gamma$ -CDs. (B) Modified CDs: (●) G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs, (○) HP- $\beta$ -CDs, (■) methyl- $\beta$ -CDs (□), acetyl- $\beta$ -CDs (▲), carboxymethyl- $\beta$ -CDs.

modified equation for free substrate was used (Lucas-Abellán et al., 2007):

$$[\text{resv}]_f + [\text{CD}]_f \xrightleftharpoons{K_c} [\text{resv} - \text{CD}] \quad (1)$$

$$K_c = \frac{[\text{resv} - \text{CD}]}{[\text{resv}]_f [\text{CD}]_f} \quad (2)$$

$$[\text{resv}]_f = \frac{-(\text{CD})_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1}{\sqrt{(\text{CD})_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{resv}]_t}} / 2K_c \quad (3)$$

$$v = \frac{V_m \left[ -((\text{CD})_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1) + \sqrt{((\text{CD})_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{resv}]_t / 2K_c} \right]}{K_M + \left[ -((\text{CD})_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1) + \sqrt{((\text{CD})_t K_c - [\text{resv}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{resv}]_t / 2K_c} \right]} \quad (4)$$

where  $[\text{resv}]_f$  is free resveratrol  $[\text{CD}]_f$  is free cyclodextrin,  $[\text{resv}]_t$  is total resveratrol  $[\text{CD}]_t$  is total cyclodextrin  $[\text{resv-CDs}]$  is complex resveratrol-cyclodextrin,  $K_c$  is complexation constant,  $V_m$  and  $K_M$  are Michaelis–Menten constants and  $v$  is the oxidation rate of free resveratrol.

## 2.2. Solubility method

Phase solubility diagrams were constructed according to Higuchi and Connors (1965). Excess amounts of resveratrol were added to aqueous solutions of increasing concentrations of  $\beta$ -CDs,  $G_2$ - $\beta$ -CDs and HP- $\beta$ -CDs up to 100 mM (15 mM in the case of  $\beta$ -CDs, its solubility limit), in 10 mL of water at 25 °C. The samples were maintained in an ultrasonic bath at 25 °C for 60 min to reach equilibrium. The aqueous solutions were filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter cellulose and diluted in 80% ethanol. The resveratrol ( $\epsilon_{312} = 28,994 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) concentration was spectrophotometrically determined.

The  $K_c$  between resveratrol and CDs was calculated by using the equation below (Higuchi & Connors, 1965):

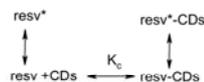
$$K_c = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})} \quad (5)$$

where  $S_0$  is the water solubility of resveratrol and "slope" the slope of the phase solubility diagram.

## 2.3. Fluorimetric method

Steady-state fluorescence measurements were performed using a Shimadzu RF 5301 PC spectrofluorimeter. Emission fluorescence spectra were acquired in the 330–600 nm range (1 nm step), at a fixed excitation wavelength of 330 nm. The reaction medium contained 30  $\mu\text{M}$  resveratrol and increasing concentrations of  $\beta$ -,  $G_2$ - $\beta$ - and HP- $\beta$ -CDs prepared in water to reach a final volume of 3 mL at 25 °C.

Assuming that the increase in the resveratrol fluorescence intensity observed in the presence of increasing concentrations of CDs is due to the formation of the inclusion complexes between resveratrol and CDs, the following equilibrium can be described:



here  $\text{resv}^*$  and  $\text{resv}^*\text{-CDs}$  are resveratrol and the complex in the excited state. They are the only fluorescent species and there is no association or dissociation process in the excited state.  $K_c$  is the complexation constant as defined in the enzymatic method.

The fluorescence intensity at any wavelength ( $F$ ) can be related to the CDs concentration by the equation (Connors, 1987):

$$F = F_0 + \frac{(F_\infty - F_0)K_c[\text{CDs}]_t}{1 + K_c[\text{CDs}]_t} \quad (6)$$

where  $F_\infty$  is the fluorescence intensity when total resveratrol has been complexed in CDs and  $F_0$  is the fluorescence of resveratrol in the absence of CDs. Experimental data of  $F$  as a function of  $[\text{CDs}]$

can be fitted to Eq. (5), using as initial parameters ( $K_c$  and  $F_\infty$ ) those obtained from the analysis of the experimental data using the Benesi–Hildebrand equation for 1:1 complexes (double reciprocal plot) (Benesi & Hildebrand, 1949):

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{F_\infty - F_0} + \frac{1}{(F_\infty - F_0)K_c[\text{CDs}]_t} \quad (7)$$

The  $K_c$  value can also be calculated by using Scatchard's equation for the 1:1 complex formation, which relates the enhanced fluorescence intensity with CD concentration (Scatchard, 1949):

$$\frac{F - F_0}{[\text{CDs}]_t} = (F_\infty - F_0)K_c - (F - F_0)K_c \quad (8)$$

## 3. Results and discussion

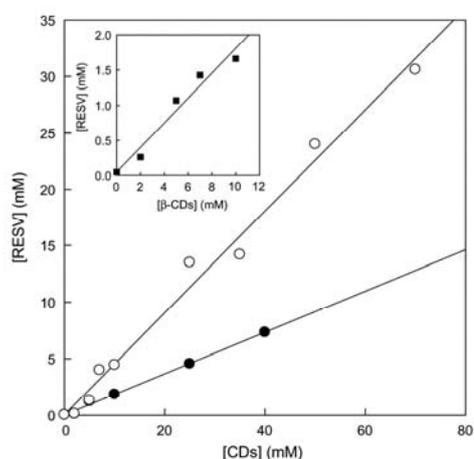
In this paper, the  $K_c$  between resveratrol and each type of native CDs was calculated using the enzymatic method described by Lucas-Abellán et al. (2007). For that, the oxidation of resveratrol by the hydroperoxidase activity of LOX was achieved in the presence of increasing concentrations of  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -CDs (Fig. 1A). As can be seen in Fig. 1A, LOX activity decreased as the CDs concentration increased, the degree depending on the type of cyclodextrin used, inhibition being strongest in the case of  $\beta$ -CDs.

To calculate the  $K_c$  between resveratrol and each type of native CDs, increasing concentrations of each type of CDs were added to the reaction medium at different resveratrol concentrations, a clear decrease in LOX activity being observed in all cases (data not shown). Assuming that this inhibitory effect was due to the formation of 1:1 inclusion complexes and that free resveratrol is the only form of substrate which LOX can use, Eq. (4) was used to obtain the  $K_c$  values for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs shown in Table 1. As can be seen from the Table 1,  $\beta$ -CDs were the native type showing the highest  $K_c$  for the complexation of resveratrol ( $4220 \pm 387 \text{ M}^{-1}$ ), similar to that described previously by Lucas-Abellán et al. (2007), while  $\alpha$ - and  $\gamma$ -CDs presented lower values of  $805 \pm 75$  and  $226 \pm 32 \text{ M}^{-1}$ , respectively. This result indicated that the size of the hydrophobic cavity of  $\beta$ -CDs permits stronger interactions with resveratrol, while the hydrophobic cavity of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -CDs, is too small and too large, respectively, thus reducing their interaction with resveratrol.

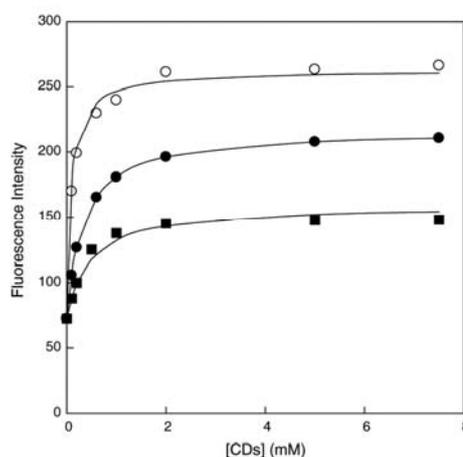
As  $\beta$ -CDs were the most effective for complexing resveratrol, different types of modified  $\beta$ -CDs were studied, adding different functional groups to the macrocyclic ring (HP- $\beta$ -,  $G_2$ - $\beta$ -, methyl- $\beta$ -, carboxymethyl- $\beta$ - and acetyl- $\beta$ -CDs). Their  $K_c$  for resveratrol complexation was calculated using the enzymatic method in all cases. The inhibition curves for the oxidation of 30  $\mu\text{M}$  resveratrol by LOX in the presence of increasing concentrations of each type of modified  $\beta$ -CDs are presented in Fig. 1B: HP- $\beta$ -CDs were the most effective (Fig. 1B, open circles). The oxidation of different concentrations of resveratrol by LOX in the presence of the different types of modified CDs was also studied (data not show), and their  $K_c$  was calculated. As can be seen in Table 1, the  $K_c$  values for modified  $\beta$ -CDs ranged from  $1518 \pm 205$  for carboxymethyl- $\beta$ -CDs to  $18,048 \pm 652 \text{ M}^{-1}$  for HP- $\beta$ -CDs, according to the functional group added. HP- $\beta$ -CDs was the most effective in resveratrol complexation ( $K_c = 18,048 \pm 652 \text{ M}^{-1}$ ), followed by methyl- $\beta$ -CDs ( $K_c = 10,089 \pm 675 \text{ M}^{-1}$ ). Moreover some modified CDs has lower  $K_c$  values than native  $\beta$ -CDs, e.g. carboxymethyl- $\beta$ -CDs and acetyl- $\beta$ -CDs,

**Table 1**  
Complexation constant ( $K_c$ ) for complexes formed between native and modified cyclodextrins and resveratrol calculated by the enzymatic, solubility and fluorimetric methods

Cyclodextrin type	Enzymatic method	Solubility method	Fluorimetric method			
	$K_c$ ( $M^{-1}$ )	$K_c$ ( $M^{-1}$ )	$K_c$ ( $M^{-1}$ ) non-linear regression	$K_c$ ( $M^{-1}$ ) Benesi-Hildebrand	$K_c$ ( $M^{-1}$ ) Scatchard	
Native CDs	$\alpha$ -CDs	805 $\pm$ 75				
	$\beta$ -CDs	4220 $\pm$ 387	4438 $\pm$ 401	2205 $\pm$ 364	2145 $\pm$ 265	2382 $\pm$ 285
	$\gamma$ -CDs	226 $\pm$ 32				
Modified CDs	Hydroxypropyl- $\beta$ -CDs	18,048 $\pm$ 625	18,018 $\pm$ 723	11,035 $\pm$ 897	10,314 $\pm$ 889	10,229 $\pm$ 845
	Methyl- $\beta$ -CDs	10,089 $\pm$ 675				
	Maltosyl- $\beta$ -CDs	5098 $\pm$ 495	5425 $\pm$ 503	3011 $\pm$ 435	3314 $\pm$ 298	3224 $\pm$ 301
	Carboxymethyl- $\beta$ -CDs	1518 $\pm$ 205				
	Acetyl- $\beta$ -CDs	1789 $\pm$ 187				



**Fig. 2.** Phase of solubility diagram of resveratrol 100 mM sodium borate buffer (pH 9.0) with HP- $\beta$ -CDs ( $\circ$ ) and G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs ( $\bullet$ ). Inset: Phase of solubility diagram of resveratrol with  $\beta$ -CDs ( $\blacksquare$ ).



**Fig. 3.** Fluorescence intensities of resveratrol at 380 nm versus different concentrations of CDs 100 mM sodium borate buffer (pH 9.0). ( $\circ$ )  $\beta$ -CDs, ( $\bullet$ ) G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs, ( $\square$ ) HP- $\beta$ -CDs. The lines show the best fits to Eq. (5).

indicating that the presence of carboxymethyl or acetyl as functional group hinders the complexation process.

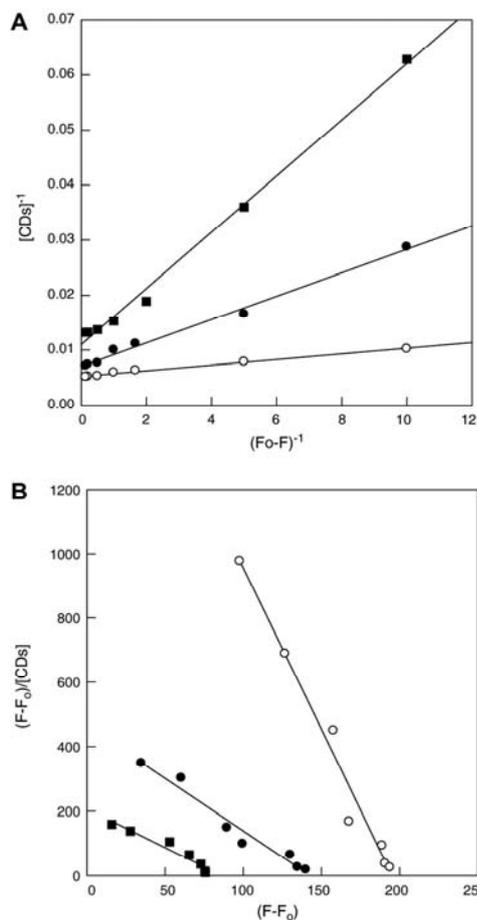
For comparison purposes, the physical method described by Higuchi and Connors (1965) was used to calculate the  $K_c$  values for  $\beta$ - and two modified  $\beta$ -CDs. The phase solubility diagrams made for resveratrol using  $\beta$ -, HP- $\beta$ - and G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs (Fig. 2) were all of the A<sub>L</sub> type, indicating the formation of 1:1 complexes in both the native and modified CDs studied. Using Eq. (5), the  $K_c$  values were calculated (Table 1). As can be seen in Table 1, the  $K_c$  values obtained using the physical method were similar to those obtained with the enzymatic method (Table 1), indicating the validity of both methods.

A fluorimetric method was also used to calculate the  $K_c$  value for the complexation of resveratrol with  $\beta$ -, HP- $\beta$ - and G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs. In this method, the increase in fluorescence intensity as a function of resveratrol complexation by CDs was used to calculate  $K_c$ .

When increasing concentrations of CDs were added to the reaction medium, the fluorescence intensity increased until a maximum was reached (Fig. 3). An increase due to the formation of inclusion complexes between resveratrol and CDs. This effect has been previously described for other compounds (Álvarez-Parrilla et al., 2005; Mahedero, Muñoz de la Peña, Bautista, & Aaron, 2002; Muñoz de la Peña, Mora-Díez, Mahedero-García, Bohoy-Gil, & Cañada-Cañada, 2007; Wagner & Fitzpatrick, 2000).

The representation of  $1/(F - F_0)$  vs.  $1/[CDs]$  (double reciprocal plot), known as a Benesi-Hildebrand plot (Fig. 4A), leads to a straight line for the three type of CDs used, indicating the 1:1 stoichiometry of the complexes. This linear relation agrees with that described by the Benesi-Hildebrand Eq. (7). The linear plots of Fig. 4A can be used to determine  $K_c$  values by simply dividing the intercepts by the slopes (Table 1). But since Benesi-Hildebrand plots tend to place more emphasis on low CD concentrations than on higher values, the slope of the line is more sensitive to the ordinate values of the points for the lowest concentrations. In order to avoid this effect, a non-linear regression analysis of the plots in Fig. 3 was carried out by applying the Eq. (6) and using as the initial parameters those estimated by the Benesi-Hildebrand plot. The  $K_c$  values obtained by the non-linear regression (Table 1) were similar to those calculated by the Benesi-Hildebrand plot.

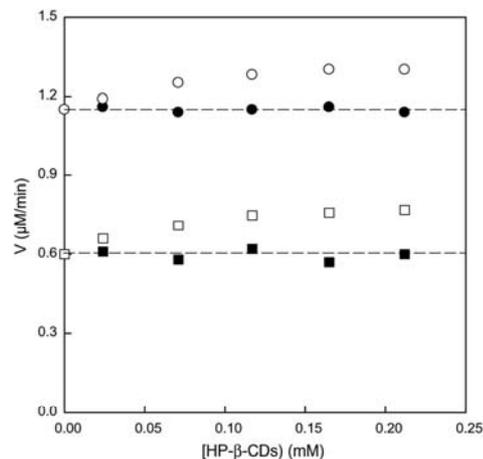
The fluorescence data (Fig. 3) were also used to calculate  $K_c$  values between resveratrol and CDs by Scatchard's method (Scatchard, 1949). In this case, when 1:1 complexes are formed, the relationship between the enhancement in fluorescence intensity ( $F - F_0$ ) and CD concentration is given by the Eq. (8). Replotting the data of Fig. 3 as  $(F - F_0)/[CDs]$  vs.  $(F - F_0)$  (Fig. 4B), straight lines were obtained confirming the 1:1 complex formation between resveratrol and the studied CDs. The  $K_c$  values give by the slope of the plots (Table 1) were similar to those obtained by the Benesi-Hildebrand plot and non-linear regression.



**Fig. 4.** (A) Benesi-Hildebrand plot for resveratrol-CDs (Eq. (7)). (■)  $\beta$ -CDs, (●)  $G_2$ - $\beta$ -CDs, (○) HP- $\beta$ -CDs. (B) Scatchard plot for resveratrol-CDs (Eq. (8)). (■)  $\beta$ -CDs, (●)  $G_2$ - $\beta$ -CDs, (○) HP- $\beta$ -CDs.

Comparing the  $K_c$  values obtained for the complexation of resveratrol by  $\beta$ -, HP- $\beta$ - and  $G_2$ - $\beta$ -CDs using the different methods (Table 1), shows that the enzymatic and solubility methods provide similar values, while the fluorimetric method gives lower values for all three CDs studied.

To determine which method is more accurate (enzymatic or fluorimetric), the so-called CD assay (López-Nicolás, Bru, & García-Carmona, 1997; Lucas-Abellán et al., 2007), in which the total CD and resveratrol concentrations are set so that the free resveratrol concentration remains constant, was carried out for the HP- $\beta$ -CDs. By using the  $K_c$  values determined enzymatically or fluorimetrically and Eq. (3), we have performed the corresponding CD assay. It is expected that when the concentration of effective free resveratrol is constant, the rate of resveratrol oxidation by LOX ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) is constant too, independent of the total resveratrol concentration.



**Fig. 5.** Cyclodextrin assay. The HP- $\beta$ -CDs and resveratrol total concentrations used in each case, were calculated to obtain two different free resveratrol concentrations, by using the  $K_c$  values obtained by the enzymatic method and Eq. (3) ((●) 15  $\mu\text{M}$  free resveratrol, (■) 5  $\mu\text{M}$  free resveratrol) and the fluorimetric method ((○) 15  $\mu\text{M}$  free resveratrol, (□) 5  $\mu\text{M}$  free resveratrol). The oxidation of free resveratrol was followed in 100 mM sodium borate buffer (pH 9.0) using 50 nM of LOX.

As shown in Fig. 5, the results obtained using enzymatically determined  $K_c$  ( $18,048 \pm 625 \text{ M}^{-1}$ ) were as expected (the LOX activity was independent of total CDs and resveratrol concentrations), but those obtained with fluorimetrically determined  $K_c$  ( $11,035 \pm 897 \text{ M}^{-1}$ ) deviated from expectations (the LOX activity did not remain constant), indicating that the free resveratrol concentration is not the same in all cases, so, the value of  $K_c$  used is not correct. Thus, the differences observed between the enzymatically and fluorimetrically obtained constants (Table 1) are very important as regards the real effective resveratrol concentration. It can be concluded that fluorimetric determination undervalues the  $K_c$ , the free resveratrol concentration being higher than expected and explaining the increase in LOX activity observed in Fig. 5.

In conclusion, HP- $\beta$ -CDs are the most effective agents for complexing resveratrol regardless of the  $K_c$  calculation method used. Fluorimetric method undervalues the  $K_c$ , in the resveratrol case, so the enzymatic and solubility methods are most accurate for calculating the  $K_c$  between resveratrol and CDs. Moreover, in the case of resveratrol and other compounds that could be oxidized by different enzymes the optimum method to calculate its  $K_c$  is the enzymatic one, because of the high specificity of the enzymes acting only on free substrate.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by Fundación Séneca (03025/PPC/05) and Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-08702/ALI). C.L.A. is a holder of a research grant from the Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI), Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) (BES-2007-16082).

#### References

- Agrios, G. N. (1998). *Plant Pathology* (3rd ed.). San Diego, CA: Academic Press, Inc. (109–111).
- Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L., Torres-Rivas, F., Rodrigo-García, J., & González-Aguilar, G. A. (2005). Complexation of apple antioxidants: Chrogenic acid.

- quercetin and rutin by  $\beta$ -cyclodextrins ( $\beta$ -CDs). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 53, 11–129.
- Bailey, J. A., & Mansfield, J. W. (1982). *Phytoalexins*. John and Sons. New York: Wiley (p. 334).
- Benesi, H. A., & Hildebrand, J. H. (1949). A spectrophotometric investigation on the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 71, 2703–2707.
- Bertacche, V., Lorenzi, N., Nava, D., Pini, E., & Cinico, C. (2006). Host-Guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 55, 279–287.
- Cai, Y., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C. M., & Haslam, E. (1990). Polyphenol interactions, Part 4: Model studies with caffeine and cyclodextrins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans. 2*, 2197–2209.
- Connors, K. A. (1987). Wiley.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341, 1103–1104.
- Higuchi, T., & Connors, K. A. (1965). Phase solubility techniques. *Analytical Chemistry*, 4, 56–63.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., et al. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218–220.
- Kahn, A. R., Forgo, P., Stine, K. J., & D'Souza, V. T. (1988). Methods for selective modifications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 1977–1996.
- Cook, A. P., & Kulkarni, D. C. (1988). Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: hydrogen peroxide-dependent oxidation of xenobiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 155, 1075–1081.
- Lamuela-Raventos, R. M., Romero-Pérez, A. I., Waterhouse, A. L., & De la Torre-Boronat, M. C. (1995). Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 281–283.
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and others members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 9, 77–86.
- López-Nicolás, J. M., Bru, R., & García-Carmona, F. (1997). Enzymatic oxidation of linoleic acid by lipoxygenase forming inclusion complexes with cyclodextrins as starch model molecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1144–1148.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., López-Nicolas, J. M., & Núñez-Delgado, E. (2007). Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chemistry*, 104, 39–44.
- Luong, J. H., Male, K. B., & Zhao, S. (1993). Electrochemical preparation of 1,1'-dimethylferrocenium from water-soluble 1, 1'-dimethylferrocene-2-hydroxypropyl-( $\alpha$ -cyclodextrin complex and its applications in enzyme assay. *Analytical Chemistry*, 65, 269–276.
- Mahedero, M. C., Muñoz de la Peña, A., Bautista, A., & Aaron, J. J. (2002). An investigation of inclusion complexes of cyclodextrins with phenylurea herbicides by photochemically induced fluorescence. Analytical applications. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 42, 61–70.
- Martin del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 39, 1033–1046.
- Muñoz de la Peña, A., Mora-Diez, N., Mahedero-García, M. C., Bohoyo-Gil, D., & Cañada-Cañada, F. (2007). A chemometric sensor for determining sulphaguanidin residues in Money simples. *Talanta*, 73, 304–313.
- Nelson, D. P., & Kiesow, L. A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, 49, 474–478.
- Pinto, M. C., García-Barrado, J. A., & Macías, P. (1999). Resveratrol is a potent inhibitor of the Dioxigenase activity of Lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4842–4846.
- Platzer, M., Schward, M. A., & Neubert, R. H. H. (1999). Determination of formulation constants of cyclodextrins inclusion complexes using affinity capillary electrophoresis. *Journal of Microcolumn Separation*, 11, 215–222.
- Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Konovalova, T. A., Hand, E. O., & Kispert, L. D. (2004). Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: H1 NMR, EPR, and optical studies. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 872–880.
- Scatchard, G. (1949). *The attractions of proteins for small molecules and ions*. Annals of the New York Academy of Sciences.
- Sheehy, P. M., & Ramstad, T. (2005). Determination of the molecular complexation constant between alprostadil and alpha-cyclodextrins by conductimetry implications for a freeze-dried formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 877–885.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30, 91–113.
- Spaepen, L. J., Veldink, G. A., Liefkens, T. J., Vliegthart, J. F., & Kay, C. M. (1979). Circular dichroism of lipoxygenase-1 from soybeans. *Biochemical and Biophysical Acta*, 574, 301–311.
- Tokusoglu, Ö., Unal, M. K., & Yemis, F. (2005). Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and Gas Chromatographic-mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5003–5009.
- Ugwu, S. O., Alcalá, M. J., Bhardwaj, R., & Blanchard, J. (1996). The application of equilibrium dialysis to the determination of drug-cyclodextrin stability constants. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 25, 173–176.
- Wagner, B. D., & Fitzpatrick, S. J. (2000). A comparison of the host-guest inclusion complexes of 1,8-ANS in parent and modified cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 38, 467–478.

**CAPÍTULO IV: COMPARATIVE STUDY OF DIFERENT  
METHODS TO MEASURE ANTIOXIDANT ACTIVITY  
OF RESVERATROL IN THE PRESENCE OF  
CYCLODEXTRINS**



## 1. ABSTRACT

The antioxidant activity of resveratrol in the absence and presence of increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs was determined using three different methods: ORAC, ABTS and DPPH. The three methods were validated and compared for their linearity, precision and accuracy in measuring resveratrol antioxidant activity. The results indicated that the most sensitive method is the ORAC assay, which can measure the lowest resveratrol concentration (0.15-2 $\mu$ M) with the highest precision. In the presence of increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs, the antioxidant activity of resveratrol was seen to increase when it was measured by the ORAC and ABTS assays. However, no increase was observed when the DPPH assay was used. With the ORAC assay, the antioxidant activity increased until all the resveratrol had been included in HP- $\beta$ -CDs (0.4 mM CDs), whereas in the case of ABTS assay the plateau in antioxidant activity was reached after 2 mM HP- $\beta$ -CDs, suggesting that the CDs interferences in the measurement method. When the DPPH assay was used, no effect of whereasing HP- $\beta$ -CDs concentration was observed indicating that in a methanolic medium resveratrol is free. Therefore, so this method can not be used to measure the effect of resveratrol complexation with CDs on its antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant activity, Resveratrol, Cyclodextrins, ORAC-FL, ABTS, DPPH.

## 2. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are an entire class of highly reactive molecules derived from the metabolism of oxygen and, are often generated as by-products of biological reactions or by exogenous factors. *In vivo*, some of these ROS play a positive role in cell physiology; however, they may also do great damage to cell membranes and DNA, inducing the oxidation that causes membrane lipid peroxidation, decreased membrane fluidity and other DNA mutations, that may lead to cancer, degenerative diseases and others (Finkel, & Holbrook, 2000).

Antioxidants are chemical substances that reduce or prevent oxidation. The growing interest in free radical biology and the lack of effective therapies for most chronic diseases have meant that the usefulness of antioxidants in protection against these diseases is increasingly studied.

Many studies have shown that phenolic compounds display antioxidant activity as a result of their capacity to scavenge free radicals (Seyoum, Asres, Kandeel & El-Fiky, 2006). They can also act as antioxidants by chelating metal ions, preventing radical formation and improving the antioxidant endogenous system (Al-Azzawie, & Alhamdani, 2006). These compounds are known to act as antioxidants not only because of their ability to donate hydrogen or electrons, but also because they are stable radical intermediates.

*Trans*-resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a triphenolic phytoalexin found in a variety of plant species such as grapevines, mulberries, peanuts and the dried roots and stems of *Polygonium cuspidatum* (Japanese knotweed). Its synthesis is triggered by plant stress conditions such as fungal infection, UV irradiation, and exposure to ozone or heavy metal ions (Fremont, 2000; Sanders, McMichael, & Hendrix, 2000). Resveratrol has attracted considerable attention due to its cardioprotective and cancer chemopreventive activities (Jang, Cai, Udeani, Slowing, Thomas, & Beecher, 1997), which explain the great interest shown in consuming grapes, wines and dietary products containing this phytoalexin. However, its therapeutic usefulness is limited because of its high hydrophobicity and sensitivity to external agents such as air, light and oxidative enzymes. In order to avoid this

limitation, our group has recently suggested including resveratrol in cyclodextrins (CDs) (Lucas-Abellán, Fortea, Gabaldón, & Núñez-Delicado, 2008).

The growing interest in the physiological benefits of natural antioxidants has been matched by acceleration in the development of analytical and biological methodologies for measurement of both the levels and antioxidant potential of these compounds. Numerous *in vitro* studies have been conducted to evaluate the total antioxidant capacity of food products. So far, however, there is no official standardised method, and therefore it is recommended that each evaluation should be made with various oxidation conditions and different methods of measurement (Frankel, & Meyer, 2000).

The methods most commonly used to determine the total antioxidant capacity differ in terms of their assay principles and experimental conditions, and fall into two major groups: assays based on a single electron transfer reaction, monitored through a change in colour as the oxidant is reduced, and assays based on a hydrogen atom transfer reaction, where the antioxidant and the substrate (probe) compete for free radicals (Huang, Ou, & Prior, 2005). Electron transfer reaction assays include the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC or ABTS) assay, the ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay, the copper reduction (CUPRAC) assay, and the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay. Hydrogen atom transfer reaction assays include the crocin bleaching assay, the total peroxyl radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay, and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay (Huang et al, 2005; Prior, Wu, & Schovich, 2005). Of all these methods, ABTS, DPPH and ORAC are among the most widely used.

ABTS<sup>•+</sup> and DPPH<sup>•</sup> radicals are foreign to biological systems. The ABTS assay measures the relative ability of antioxidants to scavenge the ABTS<sup>•+</sup> generated in an aqueous phase, compared with the Trolox standard. The method is usually expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The method is rapid and can be used over a wide range of pH values, in both aqueous and organic solvent systems (Arnao, Cano, & Acosta, 1999; Lemanska, Szymusiak, Tyrakowska, Zielinski, Soffer, & Rietjens, 2001).

The DPPH<sup>•</sup> is a stable free radical with an absorption band at 515 nm. This assay measures the losses in absorption when DPPH<sup>•</sup> radical is reduced by an antioxidant or free radical species. This method is widely used to determine the antioxidant activity of purified phenolic compounds as well as natural plant extracts (Brand-

Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Sripriya, Chandrasekharan, Murty, & Chandra, 1996; Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997; Mahinda, Shahidi, 2000; Peyrat-Maillard, Bonnely, & Berset, 2000; Fukumoto, & Mazza, 2000) Using this method, the antioxidant activity can be evaluated over time, because most phenolic antioxidant reacts slowly with DPPH<sup>•</sup>, reaching the steady state in 1-6 hours (15). However, like ABTS, it has limited relevance to biological systems.

The ORAC-FL assay is said to be more relevant because it uses a biologically relevant radical source (Prior et al, 2003). This method measures the ability of antioxidants to protect fluorescein (FL) from damage by free radicals. It consists of measuring the decrease in the fluorescence of FL when it suffers oxidative damage caused by a source of peroxy radical (ROO<sup>•</sup>) such as 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH). A major advantage of ORAC is that the method is automated and largely standardized; hence, values can be easily compared across laboratories. Also, the ORAC method is reported to mimic antioxidant activity of phenols in biological systems better than other methods since it uses biologically relevant free radicals and integrates both time and the degree of activity of antioxidants (Cao, Sofic, & Prior, 1996; Cao, & Prior, 2001; Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Deemer, 2002).

The aim of this paper is to compare the efficiency of ORAC ABTS and DPPH, assays for the *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of resveratrol in the presence of CDs.

### 3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.1. REAGENTS

Methanol (MeOH) of analytical grade was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Mili-Q system (Millipore Corp., Bedford, MA) ultrapure was used throughout this research. Resveratrol was purchased from Sigma (Madrid, Spain). Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins (HP- $\beta$ -CDs) were from TCI (Europe). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 2,2'-azinobis (3-

ethylbenzothialozinesulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) and fluorescein (FL) were purchased from Sigma (Madrid, Spain). All other chemicals used were of analytical grade.

### 3.2. DPPH ASSAY

Samples were analysed according to the technique reported by Brand-Williams et al. (Brand-williams et all, 1995). The stock solution was prepared by dissolving 24 mg of DPPH with 100 mL in MeOH, and then stored at -20 °C in the dark until needed. The working solution was obtained by diluting 10 mL of stock solution with 45 mL MeOH, to obtain an absorbance of  $1.1 \pm 0.1$  units at 515 nm, using a Shimadzu UV-1063 spectrophotometer. Briefly, a volume of 10  $\mu$ L of different resveratrol concentrations, alone or in the presence of HP- $\beta$ -CDs, was added to 990  $\mu$ L of 0.094 mM DPPH<sup>•</sup> in MeOH, to reach one mL. To determine the reaction kinetics, the assays were continuously monitored at 515 nm over a 1 h period at 25 °C. Most of the samples tested showed residual reactivity even after 1 h. However, changes in absorbance were minimal for all samples after 20min.

The antioxidant abilities were expressed as  $\mu$ M Trolox equivalents by using a Trolox calibration curve prepared for a concentration range of 0-5  $\mu$ M. Each sample was analysed in triplicate.

### 3.3. ABTS METHOD

The antioxidant activity of resveratrol alone or in the presence of CDs, was determined by using ABTS<sup>•+</sup> radical cation (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, & Milner, 1993). The method is based on the ability of an antioxidant to reduce ABTS<sup>•+</sup> into its colourless form. For ABTS<sup>•+</sup> generation from ABTS salt, 3 mM of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> was reacted with 8 mM ABTS salt in sodium phosphate buffer (75 mM, pH 7.4), for 16 h at room temperature in the dark. The ABTS<sup>•+</sup> solution was then diluted with sodium phosphate (buffer 75 mM, pH 7.4) to obtain an initial absorbance of  $1.1 \pm 0.1$  at 414 nm, using a Shimadzu UV-1063 spectrophotometer. Fresh ABTS<sup>•+</sup> solution was prepared everyday. The reaction kinetics was determined at 414 nm over a 1 h period, by continuously monitoring, at 25 °C. Most of the samples tested

showed residual reactivity even after 1 h. However, changes in absorbance were minimal for all samples after 30 min.

The antioxidant abilities were expressed as  $\mu\text{M}$  Trolox equivalents by using a Trolox calibration curve prepared for a concentration range of 0-3  $\mu\text{M}$ . Each sample was analysed in triplicate.

### 3.4. ORAC-FL ASSAY

The oxygen radical absorbance capacity was determined as described by Dávalos et al. (Dávalos, Gómez-Cordovés, & Bartolomé, 2004) with slight modifications. The ORAC analyses were carried out on a Synergy HT multi-detection microplate reader, from Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, Vt, USA), using 96-well polystyrene microplates with black sides and clear bottom, purchased from Nalge Nunc International. Fluorescence was read through the clear bottom, with an excitation wavelength of 485/20 nm and an emission filter of 528/20 nm. The plate reader was controlled by KC4, version 3.4, software. The reaction was carried out in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and the final reaction mixture was 200  $\mu\text{L}$ . FL (100  $\mu\text{L}$ ; 3 nM, final concentration) and resveratrol in the absence or presence of HP- $\beta$ -CDs (70  $\mu\text{L}$ ) solutions, were placed in the wells of the microplate. The mixture was preincubated for 30 min. at 37 °C, before rapidly adding the AAPH solution (30  $\mu\text{L}$ ; 19 mM, final concentration) using a multichannel pipette. The microplate was immediately placed in the reader and the fluorescence recorded every 1.14 min. for 120 min. The microplate was automatically shaken prior to each reading. A blank with FL and AAPH using sodium phosphate buffer instead of the antioxidant solution, and eight calibration solutions using Trolox C (from 6.25 to 31.25  $\mu\text{M}$ ) as antioxidant were also used in each assay. All reaction mixtures were prepared in triplicate and at least three independent assays were performed for each sample. In order to avoid a temperature effect, only the inner 60 wells were used for experimental purposes, while the outer wells were filled with 200  $\mu\text{L}$  of distilled water. The antioxidant abilities were expressed as  $\mu\text{M}$  Trolox equivalents.

## 4. RESULTS AND DISCUSIÓN

The antioxidant activity of resveratrol in the absence and presence of increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs was determined using three different methods: ORAC ABTS and DPPH. In order to compare the results obtained by these three methods, Trolox was used as a standard in all cases, and the antioxidant capacity was expressed as  $\mu$ M Trolox equivalent.

### 4.1. METHODS VALIDATION.

The three methods were validated to quantify the antioxidant activity of resveratrol. ABTS and DPPH were stable when no antioxidant compound was added for at least 60 min under the reaction conditions used. FL was also stable at least 120 min when no AAPH was added to the reaction medium under the excitation conditions used.

### 4.2. LINEARITY.

The linear relationship between the antioxidant activity and antioxidant concentration was calculated using Trolox (**Figure IV.1**) and resveratrol (**Figure IV.2**) at different concentrations in the ORAC, ABTS and DPPH assays. The regression analysis in Figure 2 points to the linear response between the resveratrol concentration and the  $\mu$ M Trolox equivalents, yielding the following equations:

$$\text{ORAC method: } y = 0.45 + 12.05x \quad r^2 = 0.998$$

$$\text{ABTS method: } y = 6.8 \cdot 10^{-4} + 0.33x \quad r^2 = 0.998$$

$$\text{DPPH method: } y = 0.095 + 0.044x \quad r^2 = 0.996$$

### 4.3. LIMIT OF QUANTIFICATION (LOQ) AND LIMIT OF DETECTION (LOD).

The limit of detection or least detectable dose (LOD) is the smallest concentration of the analyte that produces a signal significantly different from zero with a stated degree of confidence. There is a general consensus in favour of selecting the analyte dose providing three times the standard deviation (SD) from the mean measurement of the blank dose signal. The LOD was estimated by analysis of five

sets of 12 replicates of the zero standards (Gabaldón, Maquierira, & Puchades, 2007). The mean value plus 3-fold SD corresponded to an estimated limit of detection of 0.042, 0.3 and 1.3  $\mu\text{M}$  of resveratrol for ORAC, ABTS and DPPH assays, respectively (Table 1).

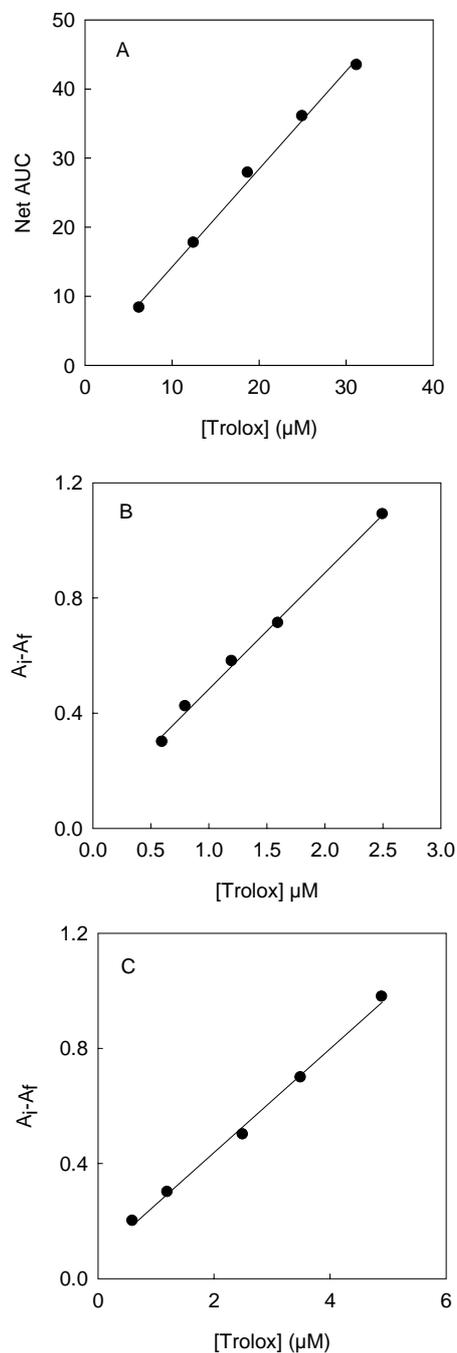
The limit of quantification (LOQ) is the smallest concentration of analyte that can be measured in samples so as to yield a predicted concentration with a stated relative precision and accuracy (Michaliak, Berberich, Nelson, Karu, & Wong, 1995). Commonly, the selected LOQ is defined by the mean value plus 10-fold SD. The LOQ was calculated on the basis of the analysis of 20 samples with 0.15  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$  of resveratrol for ORAC, ABTS and DPPH assays, respectively (data not shown). The mean concentration determined for the 20 samples was  $0.15 \pm 0.007$ ,  $0.5 \pm 0.03$  and  $5.02 \pm 0.17$   $\mu\text{M}$  for ORAC, ABTS and DPPH assays, respectively (Table IV.1).

#### 4.4. PRECISION.

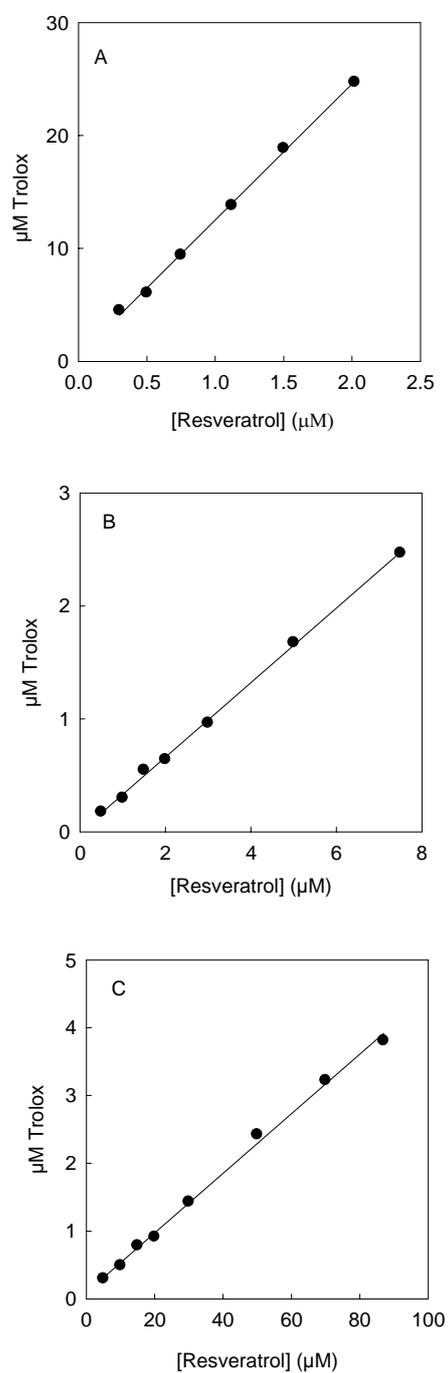
Assay precision was tested by repeatability (intra-day variation) and reproducibility (inter-day variation) studies. Six samples of resveratrol (1.5  $\mu\text{M}$ ) were analysed six times (in triplicate), on the same day (repeatability) and of five different days (reproducibility) by using the ORAC and ABTS assays. The SD and intra and inter-day coefficient of variation (%CV) of the three methods were calculated, giving values of 3% and 11%, respectively, for the ORAC assay, and 5% and 13%, respectively, for ABTS assay. In the case of the DPPH assay six samples of 15 $\mu\text{M}$  resveratrol were analysed giving intra and inter-day %CV of 8% and 15%, respectively (Table IV.1).

#### 4.5. RUGGEDNESS.

To determine the ruggedness of three methods, 1.5  $\mu\text{M}$  of resveratrol was analyzed using the ORAC and ABTS assay; and 15  $\mu\text{M}$  using the DPPH assay. During a 30 days period the  $\mu\text{M}$  Trolox equivalent presented a CV of 7.6%, 9.3% and 10.5% for ORAC, ABTS and DPPH assays, respectively (data not shown), confirming the reliability of the assays (Table IV.1).



**Figure IV.1:** Regression of Trolox C on different concentrations of Trolox C in ORAC (A), ABTS (B), and DPPH (C) assays.



**Figure IV.2:** Regression of  $\mu\text{M}$  Trolox Equivalents of resveratrol at different concentrations in ORAC (A), ABTS (B) and DPPH (C) assays

**Table IV.1:** Values of more representative validation parameters.

Assay method	Linearity	LOD ( $\mu\text{M}$ )	LOQ ( $\mu\text{M}$ )	Precision (%)		Ruggedness (%)
				Intraday	Interday	
ORAC	0.15-2	0.042 $\pm$ 0.003	0.15 $\pm$ 0.007	3	11	7.6
ABTS	0.5-7.5	0.3 $\pm$ 0.01	0.5 $\pm$ 0.03	5	13	9.3
DPPH	5-90	1.3 $\pm$ 0.06	5 $\pm$ 0.17	8	15	10.5

The data obtained with these three methods showed that the highest antioxidant activity was observed using the ORAC method, whereas ABTS and DPPH assays reported lower values (**Table IV.2**). These results agree with those described in the literature (Awika, Rooney, Wu, Prior, & Cisneros-Zevallos, 2003; Zulueta, Esteve, & Frívola, 2009). The ORAC assay as used in this paper permitted us to measure the antioxidant activity of resveratrol in the absence of CDs in a range from 0.15 to 2  $\mu\text{M}$ . In the case of the ABTS assay, the range of resveratrol that could be measured was from 0.5 to 7.5 $\mu\text{M}$  and in the case of DPPH method from 5 to 90  $\mu\text{M}$  (Table 1). These results indicated that the most sensitive method for measuring resveratrol antioxidant activity was the ORAC assay, which can measure the lowest resveratrol concentration (0.15-2 $\mu\text{M}$ ) with the highest precision (**Table IV.1**). The least sensitive method to measure the antioxidant activity of resveratrol was the DPPH assay, which only serves to measure high resveratrol concentrations (5-90 $\mu\text{M}$ ), but is not capable of quantifying the antioxidant activity of resveratrol concentrations below 5 $\mu\text{M}$ . It is important to note that resveratrol concentration in foods is very low, so, the ORAC method must be considered best for quantifying the antioxidant activity of resveratrol in such cases.

#### 4.6. ANTIOXIDANT CAPACITY OF RESVERATROL IN THE PRESENCE OF CDs.

To compare the efficiency of each method for measuring the antioxidant activity of phenolic compounds in the presence of cyclodextrin, the antioxidant activity of resveratrol was evaluated in the presence of increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs using the ORAC, ABTS and DPPH assays.

**Table IV.2:** Antioxidant activity values obtained with ORAC, ABTS and DPPH assays.

[Resveratrol] ( $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{M}$ Trolox		
	ORAC	ABTS	DPPH
0.5	6	0.17	-
1.5	18	0.49	-
5	-	1.65	0.315
15	-	-	0.755

When increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs were added to the reaction medium at different resveratrol concentrations, a clear increase in the antioxidant activity was observed when the ORAC and ABTS assays were used (**Figures IV. 3.A and B**), but no effect was observed when the DPPH assay was used (**Figure IV. 3.C**). As can be seen in **Figures IV.3.A and B**, when HP- $\beta$ -CDs increased the antioxidant activity of resveratrol also increased up to saturation, although this effect was only evident when measured by the ORAC or ABTS assays. When the ORAC assay was used at the saturation level (0.4 mM CDs), resveratrol showed almost double the antioxidant activity in the presence of CDs than in its absence of CDs for resveratrol at 0.5 and 1.5  $\mu\text{M}$  (**Figure IV.3.A**).

This effect on the antioxidant activity of resveratrol may be due to the formation of inclusion complexes between resveratrol and HP- $\beta$ -CDs as has been previously described in the literature (Lucas-Abellán, Mercader-Ros, Zafrilla, Gabaldón, & Núñez-Delicado, 2008; Lu, Cheng, Hu, Zhang, Zou, 2009).

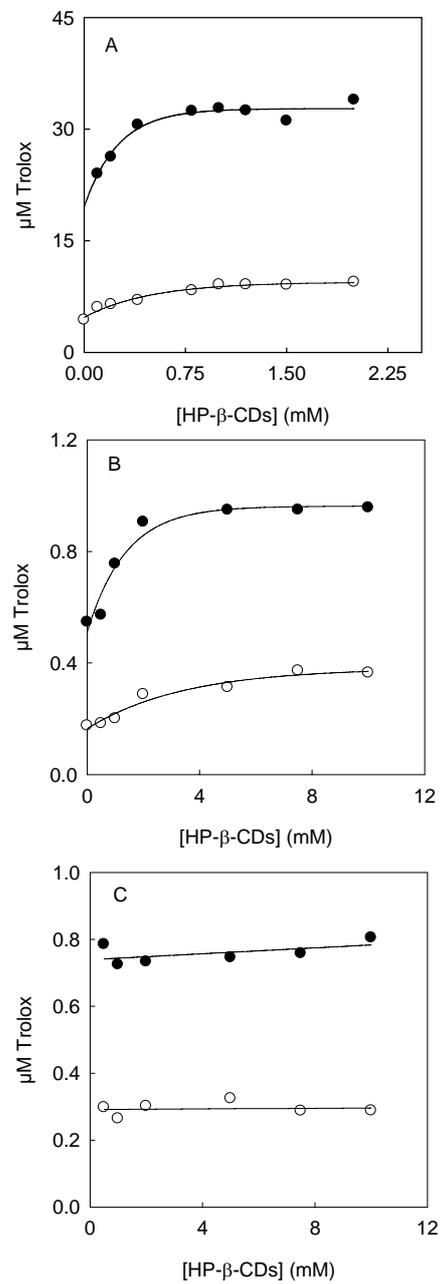
It is important to note that when the ORAC assay was used, the plateau was reached at 0.4 mM HP- $\beta$ -CDs, indicating that all the resveratrol had been complexed, and so, the antioxidant activity of resveratrol remained constant (Lucas-Abellán et al, 2008).

However, in the case of the ABTS assay, the plateau in the antioxidant activity curve was reached at 2 mM HP- $\beta$ -CDs (**Figure IV.3.B**). The higher CDs concentration needed to reach the plateau than in the ORAC assay may be because CDs interfere with the measurement method, complexing the ABTS $^{\bullet+}$ . Resveratrol and ABTS $^{\bullet+}$  compete for the hydrophobic cavity of HP- $\beta$ -CDs. Using the

ORAC assay it was not possible to measure the antioxidant activity of resveratrol at concentrations higher than 1.5  $\mu\text{M}$  in the presence of CDs because the measurement times exceeded the 2 hours established as optimum for this assay. In the case of the ABTS assay, the highest resveratrol concentration that could be measured in the presence of HP- $\beta$ -CDs was 3.5  $\mu\text{M}$  above which the decrease in absorbance was so great that in less than 2 min the absorbance was less than 0.1, and the method could not be considered valid.

When the DPPH assay was used to measure the antioxidant activity of resveratrol in the presence of HP- $\beta$ -CDs, no effect was observed as the CDs concentration increased (**Figure IV.3.C**), suggesting that the methanolic medium of the DPPH assay prevents resveratrol complexation in the hydrophobic cavity of CDs. In such conditions, resveratrol is free in the assay medium, so CDs have no effect on its antioxidant activity. Therefore, the DPPH assay can not be used to measure the effect of resveratrol complexation in CDs on its antioxidant activity.

In conclusion, the ORAC-FL approach is the best method for quantifying the antioxidant activity of phenolic compounds complexed in CDs, because of its sensitivity and the fact that the FL and AAPH do not interfere with CDs complexation. In the case of the ABTS assay, the ABTS $^{\bullet+}$  competes with phenolic compounds to enter in to the hydrophobic cavity of CDs, so CDs interferes with the measurement method. With respect to the DPPH assay, the hydrophobic nature of the medium prevents the complexation of phenolic compounds in the hydrophobic cavity of CDs, so it can not be used to measure this effect.



**Figure IV.3:** Effect of HP- $\beta$ -CDs concentration on the  $\mu$ M Trolox equivalents of resveratrol: (A) 0.5  $\mu$ M (O), 1.5  $\mu$ M (●) by using ORAC assay; (B) 0.5  $\mu$ M (O), 1.5  $\mu$ M (●) by using ABTS assay; (C) 5  $\mu$ M (O), 15  $\mu$ M (●) by using DPPH assay.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-08702/ALI). C.L.A. is a holder of a research grant from the Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI), Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## 6. REFERENCES

- Al-Azzawie, H. F. & Alhamdani, M. S. S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alleoxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, 78, 1371-1376.
- Arnao, M. B., Cano, A. & Acosta, M. (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research*, 31, s89-s96.
- Awika, M. A., Rooney, L. W., Wu X., Prior, R. L. & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657-6662.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30, 609-615.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 25-30.
- Cao, G. & Prior, R. L. (2001). Measurement of total antioxidant capacity in nutritional and clinical studies. In *Handbook of Antioxidants*, 2nd ed.; Cadenas, E., Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, pp 47-55.
- Cao, G., Sofic, E. & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.

- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Frankel, E.N. & Meyer, A.S. (2000). The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Science*, 66, 663-673.
- Fukumoto, L. R. & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Gabaldón, J. A., Maquieira, A. & Puchades, R. (2007) Developmen of a simple extraction procedure for chlorpyrifos determination in food samples by immunoassay. *Talanta*, 71, 1001-1010.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F. & Beecher, C. W. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffer, A. E. M. F. & Rietjens, I. M. C. M. (2001). The influence of pH on the antioxidant property and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 31, 869-881.
- Lu, Z., Cheng, B., Hu, Y., Zhang, Y. & Zou, G. (2009). Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 113, 17-20.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A. & Núñez-Delicado, E. (2008). Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 255-259.
- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A. & Núñez-Delicado, E. (2008). ORAC-Fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2254-2259.
- Mahinda, W. & Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70, 17-26.

- Michaliak, C. A., Berberich, S. A., Nelson, J. O., Karu, A. E. & Wong, R. (Eds). (1995). Immunoanalysis of Agrochemical: Emerging Technologies, (ACS Symposium Series No. 586), *Journal of the American Chemical Society, Washington, DC*, 228-300.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. L., Gopinathan, V. & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Ou, B.; Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122-3128.
- Peyrat-Maillard, M. N., Bonnely, S. & Berset, C. (2000). Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51, 709-716.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchioca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273-3279.
- Prior, R. L., Wu, X. & Schovich, k. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 52-63.
- Sanders, T. H., McMichael, R. W. & Hendrix, K. W. (2000). Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1243-1246.
- Seyoum, A., Asres, K. & Kandeel El-Fiky, F. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.
- Sripriya, G., Chandrasekharan, K., Murty, V. S. & Chandra, T. S. (1996). ESR spectroscopic studies on free radical quenching action of finger millet (*Eleusine coracana*). *Food Chemistry*, 47, 537-540.
- Zulueta, A., Esteve, M. J. & Frívola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.



**CAPÍTULO V. ORAC-FLUORESCEIN ASSAY TO  
DETERMINE THE OXIGEN RADICAL ABSORBANCE  
CAPACITY OF RESVERATROL COMPLEXED IN  
CYCLODEXTRINS**



## ORAC-Fluorescein Assay To Determine the Oxygen Radical Absorbance Capacity of Resveratrol Complexed in Cyclodextrins

C. LUCAS-ABELLÁN, M. T. MERCADER-ROS, M. P. ZAFRILLA, M. I. FORTEA,  
J. A. GABALDÓN, AND E. NÚÑEZ-DELICADO\*

Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Católica San Antonio de Murcia, Avenida de los Jerónimos s/n. 30107 Guadalupe, Murcia, Spain

The effect of the complexation of resveratrol with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins (HP- $\beta$ -CDs) on the antioxidant capacity of the polyphenol is studied for the first time by means of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method, using fluorescein (FL) as the fluorescent probe. The method is validated through its linearity, precision, and accuracy for measuring the ORAC of resveratrol in the absence or presence of cyclodextrins (CDs). The complexation of resveratrol in CDs increased the net area under the FL decay curve (net AUC) of resveratrol up to its saturation level, at which the polyphenol showed almost double the antioxidant activity it shows in the absence of CDs. The complexation constant ( $K_c$ ) between resveratrol and HP- $\beta$ -CDs was calculated by linear regression of the phase solubility diagram ( $K_c = 18048 \text{ M}^{-1}$ ). The antioxidant activity of resveratrol was dependent on the complexed resveratrol because CDs acts as a controlled dosage reservoir that protects resveratrol against rapid oxidation by free radicals. In this way, its antioxidant activity is prolonged and only reaches its maximum when all the resveratrol is complexed.

**KEYWORDS:** Resveratrol; cyclodextrin; ORAC assay; antioxidant; fluorescein

### INTRODUCTION

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a natural polyphenol found in a variety of plants, for example in grapes and peanuts (1), where it is produced during environmental stress or pathogenic attack (2). It is found principally in the skins and seeds of grape berries and therefore usually occurs in greater concentrations in red than in white wines due to skin contact during fermentation.

This phytoalexin has been reported to have antiplatelet (3), anti-inflammatory (4, 5), and anticarcinogenic effects (6). The various activities of resveratrol have been attributed to its antioxidant properties (7), which contribute to controlling the intracellular redox balance by inhibiting the formation of reactive oxygen species (6). The phenolic nature of resveratrol explains its antioxidant activity.

The high hydrophobicity of resveratrol and its sensitivity to external agents such as air, light, and oxidative enzymes may constitute a serious problem for its bioavailability in the formulation and manipulation of functional foods.

In recent years, cyclodextrins (CDs) complexation has been successfully used to improve the solubility, chemical stability and bioavailability of a number of poorly soluble compounds. CDs are a group of naturally occurring cyclic oligosaccharides derived from starch with six  $\alpha$ -cyclodextrins, seven  $\beta$ -cyclo-

dextrins, or eight  $\gamma$ -cyclodextrins glucose residues, linked by  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidic bonds (8). In the pharmaceutical, cosmetics and food industries, cyclodextrins have been used as complexing agents to increase the water solubility of various compounds, such as drugs, vitamins, and food colorants, increasing the solubility, stability, and bioavailability of the guest molecule (9–11).

As has been recently described by our group, CDs can be used as resveratrol complexation agent, not only to increase the total resveratrol concentration in aqueous solution, while the free resveratrol concentration remains constant, but also to decrease the free resveratrol concentration in aqueous solution, while the total concentration remains constant (12). In both cases, CDs acts as substrate reservoir in a dosage-controlled manner.

The complexation of resveratrol by CDs delays resveratrol enzymatic oxidation (12), but it is not known whether entrapment in the internal cavity of CDs affects the antioxidant capacity of the polyphenol.

There are several methods available to determine antioxidant activity *in vitro* (13). However, the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method, adapted to use fluorescein (FL) as fluorescent probe, is increasingly used for this purpose in biological samples and foods. The ORAC method is based on inhibition of the peroxy radical-induced oxidation initiated by thermal decomposition of azo-compounds, like 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), and is the only

\* Corresponding author. Fax: #34968-278620. E-mail: enunez@pdi.ucam.edu.

method that combines both inhibition time and inhibition degree into a single quantity (14).

In the present paper, the effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins (HP- $\beta$ -CDs) on the antioxidant capacity of resveratrol against reactive oxygen species (ROS) is studied by ORAC-fluorescein (ORAC-FL) method (15). The antioxidant capacity of resveratrol in aqueous solution in the absence and presence of CDs has been studied for the first time, using an ORAC-FL assay adapted to manual handling and a conventional fluorescence plate reader.

#### MATERIAL AND METHODS

**Chemicals.** FL, AAPH, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox C), and resveratrol were purchased from Sigma (Madrid, Spain). HP- $\beta$ -CDs were from TCI (Europe). All other chemicals used were of analytical grade.

An FL stock solution (4  $\mu$ M) was made in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and was stored at  $-20$  °C for 4 weeks. An FL solution was prepared daily in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) by diluting the stock FL to a final concentration of 6 nM. Solutions of 0.25 mM Trolox C and 15  $\mu$ M resveratrol in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) were prepared and aliquoted into small vials for storage at  $-80$  °C until use. A 127 mM AAPH solution in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) was prepared daily.

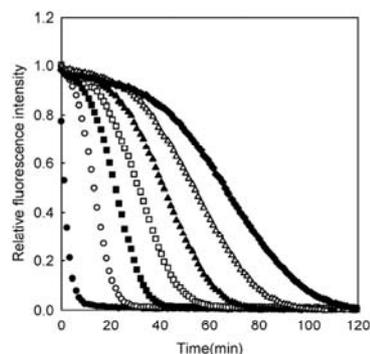
**ORAC-FL Assay.** The ORAC analyses were carried out on a Synergy HT multidetection microplate reader, from Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT), using 96-well polystyrene microplates with black sides and clear bottom, purchased from Nalge Nunc International. Fluorescence was read through the clear bottom, with an excitation wavelength of 485/20 nm and an emission filter of 528/20 nm. The plate reader was controlled by KC4, version 3.4, software. The oxygen radical absorbance capacity was determined as described by Dávalos et al. (16) with slight modifications. The reaction was carried out in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and the final reaction mixture was 200  $\mu$ L FL (100  $\mu$ L; 3 nM, final concentration) and resveratrol in the absence or presence of HP- $\beta$ -CDs (70  $\mu$ L) solutions were placed in the wells of the microplate. The mixture was preincubated for 30 min at 37 °C, before rapidly adding the AAPH solution (30  $\mu$ L; 19 mM, final concentration) using a multichannel pipet. The microplate was immediately placed in the reader and the fluorescence recorded every 1.14 min for 120 min. The microplate was automatically shaken prior to each reading. A blank with FL and AAPH using sodium phosphate buffer instead of the antioxidant solution and eight calibration solutions using Trolox C (6.25, 12.5, 15, 18.75, 21.25, 25, 27.5, and 31.25  $\mu$ M) as antioxidant were also used in each assay. All reaction mixtures were prepared in triplicate, and at least three independent assays were performed for each sample. In order to avoid a temperature effect, only the inner 60 wells were used for experimental purposes, while the outer wells were filled with 200  $\mu$ L of distilled water.

The results were expressed as relative fluorescence with respect to the initial reading. The area under the fluorescence decay curve (AUC) was calculated by the equation

$$AUC = 1 + \sum_{i=1.14}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad (1)$$

where  $f_0$  is the initial fluorescence reading at 0 min and  $f_i$  is the fluorescence reading at time  $i$ . The net AUC corresponding to the sample was calculated by subtracting the AUC corresponding to the blank. Data processing was performed using Sigmaplot software package (Jandel Scientific, German).

**Phase Solubility Diagram.** A phase solubility diagram was constructed according to Higuchi and Connors (17). Excess amounts of resveratrol were added to aqueous solutions containing increasing concentrations HP- $\beta$ -CDs (up to 100 mM) in 10 mL of 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 25 °C. The samples were placed in an ultrasonic bath for 60 min to reach equilibrium. The aqueous solutions were filtered through a 0.2  $\mu$ m cellulose membrane filter and diluted



**Figure 1.** FL fluorescence decay curves induced by AAPH in the presence of resveratrol at different concentrations: blank (●), resveratrol: 0.3  $\mu$ M (○), 0.5  $\mu$ M (■), 0.75  $\mu$ M (□), 1.12  $\mu$ M (▲), 1.5  $\mu$ M (△) and 2.02  $\mu$ M (◆).

in 80% ethanol–water. The resveratrol ( $\epsilon_{312} = 28\,993\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) concentration was spectrophotometrically determined in a Shimadzu model UV-1063 spectrophotometer.

#### RESULTS AND DISCUSSION

The purpose of this paper is to demonstrate the effect of the inclusion of resveratrol in CDs on the antioxidant activity of resveratrol using the ORAC-FL method.

**Method Validation.** The fluorescence signal of FL was constant for at least 120 min when no AAPH was added, indicating that FL was photostable under the excitation conditions used (data not shown).

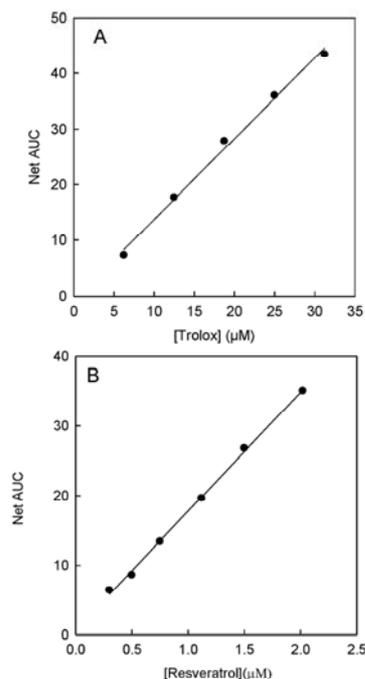
**Linearity.** Figure 1 shows the FL fluorescence decay curves in the presence of resveratrol and AAPH. The linear relationship between net area and antioxidant concentration was calculated using Trolox C (Figure 2A) and resveratrol (Figure 2B) at different concentrations. The regression analysis in Figure 2B points to the linear response between the resveratrol concentration and the net AUC, yielding the following equation:

$$y = 0.664 + 17.1097x \quad (2)$$

with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.998 (Table 1).

**Limit of Quantitation (LOQ) and Limit of Detection (LOD).** The limit of detection or least detectable dose (LOD) is the smallest concentration of the analyte that produces a signal significantly different from zero with a stated degree of confidence. There is a general consensus in favor of selecting the analyte dose providing 3 times the standard deviation (SD) from the mean measurement of the blank dose signal. The LOD was estimated by analysis of five sets of 12 replicates of the zero standards (18). The mean absorbance value plus 3-fold SD corresponded to an estimated limit of detection of 0.042  $\mu$ M of resveratrol.

The limit of quantification (LOQ) is the smallest concentration of analyte that can be measured in samples so as to yield a predicted concentration with a stated relative precision and accuracy (19). Commonly, the selected LOQ is defined by the mean absorbance value plus 10-fold SD. The LOQ was calculated on the basis of the analysis of 20 samples with 0.141  $\mu$ M of resveratrol (data not shown). The mean concentration determined for the 20 samples was 0.15  $\mu$ M with a SD of 0.007  $\mu$ M (Table 1).



**Figure 2.** (A) Regression of net AUC of Trolox C on different concentrations of Trolox C. The net AUC =  $AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{blank}}$ . (B) Regression of net AUC of resveratrol on different concentrations of resveratrol. The net AUC =  $AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{blank}}$ .

**Table 1.** Values of More Representative Validation Parameters

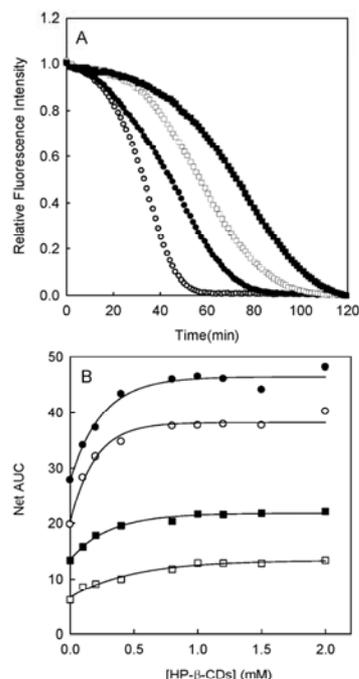
linearity ( $\mu\text{M}$ )	LOD ( $\mu\text{M}$ )	LOQ ( $\mu\text{M}$ )	precision (%)		ruggedness (%)
			interday	intraday	
0.25–2.0	$0.042 \pm 0.004$	$0.15 \pm 0.007$	11	3	7.6

**Precision.** Assay precision was tested by repeatability (intraday variation) and reproducibility (interday variation) studies. Six samples were fortified at  $0.5 \mu\text{M}$ , and the resveratrol concentration was measured six times (by triplicate), on the same day (repeatability) and of five different days (reproducibility). The SD and intra and interday coefficient of variation (% CV) of the ORAC values were calculated giving values of 3% and 11%, respectively (Table 1).

**Ruggedness.** To determine the ruggedness of the method,  $1.5 \mu\text{M}$  of resveratrol was analyzed for 30 days, during which time the net AUC presented a CV of 7.6% (data not shown), confirming the reliability of the assay (Table 1).

#### Antioxidant Capacity of Resveratrol in the Presence of CDs

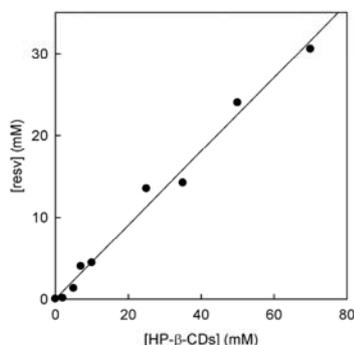
When the decay curves of FL in the presence of resveratrol alone were compared with those in the presence of HP- $\beta$ -CDs 2 mM, an increase in the area under the curve was observed (Figure 3A). As can be seen in Figure 3A, the slope of the curves from resveratrol alone [ $0.75 \mu\text{M}$  (○) or  $1.5 \mu\text{M}$  (□)] were higher than those for resveratrol-CDs complex [ $0.75 \mu\text{M}$  (●) or  $1.5 \mu\text{M}$  (■)]. This fact originated an increase in the lasting time of its activity.



**Figure 3.** (A) FL fluorescence decay curves induced by AAPH in the presence of resveratrol alone, ( $0.75 \mu\text{M}$  (○) and  $1.5 \mu\text{M}$  (□)) and with HP- $\beta$ -CDs 2 mM (resveratrol  $0.75 \mu\text{M}$  (●) and resveratrol  $1.5 \mu\text{M}$  (■)). (B) Effect of HP- $\beta$ -CDs concentration on the net AUC of resveratrol  $1.5 \mu\text{M}$  (●),  $1.12 \mu\text{M}$  (○),  $0.75 \mu\text{M}$  (■) and  $0.5 \mu\text{M}$  (□).

When increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs were added to the reaction medium at different resveratrol concentrations ( $0.5$ ,  $0.75$ ,  $1.12$ , and  $1.5 \mu\text{M}$ ), a clear increase in the antioxidant activity was observed in all cases (Figure 3B). It was not possible to measure the net AUC of resveratrol concentrations higher than  $1.5 \mu\text{M}$  in the presence of CDs because the measure times exceeded 2 h, established as optimum for the ORAC assay. As can be seen in Figure 3B, when HP- $\beta$ -CDs increased, the net AUC of resveratrol also increased up to saturation at ( $0.4 \text{ mM}$ ) HP- $\beta$ -CDs. At the saturation level, resveratrol showed almost double the antioxidant activity in the presence than in the absence of CDs in all cases studied (Figure 3B). This effect on antioxidant activity may be due to the formation of inclusion complexes between resveratrol and HP- $\beta$ -CDs. Indeed, such complexation has recently been demonstrated for  $\beta$ -CDs and maltosyl- $\beta$ -CDs (G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs) by our group (12). From these results, it was possible to deduce that the OH group of monophenolic ring of resveratrol is implied in the complexation process, because of the increase in antioxidant activity observed after complexation process and the decrease observed in the oxidation of resveratrol by lipoxygenase (12). Moreover, it has been described in the literature that phenolic groups are entrapped in the hydrophobic cavity of cyclodextrins.

In order to corroborate that resveratrol is complexed by HP- $\beta$ -CDs in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and to calculate its complexation constant,  $K_c$ , a phase solubility diagram was carried out (17) (Figure 4). The linear relationship observed between HP- $\beta$ -CDs and resveratrol concentration



**Figure 4.** Phase solubility diagram of resveratrol with HP- $\beta$ -CDs in sodium phosphate buffer (75 mM, pH 7.4) at 25 °C.

(**Figure 4**) corresponded to a 1:1 complex formation, so that the equilibrium between resveratrol and HP- $\beta$ -CDs can be expressed as



where the complexation constant,  $K_c$ , is defined as

$$K_c = \frac{[\text{resv-CD}]}{[\text{resv}]_f [\text{CD}]_f} \quad (4)$$

The  $K_c$  value was calculated using the equation described by Higuchi and Connors (17):

$$K_c = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})} \quad (5)$$

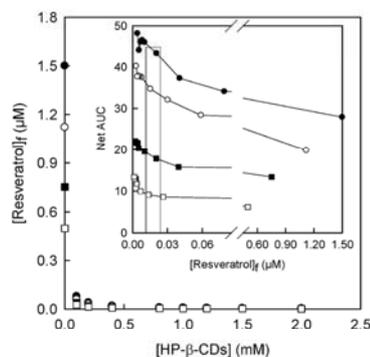
where  $S_0$  is the solubility of resveratrol in 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) ( $S_0 = 45 \mu\text{M}$ ). The  $K_c$  value obtained was  $18\,048 \text{ M}^{-1}$ . This  $K_c$  value is much higher than that obtained for  $\beta$ -CDs or  $\text{G}_2$ - $\beta$ -CDs ( $4317$  and  $5130 \text{ M}^{-1}$ , respectively) (12).

At the concentrations studied in this paper (up to  $2 \mu\text{M}$ ), resveratrol is soluble in the reaction medium ( $S_0 = 45 \mu\text{M}$ ). So, the increase in net AUC observed in **Figure 3** with increasing CDs, can not be attributed to the solubilization of resveratrol, as has previously been described to the case of  $\alpha$ -tocopherol (20) and lycopene (21). In the case of resveratrol, when it is complexed, HP- $\beta$ -CDs acts as a reservoir of controlled substrate dosage that protects resveratrol against its rapid oxidation by AAPH radical. So, its antioxidant activity is prolonged and only reaches a maximum when all resveratrol is complexed (a minimum quantity of free resveratrol is always present because the complexation phenomenon is a dynamic equilibrium).

In order to clarify whether the increase in antioxidant activity of resveratrol is due to protection by HP- $\beta$ -CDs, the free resveratrol concentration ( $[\text{resv}]_f$ ) at each point of **Figure 3** was calculated using the  $K_c$  value previously obtained ( $18\,048 \text{ M}^{-1}$ ) and the following equation (12):

$$[\text{resv}]_f = \frac{-( [\text{CD}]_f K_c - [\text{resv}]_f K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_f K_c - [\text{resv}]_f K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{resv}]_f}}{2K_c} \quad (6)$$

replotting the data and data in **Figure 5**. This **Figure 5** showed that the points of different curves in **Figure 3** that reached the



**Figure 5.** Effect of increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs on free resveratrol concentration. Total resveratrol concentration:  $1.5 \mu\text{M}$  (●),  $1.12 \mu\text{M}$  (○),  $0.75 \mu\text{M}$  (■), and  $0.5 \mu\text{M}$  (□). Inset: Effect of free resveratrol concentration on net AUC. The free resveratrol concentrations were calculated from data shown in **Figure 3**, using eq 6 (see text for details). Total resveratrol concentration:  $1.5 \mu\text{M}$  (●),  $1.12 \mu\text{M}$  (○),  $0.75 \mu\text{M}$  (■), and  $0.5 \mu\text{M}$  (□).

maximum net AUC, independently of total resveratrol present ( $0.5$ ,  $0.75$ ,  $1.12$ , and  $1.5 \mu\text{M}$ ), have the same  $[\text{resv}]_f$  ( $4 \pm 0.8 \text{ nM}$ , practically null). This result indicates that due to the high  $K_c$  value between resveratrol and HP- $\beta$ -CDs ( $18\,048 \text{ M}^{-1}$ ), when working at resveratrol concentrations below its  $S_0$  ( $0.5$ – $1.5 \mu\text{M}$ , in our case), the HP- $\beta$ -CDs complexed all the resveratrol. When the  $[\text{resv}]_f$  was plotted vs net AUC (**Figure 5**, inset), points with the same  $[\text{resv}]_f$  did not have the same net AUC. Moreover, as free resveratrol increased, the net AUC decreased to reach the same net AUC value for resveratrol as in the absence of CDs, that is, when all the resveratrol is free. All these data point to the fact that the  $[\text{resv}]_f$  is not the determinant factor of the increase in the antioxidant activity of resveratrol in the presence of CDs.

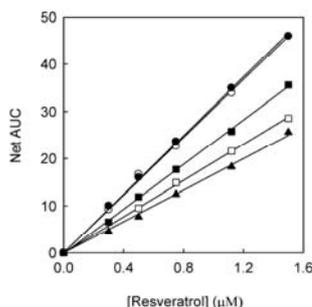
To determine whether the increase in antioxidant activity is a function of complexed resveratrol ( $[\text{resv-CDs}]$ ), the concentration of  $[\text{resv-CDs}]$  was calculated at each point of **Figure 3**, using the equation

$$[\text{resv-CD}] = [\text{resv}]_t - [\text{resv}]_f \quad (7)$$

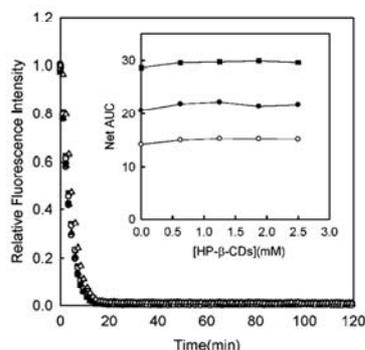
The results (data not shown), indicated that the net AUC increased as  $[\text{resv-CDs}]$  increased, until all the resveratrol was complexed. This result was obtained because the ORAC method combines both inhibition time and degree of inhibition into a single quantity.

To complete the study, an experiment was carried out in which increasing concentrations of resveratrol were added to the reaction medium at fixed HP- $\beta$ -CDs concentrations ( $0$ ,  $0.05$ ,  $0.2$ ,  $0.4$ , and  $2 \text{ mM}$ ), and the net AUC was measured (**Figure 6**). The results indicated that the net AUC increases with the resveratrol concentration. However, at each point of **Figure 6**, for the same resveratrol concentration, the net AUC increased as HP- $\beta$ -CDs increased up to  $0.4 \text{ mM}$ , above which the HP- $\beta$ -CDs concentration had no effect on the antioxidant activity of resveratrol because of all the resveratrol had already been complexed.

In order to discard any antioxidant effect of HP- $\beta$ -CDs per se, the disappearance of fluorescence signal of FL by the attack of AAPH radical were measured in the presence of increasing concentrations of HP- $\beta$ -CDs (in the absence of resveratrol or Trolox C) (**Figure 7**). In this case, no effect was observed as CDs



**Figure 6.** Effect of resveratrol concentration on the net AUC at fixed HP- $\beta$ -CDs concentration: 2 mM (●), 0.4 mM (○), 0.2 mM (■), 0.05 mM (□), and 0 mM (▲).



**Figure 7.** FL fluorescence decay curves induced by AAPH in the presence of HP- $\beta$ -CDs at different concentrations: HP- $\beta$ -CDs 0 mM (●), 0.2 mM (○), 0.4 mM (■), 1 mM (▲), 2 mM (△). (Inset) Effect of HP- $\beta$ -CDs concentration on the net AUC of Trolox C 25  $\mu$ M (■), 18.75  $\mu$ M (●), and 12.5  $\mu$ M (○).

concentration increased, indicating that HP- $\beta$ -CDs, at the studied concentrations, do not present antioxidant effect per se.

Moreover, the antioxidant activity of Trolox C by ORAC-FL was measured in the presence of HP- $\beta$ -CDs (Figure 7, inset). In this case, no effect was observed as CDs concentration increased, indicating that Trolox C was not complexed by HP- $\beta$ -CDs and so the net AUC did not vary. This result indicates that CDs only increase the antioxidant activity of compounds that can be complexed in their hydrophobic cavity.

In conclusion, the complexation of resveratrol in HP- $\beta$ -CDs increases its antioxidant activity, with CDs acting as a controlled dosage reservoir that protects resveratrol against its rapid oxidation by free radicals. In this way, its antioxidant activity is prolonged with time and reaches its maximum when all the resveratrol has been complexed.

#### ABBREVIATIONS USED

AAPH, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; CDs, cyclodextrins; CV, intra- and interday coefficient of variation; FL, fluorescein; G<sub>2</sub>- $\beta$ -CDs, maltosyl- $\beta$ -cyclodextrins; HP- $\beta$ -CDs, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins;  $K_c$ , complexation constant; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation; net AUC, net area; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; ORAC-FL, oxygen radical absorbance capacity-fluorescein; resv, resveratrol; ROS, reactive oxygen species; SD, standard deviation.

#### LITERATURE CITED

- (1) Gorham J. The stilbenoids. In *Reinhold L. Progress in Phytochemistry*; Harbone, J. B., Swain, T., Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1980; pp 203–252.
- (2) Langcake, P.; Pryce, R. J. The production of resveratrol by *Vitis Vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **1976**, *9*, 77–86.
- (3) Bertelli, A. A. E.; Giovannini, L.; De Caterina, R.; Bernini, W.; Migliori, M.; Fregoni, M.; Bavaresco, L.; Bertelli, A. Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1996**, *22*, 61–63.
- (4) Kimura, Y.; Okuda, H.; Arichi, S. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *834*, 275–278.
- (5) Rotondo, S.; Rajtar, G.; Manarini, S.; Celardo, A.; Rotillo, D.; De Gaetano, G.; Evangelista, V.; Cerletti, C. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 1691–1699.
- (6) Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **1997**, *275*, 218–220.
- (7) Belguendouz, L.; Fremont, L.; Linard, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 1347–1355.
- (8) Szejtli, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1825–1845.
- (9) Buschmann, H. J.; Schollmayer, E. Application of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53*, 185–191.
- (10) Lofsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical application of cyclodextrins Drug solubilisation and stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017–1025.
- (11) Szejtli, J. *Cyclodextrin technology*; Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands, 1988.
- (12) Lucas-Abellán, C.; Fortea, M. I.; López-Nicolás, J. M.; Núñez-Delgado, E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chem.* **2007**, *104*, 39–44.
- (13) Cao, C.; Prior, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1309–1315.
- (14) Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchioca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273–3279.
- (15) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626.
- (16) Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54.
- (17) Higuchi, T.; Connors, K. A. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **1965**, *4*, 107–212.
- (18) Gabaldón, J. A.; Maquieira, A.; Puchades, R. Development of a simple extraction procedure for chlorpyrifos determination in food samples by immunoassay. *Talanta* **2007**, *71*, 1001–1010.
- (19) Michaliak, C. A.; Berberich, S. A.; Nelson, J. O.; Karu, A. E.; Wong, R., Eds.; *Immunoanalysis of Agrochemical: Emerging Technologies*; ACS Symposium Series No. 586; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Vol. 228, p 300.
- (20) Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1815–1821.

- (21) Bangalore, D. V.; McGlynn, W.; Scott, D. D. Effect of b-cyclodextrin in improving the correlation between lycopene concentration and ORAC values. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1878–1883.

supported by Fundación Séneca (03025/PPC/05) and Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-08702/ALI). C.L.A. is a holder of a research grant from the Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI) (Bes-2007-16082), Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). M.T.M. is a holder of a research grant from the Catholic University of Murcia.

---

Received for review October 23, 2007. Revised manuscript received January 17, 2008. Accepted January 22, 2008. This work was partially

JF0731088

**CAPÍTULO VI. RESUMEN GLOBAL DE LOS  
RESULTADOS OBTENIDOS**



## 1. ESTUDIO DE LA COMPLEJACIÓN DE RESVERATROL CON DIFERENTES TIPOS DE CICLODEXTRINAS. CÁLCULO DE LA $K_C$ POR DIFERENTES MÉTODOS

En los últimos años numerosos estudios han demostrado los efectos beneficiosos para la salud que posee el resveratrol. La interacción entre los argumentos científicos publicados y el creciente interés de la población por el binomio alimentación-salud, hace que resulte interesante desde el punto de vista empresarial la elaboración de alimentos funcionales que lo contengan.

El principal problema que se presenta a la hora de utilizar el resveratrol para la elaboración de bebidas funcionales, es su baja solubilidad acuosa y su inestabilidad frente a diferentes factores como pueden ser el oxígeno y la luz. Para solucionar este problema, nos planteamos la posibilidad de utilizar las CDs como agentes complejantes, ya que son capaces de aumentar la solubilidad de los compuestos encapsulados, además de protegerlos frente a la oxidación por diferentes agentes, haciéndolos, en consecuencia, más estables (Martín del valle, 2004).

Por este motivo, se estudió la complejación del resveratrol con diferentes tipos de CDs y se determinó el valor de  $K_C$  con cada una de ellas, por diferentes métodos. Este trabajo previo permitió establecer el tipo de CDs, que mostró más afinidad por el resveratrol (mayor valor de  $K_C$ ) y por lo tanto la más indicada para su complejación.

En primer lugar, se estudió la oxidación del resveratrol por lipoxigenasa (LOX) observándose un descenso en el máximo de absorción del resveratrol a 312 nm, acompañado de un incremento de absorbancia a 250 nm, el cual corresponde al producto de oxidación del resveratrol, como previamente fue descrito por Pinto y col. en 1999. La formación de tres puntos isobésticos a 240, 280 y 360 nm corroboró la presencia de dos especies en el medio de reacción: el resveratrol y su producto de oxidación.

Cuando se estudió la oxidación del resveratrol por LOX en presencia de diferentes tipos de CDs, se observó una disminución en la velocidad de oxidación del polifenol en presencia de CDs, en todos los casos estudiados. Esta inhibición de la

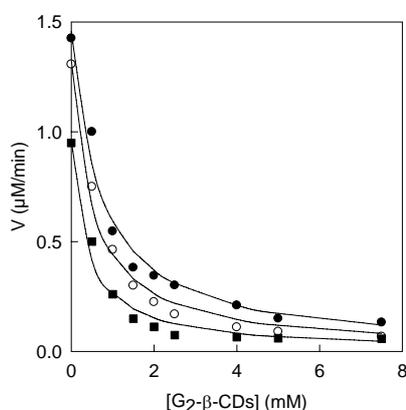
actividad enzimática nos indicó que el resveratrol estaba siendo secuestrado por las CDs, dejando así de estar disponible para la enzima. Por tanto, LOX pudo ser utilizada para calcular la  $K_C$  entre el resveratrol y los diferentes tipos de CDs mediante el método enzimático (López-Nicolás, y col., 1997; Núñez-Delicado, y col., 1999a; Núñez-Delicado y col., 1999b).

Posteriormente se estudió la actividad de LOX sobre resveratrol en presencia de concentraciones crecientes de los tres tipos de CDs parentales ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs), manteniendo constante la concentración de resveratrol. En todos los casos, se observó una disminución en la actividad de LOX conforme aumentó la concentración de CDs, siendo mayor esta inhibición para  $\beta$ - que en el caso de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -CDs. Estos resultados indicaron que el resveratrol puede entrar en la cavidad hidrofóbica de los tres tipos de CDs estudiados ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs), para formar complejos de inclusión e inhibir así su oxidación.

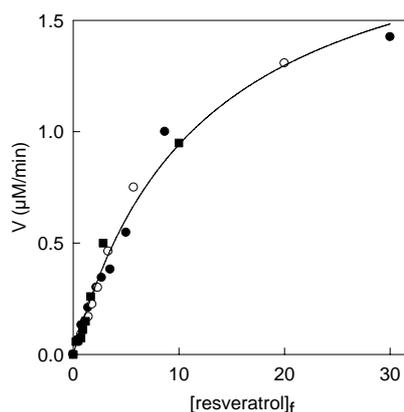
De los valores de  $K_C$  obtenidos para los tres tipos de CDs, el de  $\beta$ -CDs fue el mayor ( $4220 \pm 387 \text{ M}^{-1}$ ), mientras que  $\alpha$ - y  $\gamma$ -CDs presentaron valores de  $K_C$  muchos más bajos ( $805 \pm 75$  y  $226 \pm 32 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente). Este resultado indicó que el tamaño de la cavidad hidrofóbica de las CDs era el factor determinante de la magnitud de  $K_C$ . En el caso de  $\beta$ -CDs su tamaño permite una interacción más estable con el resveratrol que en el caso de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -CDs, por tener éstas un tamaño muy pequeño y muy grande, respectivamente. De estos resultados concluimos que  $\beta$ -CDs son las CDs naturales más efectivas para la complejación de resveratrol.

Avanzando un paso más allá en la investigación, estudiamos la complejación del resveratrol en diferentes tipos de  $\beta$ -CDs modificadas: HP- $\beta$ -, metil- $\beta$ -, G<sub>2</sub>- $\beta$ -, carboximetil- $\beta$ - y acetil- $\beta$ -CDs. El cálculo de  $K_C$  para estos tipos de CDs modificadas también se llevó a cabo usando el método enzimático. En todos los casos, se observó un descenso en la velocidad de oxidación del resveratrol por LOX, al igual que ocurría con las CDs nativas. En este caso, las CDs modificadas más efectivas en la complejación del resveratrol fueron HP- $\beta$ - y metil- $\beta$ -CDs, con unos valores de  $K_C$  de  $18048 \pm 652 \text{ M}^{-1}$  y  $10089 \pm 675 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente. Es importante resaltar que estos valores de  $K_C$  fueron muy superiores a los obtenidos para las  $\beta$ -CDs nativas. Por otro lado, carboximetil- $\beta$ -, y acetil- $\beta$ -CDs presentaron valores de  $K_C$  más bajos que los obtenidos para sus parentales, indicando que la presencia de los grupos funcionales carboximetil y acetil en la boca del cono, dificultan la complejación del resveratrol por CDs.

Para demostrar que la enzima solo trabajaba sobre el resveratrol libre y no sobre el complejo, se calculó la concentración de resveratrol libre en los experimentos de oxidación de resveratrol en presencia de CDs (**Figura VI.1.**) y se representaron frente a la velocidad de reacción. Esta representación mostró una cinética michaeliana exactamente igual que en ausencia de CDs (**Figura VI.2.**). Indicando que los puntos que presentaban la misma velocidad tienen la misma concentración de resveratrol libre a pesar de tener distinta concentración de CDs y resveratrol totales.

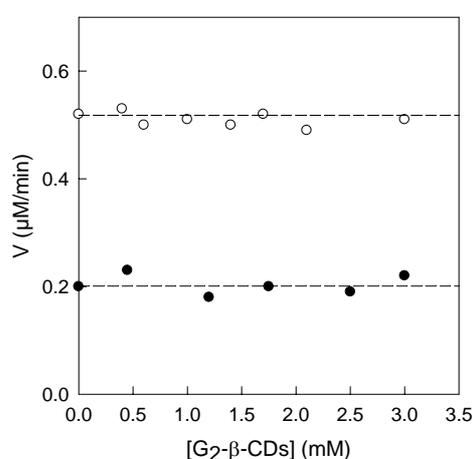


**Figura VI.1.:** Efecto de  $G_2$ - $\beta$ -CDs en la oxidación del resveratrol por LOX en presencia de  $H_2O_2$ . El medio de reacción a  $25^\circ C$  contenía  $100mM$  de tampón borato sódico  $pH$  9.0,  $30 \mu M$  de resveratrol,  $400 \mu M$  de  $H_2O_2$ ,  $50 nM$  de LOX y concentraciones crecientes de  $G_2$ - $\beta$ -CDs. (●)  $10 \mu M$  resveratrol, (○)  $20 \mu M$  resveratrol, (■)  $30 \mu M$  resveratrol.



**Figura VI.2.:** Efecto de la concentración de resveratrol libre con LOX. (●)  $10 \mu M$  total resveratrol, (○)  $20 \mu M$  total resveratrol, (■)  $30 \mu M$  total resveratrol.

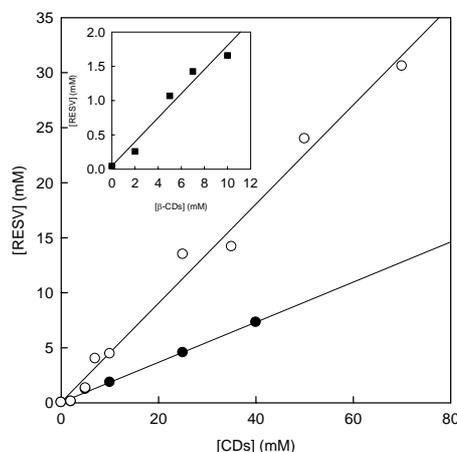
Para comprobar que los valores de  $K_C$  obtenidos eran correctos se llevo a cabo un ensayo en el que se varió la concentración de resveratrol y CDs totales para que al utilizar los valores de  $K_C$  obtenidos, la concentración de resveratrol libre fuera siempre la misma. Cuando se adicionó la enzima a estos medios de reacción la velocidad fue la misma en todos los casos, indicando que efectivamente la concentración de resveratrol libre estaba bien calculada numéricamente utilizando la  $K_C$  obtenida (**Figura VI.3.**).



**Figura VI.3.:** Ensayo de CDs con diferentes concentraciones de resveratrol libre. (●) 1.5 μM resveratrol, (○) 5 μM resveratrol.

Una vez calculada y comprobada la  $K_C$  del resveratrol con los diferentes tipos de CDs nativas y modificadas por el método enzimático, se pasó a calcular la  $K_C$  de tres tipos de CDs (β-CDs y dos de sus modificadas HP-β- y G<sub>2</sub>-β-CDs) mediante estudios de solubilidad, utilizando el método descrito por Higuchi y Connors (1965), con el fin de comparar los resultados obtenidos por los dos métodos (enzimático y solubilidad).

Para ello, se llevaron a cabo estudios de solubilidad del resveratrol en medio acuoso en presencia de concentraciones crecientes β-, HP-β- y G<sub>2</sub>-β-CDs (**Figura VI.4.**). Los diagramas de fases obtenidos fueron de tipo A<sub>L</sub> en los tres casos, indicando la formación de complejos con estequiometría 1:1, similar a la obtenida mediante el método enzimático. Los valores de  $K_C$  obtenidos con este método fueron similares a los obtenidos mediante el método enzimático (**Tabla VI.1.**).



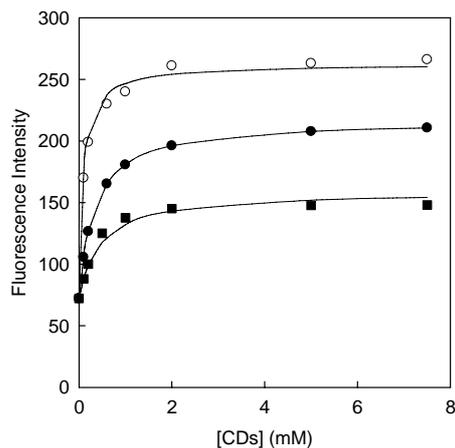
**Figura VI.4.:** Diagrama de fases del resveratrol con HP-β-CDs (○) y G<sub>2</sub>-β-CDs (●). Figura insertada: β-CDs (■).

**Tabla VI.1.:**  $K_C$  de los diferentes tipos de CDs por método enzimático y de solubilidad.

CDs	Método enzimático	Método de solubilidad
	$K_C$ (M <sup>-1</sup> )	$K_C$ (M <sup>-1</sup> )
α-CDs	805 ± 75	
β-CDs	4220 ± 387	4438 ± 401
γ-CDs	226 ± 32	
Hidroxipropil-β-CDs	18048 ± 625	18018 ± 723
Metil-β-CDs	10089 ± 675	
Maltosil-β-CDs	5098 ± 495	5425 ± 503
Carboximetil-β-CDs	1518 ± 205	
Acetil-β-CDs	1789 ± 187	

Otro método utilizado para calcular la  $K_C$  de estos tres tipos de CDs (β-, HP-β- y G<sub>2</sub>-β-CDs) fue el método fluorimétrico. En este método, se utilizó el aumento en la intensidad de fluorescencia del resveratrol, debido a la complejación en CDs, para calcular su  $K_C$ . La complejación de resveratrol en CDs provocó un incremento de la intensidad de fluorescencia conforme aumentaba la concentración de CDs en el medio de reacción. Este aumento se produjo hasta que todo el polifenol estuvo

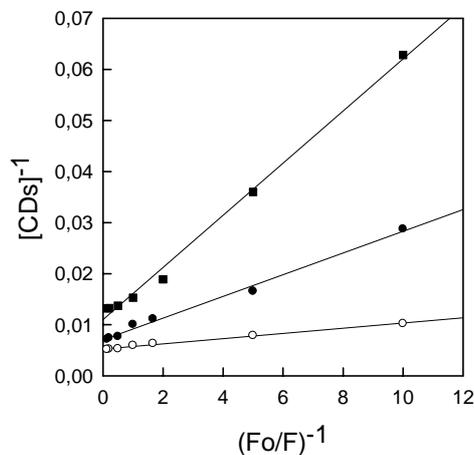
complejado, para permanecer constante a partir de esa concentración de CDs (**Figura VI.5.**).



**Figura VI.5.:** Intensidad de fluorescencia del resveratrol en presencia de concentraciones crecientes de  $\beta$ -CDs (■),  $G_2$ - $\beta$ -CDs (●), HP- $\beta$ -CDs (○).

El ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones de Connors, Benesi-Hildebrand y Scatchard (Connors, 1987; Benesi y Hildebrand, 1949; Scatchard, 1949), nos permitió calcular el valor de  $K_C$  por el método fluorimétrico. La obtención de representaciones lineales en el caso de las ecuaciones de Benesi-Hildebrand y Scatchard, reveló una estequiometría 1:1 de los complejos de inclusión. Este resultado coincide con el obtenido con el método enzimático y estudios de solubilidad.

La representación de la doble recíproca de Benesi-Hildebrand permite calcular el valor de  $K_C$  por división del valor de la pendiente entre el intercepto con el eje Y (**Figura VI. 6.**). El problema de este tipo de representación es su sensibilidad a concentraciones bajas de CDs, pudiendo variar mucho el valor obtenido de  $K_C$ .



**Figura VI.6:** Representación de Benesi-Hildebrand para resveratrol con  $\beta$ -CDs ( $\blacksquare$ ),  $G_2$ - $\beta$ -CDs ( $\bullet$ ), HP- $\beta$ -CDs ( $\circ$ ).

Sin embargo, el cálculo de  $K_C$  mediante el uso de la ecuación no lineal, tiene en cuenta de forma más equitativa, los valores de fluorescencia obtenidos para todas las concentraciones de CDs utilizadas. Los valores de  $K_C$  obtenidos mediante el uso de las tres ecuaciones fueron muy similares entre sí, tal y como se muestra en la **Tabla VI. 2.**

**Tabla VI. 2.:**  $K_C$  calculadas mediante el método fluorimétrico.

CDs	$K_C$ (M <sup>-1</sup> ) Connors o no-lineal	$K_C$ (M <sup>-1</sup> ) Benesi-Hildebrad	$K_C$ (M <sup>-1</sup> ) Scatchard
$\beta$ -CDs	2205 $\pm$ 364	2145 $\pm$ 265	2382 $\pm$ 285
Hidroxipropil- $\beta$ -CDS	11035 $\pm$ 897	10314 $\pm$ 889	10229 $\pm$ 845
Maltosil- $\beta$ -CDs	3011 $\pm$ 435	3314 $\pm$ 298	3224 $\pm$ 301

Cuando se compararon los valores de  $K_C$  obtenidos para  $\beta$ -, HP- $\beta$ - y  $G_2$ - $\beta$ -CDs mediante el método fluorimétrico, con los obtenidos mediante el método enzimático y los estudios de solubilidad, se observó que mediante el método fluorimétrico se obtenían valores de  $K_C$  más bajos que aplicando los otros dos métodos.

Por otra parte y teniendo en cuenta los valores obtenidos para las  $K_C$  entre el resveratrol y todos los tipos de CDs estudiados, queda patente que son las HP- $\beta$ -CDs las más efectivas en la complejación de dicho polifenol, ya que obtenemos un valor de  $K_C$  mayor que el alcanzado con los demás tipos de CDs, en cualquiera de los métodos estudiados.

## 2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL RESVERATROL COMPLEJADO EN CDs POR DIFERENTES MÉTODOS

Otro de los objetivos de esta tesis fue estudiar el efecto de la complejación del resveratrol en CDs sobre su capacidad antioxidante. Para ello, se determinó la capacidad antioxidante del resveratrol en presencia de HP- $\beta$ -CDs por diferentes métodos: ORAC-FL, ABTS y DPPH.

En primer lugar, se validaron los tres métodos, siendo el método ORAC-FL el más sensible y preciso para medir la capacidad antioxidante del resveratrol en ausencia de CDs. Por este orden, los métodos de ABTS y DPPH mostraron menor sensibilidad. El intervalo de trabajo de cada uno de los métodos fue inversamente proporcional a la sensibilidad del mismo. Los intervalos de trabajo obtenidos fueron: 0,15-2  $\mu$ M de resveratrol para ORAC-FL, 0,5-7,5  $\mu$ M para ABTS y 5-90  $\mu$ M en el caso del DPPH. Esto indica que el método más sensible para medir la capacidad antioxidante del resveratrol es el método ORAC-FL, pudiendo medir concentraciones muy bajas de resveratrol con una gran precisión (**Tabla VI. 3**).

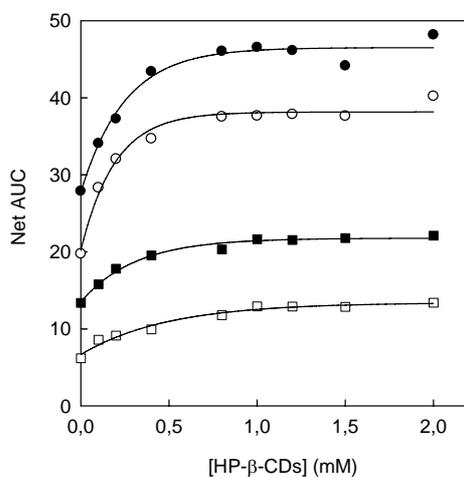
**Tabla VI.3.:** Valores más representativos de los parámetros validados.

Método	Linealidad	LOD ( $\mu$ M)	LOQ ( $\mu$ M)	Precision (%)		Robusted (%)
				Repetibilidad	Reproducibilidad	
ORAC	0,15-2	0,042 $\pm$ 0,003	0,15 $\pm$ 0,007	3	11	7,6
ABTS	0,5-7,5	0,3 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,03	5	13	9,3
DPPH	5-90	1,3 $\pm$ 0,06	5 $\pm$ 0,17	8	15	10,5

Una vez validados los tres métodos, se pasó a estudiar la capacidad antioxidante del resveratrol en presencia de HP- $\beta$ -CDs por cada uno de ellos. Conforme aumentó la concentración de CDs, a diferentes concentraciones fijas de resveratrol, se observó un aumento en la capacidad antioxidante del resveratrol, tanto cuando fue medida por el método ORAC-FL, como cuando se utilizó el método del ABTS. Sin embargo, este aumento no se observó cuando el método utilizado fue el del DPPH. Este hecho se justifica por el empleo de metanol como medio de reacción, dando lugar a la ruptura de los complejos de inclusión entre las CDs y el resveratrol, convirtiéndolo en un método no apto para evaluar la actividad antioxidante de compuestos complejados con CDs.

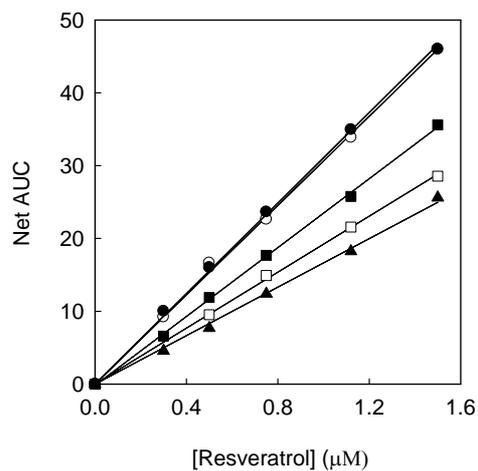
Cuando se evaluó la actividad antioxidante por el método ORAC-FL, se observó que conforme aumenta la concentración de CDs en el medio, aumenta la capacidad antioxidante del resveratrol, hasta llegar a saturación. Esto indicó que en el momento de la saturación, todo el resveratrol ha sido complejado y por tanto, la actividad antioxidante es independiente de la concentración de HP- $\beta$ -CDs en el medio (no aumenta la capacidad antioxidante). La actividad antioxidante que presentó el resveratrol complejado fue más del doble de la capacidad antioxidante del resveratrol en ausencia de CDs (**Figura VI.7**). Este aumento en la actividad antioxidante viene dado por la protección que ejercen las CDs frente al ataque de radicales libres al resveratrol.

La saturación de la actividad antioxidante del resveratrol (medida por el método ORAC-FL) en presencia de HP- $\beta$ -CDs, se alcanzó a una concentración de CDs 0,4 mM (concentración a la cual todo el resveratrol está complejado). Sin embargo, en el caso del método del ABTS, esta saturación se alcanza con una concentración de HP- $\beta$ -CDs 2 mM. Este resultado indicó que algún componente del medio de reacción estaba compitiendo con el resveratrol por la cavidad hidrofóbica de las CDs, y por lo tanto, estaba interfiriendo en la medida. Por este motivo, el método del ABTS no es idóneo para medir la actividad antioxidante de compuestos complejados en CDs.



**Figura VI.7.:** Efecto de HP-β-CDs en el Net AUC del resveratrol 1.5 μM (●), 1.12 μM (○), 0.75 μM (■) and 0.5 μM (□).

Para completar el estudio de la actividad antioxidante del resveratrol por el método ORAC-FL, se realizó el ensayo de la actividad antioxidante a concentraciones crecientes de resveratrol con una concentración fija de CDs, observándose un aumento lineal de la actividad antioxidante del resveratrol (**Figura VI.8**).



**Figura VI.8.:** Capacidad antioxidante de concentraciones crecientes de resveratrol en presencia de una concentración fija de HP-β-CDs: 2 mM (●), 0.4 mM (○), 0.2 mM (■), 0.05 mM (□) y 0 mM (▲).

Como conclusión, decir que el método ORAC-FL es el único que permite medir la capacidad antioxidante de compuestos complejados en CDs de forma fiable.

### 3. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones globales:

1. El resveratrol, compuesto polifenólico inestable y con limitada solubilidad acuosa, puede ser complejado por los diferentes tipos de CDs nativas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs), siendo las más efectivas  $\beta$ -CDs. Dentro de las  $\beta$ -CDs modificadas, las HP- $\beta$ -CDs son las más eficaces para la complejación del resveratrol, ya que presentan la  $K_C$  más elevada, independientemente del método utilizado para el cálculo de la misma.
2. Todos los tipos de CDs estudiados aumentan tanto la solubilidad acuosa del resveratrol como su estabilidad frente a la oxidación enzimática. Aunque son las HP- $\beta$ -CDs las que presentan una mayor  $K_C$  entre todas las estudiadas, consideramos que, por el momento, las  $\beta$ -CDs son las más idóneas para su utilización en la elaboración de alimentos funcionales enriquecidos en resveratrol, debido a su bajo coste y a que están autorizadas en la UE para su empleo como ingrediente alimentario.
3. Una vez comparados los valores de  $K_C$  del resveratrol en los diferentes tipos de CDs estudiados, obtenidos por varios métodos, podemos concluir que tanto el método enzimático como los estudios de solubilidad nos proporcionan valores reales de  $K_C$  (y muy similares entre sí). Sin embargo, el método fluorimétrico infravalora las  $K_C$ .
4. El estudio comparativo de diferentes métodos para determinar la actividad antioxidante del resveratrol complejado en CDs revela que, el único método válido para cuantificar dicha actividad es el método ORAC-FL. Esto es debido a su mayor sensibilidad, la naturaleza acuosa de su medio de reacción y a la no interferencia de ninguno de los componentes del medio en la complejación del resveratrol por CDs.

5. Los métodos ABTS y DPPH no pueden ser utilizados para determinar la actividad antioxidante del resveratrol complejado en CDs, ya que los componentes del medio de reacción del método ABTS interfieren en la formación de los complejos del resveratrol, y el medio de reacción del método DPPH, al ser metanólico, rompe los complejos formados.
6. La capacidad antioxidante del resveratrol aumenta en presencia de HP- $\beta$ -CDs, hasta llegar a un nivel de saturación, en el cual, todo el resveratrol ha sido complejado, presentando más del doble de actividad antioxidante que el resveratrol libre.

## **CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R., Joubert, J. M. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride (AlCl<sub>3</sub>). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1979-1981.
- Akiyama, Y., Miyao, K. Microencapsulation of royal jelly. *Jpn. Kokai JP 77 80 463*. **1979**.
- Anekonda TS, Reddy PH. Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **2006**, *96*, 305.
- Angell, W.F., France, P.A. Detergent composition having granular cyclodextrin. *PCT Int Appl WO 01 18,163*. **2001**.
- Arichi, H., Kimura, Y., Okuda, H., Baba, K., Kozawa, M., Arichi, S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1982**, *30*, 1766-1770.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Rad. Res.* **1999**, *31*, 89-96.
- Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Baño, M.C., Obrador, E. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related its low bioavailability. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 387-398.
- Astray, G., González-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándera, L. A review on the use cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids.* **2009**, *23*, 1631-1640.
- Atwood, J.L. Inclusion phenomenon and molecular recognition. New York: Plenum. **1990**.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., Pruess, H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* **2000**, *148*: 187-197.
- 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 -  $\beta$ - cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *J. Pharm. Medical Anal.* **2001**, *26*, 171-178.

- Baur, J.A., Sinclair, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 493-506.
- Bavaresco, L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Exp. Clin. Res.* **2003**, *29*, 181-187.
- Bazzano, L., He, J. G., Loria, C. M., Vupputuri, S., Myers, L., Whelton, P. K. Fruit and vegetables intake and risk of cardiovascular disease in US adults the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 93-99.
- Benesi, H.A., Hildebrand, J.H. (). A spectrophotometric investigation on the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703-2707.
- Berliner, J.A., Heinecke, J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 707-727.
- Bertacche, V., Lorenzi, N., Nava, D., Pini, E., Cínico, C. Host-Guest Interaction Study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins. *J. Incl. Phen. Macr. Chem.* **2006**, *55*, 279-287.
- Bertelli, A.A.E., Giovannini, L., Giannessi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.* **1995**, *17*, 1-3.
- Bertelli, A.A.E., Giovannini, L., De Caterina, R., Migliori, M., Fregoni, M., Bavaresco, L. Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exp Clin Res.* **1996**, *22*, 61-63.
- Bertelli, A., Bertelli, A.A.E., Gozzini, A., Giovannini, L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1998**, *24*, 133-138.
- Bertelli, A.A.E. Wine, research and cardiovascular disease: instructions for use. *Atherosclerosis.* **2007**, *195*, 242-247.
- Bhardwaj, R., Dorr, R.T., Blanchard, J. Approaches to reducing toxicity of parenteral anticancer drug formulations using cyclo-dextrins. *J Pharm Sci Technol.* **2000**, *54*, 233-239.
- Bradamante, S., Barenghi, L., Piccinini, F., Bertelli, A.A., De Jonge, R., Beemster, P. Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric oxide- and adenosine-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *465*, 115-123.

- Brakenhielm, E., Cao, R., Cao, Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1798-1800.
- Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* **1998**, *56*, 317-333.
- Breslow, R., Hammond, M., Lauer, M. Selective Transamination and optical Induction by a Beta-cyclodextrin-pyridoxamine artificial enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, **102**, 421-425.
- Bru-Martínez, R., Pedreño-García, M.A.. Method for the production of resveratrol in cell culture. *Patent US20060205049A1.* **2005**.
- Burns, J., Gardner, P.T., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E., Crozier, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3337-3340.
- Buschmann, H. J. y Schollmayer, E.. Application of ciclodextrins in cosmetic products: a review. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53*, 185-191.
- Caesar, G.V. Dextrins and dextrinisations. In: radley, J.A.\_Ed., starch and its derivatives, 4th edn., Chapman & Hall, London. **1968**, 282-289.
- Cantos, E. García-Viguera, C., Pascual-Teresa, S., Tomás-Barberán, F.A. Effect of postharvest ultraviolet table grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4606-4612.
- Cantos, E., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: A new 'functional' fruit?. *J. Agric. Food Chem.* **2001** *49* 5052-5058.
- Cantos, E., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F.A. Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6322-6329.
- Cantos, E., Tomas-Barberan, F.A., Martinez, A., Espin, J.C. Differential stilbene induction susceptibility of seven red wine grape varieties upon postharvest UV-C irradiation. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 253-258.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3426-3431.
- Cao, G., Prior, R.L. Measurement of total antioxidant capacity in nutritional and clinical studies. In *Handbook of Antioxidants*, 2nd ed.; Cadenas, E., Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, **2001**, 47-55.
- Carando, S., Teissedre, P.L., Waffo-Teguo, P., Cabanis, J.C., Deffieux, G., Merillon, J.M. High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence

- detection for the determination of *trans*-astringin in wine. *J. Chromatogr. A.* **1999**, 849, 617-620.
- Celotti E., Ferrarini, R., Zironi, R., Conte, L. Resveratrol content of some wines obtained from dried valpolicella grapes: recioto and amarone. *J. Chromatogr.* **1996**, 730, 47-52.
- Chan, M.M.Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem. Pharm.* **2002**, 63, 99-104.
- Cichewicz, R.H., Kouzi, S.A. Resveratrol oligomers: structure, **chemistry**, and biological activity. *J. Nat. Prod. Chem.* **2002**, 26, 507-579.
- Cignarella, A., Minici, C., Bolego, C., Pinna, C., Sanvito, P., Gaion, R.M. Potential pro-inflammatory action of resveratrol in vascular smooth muscle cells from normal and diabetic rats. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2006**, 16, 322-329.
- Comini, S., Mentink, L. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat. Appl. EP 440539.* **1991**.
- Connors, K.A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1325-57.
- Counet, C., Callemien, D., Collin, S. Chocolate and cocoa: new sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chem.* **2006**, 98, 649-657.
- Covas, M., Fito, M., Lamuela-Raventós, L. M., Sebastiá, N., De la Torre-Boronat, M. C., Marrugat, J. Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **2000**, 20, 49-54.
- 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.
- Cruz, M.N., Luksha, L., Logman, H., Postar, L., Agewall, S., Kublickiene, K. Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, 290, 1969-1975.
- Das, D. K., Sato, M., Ray, P. S., Maulik, G., Engelman, R. M., Bertelli, A. A., Bertelli, A. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidant. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1999**, 25, 115-120.
- Das, S., Alegappan, V.K., Bagchi, D., Shama, H.S., Maulik, N., Das, D.K. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a

- potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul. Pharmacol.* **2005**, *42*, 281–289.
- Das, S., Das, D.K. Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Patents Cardiovasc. Drug Discov.* **2007**, *2*, 133-138.
- Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinasa activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2007**, *24*, 7217-7222.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agri. Food Chem.* **2004**, *52*, 48-54.
- Davies, N.M., Jamali, F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *7*, 332–336.
- De Gaetano, G., Cerletti, C. Wine and cardiovascular disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2001**, *11*, 47-50.
- De Gaetano, G., De Curtis, A., Di Castelnuovo, A., Donati, M.B., Iacoviello, L., Rotondo, S. Antithrombotic effect of polyphenols in experimental models: a mechanism of reduced vascular risk by moderate wine consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *957*, 174-188.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **1997**, *324*, 1-18.
- Dercks, W., Creasy, L.L. The significance of stilbene phytoalexins in the plasmopara viticola-grapevine interaction. *Physiol. Plant Pathol.* **1989**, *34*, 189-202.
- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* **1998**, *80*, 77-112.
- Dobrydneva, Y., Williams, R.L., Blackmore, P.F.. Trans-resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 149-157.
- Docherty, J. J., Fu, M. M., Stiffer, S., Limperos, R. J., Pokabla, C. M., CeLucia, A. L. Resveratrol inhibition of herpes simples replication. *Antivir. Res.* **1999**, *43*, 145-155.
- Docherty, J. J., Fu, M. M., Stiffer, S., Tsai, M., Resveratrol selective inhibits Neisseria Gonorrhoeae and Neisseria meningitides. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2001**, *47*, 239-246.

- 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.
- Eastburn, S.D. Tao, B. Y. Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* **1994**, 12, 325-339.
- Eastwood, M. A. Interaction dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *Q. M. J.* **1999**, 92, 527-530.
- El-Mohsen, M.A., Bayele, H., Kuhnle, G., Gibson, G., Debnam, E., Kaile, Srail, S. Distribution of [3H] *trans*-resveratrol in rat tissues following oral administration. *Brit. J. Nutr.* **2006**, 96, 62–70.
- Espin, J. C., Wichers, H. J. Study of the resveratrol catalized by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, lacasse and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *J. Food Biochem.* **2000**, 24, 225-250.
- Fan, E., Zhang, K., Yao, C., Yan, C., Bai, Y., Jiang, S. Determination of *trans*-resveratrol in china great wall fazenda red wine by use of micellar electrokinetic chromatography. *Cromatography.* **2005**, 62, 289-294.
- Ferrero, M.E., Bertelli, A.A.E., Fulgenzi, A., Pellegatta, F., Corsi, M.M., Bonfrate, M. Activity *in vitro* of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, 68, 1208-1214.
- Flood, A. Velie, E.M., Chatterjee, N. S., Amy, F., Thompson, F. E., Lacey, J. V., Schairer, C., Troisi, R., Schatzkin, A. Fruit and vegetables intake and the risk of colorectal cancer in the breast cancer detection demonstration project follow-up cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 75, 936-943.
- Floreani, M., Napoli, E., Quintieri, L., Palatini, P. Oral administration of *trans*-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life Sci.* **2003**, 72, 2741-2750.
- Foley, P.R., Kaiser, C.E., Sadler, J.D., Burckhardt, E.E., Liu, Z. Detergent composition with cyclodextrin perfume complexes to mask malodours. *PCT Int Appl WO 01 23,516.* **2000**.
- Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* **1993**, 341, 454-457.
- Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* **2000**, 66, 663-673.

- 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 No. 895,769*, **1953**.
- Frömring, K.H., Szejtli, J. Cyclodextrins in pharmacy. Topics in inclusion science. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. **1994**.
- Fujishima, N., Kusaka, K., Umino, T., Urushinata, T., Terumi, K. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. *Japanese Patent JP 136,898*. **2001**.
- Gao, S., Wang, L. Application of cyclodextrin in environmental science. *Huanjing. Kexue. Jinzhan.* **1998**, 6, 80-86.
- Gerber, M., Boutron-Ruaut, M. C., Hercberg, S., Riboli, E., Scabelbert, A., Siess, M. H. Food and cancer: State of the art about the protective effect of fruit and vegetables. *Bull. Cancer.* **2002**, 293-312.
- Gerster, H.  $\beta$ -Carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. *Eur J Clin Nutr.* **1995**, 49, 155-168.
- Gimeno E., Fito, M., LAmuela-Raventos, L. M., Castellote, A. I., Covas, M., Farre, M., De la Torre-Boronat, M. C., López-Sabater, M. C. Effect of ingestión of virgen olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur. J. Clin. Nutr. Metab. Cardiovasc.* **2002**, 10, 38-44.
- Goldberg, D.M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E., Soleas, G., Ng, E. Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1688-1694.
- Goldberg, D.M., Yan, J., Soleas, G.J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.* **2003**, 36, 79-87.
- Gorham, J. The stilbenoids, in progressin phytochemistry Eds, Pergamon, Oxford. Reinhold, I., Harborne, J.B., Swain, I. **1980**, 6, 203-252.
- Gu, J., Wang, C.Q., Fan, H.H., Ding, H.Y., Xie, X.L., Xul. Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2006**, 47, 711-721.
- Hahn M.G. Microbial Elicitors and Their Receptors in Plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **1996**, 34. 387-412.

- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stöcker, R.H. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*. **1993**, 361, 153–156.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, 280, 1-8.
- Halliwell, B. Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radic. Res.* **1996**, 25, 57-74.
- Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., Samuelsson, B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **1974**, 71, 345-349.
- Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1975**, 72, 2994-2998.
- Hara, H., Hashimoto, H. Antimicrobial and insect-repellent cyclodextrin films. *Jpn. Kokai 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.
- Harata, K., Uedaira, H. The Circular dichroism Spectra of the  $\beta$ -cyclodextrin complex with naphthalene derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, 48 (2), 375-378.
- Hatae, S., & Nakajima, K. Skin whitening cosmetics. *Jpn Kokai JP 86109 705*. **1986**.
- Hedges, R.A. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev*, **1998**, 98, 2035–2044.
- Hendler, S.S., Rorvick, D. Alpha-lipoic acid. Eds, *PDR for Nutritional Supplements*. MedicalEconomics Company. Montvale, N.J. **2001**.
- Heredia, A., Davis, C., Redfield, R. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. *J. Acq. Immune. Def. Synd.* **2000**, 25, 246-255.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollma, P. C., Katan, M. B., Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease, the Zutphen Study. *Lancet*. **1993**, 342, 1007-1011.
- Hertog, M. G. L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blachburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pkkarinen, M, Simic, B. S., Toshima, H., Feskens, E. J., Hollman, C. H., Katan, M. B. Flavonoids

- intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch, Intern. Med.* **1995**, 155, 381-386.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J., Kromhout, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet.* **1997a**, 349, 699.
- Hertog, M. G. L., Sweetnam, P. M., Fehily, A. M., Elwood, P. C., Kromhout, D. Antioxidant flavonoles and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997b**, 65, 1489-1494.
- Higuchi, T. y Connors, K. A.. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* **1965**, 4 117-212.
- Hioki, Z. Constraints on the Mixing Angle between Ordinary and Heavy Leptons in a ( $V - A$ ) Model. *Progress of Theoretical Physics.* **1977**, 58, 706-708.
- Hirayama, F., Uekama, K. Methods of investigating and preparing inclusion compounds. In: Duchêne D, editor. Cyclodextrins and their industrial uses. Paris: Editions de Santé, **1987**. 131-172.
- Hirose, T., Yamamoto, Y. Hinokitol containing cyclo-olefin polymer compositions and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties. *Japanese Patent JP 55480.* **2001**.
- Holland, L., Rizzi, G., Malton, P. Cosmetic compositions comprising cyclic oligosaccharides and fragrance. *PCT Int Appl WO 67,716.* **1999**.
- Holvoet, P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol.* **2004**, 59, 479-484.
- Hoos, G., Blaich, R. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *J. Phytopathol.*, **1990**, 129, 102-110.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Levu, S., Wool, J.G. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* **2003**, 425, 191-196.
- Hrazdina, G., Parsons, G.F., Mattick, L.R. Physiological and biochemical events during development and maturation of grapes berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, 35, 220-227.
- Hung, L.M., Chen, J.K., Huang, S.S., Lee, R.S., Su, M.J. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc. Res.* **2000**, 47, 549-555.
- Hurtubise, E.U. Piaspharimetry. 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.
- 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 <sup>13</sup>C NMR. *J. Incl. Phen.* **1986**, *4*, 281–290.
- Irie, T., Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147–162.
- Irie, T., Uekama, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 101–123.
- Jampol, L.M., Ferris, F.L. Antioxidants and zinc to prevent progression of age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* **2001**, *286*, 2466–2468.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **1997**, *275*, 218–220.
- Jang, M., Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp. Clin Res.* **1999**, *25*, 65–77.
- Jarho, P., Urtti, A., Pate, D.W., Suhonen, P., Järvinen, T. Increase in aqueous solubility. *Int. J. Pharm.* **1996**, *137*, 209–217.
- Juan, M.E., Vinardell, M.P., Planas, J.M. The daily oral administration, of high doses of *trans*-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 257–260.
- Jung, T.H., HA, H.J., Kwak, H.S. Development of cholesterol-reduced mayonnaise with crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin and added phytosterol. *Korean J. Food Sci. animal Res.* **2008**, *28*, 211–217.
- Kaeberlein, M., McVery, M., Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2570–2580.
- Kamal, A., Rabalingum, T., Venugopalan, N. Enantioselective hydrolysis of aryloxypropionic esters by bovine serum albumin: enhancement in selectivity by  $\beta$ -CD. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1991**, *2*, 39.

- Karatsu, M. Antibacterial stretch packaging films for food. *Jpn. Kokai JP 04359029*. **1992**.
- 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**.
- Kim, H.O., Hill, R. D. (1984). Modification of wheat flour dough characteristics with cyclodextrins. *Cereal Chem.* **1984**, 61, 406– 407.
- Knekt, P., Jävinen, R., A., Maatela, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. Med. J.* **1996**, 312, 478-481.
- Kolouchová-Hanzlíková J., Melzoch K., Filip, V., Šmidrkal, J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem.* **2004**, 87, 151-158.
- Konturek, S. J., Kitler, M. E., Brzozowski, T. Radecki, T. Gastric protection by meciadanol. A new synthetic flavonoid inhibiting histidine decarboxylase. *Digest. Dis. Sci.* **1986**, 31, 847-852.
- 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, 63–8.
- Kublik, H., Bock, T.K., Schreier, H., Müller, B.W. Nasal absorption of 17 $\beta$ -estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1996**, 42, 320–324.
- Kuc, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants *Ann. Rev. Phytopathol.* **1995**, 33, 275-297
- Kwak, H.S., Kim, J.H., Choi, H.J., Kang, J. Immobilized  $\beta$ -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk. *Arch. Pharmacol. Res.* **2004**, 27, 873-877.
- Lamuela-Raventós, R.M., Romero-Pérez, A.I., Waterhouse, A.L., De la Torre-Boronat, M.C. Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*- resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 281-283.
- Landolfi, R., Mower, R. L., Steiner, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relation. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 1525-1530.

- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, C. Levels of stilbene oligomers and astilbin in French wines and grapes during noble rot development. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2046-2052.
- Langcake, P., Pryce, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant. Pathol.* **1976**, 9, 77-86.
- 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.
- Le Core, L., Fustier, P., Chalabi, N., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clin Chim Acta.* **2004**, 344, 115-121.
- Lee, S.K., Mbwambo, Z.H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E.J., Mehta, R.G., Kinghorn, A. D., Pezzuto J.M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **1998**, 1, 35-46
- Leikert, J.F., Räthel, T.R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A.M., Dirsch, V.M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* **2002**, 106, 1614-1617.
- Li, H.F., Chen, S.A., Wu, S.N. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc.* **2000**, 45, 1035-1045.
- Liew, R., Stagg, M.A., Macleod, K.T., Collins, P. The red wine polyphenol, resveratrol, exerts acute direct actions on guinea-pig ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 519, 1-8.
- Lin, C.H., Chen, Y.H. On-line identification of trans- and cis-resveratrol by nonaqueous capillary electrophoresis/fluorescence spectroscopy at 77 K. *Electrophoresis.* **2001**, 22, 2574-2579.
- 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. 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., Stefánsson, E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug. Devel. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 473–481.
- Loftsson, T., Leeves, N., Bjornsdottir, B., Duffy, L., Masson, M. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1254–1258.
- 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  $\beta$ -cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chrom.* **2006**, *1135*, 158-165.
- Lu, R., Serrero, G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J. Cell Physiol.* **1999**, *179*, 297-304.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabldón-Hernández, J.A., Núñez-Delicado, E. Encapsulation of quercetina and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *J. Agri. Food Chem.* **2008a**, *56*, 255-259.
- Lucas-Abellán, C., Gabldón-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. Agri. Food Chem.* **2008b**, *56*, 8081-8085.
- Lyons, M.M., Yu, C., Toma, R.B., Cho, S.Y., Reiboldt, W., Lee, J. Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5867-5870.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L. Resveratol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am. J. Gastroenterol.* **2000**, *95*, 1849.
- Martín del Valle, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033-1046.
- Martín, M.A., Ballesteros, M., del Castillo, E. The influence of solvent polarity and viscosity on fluorescence of quinolizinium salts. *Anal. Chim. Acta.* **1985**, *170*, 95-100.
- Martin, A. Physical pharmacy. 4th ed. Philadelphia: Lea & Fedbiger, **1993**.
- Martinez, J. Moreno, J. J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 865-870.

- 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.
- Meng, X., Maliakal, P., Lu, H., Lee, M.J., Yang, C.S. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 935-942.
- Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J., Vane, J.R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **1993**, 90, 11693-11697.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., Yamori, Y. Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2001**, 28, 55-59.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **1976**, 263, 663-665.
- Mukherjee, D., Nissen, S.E., Topol, E.J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA.* **2001**, 286, 954–959.
- 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.
- 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- $\beta$ -cyclodextrin Ground Mixtures. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 28, 1552-1558.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M.M., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. Hydroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 367, 274-280.
- Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M. Polyphenol oxidase from dominga table grape. *J. Agri. Food Chem.* **2005**, 53, 6087-6093.

- 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.
- Orallo, F., Alvarez, E., Carmiña, M., Leiro, J.M., Gómez, E., Fernández, P. The possible implication of *trans*-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 61, 294-302.
- Osbourn, A.E. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens, A commentary. *Fungal Genet. Biol.* **1999**, 26, 163-168
- Ota, T., Takeda, F. (1981). Cyclodextrins as cheese additives. *Jpn. Kokai JP* 8175060. **1981**.
- Pallas, M., Verdaguer, E., Tajés, M., Gutierrez-Cuesta, J., Camins, A. Modulation of sirtuins: new targets for antiageing. *Recent Patents CNS Drug Discov.* **2008**, 3, 61-69.
- Pannala, A.S., Chan, T.S., O'Brien, P., Rice-Evans, C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Com.* **2001**, 282, 1161-1168.
- Park, Y.K., Park, E., Kim, J.S., Kang, M.H. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res.* **2003**, 529, 77-86.
- Pellegatta, F., Bertelli, A.A.E., Staels, B., Duhem, C., Fulgenzi, A., Ferreo, M.E. Different short- and long-term effects of resveratrol on nuclear factor-kB phosphorylation and nuclear appearance in human endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 77, 1220-1228.
- 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.
- Plin, C., Tillement, J.P., Berdeaux, A., Morin, D. Resveratrol protects against cold ischemia—warm reoxygenation-induced damages to mitochondria and cells in rat liver. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 528, 162-168.
- Prasad, N., Strauss, D., Reichart, G. Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals. *European Patent .1,084,625.* **1999**.
- Rajewski, R.A., Stella, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 1142-1168.

- Rao, B.P., Zurréis, S., Balasangameshwer, C.N. Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina de rifampicina. *Ars Pharm*, **2006**, 47, 37-59.
- Rasouri S, Lagouge M, Auwerx J.SIRT1/PGC-1: a neuroprotective axis?. *Med Sci*. **2007**, 23, 840-844.
- Ray, P.S., Maulik, G., Cordis, G.A., Bertelli, A.A., Bertelli, A., Das, D.K. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27, 160-169.
- Regina, B., Helfand, S.L. SIR 2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calories restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2004**, 101, 15998-16003.
- Reineccius, T.A., Risch, S. J. Encapsulation of artificial flavours by  $\beta$ -cyclodextrin. *Perfumer of flavorist*, **1986**, 11, 1-11.
- 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., 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  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins/flavour molecular inclusion complexes. *J. agric. Food Chem.* **2005**, 53, 388-392.
- Renaud, S., De Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. **1992**, 339, 1523-1525.
- Renaud, S., Gueguen, R. The French paradox and wine drinking. Novartis Found. Symp. **1998**, 216, 208-217, discussion 152-158, 217-222.
- Rimm, E. B., Katn, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., Willet, W. C. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* **1996**, 125, 384-389.
- Romero-Pérez, A., Lamuela-Raventós, R.M., Waterhouse, A.L., De la Torre-Boronat, M.C. Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in white and rosé *Vitis vinifera* wines from Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2124-2128.
- Romero-Pérez, A.I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R.M., De La Torre-Boronat, M.C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1533-1536.

- Saenger, W. Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Eds. Inoue, S., Atwood, U.L., Davies, J.E., McNicol, D.D. Academic Press, London, **1984**. Vol.2.
- Saitô, H., Izumi, G., Mamizuka, S., Tabeta, R. A  $^{13}\text{C}$  cross polarization-magic angle spinning (CP-MAS) n.m.r. study of crystalline cyclohexa-amylose inclusion complexes. Conformation-dependent  $^{13}\text{C}$  chemical shifts are related to the dihedral angles of glycosidic linkages. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 1386-1388.
- 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1949**, 51, 660.
- Schmid, G. Cyclodextrin glucanotransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends. Biotechnol.* **1989**, 7, 244-248.
- Schneiderman, E., Stalcup, A.M. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B.* **2000**, 745, 83-102.
- Schubert, R., Fischer, R., Hain, R., Schreier, R., Bahnweg, G., Ernst, D., Sandermann, H. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant. Mol. Biol.* **1997**, 34, 417-426.
- Serafini, M., Laranjinha, J. A., Almeida, L. M., Maiana, G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in human, *J. Nutr. Biochem.* **2000**, 11, 585-590.
- Shaw, P. E., Wilson, C. W. Debitting of citrus juices with cyclodextrin polymer. *J. Food Sci.*, **1983**, 48, 646.
- Shen, F., Chen, S.J., Dong, X.J., Zhong, H., Li, Y.T., Cheng, G.F. Suppression of IL-8 gene transcription by resveratrol in phorbol ester treated human monocytic cells. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2003**, 5, 151-157.
- Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **1991**, 91, 31S-39S.
- 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.

- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* **2002**, 20, 341–359.
- 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.
- Specht, M., Rothe, M., Szente, L., Szejtli, J. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates. *Ger. Offen.* 147 615. **1981**
- Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., HanBler, G., Muhlbach, H.P., Thomzik, J.E. Transfor of grapesvine stilbene synthase gene to rice (*Oryza Sativa* L). *Plant Cell. Rep.* **1997**, 16, 668-673.
- Stein, U. Induktions und nachweismethoden fur stilbene bei Vitaceen. *Hoos G., Vitis.* **1984**, 23. 179-194.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review, *J. Am. Diet. Assoc.* **1996**, 96, 1027-1036.
- Stervbo, U., Vang, O., Bonnesen, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem.* **2007**, 101, 449-457.
- 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., Szente, L., Banky-Elod, E. Molecular encapsulation of volatile, easily oxydizable flavor substances by cyclodextrins. *Acta Chimica Sci. Hung.* **1979**, 101, 27–46.
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743-1753.
- Szente, L., Szejtli, J. Stabilization of flavors by cyclodextrins. Eds., . Flavor Encapsulation Am. Chem. Soc. Symp. S. Risch, S., Reineccius, G. New Orleans: ACS. **1987**, Series 370, pp. 148–158.
- Szente, L., Szejtli, J., Kis, G.L. Spontaneous opalescence of aqueous  $\gamma$ -cyclodextrin solutions: complex formation or self-aggregation. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 778–781.
- Szente, L., Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Food Sci. Technol.* **2004**, 15, 137-142.

- Szewczuk, L.M., Forti, L., Stivala, L.A., Penning, T.M. Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 22727-22737.
- Takaoka, M. J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.) *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University.* **1940**, 3, 1-16.
- Tatsuya, S. Stabilisation of fragrance in bathing preparations. *Japanese Patent* 11,209,787. **1999**.
- Trayler, R. J. Nucleosynthesis and the origin of the elements. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1988**, 325, 391-403.
- Taylor, A.. Cataract: relationship between nutrition and oxidation. *J Am Coll Nutr.* **1993**, 12, 138-146.
- Teel, R.W., Huynh, H. Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-linked enzyme activity. *Cancer Lett.* **1998**, 133, 135-141.
- Teissedre, P. L., Frankel, E. N., Waterhouse, E. L., Peleg, H., German, J. B. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, 70, 55-61.
- Thompson, D.O. Cyclodextrins-enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. *Crit Rev. Ther Drug Carrier Syst.* **1997**, 14, 1-104.
- Tokusoglu, O., Unal, M.K., Yemis, F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 5003-5009.
- Tomás-Barberán, F. A., Espin, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 81, 853-876.
- 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.
- Tredici, G., Miloso, M., Nicolini, G., Gabalbiati, S., Cavaletti, G., Bertelli, A. Resveratrol, MAP kinase and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp. Clin. Res.* **1999**, 25, 99-103.
- Trela, B.C., Waterhouse A. L. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1253-1257.

- Trinh, J., Dodd, T.M., Bartolo, R., Lucas, J.M. Cyclodextrin based compositions for reducing body odour. *US Patent 5,897,855*. **1999**.
- 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., 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. Inclusion complexes of cyclodextrins with organic drug molecules. *Jpn. J. Antibiot.* **1979**, 32, 103-111.
- 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. *International Journal of Pharmaceutics*, **1983**, 13, 253-261.
- Uekama, K., Adachi, H., Irie, T., Yano, T., Saita, M. Improved transdermal delivery of prostaglandin E 1 through hairless mouse skin: combined use of carboxymethyl-ethyl- $\beta$ -cyclodextrin and penetration enhancers. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, 44, 119-121.
- Ujhazy, A., Szejtli, J. Removal of naringin from aqueous solutions with cyclodextrin bead polymer. *Gordian*. **1989**, 89, 43-45.
- Urpí-Sarda, M., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Jaeger, W., Miksits, M., Covas, M.I. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3149-3155.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., Cellarino, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.* **2006**, 16, 296-300.
- van Dorne, H. Interaction between cyclodextrins and ophthalmic drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, 39, 133-139.
- Van Wauwe, J., Gossenc, L. Effects of antioxidants on cyclooxygenase and lipoxygenase activities in intact human platelets: comparison with indomethacin and ETYA. *Prostaglandins*. **1983**, 26, 725-730.

- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* **1971**, 231, 232-235.
- Vastano, B.C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.T., Zhou, Z., Rosen, R.T. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 253-256.
- Vidavalur, R., Otani, H., Singal, P.K., Maulik, N. Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp. Clin. Cardiol.* **2006**, 11, 217-225.
- Villiers A. Sur la fermentation de la fécula par l'action du ferment butyrique. *C R Acad Sci*, **1891**, 112, 536.
- Vitaglione, P., Sforza, S., Galaverna, G., Ghidini, C., Caporaso, N., Vescovi, P.P. Bioavailability of *trans*-resveratrol from red wine in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 495-504.
- Vitrac, X., Desmoulière, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N. Distribution of [<sup>14</sup>C]-*trans*-resveratrol, a cancer chemo-preventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* **2003**, 72, 2219-2233.
- Vrhovsek, U., Wendelin, S., Eder, R. Effects of various vinification techniques on the concentration of *cis*- and *trans*-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. *Am. J. Enol. Viticult.* **1997**, 48, 214-219.
- Waffo-Teguo, P., Fauconneau, B., Deffieux, C., Huguet, F., Vercauteren J, Merillon JM. Isolation, identification and antioxidant active of three stilbene glycosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 655-657.
- Wagner, C. W., Wilson, C. W., Shaw, P. E. Reduction of grape fruit bitter components by cyclodextrin polymers. *J. Food Sci.* 1988, 53, 516.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.E., Walle, U.K.. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, 32, 1377-1382.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R. L. Total antioxidant capacity of fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 701-705.
- Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick,, R., van Breemen, R. B. An LC-MS method for analysing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 431-435.

- Wang, Z., Zou, J., Cao, K., Hsieh, T.C., Huang, Y., Wu, J.M. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, 16, 533-540.
- Waterhouse, A. L. Wine phenolic. *Am. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, 957, 21-36.
- Williams, A., Hennekens, C.H. The role of aspirin in cardiovascular diseases forgotten benefits? *Expert Opin. Pharmacother.* **2004**, 5, 109-115
- Wollin, S.D., Jones, P.J. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J. Nut.* **2001**, 131, 1401-1404.
- Woo, R.A.M., Trinh, T., Cobb, D.S., Schneiderman, E., Wolff, A.M., Rosenbalm, E.L., Ward, T.E., Chung, A.H., Reece, S. Uncomplexed cyclodextrin compositions for odour control. *US Patent 5,942,217.* **1999**.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., Sinclair, D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature.* **2004**, 430, 686-689.
- Yu, E. K.. Novel decaffeination process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, 28, 546.
- Zamora-Ros, R., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Berenguer, T., Jakšzyn, P., Martínez, C. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *Br. J. Nutr.* **2008**, 100, 188-196.
- Zhang, Y., Liu, Y., Wang, T., Li, B., Li, H., Wang, Z. Resveratrol, a natural ingredient of grape skin: antiarrhythmic efficacy and ionic mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 340, 1192-1199.
- Zhao, T., Temsamani, J., Agarwal, S. Use of cyclodextrin and its derivatives as carriers for oligonucleotide delivery. *Antisense. Res.* **1995**, 5, 185-192.
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A.A.E., Tillement, J.P. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1999**, 25, 87-97.
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A.A.E., Tillement, J.P. Resveratrol induced limitation of dysfunction of mitochondria isolated from rat brain in an anoxia-reoxygenation model. *Life Sci.* **2002**, 71, 3091-3108.
- Diario oficial de la Unión Europea 5.6.2008.
- <http://www.cancer.gov/search/ViewClinicalTrials.aspx?cdrid=457861&version=patient&protocolsearchid=5057507>.

<http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00256334>



## **CAPÍTULO VI II. APÉNDICE**



**Art. 1\***

Carmen Lucas-Abellán, Isabel Fortea, José Manuel López-Nicolás, Estrella Núñez-Delicado. "Cyclodextrins as resveratrol carrier system". *Food Chemistry* 104, 39-44,

Fecha de publicación: 2007

Datos Index: Fuente JCR. Índice de impacto 3.052. Posición 4 de 103 en ciencia y tecnología de los alimentos. ISSN 0308-8146.

**Art. 2\***

Carmen Lucas-Abellán, Isabel Fortea, José Antonio Gabaldón, Estrella Núñez-Delicado. "Complexation of resveratrol by native modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays" *Food Chemistry*, 111, 262-267

Fecha de publicación: 2008.

Datos Index: Fuente JCR. Índice de impacto 2.433. Posición 6 de 96 en ciencia y tecnología de los alimentos. ISSN 0308-8146.

**Art. 3\***

Carmen Lucas-Abellán, María Teresa Mercader-Ros, Maria del Pilar Zafrilla, Isabel Fortea, José Antonio Gabaldón, Estrella Núñez-Delicado. "ORAC-Fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins". *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 2254-2259

Fecha de publicación: 2008

Datos Index Fuente JCR. Índice de impacto 2.322. Posición 8 de 96 en ciencia y tecnología de los alimentos. ISSN 0021-8561.

**Art. 4\***

Carmen Lucas-Abellán, María Teresa Mercader-Ros, Maria del Pilar Zafrilla, José Antonio Gabaldón, Estrella Núñez-Delicado. "Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins". (en proceso de revisión)

Fecha de publicación: 2009 en proceso de revisión

---

