



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

Encapsulación de flavonoles en ciclodextrinas.
Efecto en su actividad antioxidante

María Teresa Mercader Ros

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

Murcia, mayo 2010



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado y el Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández como Directores de la Tesis Doctoral titulada **“Encapsulación de flavonoles en ciclodextrinas. Efecto en su actividad antioxidante”** realizada por D^a. María Teresa Mercader Ros en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 56/2005 y 778/98, en Murcia a 31 de Mayo de 2010.

Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

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

A Juan, por ser sencillamente perfecto

A mis padres, por ser los mejores

A mis hermanas, Encarni, Belén y Alicia

Os quiero

AGRADECIMIENTOS

Elaborar la lista de agradecimientos ha sido una de las tareas más placenteras de la realización de esta Tesis Doctoral. Al hacerla me he dado cuenta del gran número de personas que han contribuido a que esta tesis llegase a ser una realidad.

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, ya que para mí es un honor haber realizado este trabajo bajo su dirección y les estaré siempre muy agradecida porque han dedicado su valioso tiempo a ello.

A Estrella, gracias a ella todos mis objetivos profesionales se han cumplido. Gracias por su humanidad, sinceridad, profesionalidad, confianza, fortaleza, amistad y muchas más cualidades que le hacen ser ESTRELLA.

A José Antonio, gracias por haber confiado en mí desde el primer momento y haber sido persistente en conseguirme un futuro.

A Carmen, por su dedicación absoluta, gracias por enseñarme tanto, por contestarme a todas esas preguntas, una y otra vez, porque por ella sé mucho más de lo que se pueda imaginar, pero sobre todo, gracias por su gran amistad en estos 4 años con sus malos y bellísimos momentos.

A Pilar, por su amistad y porque es imposible no quererla. A Ana, mi compañera de 10 años, por seguir ahí y ayudarme cuando lo he necesitado. A Patricia, por su alegría, ya que cada día es capaz de sacarme una sonrisa. Muchas gracias por las flores.

A Santiago, gracias por ser como eres y sorprenderme cada día. A Antonio José, por su amistad y ayuda. A mi compañero, Antonio Soler, por sus consejos. A Ginés y Mariano, por ser tan buenos compañeros.

A Isabel, por su cariño. A Eva Salazar, por ser la mejor persona que he conocido en mi vida. A mis compañeros del palomar Paco y Fernando, por su amistad. A Paco, gracias por nuestras largas conversaciones.

A Gabi y Alfonso, por su ayuda en el laboratorio y sus clases de fontanería en el HPLC.

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

A Juan, por lo feliz que me siento a su lado y quererme tanto.

A mis padres y hermanas, por la vida que me han dado, gracias a ellos he conseguido todo lo que soy. Mamá y Papá os quiero, gracias por todo. A mis sobrinos Antonio, Alicia, Irene, Rocío y Julio, por alegrarme la vida.

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

*“Si consigo ver más lejos
es porque he conseguido auparme
a hombros de gigantes”*

Isaac Newton

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

- M^a Teresa Mercader-Ros, Carmen Lucas-Abellán, M^a Isabel Fortea, José Antonio Gabaldón, Estrella Núñez-Delicado. "Effect of HP- β -Cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols". *Food Chemistry*. **2010**, 118, 769-773.
- M^a Teresa Mercader-Ros, Carmen Lucas-Abellán, José Antonio Gabaldón, M^a Isabel Fortea, Adela Martínez-Cachá, Estrella Núñez-Delicado. "Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 4675-4680.
- 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*. **2008**, 56, 2254-2259.
- 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.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	23
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	29
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	39
1. Compuestos Fenólicos.....	41
1.1. FLAVONOIDES.....	46
1.1.1. Estructura química y ruta común fenilpropanoide de biosíntesis de flavonoides	47
1.1.2. Clasificación y principales fuentes naturales.....	51
1.1.2.1. Flavanonas.....	51
1.1.2.2. Flavonas.....	52
1.1.2.3. Isoflavonas	53
1.1.2.4. Flavonoles	54
1.1.2.5. Flavanoles	55
1.1.2.6. Antocianos.....	57
1.1.3. Propiedades biológicas de los flavonoides.....	58
1.1.3.1. Propiedades antioxidantes	61
1.1.3.2. Propiedades prooxidantes	63
1.1.4. Farmacocinética y biodisponibilidad	64
1.1.5. Aplicaciones de los flavonoides.....	65
2. Ciclodextrinas (CDs)	68
2.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN	68
2.2. PROPIEDADES	70

2.3. CONSIDERACIONES TOXICOLÓGICAS	72
2.3.1. α -CDs	73
2.3.2. β -CDs	73
2.3.3. γ -CDs.....	73
2.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN	74
2.4.1. Equilibrio de los complejos de inclusión	78
2.5. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE COMPLEJOS.....	79
2.5.1. Solución Dinámica	79
2.5.1.1. <i>Efecto de la temperatura</i>	79
2.5.1.2. <i>Empleo de disolventes</i>	79
2.5.1.3. <i>Efecto del agua</i>	80
2.5.1.4. <i>Analitos volátiles</i>	80
2.5.2. Co-precipitación	80
2.5.3. Complejación por método "slurry"	81
2.5.4. Complejación por pasta.....	81
2.5.5. Mezcla húmeda y calefacción.....	82
2.5.6. Método de extrusión.....	82
2.5.7. Mezcla en seco	82
2.6. MÉTODO DE SECADO DE LOS COMPLEJOS FORMADOS	83
2.6.1. Analitos altamente volátiles	83
2.6.2. Secado por atomización	83
2.6.3. Secado a baja temperatura	83
2.7. LIBERACIÓN	84
2.8. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CDS.....	84
2.8.1. Métodos de detección de complejos sólidos.....	84
2.8.1.1. <i>Difracción de rayos-X</i>	84
2.8.1.2. <i>Espectroscopía de resonancia magnética nuclear</i>	85
2.8.1.3. <i>Espectroscopía de absorción infrarroja</i>	85
2.8.1.4. <i>Espectroscopía Raman</i>	85

2.8.1.5. Métodos térmicos.....	86
2.8.2. Métodos de detección de complejos en solución.....	86
2.8.2.1. Métodos de variación de la solubilidad	87
2.8.2.2. Métodos cinéticos	89
2.8.2.3. Métodos instrumentales	90
2.8.2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-VIS	90
2.8.2.3.2. Espectroscopía de luminiscencia	91
2.8.2.3.3. Dicroísmo circular.....	91
2.8.2.3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	92
2.8.2.3.5. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico	92
2.8.2.3.6. Métodos voltamétricos	93
2.8.2.3.7. Conductimetría.....	93
2.8.2.3.8. Cromatografía.....	93
2.9. APLICACIONES DE LA CDS.....	94
2.9.1. Cosmética y aseo personal.....	94
2.9.2. Industria alimentaria.....	95
2.9.2.1. CDS como agentes atrapadores de sabores	96
2.9.2.2. CDS como agentes protectores frente a la oxidación por oxígeno	96
2.9.2.3. CDS como agentes protectores frente a la luz	97
2.9.2.4. CDS como agentes protectores frente a la temperatura.....	97
2.9.2.5. CDS para mejorar la vida útil de los alimentos.....	97
2.9.2.6. Aplicaciones de las CDS vacías.....	98
2.9.2.7. Aplicaciones especiales de las CDS en alimentos	100
2.9.3. Industria farmacéutica	100
2.9.4. Agricultura e industria química.....	102
2.10. REGULACIÓN DE LAS CDS.....	103
3. Flavonoides y ciclodextrinas.....	103
4. Capacidad antioxidante	105
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	109

1. Objetivos.....	111
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	113
1. Materiales y métodos.....	115
1.1. CÁLCULO DE K_C	115
1.1.1. Reactivos	115
1.1.2. Método enzimático	115
1.1.3. Método de solubilidad	121
1.1.4. Método fluorimétrico.....	124
1.2. MEDIDA DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	125
1.2.1. Reactivos	125
1.2.2. Método ORAC-FL.....	126
CAPÍTULO IV. MIRICETINA	129
1. Miricetina.....	131
1.1. INTRODUCCIÓN	131
1.1.1. Miricetina y salud	131
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	134
1.2.1. Cálculo de K_C	134
1.2.1.1. <i>Método enzimático</i>	134
1.2.1.2. <i>Método de solubilidad</i>	138
1.2.1.3. <i>Método fluorimétrico</i>	141
CAPÍTULO V. QUERCETINA	149
1. Quercetina	151
1.1. INTRODUCCIÓN	151
1.1.1. Quercetina y salud	152
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	155
1.2.1. Cálculo de K_C	155

1.2.1.1. Método enzimático.....	155
1.2.1.2. Método de solubilidad.....	161
1.2.1.3. Método fluorimétrico.....	164
CAPÍTULO VI. KAEMPFEROL.....	173
1. Kaempferol.....	175
1.1. INTRODUCCIÓN.....	175
1.1.1. Kaempferol y salud.....	175
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	177
1.2.1. Cálculo de K_C	177
1.2.1.1. Método fluorimétrico.....	177
1.2.1.2. Método enzimático.....	181
1.2.1.3. Método de solubilidad.....	185
CAPÍTULO VII. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	191
1. Efecto de la complejación de miricetina, quercetina y kaempferol en HP-β-CDs, sobre su actividad antioxidante.....	193
1.1. INTRODUCCIÓN.....	193
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	195
1.2.1. Medida de actividad antioxidante.....	195
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES.....	205
1. Conclusiones.....	207
CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA.....	209
1. Bibliografía.....	211

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4CL: 4-cumaroil-CoA-ligasa.
AAPH: 2, 2-azobis-[2-metilpropionamida]dihidroclorido.
ABTS: Ácido 2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.
ACC: Acetil-CoA-carboxilasa.
ADN: Ácido desoxiribonucleico.
AGr: Energía libre total del sistema.
ANR: Antocianidina reductasa.
ANS: Antocianidina sintetasa.
C4H: Cinamato-4-hidroxilasa.
CDs: Ciclodextrinas.
CE: Eficacia de complejación.
CGTasa: Ciclodextrina glucanotransferasa.
CHI: Chalcona-isomerasa.
CHS: Chalcona-sintetasa.
COX: Ciclooxygenasa.
DC: Dicroísmo circular.
DFR: Dihidroflavonol reductasa.
DIME- β -CDs: 2, 6 dimetil- β -ciclodextrinas.
DMSO: Dimetil sulfóxido.
DPPH: 2, 2-difenil-picril-hidracil.
DSC: Calorimetría diferencial de barrido.
DTA: Análisis térmico diferencial.
E.E.U.U.: Estados Unidos.
EGCG: Epigallocatequina galato.
EPA: Agencia de protección ambiental.
F: Intensidad de fluorescencia.
F3'H/F3'5'H: Flavonoide 3'-hidroxilasa/ Flavonoide 3'5'-hidroxilasa.
F3H: Flavanona 3- β -hidroxilasa.
FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas.

FDA: American Food and Drug Administration.
FL: Fluoresceína.
FLS: Flavonol sintetasa.
FRAP: Reducción del hierro - poder antioxidante.
FSI/FSII: Flavonol sintetasa I/ Flavonol sintetasa II.
G₂- β -CDs: Maltosil- β -CDs
GC: Cromatografía de gases.
GRAS: En general reconocido como seguros.
GT: Flavonoide gluosil transferasa.
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.
HP- β -CDs: Hidroxipropil- β -ciclodextrinas.
HPE-- β -CDs: Hidroxietil- β -CDs.
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.
HPR: Peroxidasa de rábano.
IFS: Isoflavona sintetasa.
iNOS: Oxido nítrico sintetasa inducible.
IR: Espectroscopia de absorción infrarroja.
JECFA: Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios.
Kc: Constante de complejación.
LAR: Leucoantocianidina reductasa.
LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
LOX: Lipoxigenasa.
L-Phe: L-fenilalanina.
LPS: Lipopolisacáridos.
Net AUC: Área neta.
NO: Oxido nítrico.
NOS: Oxido nítrico sintetasa.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OMTs: Flavonoide O-metiltransferasa.
ORAC: Capacidad de absorción del radical de oxígeno.
ORAC-FL: ORAC-fluoresceína.
OTGL: Termogravimetría diferencial.
OVX: Ovariectomizadas.
P: Producto.

PAL: Fenilalanina amino liasa.

PASSCLAIM: "Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods".

pH: Potencial de hidrógeno.

pKa: Logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

ROS: Especie reactiva de oxígeno.

S: Sustrato.

S₀: Solubilidad del sustrato.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

STS: Estilbeno-sintetasa.

T: Temperatura.

TE: Equivalentes de Trolox

TG: Termogravimetría.

TIME-β-CDs: 2, 3, 6 trimetil-β-ciclodextrinas.

TRAP: Potencial antioxidante total.

USDA: United State Departament of Agricultural.

UV: Ultravioleta.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia en humanos.

VIS: Visible.

VMA: *Vaccinium myrtillus*.

ε: Coeficiente de extinción molar.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Tabla I.1.: <i>Clasificación de los polifenoles</i>	42
Tabla I.2.a.: <i>Clasificación de polifenoles no flavonoides</i>	44
Tabla I.2.b.: <i>Clasificación de polifenoles flavonoides</i>	45
Tabla I.3.: <i>Propiedades beneficiosas de los flavonoides</i>	60
Tabla I.4.: <i>Propiedades de las CDs</i>	70
Figura I.1.: <i>Núcleo flavonoide</i>	47
Figura I.2.: <i>Ruta común fenilpropanoide, de fenilalanina a p-cumaril-CoA</i>	49
Figura I.3.: <i>Ruta biosintética de flavonoides.</i>	50
Figura I.4.: <i>Hesperetina</i>	52
Figura I.5.: <i>Luteolina</i>	53
Figura I.6.: <i>Genisteína</i>	53
Figura I.7.: <i>Quercetina</i>	54
Figura I.8.: <i>Epicatequina</i>	56
Figura I.9.: <i>Epigallocatequina</i>	56
Figura I.10.: <i>Procianidina B1 (epicatequina-(4β→8)-catequina)</i>	57
Figura I.11.: <i>Cianidina</i>	57
Figura I.12.: <i>Estructura de quercetina, resaltando los grupos implicados en su actividad antioxidante</i>	62
Figura I.13.: <i>Grupo galato presente en la molécula epigallocatequina galato</i>	63
Figura I.14.: <i>Estructura de α-, β- y γ-CDs</i>	68
Figura I.15.: <i>Estructura ciclodextrina</i>	69

Figura I.16.: Tipos de CDs modificadas.....	71
Figura I.17.: Hilos supramoleculares.....	72
Figura I.18.: Formación del complejo huésped-CDs	76
Figura I.19.: Diámetro externo e interno de las diferentes CDs.	77
Figura I.20.: Tipos de diagramas de fases con CDs.....	87
Figura I.21.: Complejo de inclusión colesterol-CDs	96
Figura I.22.: Complejo de inclusión catequina-CDs.....	104
Figura I.23.: Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres	106

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura III.1.: Oxidación de miricetina por HPR en presencia de H ₂ O ₂	116
Figura III.2.: Oxidación de quercetina por HPR en presencia de H ₂ O ₂	116
Figura III.3.: Oxidación de kaempferol por HPR en presencia de H ₂ O ₂	117
Figura III.4.: Efecto de la variación de pH en la oxidación de miricetina por HPR	117
Figura III.5.: Efecto de la variación de pH en la oxidación de quercetina por HPR.....	118
Figura III.6.: Efecto de la variación de pH en la oxidación de kaempferol por HPR.....	118
Figura III.7.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de miricetina	122
Figura III.8.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de quercetina	122
Figura III.9.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de kaempferol.....	123
Figura III.10.: Regresión lineal de Net AUC con diferentes concentraciones de Trolox C	127
Figura III.11.: Curva de caída de la FL inducida por AAPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox C.....	128

CAPÍTULO IV. MIRICETINA

Tabla IV.1.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs, obtenidos por el método enzimático	136
Tabla IV.2.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs, calculados mediante el método de solubilidad	140
Tabla IV.3.: Eficacia de complejación (CE) entre miricetina y distintos tipos de CDs.....	140
Tabla IV.4.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs, obtenidos por el método fluorimétrico.....	143
Tabla IV.5.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs, calculados mediante los métodos fluorimétrico, enzimático y solubilidad.	146
Figura IV.1.: Estructura química de miricetina.....	131
Figura IV.2.: Efecto de la adicción al medio de diferentes tipos de CDs sobre la oxidación de miricetina por HPR.....	134
Figura IV.3.: Efecto de diferentes concentraciones de β -CDs en la oxidación de miricetina por HPR.....	135
Figura IV.4.: Efecto de diferentes concentraciones de HP- β -CDs en la oxidación de miricetina por HPR	136
Figura IV.5.: Efecto de diferentes concentraciones de G ₂ - β -CDs en la oxidación de miricetina por HPR	137
Figura IV.6.: Efecto de la concentración de miricetina libre en la actividad HPR.....	138
Figura IV.7.: (A) Diagrama de fases de miricetina con (■) β -CDs. (B) Diagrama de fases de miricetina con (○) HP- β -CDs y (●) G ₂ - β -CDs	139
Figura IV.8.: Espectro de fluorescencia de miricetina con concentraciones crecientes de HP- β -CDs	142
Figura IV.9.: Intensidad de fluorescencia de miricetina a 524 nm y diferentes concentraciones de CDs: (■) β -CDs, (●) HP- β -CDs y (▲) G ₂ - β -CDs.....	142

Figura IV.10.: Representación de Benesi-Hildebrand para miricetina con (●) HP- β -CDs y (▲) G ₂ - β -CDs	144
Figura IV.11.: Representación de Scatchard para miricetina con (●) HP- β -CDs y (▲) G ₂ - β -CDs.....	145
Figura IV.12.: Ensayo de CDs.....	147

CAPÍTULO V. QUERCETINA

Tabla V.1.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs, obtenido por el método enzimático	158
Tabla V.2.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs, obtenidos por el método de solubilidad.....	163
Tabla V.3.: Eficacia de complejación (CE) entre quercetina y distintos tipos de CDs	163
Tabla V.4.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs, obtenidos por el método fluorimétrico	166
Tabla V.5.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs, calculados mediante los métodos fluorimétrico, enzimático y solubilidad	169
Figura V.1.: Estructura química de quercetina	151
Figura V.2.: Efecto de la adición al medio de diferentes tipos de CDs sobre la oxidación de quercetina por HPR	156
Figura V.3.: Efecto de diferentes concentraciones de CDs en la oxidación de quercetina por HPR. (A) Oxidación de quercetina en presencia de β -CDs. (B) Oxidación de quercetina en presencia de γ -CDs	157
Figura V.4.: Efecto de diferentes concentraciones de CDs modificadas en la oxidación de quercetina por HPR. (A) Oxidación de quercetina en presencia de HP- β -CDs. (B) Oxidación de quercetina en presencia de G ₂ - β -CDs	159
Figura V.5.: Efecto de la concentración de quercetina libre sobre la velocidad de la reacción	160
Figura V.6.: Diagrama de fases de quercetina con β -CDs	162

Figura V.7.: Diagrama de fases de quercetina con (○) HP-β-CDs y (●) G₂-β-CDs 162

Figura V.8.: Espectro de fluorescencia de quercetina con concentraciones crecientes de β-CDs..... 164

Figura V.9.: Intensidad de fluorescencia de quercetina a 520 nm y diferentes concentraciones de CDs 165

Figura V.10.: Representación de Benesi-Hildebrand para quercetina con (■) β-CD, (●) HP-β-CDs y (▲) G₂-β-CDs..... 167

Figura V.11.: Representación de Scatchard para quercetina con (■) β-CD, (●) HP-β-CDs y (▲) G₂-β-CDs..... 168

Figura V.12.: Ensayo de CDs 170

CAPÍTULO VI. KAEMPFEROL

Tabla VI.1.: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs, obtenidos por el método fluorimétrico..... 179

Tabla VI.2.: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs, obtenido por el método enzimático 185

Tabla VI.3.: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs, obtenido por el método de solubilidad..... 186

Tabla VI.4.: Eficacia de complejación (CE) entre kaempferol y distintos tipos de CDs ... 187

Tabla VI.5.: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs, calculados mediante los métodos fluorimétrico, enzimático y solubilidad..... 189

Figura VI.1.: Estructura química de kaempferol 175

Figura VI.2.: Espectro de fluorescencia de kaempferol con concentraciones crecientes de β-CDs..... 177

Figura VI.3.: Intensidad de fluorescencia de kaempferol a 539 nm y diferentes concentraciones de CDs 178

Figura VI.4.: Representación de Benesi-Hildebrand para kaempferol con (■)β-, (●) HP-β- y (▲) G₂-β-CDs..... 180

Figura VI.5.: Representación de Scatchard para kaempferol con (■) β -CDs, (●) HP- β -CDs y (▲) G ₂ - β -CDs.....	181
Figura VI.6.: Efecto de la adición al medio de diferentes tipos de CDs sobre la oxidación de kaempferol por HPR.....	182
Figura VI.7.: Efecto de diferentes concentraciones de β -CDs en la oxidación de kaempferol por HPR.....	183
Figura VI.8.: Efecto de diferentes concentraciones de HP- β -CDs en la oxidación de kaempferol por HPR.....	183
Figura VI.9.: Efecto de diferentes concentraciones de G ₂ - β -CDs en la oxidación de kaempferol por HPR.....	184
Figura VI.10.: Diagrama de fases de kaempferol con β -CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0 a 25°C.....	185
Figura VI.11.: Diagrama de fases de kaempferol con (●) HP- β -CDs y (▲) G ₂ - β -CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0 a 25°C.....	186
Figura VI.12.: Ensayo de CDs.....	188

CAPÍTULO VII. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Tabla VII.1.: Contenido en flavonoles de diferentes alimentos (mg/100 g de porción comestible).....	194
Figura VII.1.: Estructuras de los flavonoles: miricetina, quercetina y kaempferol.....	193
Figura VII.2.: Estructura general de los tres flavonoles.....	195
Figura VII.3.: Área bajo la curva de caída de la FL inducida por el radical AAPH de miricetina (A), quercetina (B) y kaempferol (C) a diferentes concentraciones:.....	196
Figura VII.4.: Regresión lineal de miricetina (■), quercetina (○) y kaempferol (●) a diferentes concentraciones.....	197
Figura VII.5.: Área bajo la curva de caída de la fluoresceína inducida por el radical AAPH de miricetina.....	198

Figura VII.6.: Área bajo la curva de caída de la fluoresceína inducida por el radical AAPH de quercetina.....	198
Figura VII.7.: Área bajo la curva de caída de la fluoresceína inducida por el radical AAPH de kaempferol	199
Figura VII.8.: Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la capacidad antioxidante de miricetina, expresado en equivalentes de Trolox (μ M)	200
Figura VII.9.: Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la capacidad antioxidante de quercetina, expresado en equivalentes de Trolox (μ M)	200
Figura VII.10.: Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la capacidad antioxidante de kaempferol, expresado en equivalentes de Trolox (μ M).....	201
Figura VII.11.: Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la actividad antioxidante de miricetina, quercetina y kaempferol	202

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. COMPUESTOS FENÓLICOS

El descubrimiento de las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos, su gran abundancia en nuestra dieta, y su papel en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Scalbert y Williamson, 2000), ha despertado un gran interés, desde el punto de vista científico y empresarial, sobre estos compuestos.

Antiguamente, los polifenoles se consideraban antinutrientes porque tenían la peculiaridad de precipitar macromoléculas como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivas, reduciendo la digestibilidad de algunos alimentos. Sin embargo, en la década de los 90 aumentó el interés por los polifenoles debido a sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. Se propusieron efectos favorables en enfermedades cardiovasculares (Renaud y de Lorgeril, 1992) o neurodegenerativas (Sun y col., 2002), en la prevención y tratamiento de distintos tipos de cáncer (Lambert y col., 2005) y, en general, en todas aquellas enfermedades donde el estrés oxidativo tuviera un papel importante. Estos efectos beneficiosos se explicaban fundamentalmente por las propiedades antioxidantes (Frankel y col., 1995), antiinflamatorias (Haqqi y col., 1999) y anticancerígenas (Yang y col., 2001) que presentaban los polifenoles.

Los polifenoles constituyen una de las clases principales de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diferentes funciones fisiológicas: intervienen en el crecimiento y reproducción y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o radiación ultravioleta.

Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Martínez-Valverde y col., 2000; Duthie y Crozier, 2000).

Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en vegetales (se conocen más de 8000), la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido shikímico y el metabolismo de los fenilpropanoides (Robards y col., 1999). Esta ruta biosintética conduce a la producción de ácidos benzoico y cinámico, así como a aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina).

Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono que forman su esqueleto básico molecular (Tabla I.1.).

Tabla I.1.: Clasificación de los polifenoles.

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

Los niveles de éstos compuestos pueden variar considerablemente dentro de la misma especie vegetal, e incluso entre sus variedades, debido a factores genéticos y ambientales que condicionan la germinación, el crecimiento y calidad de los cultivos (Bravo, 1998; Scalbert y Williamson, 2000).

En los alimentos, los compuestos fenólicos se suelen presentar conjugados con azúcares como glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o los ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos (Duthie y col., 2003).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas (efecto resonante) en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie y col., 2003). Los compuestos fenólicos poseen, además, una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones Fenton. El tipo de compuesto, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante.

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 Espín, 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.

Según su estructura, los polifenoles se pueden clasificar en dos grandes grupos: flavonoides (flavononas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavan-3-oles, proantocianidinas y antocianos) y no flavonoides (ácidos hidroxicinámicos, taninos hidrolizables, ácidos hidroxibenzoicos y estilbenos) (Waterhouse, 2002) (**Tabla I.2.a. y b.**).

Tabla I.2.a.: Clasificación de polifenoles no flavonoides.

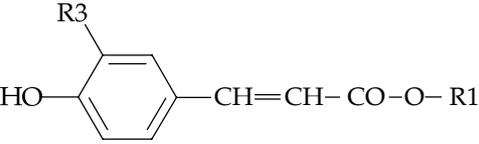
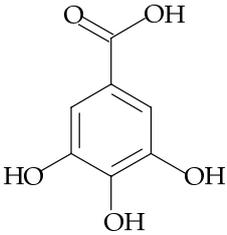
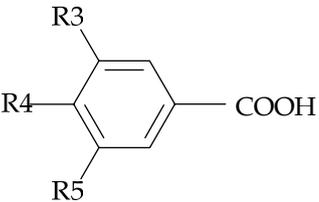
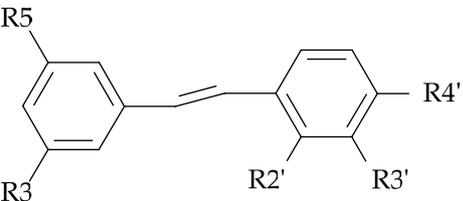
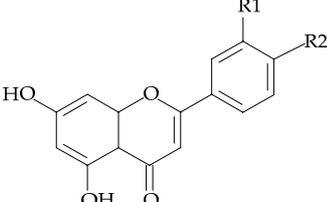
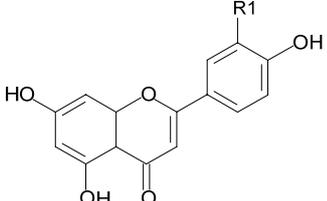
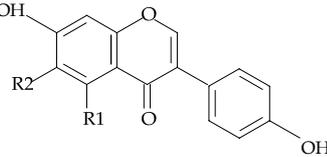
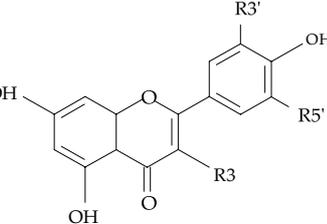
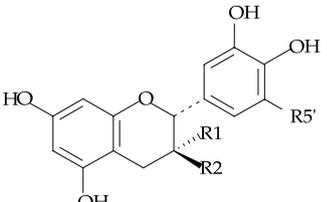
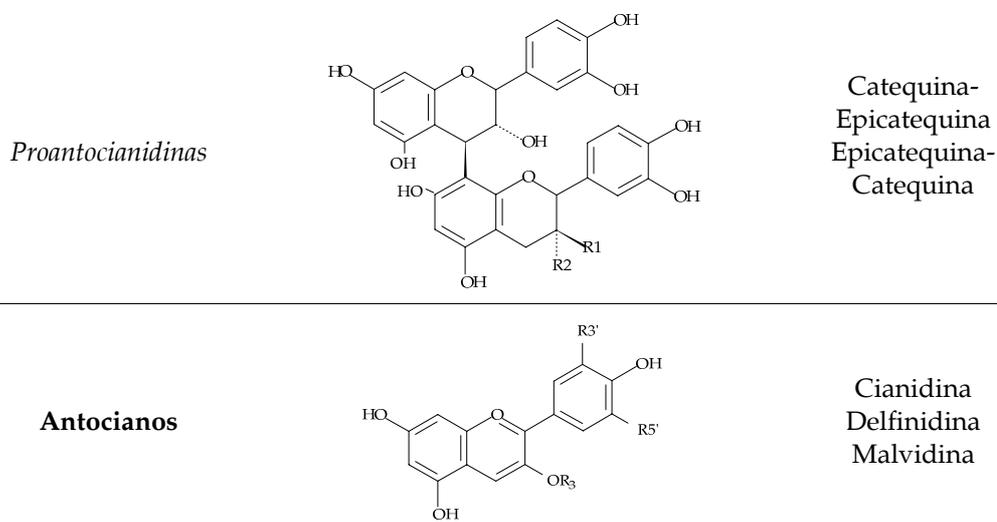
Tipos	Estructura química	Subtipos
<p>Ácidos Hidroxicinámicos</p>		<p>Ácido Cafeoil Tartárico Ácido Feruloil Tartárico</p>
<p>Taninos Hidrolizables</p>		<p>Galotanino Elagitaninos Epigalotanino</p>
<p>Ácidos Hidroxi benzoicos</p>		<p>Ácido Gálico Ácido Vanílico Ácido siríngico</p>
<p>Estilbenos</p>		<p>Resveratrol Piceido Piceatanol δ-viniferina α-viniferina ϵ-viniferina</p>

Tabla I.2.b.: Clasificación de polifenoles flavonoides.

Tipos	Estructura química	Subtipos
Flavanonas		Naringenina Hesperetina Pinocembrina
Flavonas		Apigenina Luteolina
Isoflavonas		Daidzeína Genisteína
Flavonoles		Kaempferol Quercetina Miricetina
Flavanoles		Catequina Epicatequina Galocatequina



1.1. FLAVONOIDES

Los flavonoides son la subclase de polifenoles más abundante del reino vegetal. Se distribuyen en las plantas de manera ubicua y la variedad de propiedades biológicas que presentan ha llamado poderosamente la atención de los investigadores, siendo éste el grupo de polifenoles más estudiado.

Forman parte del metabolismo secundario de plantas, siendo responsables de su crecimiento y exhibiendo determinadas interacciones con otros organismos vivos. Son responsables de la pigmentación de los pétalos en las flores de tonos amarillos, rojos y naranjas, atrayendo así a los agentes polinizadores. También tienen la capacidad de proteger a las plantas del daño provocado por los rayos UV y del ataque de insectos y patógenos (Yajum, 2005). Pueden actuar como antibióticos y antioxidantes, siendo estas dos propiedades las más estudiadas en plantas y en humanos (Pietta, 2000).

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló una sustancia de la cáscara del limón denominada citrina, con acción modificadora de la permeabilidad capilar. Los flavonoides, en primer lugar, atrajeron el interés de los farmacólogos cuando se describieron sus propiedades similares a las vitaminas. Por éste motivo, se designaron como vitamina P (que hace referencia a la permeabilidad) y también vitamina C2 (porque algunos tenían

propiedades análogas a la vitamina C). Sin embargo, como no fue posible confirmar que fueran vitaminas, ambas designaciones se dejaron de usar alrededor de 1950 (Martínez-Flórez y col., 2002).

Posteriormente, se han descrito para los flavonoides propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras (Formica y Regelson, 1995; Rice-Evans y Packer, 1998; Middleton y col., 2000). A partir de estas evidencias, los flavonoides han ido ganando interés como potenciales agentes terapéuticos frente a una amplia variedad de enfermedades. Por otra parte, los efectos curativos de muchos remedios propuestos por la medicina natural pueden ser atribuidos al empleo de estas moléculas.

1.1.1. Estructura química y ruta común fenilpropanoide de biosíntesis de flavonoides.

Su estructura básica (flaván) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) (Manach y col., 2004). Los átomos de carbono presentes en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde el 2' al 6' (Harborne y Baxter, 1999; Pérez Trueba, 2003). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (**Figura I.1.**).

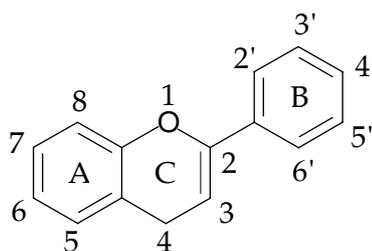


Figura I.1.: Núcleo flavonoide.

Las diferencias entre los diversos grupos de flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilación (orden y número), el tipo de sustituciones (glicosilación, metilación, sulfatación, etc.) y el

grado de polimerización de sus estructuras (Cadenas, 2008). El patrón de conjugación, glicosilación o metilación puede ser muy complejo y modificar la hidrofiliidad de la molécula y sus propiedades biológicas, pudiendo también aumentar el peso molecular del flavonoide. Las moléculas de flavonoide no unidas a un glúcido se conocen como agliconas, mientras que las formas glicosiladas se denominan glicósidos de flavonoides y son las más frecuentes en vegetales (Manach y col., 2004), ya que la glicosilación incrementa la polaridad de la molécula y la hace más soluble en agua, lo que es necesario para el almacenaje en las vacuolas celulares de las plantas (Urquiaga y Leighton, 2000; Martínez-Flórez y col., 2002).

La mayoría de agliconas flavonoides tienen nombres triviales con la terminación "INA" u "OL". Quercetina es un flavonol y corresponde al 5, 7, 3', 4'-tetrahidroxiflavonol y naringenina es una flavanona y corresponde a la 5, 7, 4'-trihidroxiflavanona. En el caso de los glicósidos flavonoides, es muy común nombrarlos con relación al nombre trivial de la aglicona, como por ejemplo: apigenina corresponde a la 5, 7, 4'-trihidroxiflavona.

La ruta biosintética de los flavonoides es una de las vías metabólicas más estudiadas del reino vegetal. Los caminos que llevan a su síntesis han sido caracterizados en detalle en numerosas especies vegetales (Dixon y Steele, 1999; Harborne y Williams, 2000; Winkel-Shirley, 2001; Springob y col., 2003). Existen evidencias de que esta ruta deriva del metabolismo primario y que en ella intervienen una gran variedad de enzimas.

Biosintéticamente, los flavonoides pueden considerarse como tetracétidos de síntesis mixta, ya que utilizan el *p*-cumaril-CoA como molécula iniciadora, a la cual se unen tres moléculas de malonil-CoA, en una relación molar 1:3 (**Figura I.2.**). El *p*-cumaril-CoA proviene de la ruta del siquimato-fenilpropanoide, y el malonil-CoA implica a la ruta del acetato-malonato. La vía del siquimato se utiliza para sintetizar compuestos aromáticos a partir de glúcidos, y proporciona los elementos básicos para la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), así como de muchos otros compuestos aromáticos de gran importancia para los organismos productores. Esta vía solamente se lleva a cabo en plantas y microorganismos y es inducible por estrés. En las plantas superiores se origina en los cloroplastos a partir de fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato. La entrada en la ruta de los fenilpropanoides se produce por la acción de la fenilalanina amino liasa (PAL). Esta enzima, mediante un proceso de desaminación oxidativa, actúa sobre la L-

fenilalanina (L-Phe) dando lugar al ácido cinámico. Posteriormente, mediante la acción de la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), el ácido cinámico es convertido al ácido *p*-cumárico, el cual es activado en forma de *p*-cumaril-CoA gracias a la 4-cumaril-CoA-ligasa (4CL) (Julsing y col., 2006). A su vez, la ruta del acetato-malonato se inicia con la formación de malonil-CoA, a partir de acetil-CoA, mediante la acetil-CoA-carboxilasa (ACC).

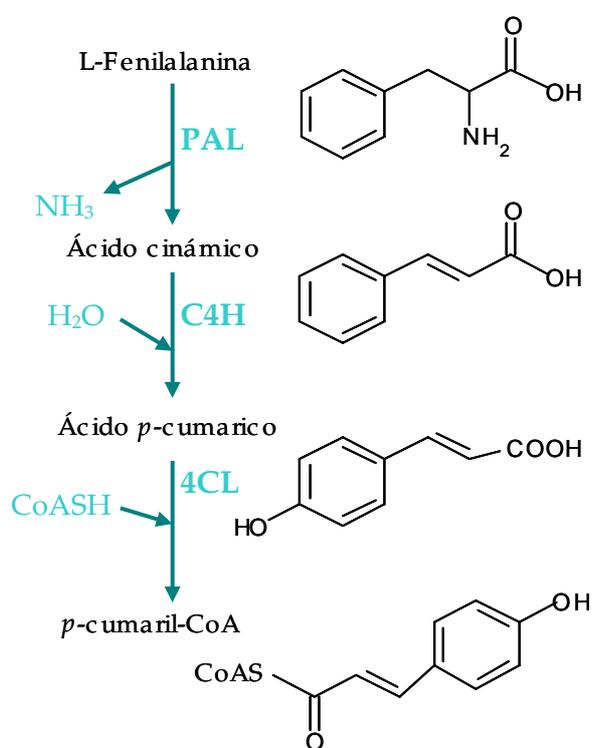


Figura I.2.: Ruta común fenilpropanoide, de fenilalanina a *p*-cumaril-CoA.

Sobre el *p*-cumaril-CoA, pueden actuar dos enzimas clave: chalcona-sintasa (CHS) o bien estilbeno-sintasa (STS) y se produce la ciclación de la tetracetona lineal (Figura I.3.).

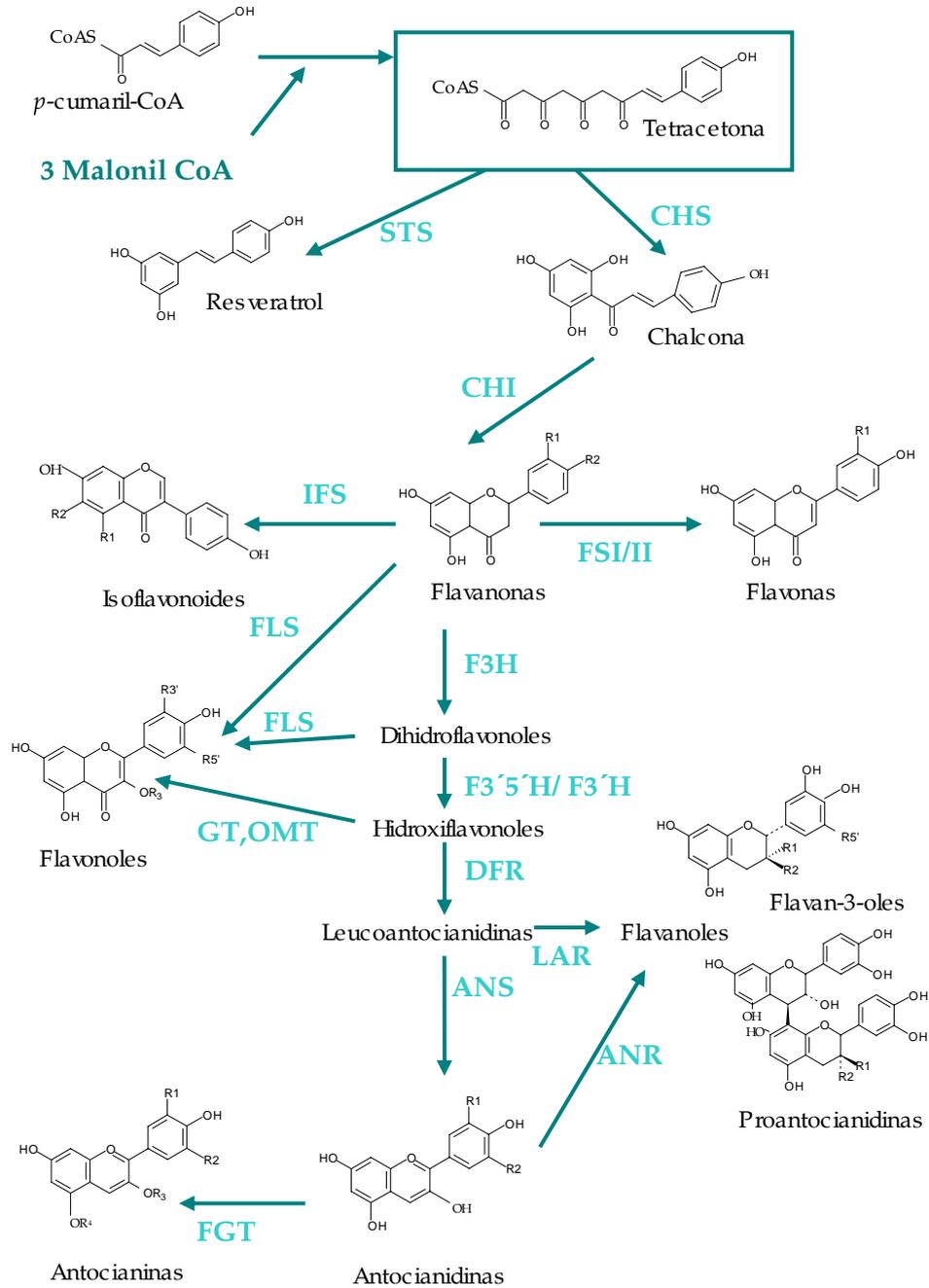


Figura I.3.: Ruta biosintética de flavonoides.

Cuando la enzima que actúa es la STS, el producto final de la reacción es el *trans*-resveratrol, liberándose cuatro moles de CO₂ por mol de resveratrol formado. En el caso de la CHS, se liberan 3 moléculas de CO₂ para formar naringenina-chalcona o pinocembrina-chalcona (de tirosina o fenilalanina respectivamente) (**Figura I.3.**).

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

Se ha observado que la biosíntesis de flavonoides se induce o incrementa con la irradiación con luz UV (Antognoni y col., 2007). Sin embargo, las investigaciones se han centrado en la interacción que se puede producir entre las plantas y otros organismos vivos, más concretamente los efectos de los compuestos fenólicos sobre los microorganismos que pueden infectar las plantas (Robards y Antolovich, 1997).

Algunos investigadores han considerado que se forman como mecanismo de defensa frente a los animales herbívoros, aportando un sabor amargo, menor digestibilidad y efectos adversos sobre la permeabilidad de la pared intestinal (Clausen y col., 1992).

1.1.2. Clasificación y principales fuentes naturales

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors, 1990).

Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en seis subclases: flavanonas, flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas) y antocianidinas (Skibola y Smith, 2000; Manach y col., 2004; Kroon y col., 2004).

1.1.2.1. Flavanonas

En la bibliografía, podemos encontrar numerosos estudios sobre flavanonas recombinantes cuya relevancia radica, no solo en ser precursoras de flavonoides, sino también por exhibir *per se*, actividad antitumoral, hormonal (Harborne y Williams,

2000), antimicrobiana (Cowan, 1999), y efectos terapéuticos frente a la fragilidad capilar causada por la hipertensión venosa (Katsenis, 2005). Se encuentran principalmente en frutas cítricas, tomates y plantas aromáticas como la menta. Dentro del grupo de flavanonas y sus derivados hidroxilados o glicosilados, podemos encontrar naringenina en el pomelo, pinocembrina en la miel, narirutina y hesperetina (**Figura I.4.**) en la naranja y eriodictiol en el limón (Erdman y col., 2007). Un vaso de zumo de naranja puede contener entre 40 y 140 mg de flavanonas glicosiladas. El mayor contenido de flavanonas se encuentra en la parte del albedo y las membranas internas de la naranja y mandarina (Clifford, 2000; Tomás-Barberán y Clifford, 2000).

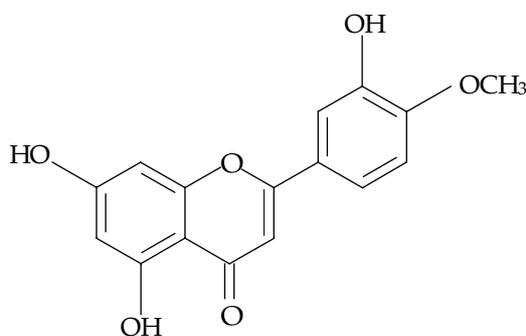


Figura I.4.: *Hesperetina.*

1.1.2.2. Flavonas

Dentro del grupo de flavonas se incluyen compuestos relevantes por su actividad fitoestrogénica (Harborne y Williams, 2000) y antimicrobiana (Cowan, 1999). Las flavonas derivan de las flavanonas por acción de las enzimas flavona sintetasa I y II (FSI o FSII) (**Figura I.3.**). Estas enzimas introducen dobles enlaces entre el C2 y C3 del anillo C de la flavanona (Turnbull y col., 2004). No son tan abundantes como los flavonoles, pero están presentes en pequeñas cantidades en vegetales y se encuentran principalmente en perejil y apio. Las más representativas son luteolina (**Figura I.5.**) y apigenina en forma glicosilada. Los cítricos contienen flavonas polimetoxiladas tales como: tengritina, nobiletina y sinensetina, siendo éstas las más hidrofóbicas (Manach y col., 2004).

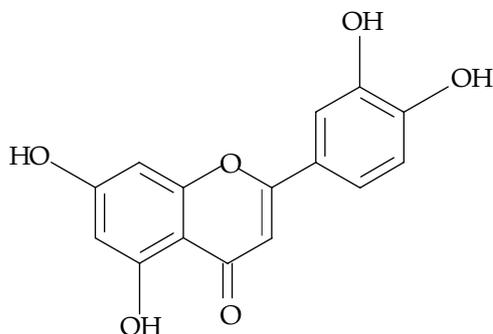


Figura I.5.: *Luteolina.*

1.1.2.3. Isoflavonas

Junto con algunos flavonoides, estilbenos y lignanos, ciertos isoflavonoides forman parte del grupo de fitoestrógenos de origen vegetal con actividad estrogénica. También se han descrito efectos inmunomoduladores asociadas a estas moléculas (Dijsselbloem y col., 2004). Dentro del grupo de los isoflavonoides podemos encontrar genisteína (**Figura I.6.**) y daidzeína (Dixon, 2004). Desde el punto de vista biosintético, genisteína es el isoflavonoide más sencillo, además de ser el precursor de isoflavonoides complejos.

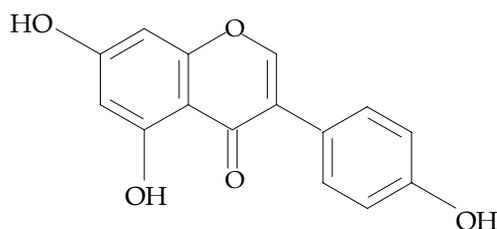


Figura I.6.: *Genisteína.*

Genisteína es sintetizada por la vía fenilpropanoide a partir de la flavanona naringenina, por acción de la enzima isoflavona sintetasa (IFS) (Liu y col., 2002) (**Figura I.3.**). La enzima da lugar a la migración del C2 del anillo B al C3 del anillo C de dicha flavanona, seguida de la hidroxilación en el C2 de este mismo anillo (Dixon,

2004). El intermedio resultante, 2-hidroxi-genisteína, es inestable y rápidamente se deshidrata para generar el producto estable correspondiente que es la genisteína (Liu y col., 2002).

Estos flavonoides se encuentran casi exclusivamente en plantas leguminosas y su principal fuente es la soja. La semilla de soja contiene entre 580 y 3800 mg de isoflavonas/Kg y la leche de soja contiene de 30 a 175 mg/L (Cassidy y col., 2000).

1.1.2.4. Flavonoles

En este grupo de polifenoles, algunos miembros destacan por su actividad antiinflamatoria (Nijveltd y col., 2001; Harborne y Williams, 2000), antioxidante (Harborne y Williams, 2000) y antimicrobiana (Cowan, 1999). Dentro del grupo de flavonoles y derivados hidroxilados, acilados, glicosilados o metilados, se incluyen: quercetina (**Figura I.7.**), miricetina, kaempferol y rutina, entre otros (Willits y col., 2004).

La sustitución del hidrógeno en el carbono 3 del anillo C de las flavonas por el grupo 3-hidroxi genera los flavonoles (Willits y col., 2004). La biosíntesis de flavonoles ocurre directamente mediante la reducción de flavanonas por la flavonol sintetasa (FLS) (Dixon y Steele, 1999) (**Figura I.3.**).

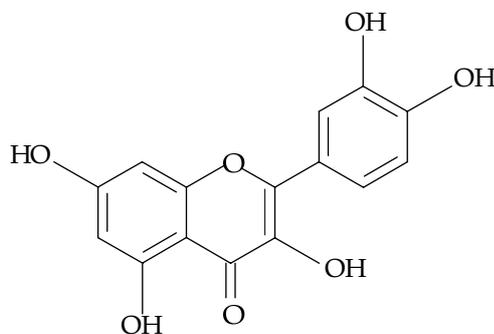


Figura I.7.: Quercetina.

También pueden ser sintetizadas por una ruta indirecta (**Figura I.3.**), que consiste en la hidroxilación de flavanonas en el carbono 3 del anillo C por la enzima flavanona 3- β -hidroxilasa (F3H), para generar dihidroflavonoles que posteriormente

son reducidos, mediante instauración, por la enzima FLS, dando lugar a flavonoles (Turnbull y col., 2004) (**Figura I.3.**). Otros flavonoles son sintetizados a partir de la hidroxilación del dihidroflavonol en los carbonos 3', 5' o sólo en el carbono 3' del anillo B, por las enzimas flavonoide 3', 5'-hidroxilasa (F3'5'H) o flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H), respectivamente (Dixon y Steele, 1999). Otras enzimas como la flavonoide glucosil transferasa (GT) y la flavonoide O-metiltransferasa (OMTs), al llevar a cabo la reacción de glicosilación o metilación, respectivamente, contribuyen a la diversificación de flavonoles (Willits y col., 2004).

Estos flavonoides poseen una coloración amarillenta y son los más frecuentes en los alimentos, siendo muy abundantes en vino tinto, té, cebolla, escarola y brócoli (Manach y col., 2004). Se presentan en forma glicosilada y se acumulan en los tejidos aéreos exteriores de las plantas (epidermis y hojas) porque su síntesis y concentración dependen de factores ambientales, como la luz solar (Macheix y col., 1990).

La cebolla contiene aproximadamente 1200 mg/Kg de flavonoles, siendo menor su concentración en vino tinto y té, en torno a 45 mg/L. Las frutas contienen entre 5 y 10 flavonoles glicosilados diferentes.

1.1.2.5. Flavanoles

Pueden presentarse en forma monomérica, denominándose flavan-3-oles (catequina y epicatequina) y en forma polimérica (proantocianidinas). Los flavanoles poseen actividad antioxidante (Yokozawa y col., 1998), anticancerígena (Ahmad y col., 2000; Ahmad y col., 1997), antialérgica (Fujimura y col., 2002) antiinflamatoria (Kundu y col., 2003), antimicrobiana (Vidhyasekaran, 1988; Feucht y Treutter, 1999) y vasodilatadora (Lorenz y col., 2004).

En la formación de catequina, intervienen las enzimas dihidroflavonol reductasa (DFR) y leucoantocianidina reductasa (LAR), actuando sobre dihidroflavonoles, mientras que en la formación de epicatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato actúan antocianidina sintetasa (ANS) y antocianidina reductasa (ANR) sobre las leucoantocianidinas (Punyasiri y col., 2004) (**Figura I.3.**).

Las catequinas son abundantes en la fruta, pero las principales fuentes de estos compuestos son el té verde (un vaso de té verde contiene hasta 200 mg de catequinas (Lakenbrink y col., 2000)), el chocolate y el vino tinto (hasta 300 mg/L). Catequina y epicatequina (**Figura I.8.**), son los principales flavanoles de la fruta, mientras que la

galocatequina, epigalocatequina (**Figura I.9.**) y epigalocatequina galato se encuentran en ciertas semillas leguminosas, uva y, sobre todo, en té (Dreosti, 2000; Manach y col., 2004). Este grupo de compuestos no se encuentra glicosilado en los alimentos.

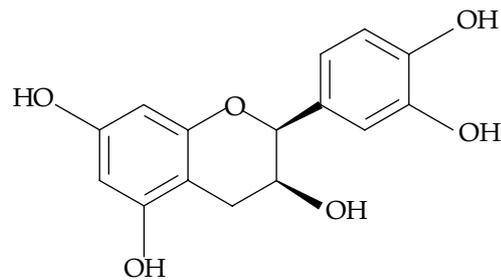


Figura I.8.: *Epicatequina.*

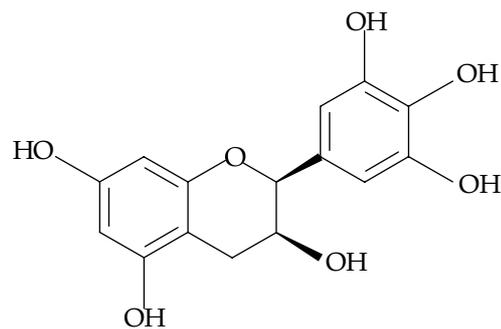


Figura I.9.: *Epigalocatequina.*

Las proantocianidinas (**Figura I.10.**), también conocidas como taninos condensados, son dímeros, oligómeros y polímeros de catequinas unidos por enlaces C4 y C8 (ó C6). Las encontramos en bebidas como té, vino y cerveza, en el chocolate y en frutas como uva, melocotón y manzana (son las responsables del carácter astringente de estos alimentos, al formar complejos con proteínas de la saliva).

Es difícil su cuantificación en los alimentos, ya que según sea el estado de maduración del fruto, podemos encontrar diferentes estados de polimerización.

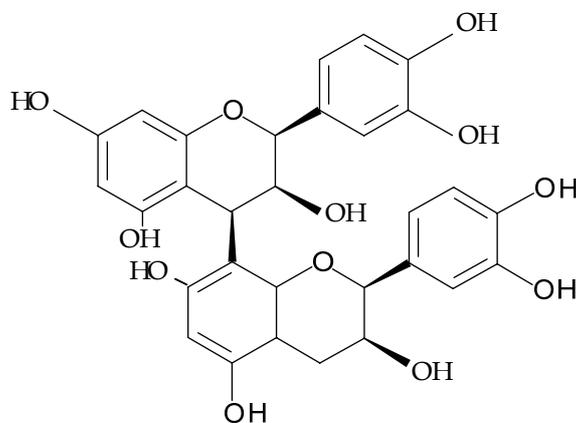


Figura I.10.: Procianidina B1 (epicatequina-(4 β →8)-catequina).

1.1.2.6. Antocianos

Son los pigmentos responsables de la llamativa coloración de las flores y los frutos de ciertos vegetales (azul, púrpura o rojo) (Kong y col., 2003). Las antocianinas son derivados glicosilados de las antocianidinas, grupo en el que se incluyen los siguientes compuestos: pelargonidina, cianidina (**Figura I.11.**), peonina, malvidina y petunidina (Kong y col., 2003).

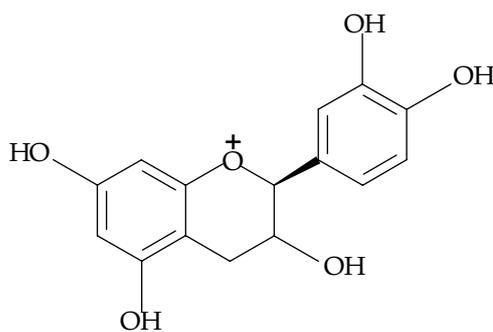


Figura I.11.: Cianidina.

Al igual que otros flavonoides, las antocianinas exhiben actividad antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante (Kong y col., 2003). En contraste con sus

precursores flavonoides, tanto las antocianinas como las antocianidinas se caracterizan por ser pigmentos coloreados, sin embargo, a diferencia de sus derivados glicosilados (antocianinas), las antocianidinas son altamente inestables (Nakajima y col., 2001). En la formación de las antocianinas, la flavanona es convertida en dihidroflavonol por la enzima flavanona 3 β -hidroxilasa (F3H). El paso siguiente, implica la conversión del dihidroflavonol en leucoantocianidina mediante la enzima dihidroflavonol reductasa (DFR) (Turnbull y col., 2004) (**Figura I.3.**). La leucoantocianidina es transformada en antocianidina por la enzima antocianidina sintetasa (ANS) (Nakajima y col., 2001) (**Figura I.3.**).

Aunque son inestables en la forma aglicona, mientras están en las plantas son resistentes a la acción de la luz, pH y agentes oxidantes, debido a que se presentan glicosiladas y esterificadas con varios ácidos orgánicos. La inestabilidad que presenta en la forma aglicona supone, la decoloración de los mismos y son por tanto no deseables. El pH no solo ejerce una marcada influencia sobre el color de los antocianos sino que también afecta a su estabilidad, un menor valor de pH implica un color rojo más intenso y una mayor estabilidad.

En la dieta humana, se encuentran en el vino tinto, ciertas variedades de cereales y vegetales como la cebolla, guisantes, calabaza, pero sobre todo, en frutas como cerezas, frambuesas, moras y ciruelas, entre otras. Su concentración en los alimentos viene determinada por la intensidad del color, pudiendo alcanzar valores entre 2000-4000 mg/Kg en la grosella y fresa, aumentando su contenido con el proceso de la maduración. El vino tinto contiene entre 200-350 mg de antocianinas/L, las cuales se transforman en complejas estructuras a medida que aumenta la edad del vino (Clifford, 2000).

1.1.3. Propiedades biológicas de los flavonoides

Entre los mecanismos propuestos para explicar los efectos beneficiosos sobre la salud ejercidos por los flavonoides, se encuentran el efecto antioxidante, la quelación de metales, la inhibición enzimática y la regulación génica (Erlejman y col., 2004). Se sabe que los flavonoides pueden ejercer su actividad antioxidante en numerosos sistemas biológicos, pero se ha de tener en cuenta que su distribución en estos sistemas depende de su relativa hidrofiliidad/hidrofobicidad y de sus interacciones con determinadas macromoléculas (Saija y col., 1995). Estos factores determinan la

concentración local de flavonoides, lo que influye en su capacidad para regular ciertos fenómenos celulares.

Gran parte del efecto protector ejercido por los flavonoides, por ejemplo de las catequinas presentes en el té, se ha atribuido a su capacidad para neutralizar o secuestrar radicales libres; pero cada vez hay más estudios que evidencian que estos compuestos también actúan regulando ciertas actividades enzimáticas celulares y que, parte de esta regulación, estaría relacionada con la capacidad de los flavonoides para alterar la estructura de la membrana plasmática (Caturla y col., 2003). Este efecto, permitiría actuar a los flavonoides sobre diversos procesos celulares estrechamente relacionados con la membrana plasmática, como la señalización celular (Spencer y col., 2001), el ciclo celular, el metabolismo del ácido araquidónico (Álvarez y Orallo, 2004), la proliferación celular, la apoptosis y la funcionalidad de las mitocondrias (Schroeder y col., 2008).

El Doctor D. Francisco Tomás Lorente en 2004, clasificó las acciones farmacológicas de los flavonoides en los siguientes grupos:

1. Vasoprotectores
2. Modificadores de los niveles del colesterol y lípidos
3. Antiagregantes
4. Modificadores enzimáticos
5. Actividad estrogénica
6. Actividad anticancerígena
7. Actividad antibacteriana y antifúngica
8. Actividad antiurémica
9. Actividad espasmolítica
10. Actividad antialérgica
11. Actividad antiinflamatoria
12. Actividad antivírica

En la **Tabla I.3.** se resumen las actividades biológicas asignadas a los flavonoides y algunas de las fuentes donde podemos encontrar estos compuestos.

Tabla I.3.: Propiedades beneficiosas de los flavonoides.

Compuesto	Efecto metabólico	Fruta	Referencias
<i>Flavanonas</i> Naringenina Hesperidina Eriocitrina	Protegen la peroxidación Afectan a la permeabilidad de los lípidos Antitumoral Hormonal Antimicrobiano	Cítricos Miel Tomates Menta	Espín y Tomás-Barberán, 2005 Tomás- Barberán y Clifford, 2000 Cowan, 1999 Katsenis, 2005
<i>Flavonas</i> Luteolina Apigenina	Actividad de fitoestrógenos Antimicrobiano	Pimiento Apio Perejil	Harborne y Williams, 2000 Cowan, 1999
<i>Isoflavonas</i> Daidzeína Genisteína	Antioxidante Actividad estrogénica	Soja Plantas leguminosas	Dijsselbloem y col., 2004 Dixon, 2004
<i>Flavonoles</i> Quercetina Miricetina Kaempferol	Antioxidante Disminuyen la agregación plaquetaria Disminuyen la oxidación de las LDL Antimutagénico Antiinflamatorio Antimicrobiano	Manzana Uva Cereza Granada Cebollas Escarola Té Brócoli	Tomás- Barberán, 2003 Nijveltd y col., 2001 Espín y Tomás-Barberán, 2005 Cowan, 1999 Harborne y Williams, 2000
<i>Flavanoles</i> Catequinas Proantocianidinas	Antioxidante Antimutagénico Antiinflamatorio Antialérgico Anticancerígeno Antimicrobiana Disminuye la oxidación de las LDL Disminuye la agregación plaquetaria	Uva Manzana Pera Cerezas Granada Té Chocolate	Kris-Etherton y col., 2002 Poyrazoglu y col., 2002 Yokozawa y col., 1998 Ahmad y col., 2000 Fujimura y col., 2002 Kundu y col., 2003
<i>Antocianos</i> Cianidina Pelargonidina	Antioxidante Antitumoral Antiinflamatorio	Cereza Uva Fresa	Mc Dougall y col., 2005 Kong y col., 2003

1.1.3.1. Propiedades antioxidantes

Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno que se generan durante el metabolismo normal del oxígeno o bien son inducidos por factores exógenos (Nishikawa y col., 2000), suponen un riesgo potencial para las células y tejidos.

Los flavonoides ejercen un efecto protector, ya que forman parte del denominado sistema de defensa antioxidante exógeno del organismo, es decir, aquellas defensas que se adquieren a través de la dieta. Existen tres tipos de mecanismos que pueden explicar la actividad antioxidante de estas defensas:

1. La transferencia de electrones que determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa.
2. La transferencia de electrones que determina la formación de una molécula antioxidante inactiva o estable.
3. Pequeñas moléculas que actúan como enzimas antioxidantes (Cadenas, 1997).

Se cree que el mecanismo por el que los flavonoides ejercen su actividad antioxidante se basa en la transferencia de electrones, que conlleva la aparición de una molécula radical activa y la capacidad de estos compuestos para quelar metales.

Pero los flavonoides deben cumplir dos requisitos adicionales para ser considerados moléculas antioxidantes (Halliwell, 1995): (1) incluso a bajas concentraciones deben proteger a los compuestos frente a la oxidación o el daño inducido por radicales libres y, (2) el radical flavonoide formado (llamado radical aroxilo), debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. El carácter inestable del radical aroxilo puede ocasionar un efecto prooxidante mostrado por algunos flavonoides, sin embargo la colaboración entre moléculas antioxidantes, favorece la recuperación del radical aroxilo por otros antioxidantes, como el ascorbato.

Los flavonoides presentan mayor o menor capacidad antioxidante en función del número y posición de sus grupos hidroxilo unidos a las estructuras de anillo (Rice-Evans, 2001). Los compuestos de naturaleza flavonoide presentan una serie de características estructurales que permiten valorar, *a priori*, su posible función antioxidante: i) presencia de un grupo catecol (3', 4'-dihidroxi) en el anillo B; ii)

presencia de un doble enlace insaturado entre C2 y C3 en el anillo C y; iii) presencia de un grupo hidroxilo en C3 en el anillo C (Dreosti, 2000; Cadenas, 2008).

También es importante la presencia de grupos funcionales, capaces de unir iones de metales de transición como el hierro o el cobre. Como ejemplo de compuesto flavonoide que reúne todas estas propiedades químicas descritas tenemos el flavonol quercetina (**Figura I.12.**) (Williams y col., 2004).

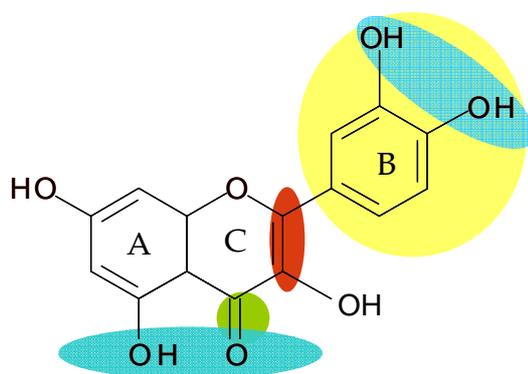


Figura I.12.: Estructura de quercetina, resaltando los grupos implicados en su actividad antioxidante. En amarillo, el grupo catecol del anillo B; en rojo, enlace insaturado del anillo C; en verde, función 4-oxo en el anillo C; en azul, puntos con capacidad de quelación de metales.

Quercetina presenta una actividad antioxidante cinco veces mayor que la determinada para las vitaminas C y E, además de poseer una hidrosolubilidad similar a esta última. Exhibe un efecto sinérgico con estas vitaminas, ya que el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus propiedades durante más tiempo. Por su parte, se ha descrito que quercetina protege de la oxidación a la vitamina E (Rice-Evans y Packer, 2003).

A la hora de valorar el poder antioxidante de los flavonoides, también debe tenerse en cuenta la presencia de grupos galato. Numerosos estudios demuestran que muchas de las actividades biológicas de las catequinas del té, se relacionan con la presencia de grupos pirogalol y ácido gálico en su estructura (**Figura I.13.**), que le

confiere a la planta mayor capacidad antibacteriana (Wang y col., 2000; Yamaguchi y col., 2002), anticarcinogénica (Matito y col., 2003; Na y Surh, 2006) y favorece su actividad antioxidante actuando como secuestrante de radicales libres (Caturla y col., 2003).

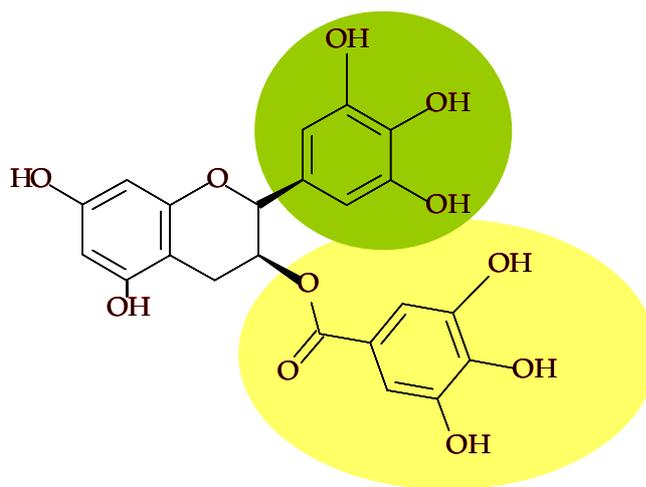


Figura I.13.: Grupo galato presente en la molécula epigalocatequina galato (EGCG). En verde, grupo pirogalol; en amarillo, grupo galato.

Los fenoles con una estructura catecol en el anillo B, a pesar de tener mayor potencial antioxidante, son metabolizados con mayor facilidad. Para entender el potencial que tienen los flavonoides para actuar como antioxidantes *in vivo*, es necesario tener en cuenta otros factores como la biodisponibilidad e interacciones en el tracto gastrointestinal, así como la influencia de la conjugación y el metabolismo (Croft, 2004).

1.1.3.2. Propiedades prooxidantes

Las mismas propiedades que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides, determinan que tengan efectos prooxidantes, lo que puede implicar una toxicidad potencial (Lambert y col., 2007). Los mecanismos en los que se basa este efecto son la formación de un radical aroxilo lábil o, un complejo flavonoide hierro redox lábil (Cadenas, 2008).

Aunque hay estudios que indican que los polifenoles, entre ellos los

flavonoides, pueden tener efectos tóxicos sobre las biomoléculas ensayadas, es mucho más amplia la bibliografía que referencia su capacidad como antioxidantes, su efecto protector frente a enfermedades relacionadas con la edad y, en general, su participación en el mantenimiento de una buena salud. De cualquier forma, se necesitan más estudios sobre la actividad y mecanismos de acción de los polifenoles para profundizar y entender mejor sus mecanismos de acción, su interacción con las diversas dianas celulares y, en general, sus funciones biológicas, "las buenas y las malas" (Lambert y col., 2007; Cadenas, 2008).

1.1.4. Farmacocinética y biodisponibilidad

En la bibliografía, podemos encontrar excelentes revisiones sobre flavonoides, centradas en aspectos nutricionales, médicos y sus interacciones con fármacos (Havsteen, 2002; Morris y Zang, 2006; Moon y col., 2006). Sin embargo, todavía no se conocen al detalle los mecanismos implicados en su absorción y biodisponibilidad (Hendrich, 2002).

Se cree que, la presencia de grupos fenólicos, tanto en los conjugados sulfatados como en los glicosilados, facilitan su eliminación. Antes de ser absorbidos, los flavonoides son escindidos para dar, por una parte su aglicona y por otra su glicósido. Este último compuesto al tener mayor solubilidad en agua, se absorbe rápidamente, sin embargo la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida. Por este motivo, el promedio de las concentraciones pico de los flavonoides se da tras 1.75 horas de la ingesta (Wittemer y col., 2005; Laranjinha, 2002).

Los flavonoides se distribuyen homogéneamente en todos los tejidos corporales, logrado incluso atravesar (en función de su hidrofobicidad y su transporte por los receptores) la barrera hematoencefálica (Abrahamse y col., 2005; Youdim y col., 2004).

Los flavonoides sufren metabolismo primario y sus metabolitos, aunque sean absorbidos, ya no presentan funcionalidad (Abrahamse y col., 2005), alcanzando una biodisponibilidad del 1.5%, en comparación con la administración de los mismos por vía intravenosa (Jiménez y col., 2009).

En base a este dato de biodisponibilidad deducimos que la transformación de los flavonoides es intensa, llevándose a cabo en dos fases: i) En la fase I, tienen lugar diferentes reacciones de biotransformación en el hígado, en las que se adicionan o

exponen grupos polares; ii) En la fase II de la biotransformación, la microbiota intestinal del colon degrada los flavonoides no absorbidos (Abrahamse y col., 2005; Youdim y col., 2004; Rimm y col., 1996), que son conjugados con glicina, ácido glucurónico y sulfatados.

Tras la formación de estos conjugados, la excreción transcurre por dos vías: Los compuestos insolubles en agua se excretan junto con la bilis al duodeno, y los compuestos hidrosolubles a las vías urinarias con la orina, siendo esta última la salida predominante (Abrahamse y col., 2005). En realidad, lo importante es la ruta por la cual se metabolizaron; pues si un flavonoide sólo es glucuronidado se excretará por vía renal (como la catequina), pero si es metilado y sulfatado será excretado por la vía hepática (como la quercetina) (Manach y col., 1999).

1.1.5. Aplicaciones de los flavonoides

a) Preparados farmacéuticos

Desde la antigüedad, los asiáticos han bebido el té verde como remedio medicinal. Ese consumo generación tras generación, se ha basado en la experiencia. La aplicación de los conocimientos bioquímicos en estudios recientes, han permitido evidenciar las propiedades saludables de unos compuestos (flavonoides) presentes en el té en altas concentraciones, avalando así su empleo en diferentes preparados farmacéuticos (Mazza, 2000). El primer efecto biológico descrito fue el de contrarrestar la permeabilidad capilar. La administración oral, por vía intravenosa o intramuscular de preparados farmacéuticos de antocianinas de *Vaccinium myrtillus* (VMA) reduce la permeabilidad y fragilidad capilar. Esta actividad antiinflamatoria de las VMA es la responsable de sus propiedades anti-edema y de su actividad frente a la microangiopatía diabética (Mazza, 2000).

La silibina del cardo (*Silybum marianum*, planta medicinal de Europa central) tiene efectos hepatoprotectores y por ello se ha incluido en muchas fórmulas farmacéuticas. Así sucede con la catequina para combatir enfermedades hepáticas, el espino blanco (*Crataegus*) para tratar insuficiencias cardíacas leves y extractos de la Ginkgo biloba (antigua planta medicinal china) para tratar insuficiencias cerebrales relacionadas con la edad, entre otros usos (De Smet, 1993). En varios estudios epidemiológicos se ha observado que beber té verde o negro puede bajar las concentraciones de colesterol en sangre, aportando así mayor protección frente a las

enfermedades cardiovasculares (Craig, 1999).

b) Uso industrial

La naringina y neohesperidina, se utilizan a escala industrial, ya que se pueden transformar en sus correspondientes dihidrochalconas que tienen un elevado poder edulcorante. Además, existen gran cantidad de flavonoides que se podrían explotar como sustitutos de aditivos sintéticos (Martínez-Tomé y col., 2001) y/o para incrementar la producción de alimentos (Robards y Antolovich, 1997).

c) En el diseño de alimentos funcionales.

En los últimos años se ha incrementado el interés por parte de las industrias alimentarias y los consumidores por el concepto de alimento funcional. Así, con un consumidor cada vez más interesado en alimentos más saludables y una industria alimentaria que ha comprendido la potencialidad del mercado de este tipo de alimentos, se ha iniciado a nivel mundial una intensa actividad investigadora en éste área. El término alimento funcional hace referencia a alimentos o ingredientes que mejoran el estado general de salud y/o reducen el riesgo de enfermedad (Rafter, 2002).

Se trata además de productos alimenticios que deben consumirse dentro de la dieta habitual para conseguir efectos beneficiosos que van más allá de los requerimientos nutricionales tradicionales (Roberfroid, 2002). Un alimento puede hacerse funcional siguiendo alguna de las siguientes estrategias o sus combinaciones (Roberfroid, 2000; Roberfroid, 2002):

1. Eliminando componentes perjudiciales presentes en el alimento (ej. alergenicos).
2. Incrementando la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta unos niveles en que pueda inducir los beneficios esperados (ej. fortificación con micronutrientes) o incrementando la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que se conoce su efecto beneficioso.
3. Añadiendo un componente que no está presente de forma natural en el alimento y que no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente, pero cuyos efectos beneficiosos son reconocidos (ej. compuestos fenólicos).

4. Sustituyendo un componente, generalmente un macronutriente (ej. grasas), cuyo consumo excesivo tenga efectos perjudiciales por un componente de reconocido efecto beneficioso (ej. inulina).
5. Incrementando la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que se sepa que es capaz de producir un efecto funcional o reducir un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento.

Estos efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente con el objetivo de validar sus efectos y para poder aprobar las declaraciones nutricionales en su etiqueta (Roberfroid, 2002). Recientemente ha sido publicado un documento en el que se establecen los criterios consensuados para la evaluación del apoyo científico a las declaraciones nutricionales relacionadas con la salud de los alimentos funcionales (PASSCLAIM) (Aggett y col., 2005).

Una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de alimentos funcionales se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidante del organismo (Roberfroid, 2000). Por esta razón, en la actualidad muchos alimentos funcionales tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales en la dieta. En este contexto, la adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible para el desarrollo de alimentos funcionales con una actividad antioxidante incrementada (Larrosa y col., 2002). De hecho, en el campo del desarrollo de nuevos ingredientes se está produciendo un aumento en la producción de este tipo de extractos vegetales en los cuales los compuestos bioactivos son aislados y concentrados para su uso como suplementos, alimentos nutraceuticos o como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales (Pszczola, 2003).

2. CICLODEXTRINAS (CDs)

2.1. HISTORIA Y DEFINICIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son azúcares cíclicos naturales de seis (α -CDs), siete (β -CDs) u ocho (γ -CDs) unidades de glucosa, unidas por enlaces α (1-4) (**Figura I.14**). También son conocidas como cicloamilosa, ciclomaltoas o dextrinas de Schardinger (Villiers, 1891; Eastburn y Tao, 1994). Se obtienen como resultado de una reacción de transglucosilación intramolecular en la degradación del almidón, llevada a cabo por la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) de *Bacillus macerans* (Szetjili, 1998).

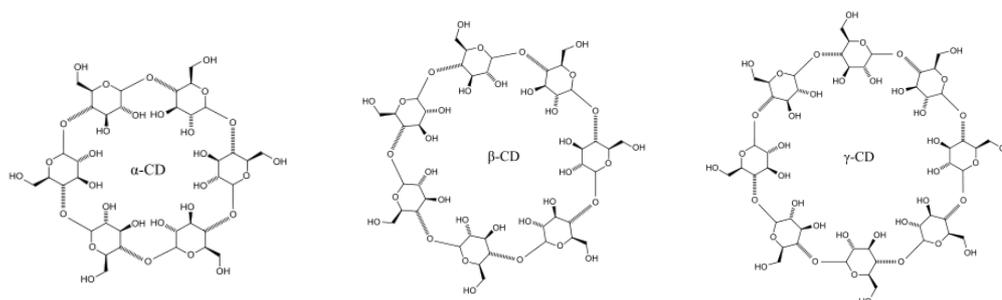


Figura I.14.: Estructura de α -, β - y γ -CDs.

Fueron descubiertas en 1891 por Villiers, obteniendo una pequeña cantidad de dextrinas tras la digestión del almidón por *Bacillus amylobacter*. La cantidad obtenida fue aproximadamente de 3 g/Kg de almidón. Tras permanecer unas semanas en alcohol se observó la presencia de cristales precipitados que respondían a la fórmula de las CDs ($C_6H_{10}O_3$) \cdot 3 H₂O. Probablemente y de acuerdo con otros autores, Villiers observó que las CDs se produjeron por la contaminación de *Bacillus macerans* (Villiers, 1891). En 1903, Schardinger fue capaz de aislar dos productos cristalinos, dextrina A y dextrina B, que no tenían poder reductor, pero la cepa que los producía no fue

identificada. En 1904, Schardinger aisló un nuevo microorganismo capaz de producir acetona y alcohol etílico a partir de azúcar y material vegetal que contenía almidón (Eastburn y Tao, 1994). Más tarde, en 1911, describió que dicho microorganismo, llamado *Bacillus macerans*, producía grandes cantidades de dextrinas cristalinas a partir del almidón (25-30%). Schardinger nombró sus productos cristalinos como dextrina cristalina α y dextrina cristalina β . La dextrina cristalina γ no fue aislada hasta 1935. En 1942 se observó la estructura de α - y β -CDs por cristalografía de rayos X, corroborando así las estructuras propuestas con anterioridad. En 1948, se elucidó la estructura de γ -CDs por rayos X y se reconoció que las CDs pueden formar complejos de inclusión. Se observó que todos los tipos de CDs tenían estructura troncocónica, debido a la conformación en forma de silla de las unidades de glucopiranososa. 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.15**). 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, 1982).

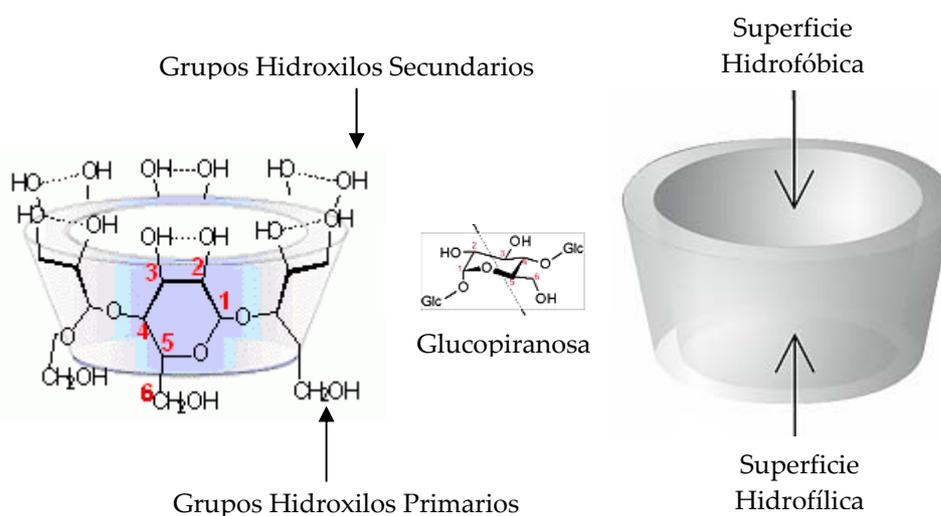


Figura I.15.: Estructura ciclodextrina.

En los años 50 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 δ -, ζ -, ξ - y η -CDs (9-12 residuos) (Hirose y Yamamoto, 2001), mientras que el grupo de Cramer se centró en el estudio de las propiedades de los complejos de inclusión formados por las CDs. En 1953 Freudenberg, 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 fármacos 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.

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.

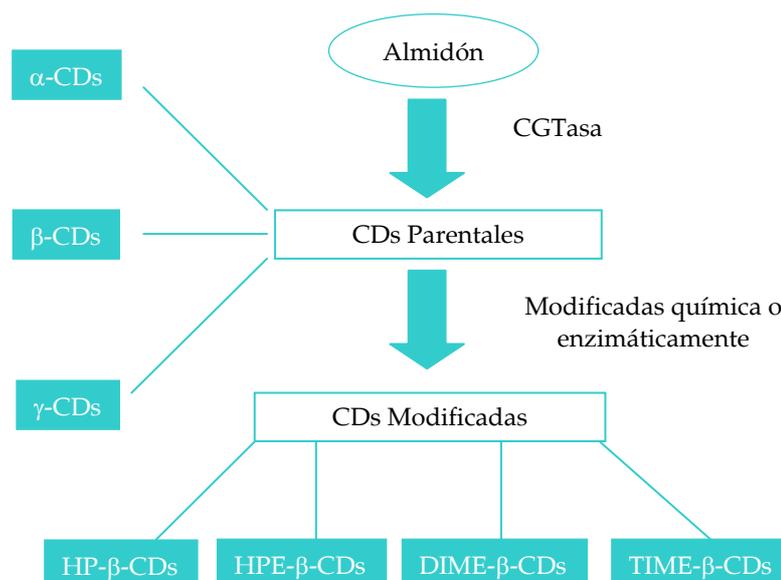
2.2. PROPIEDADES

Hay tres tipos de CDs denominadas de primera generación, parentales o naturales: α -, β - y γ -CDs. β -CDs es el tipo más utilizado debido a su bajo coste. Las principales características de las CDs naturales se describen en la **Tabla I.4.**

Tabla I.4.: Propiedades de las CDs.

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

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. La síntesis de CDs modificadas requiere la selección de reactivos, optimización de las condiciones de reacción y una buena separación de los productos. Las β -CDs han sido modificadas con más de 20 sustituyentes diferentes en una región específica de manera selectiva (Figura I.16.).



- 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.16.: Tipos de CDs modificadas.

Debido a su capacidad para unirse de forma específica mediante enlace covalente o no covalente a otras CDs, estos azúcares cíclicos se pueden utilizar como bloques para la construcción de complejos supramoleculares. Su habilidad para formar complejos de inclusión con moléculas huésped de carácter orgánico, ofrece la posibilidad de desarrollar hilos supramoleculares.

Así, se pueden construir arquitecturas moleculares como catenanos, rotaxanos, polirrotaxanos y tubos (**Figura I.17.**). Estos bloques de construcción, que no se pueden obtener por otros métodos, se emplean para la separación de mezclas complejas de moléculas y enantiómeros (Szetjli, 1998).

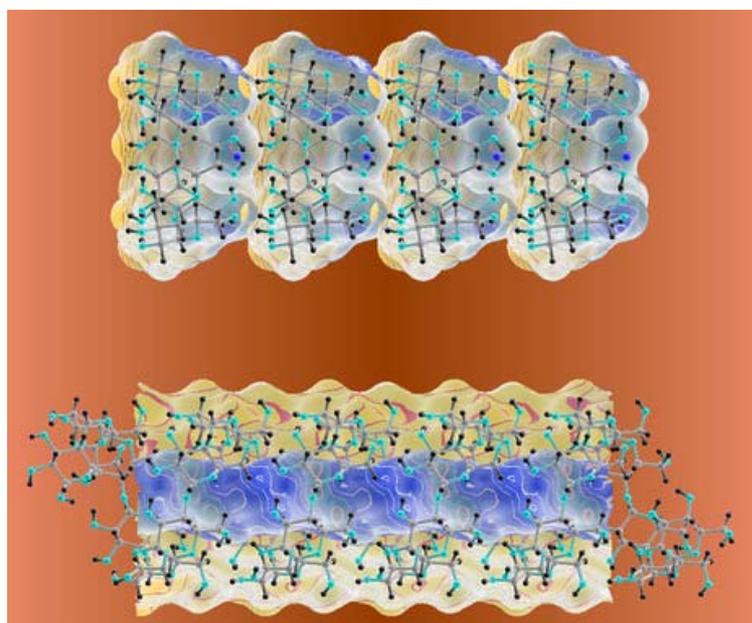


Figura I.17.: *Hilos supramoleculares.*

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 γ -, 2-

hidroxipropil- β -, sulfobutiléter- β -, sulfatada- β - y maltosil- β -CDs son seguras, incluso administradas de forma parenteral. Sin embargo, otros estudios toxicológicos revelan que las parentales α - y β -CDs y las modificadas metil- β -CDs no deben de ser administradas por vía parenteral (Martín del Valle, 2004).

2.3.1. α -CDs

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

2.3.2. β -CDs

Son menos irritantes que las α -CDs cuando se administran intramuscularmente. Cuando se ingieren por vía oral, éstas se unen al colesterol absorbiéndose en el tracto gastrointestinal superior en cantidades muy pequeñas (1-2%). Al igual que en el caso de α -CDs no son metabolizadas en el tracto intestinal superior, pero sí son degradadas por las bacterias de ciego 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. γ -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 su inyección intramuscular, y son rápidamente degradadas a glucosa en el tracto intestinal superior por las enzimas intestinales (incluso a altas dosis, por ejemplo, 10-20 g /kg/día). No son absorbidas tras su administración por vía oral y hay prácticamente ausencia de metabolismo después de su administración

intravenosa. Su habilidad para formar complejos, en general, es menor que β -CDs y sus modificadas. Con frecuencia, sus complejos tienen una solubilidad limitada en soluciones acuosas, tendiendo a precipitar generando soluciones opalescentes (Szente 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 (ΔG_T) sería la suma de todas las contribuciones individuales [$\Sigma(\Delta G)_{i-v}$] (Schneiderman y Stalcup, 2000).

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

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

Estas interacciones hidrofóbicas son relativamente débiles, ya que las fuerzas implicadas en la formación de los complejos son interacciones de tipo Van der Waals e interacciones dipolo-dipolo. Así, si se compara la energía necesaria para la formación de un enlace covalente (10^2 kcal/mol) con la necesaria para establecer un enlace por puente de hidrógeno (10 kcal/mol) y la imprescindible para las interacciones por fuerzas de Van der Waals (1 kcal/mol), se deduce que estas interacciones son las más débiles y en muchos casos, no permiten la formación de un complejo estable.

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

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

De todo lo expuesto, se desprende que el ajuste de la molécula de sustrato a la cavidad de la CDs es un proceso decisivo y en cierta medida independiente del carácter de la molécula huésped (Loftsson y Brewster, 1996). Sin embargo, esta independencia es relativa debido a que para la formación del complejo es necesaria la

deshidratación total o parcial del sustrato, seguida de la rehidratación que se produce tras el proceso de incorporación, siendo estos procesos características de los sustratos.

La unión resultante entre la CD y la molécula huésped no es fija o permanente, sino que es un equilibrio dinámico gobernado por una constante, cuya fuerza depende del tamaño relativo de la molécula complejada y de las interacciones establecidas entre la CDs y la molécula complejada (**Figura I.18.**).

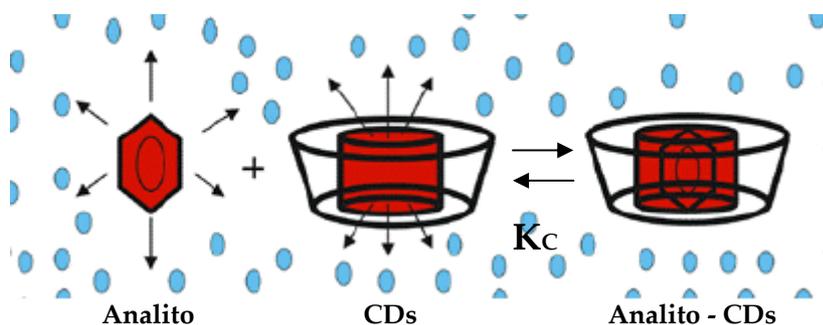


Figura I.18.: Formación del complejo huésped-CDs.

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 halogenados, oxiácidos y aminas (Schmid, 1989).

Mientras que la altura de la cavidad hidrofóbica es la misma para los tres tipos de CDs nativos, el número de unidades de glucosas de cada una de ellas determina el diámetro interior de la cavidad y su volumen (**Figura I.19.**).

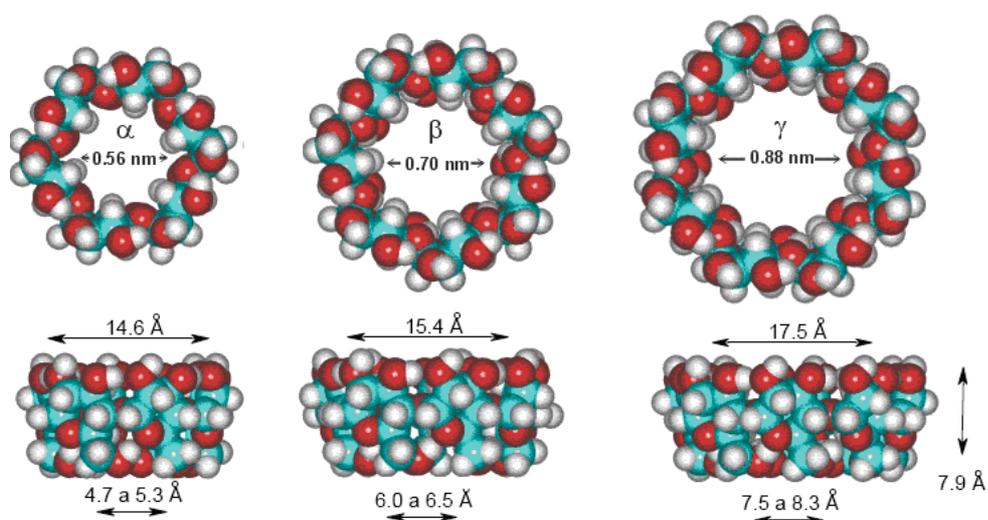


Figura I.19.: Diámetro externo e interno de las diferentes CDs.

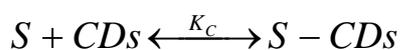
En base a estas dimensiones, las α-CDs pueden complejar moléculas de bajo peso molecular o compuestos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos; las β-CDs pueden complejar moléculas aromáticas y heterociclos; y las γ-CDs pueden acomodar moléculas más grandes, tales como macrociclos y esteroides (Martín del Valle, 2004).

El equilibrio inicial para formar el complejo es muy rápido (a menudo en cuestión de minutos), sin embargo, el equilibrio final puede dilatarse más en el tiempo. Por otra parte, la disociación del complejo de inclusión es un proceso relativamente rápido, generalmente impulsado por un gran aumento en el número de moléculas de agua en el medio ambiente circundante. En disoluciones poco concentradas resulta difícil que la molécula huésped encuentre la CD, quedando libre en el medio acuoso.

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

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

La principal desventaja de este método reside en la expansión masiva debido a la baja solubilidad de las CDs, por lo que se deben utilizar grandes volúmenes de

agua. La capacidad del depósito, el tiempo y la energía para calentar y refrigerar las muestras pueden convertirse en factores limitantes, debido al alto coste del proceso. El tratamiento y eliminación del agua tras recoger los complejos, también puede ser motivo de preocupación debido al coste de las operaciones y las posibles repercusiones medioambientales. Esto se puede solucionar en muchos casos con el reciclaje del agua (Loftsson 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 amoniaco a los medios acuosos de complejación. Por ejemplo, la solubilidad de pancratistatina con HP- β -CDs se optimizó tras la adición de hidróxido de amonio (Torres-Labandeira 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 pueden ser controladas 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 muy poca agua. Uno de los problemas que presenta este método es debido al calor generado, ya que puede afectar al analito que se va a complejar.

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 aspersion. 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 y col., 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}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 C_1 y C_4 de la CDs se relacionan con los cambios de conformación que se producen debido a la formación de complejos de inclusión (Inane y col., 1986).

2.8.1.3. Espectroscopía de absorción infrarroja

En el espectro de absorción (IR), se pueden apreciar desplazamientos de aproximadamente 40 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 -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 los casos, hasta un 300% para los complejos más hidrosolubles (Lath y Chin, 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.20.**).

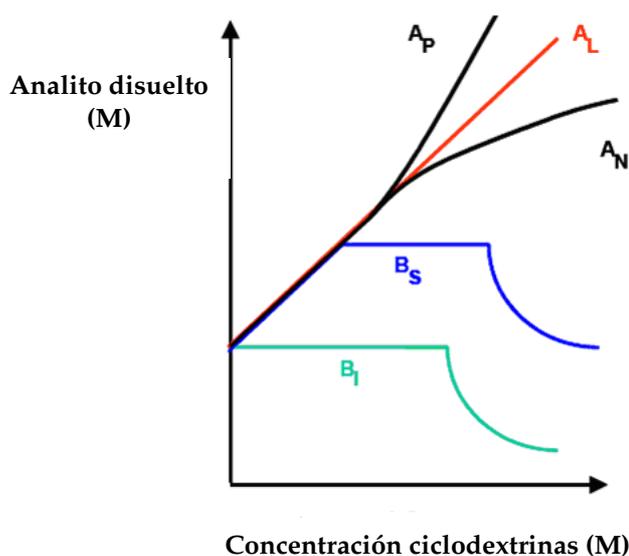


Figura I.20.: Tipos de diagramas de fases con CDs.

Se han descrito diferentes tipos de diagramas de fases (Higuchi y Connors, 1965), que se pueden agrupar en dos categorías, tipo A y tipo B, que a su vez se dividirán en otros subgrupos. En general, en los diagramas tipo A, el complejo formado tiene un límite de solubilidad muy alto y no precipita, mientras que los de

tipo B describen la formación de un complejo poco soluble que precipita en las condiciones del experimento. Los diagramas tipo B se subdividen en dos grupos: tipo B_s, que indica la presencia de complejos con una solubilidad limitada y tipo B_i, que indica la presencia de complejos totalmente insolubles. Los diagramas tipo A se subdividen en tres grupos: tipo A_L, la solubilidad del complejo aumenta de forma lineal conforme aumenta la concentración de CDs, tipo A_P, isoterma de desviación positiva y tipo A_N isoterma de desviación negativa (**Figura I.20.**).

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

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

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

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

donde S₀ es la solubilidad acuosa del analito en el medio de complejación. En este caso, la K_C puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

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

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:

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

$$[L]_t = [L] + n[Su_m - L_n] \quad (5)$$

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

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

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

$$[L] = [L]_t - n[S_mL_n] \quad (8)$$

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

2.8.2.2. Métodos cinéticos

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., 1978b), 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., 1978a).

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

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

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

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., 1978b). 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 mm, se utiliza para el control de olores en pañales, productos menstruales, toallitas de papel y preparaciones para el cuidado del cabello con el fin de proteger los mercaheptanos volátiles. Las HP- β -CDs son el tipo de CDs que proporcionan una mayor protección antimicrobiana (Woo 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 (agente antimicrobiano) (Loftsson y col., 1999). También se utilizan en la preparación de lociones de protección solar en una proporción 1:1 (pantalla solar/HP- β -CDs). De forma similar las CDs se utilizan en los autobronceadores y cremas para estabilizar la emulsión y mejorar su aplicación, de tal forma que mejora el bronceado haciéndolo más natural que los tintes amarillos o rojizos fruto del empleo de los productos tradicionales a base de dihidroxicetona tradicional (Scalia 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

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) (Figura I.21.).

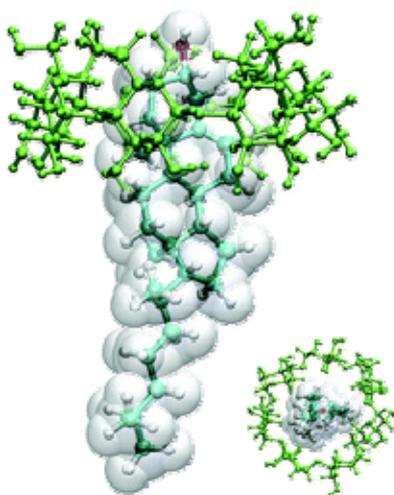


Figura I.21.: Complejo de inclusión colesterol-CDs.

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 O₂ 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 debido 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 complejoado con β -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 β -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 β -CDs y almacenados en condiciones no extremas de temperatura y humedad relativa durante 14 años, se demostró, tras analizar cada año las muestras por cromatografía de gases, que la encapsulación molecular de dichos compuestos concentrados con CDs, mejorando notablemente su estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo (Szente y Szejtli 1987, 2004). El poder de

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

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 β -CDs, no alterándose el color al elevar la temperatura a 100 °C durante 2 h (Kawashima, 1980). En productos cárnicos transformados, las CDs mejoran la retención de agua y la textura del alimento (Ota y Takeda, 1981).

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

La gelatinización es una característica importante de almidones y los alimentos que lo contengan, como las harinas. La presencia de β -CDs modifica considerablemente la gelatinización de la harina de trigo (Kim y Hill, 1984). La presencia del 1.5% de β -CDs aumenta el poder de hinchamiento y la solubilidad de los gránulos de almidón de trigo y especialmente la lixiviación de la fracción de amilosa, aumentando en un factor de 4, la viscosidad de estas pastas. Esto puede ser debido a que las CDs desestabilizan los complejos almidón-lípidos, ya que al utilizar harinas deslipidadas el efecto de las CDs se vio 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, liberando fácilmente su sabor y aroma. Para intentar eliminar los compuestos fenólicos responsables del sabor amargo del café y el té, que se forman debido a las altas temperaturas alcanzadas en los procesos de elaboración de dichos alimentos (90

°C durante varias horas), se adicionaron β -CDs 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 adición del 10% de β -CDs, el sabor amargo puede ser enmascarado (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 β -CDs (Akiyama y Miyao, 1979).

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

El sabor amargo de zumos de uva o mandarina también disminuye sensiblemente al añadir el 0.3% de β -CDs antes del tratamiento térmico. Esto es debido a que naringina y limonina (compuestos responsables del sabor amargo) forman complejos estables con β -CDs, lo que reduce el amargor del zumo (Shaw y Wilson, 1983).

Las CDs también se pueden utilizar para secuestrar determinados componentes de los alimentos. En el caso de la elaboración de café soluble, la extracción acuosa del café tostado en presencia de CDs, para su posterior secado por spray-drying o freeze-drying, genera un café soluble que conserva mejor los compuestos volátiles exhibiendo un mejor aroma que el elaborado en ausencia de CDs (Wagner 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 β -CDs sí es efectivo para eliminar el ácido clorogénico (70%, casi como el carbón vegetal que elimina el 71%) (Ujhazy y Szejtli, 1989).

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

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

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 adicción 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 del 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 Szejtli, 1994, Rajewski y Stella, 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 α - o β -CDs para aumentar la solubilidad en agua de varias sustancias poco solubles. En algunos casos esto se traduce en una mejor biodisponibilidad, aumentando el efecto farmacológico que permite una reducción de la dosis a administrar.

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

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

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.

La 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 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 arilpropiónico racémico por la enzima transportadora de albúmina de suero bovino, tenía una enantioselectividad baja (50-81%), mientras que con β -CDs no solo mejoraba la enantioselectividad (80-99%) sino que también se mejoró la tasa de hidrólisis.

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

También se han utilizado para aumentar la solubilidad de tres tipos de fungicidas (tiabendazol, carbendazima y fuberidazol), para que estén más disponibles en el suelo. Por otra parte, también aumentan la solubilidad de los hidrocarburos,

pudiendo ser utilizadas en biodegradación y biorremediación. Las β -CDs aceleran la degradación de todos los tipos de hidrocarburos que influyen en la cinética de crecimiento, produciendo un aumento de la biomasa y una mejor utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. El bajo coste de las β -CDs, hace posible su utilización para estos fines (Bardi y col., 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, α -, β - y γ -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, α -, β - y γ -CDs son reconocidos como productos naturales y su comercialización en el sector de la alimentación está limitada por consideraciones de pureza. En Australia y Nueva Zelanda α - y γ -CDs están clasificados como nuevos alimentos a partir de 2004 y 2003, respectivamente (Cravotto y col., 2006).

FAO/OMS a través del Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) recomienda un consumo máximo de β -CDs en alimentos de 500 mg/kg/día. Para α -y γ -CDs no se ha establecido la ingesta diaria admisible (IDA). Por otra parte, en julio de 2005 la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EEUU, acabó con la necesidad de establecer un nivel máximo admisible de residuos de α -, β - y γ -CDs en diversos productos alimenticios (EE.UU. Federal Register, 2005) (Astray y col., 2009). En Europa, están aprobadas α -, β - y γ -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. FLAVONOIDES Y CICLODEXTRINAS

En la actualidad, encontramos estudios sobre la complejación de flavonoides en CDs, llevados a cabo por cromatografía en capa fina, dicróismo circular, espectroscopía de absorción, UV-VIS, RMN y fluorescencia (Crupi y col., 2007; Jullian y col., 2007; Cannavà y col., 2010; Stancanelli y col., 2008). Estos estudios han

demostrado que las propiedades físico-químicas de los flavonoides cambian al ser complejados en CDs, dando lugar a un aumento en la solubilidad, a una mejora en su estabilidad frente al aire y la luz, modificaciones en su espectro UV-VIS o de fluorescencia y en su reactividad química.

Entre los estudios sobre la complejación de flavonoides y CDs encontramos a quercetina y catequina (**Figura I.22.**) como los flavonoides más estudiados con diferentes tipos de CDs (Lucas-Abellán y col., 2008a; Borghetti y col., 2009; Calabrò y col., 2004; Wang y col., 2009; Dias y col., 2008; Yan y col., 2007). También encontramos estudios de isoflavonas (genisteína y daidzeína) con γ -, β - y HP- β -CDs. (Daruházi y col., 2008; Stancanelli y col., 2007) y flavanonas como hesperetina y naringenina C (Tommasini y col., 2004a; Tommasini y col., 2004b).

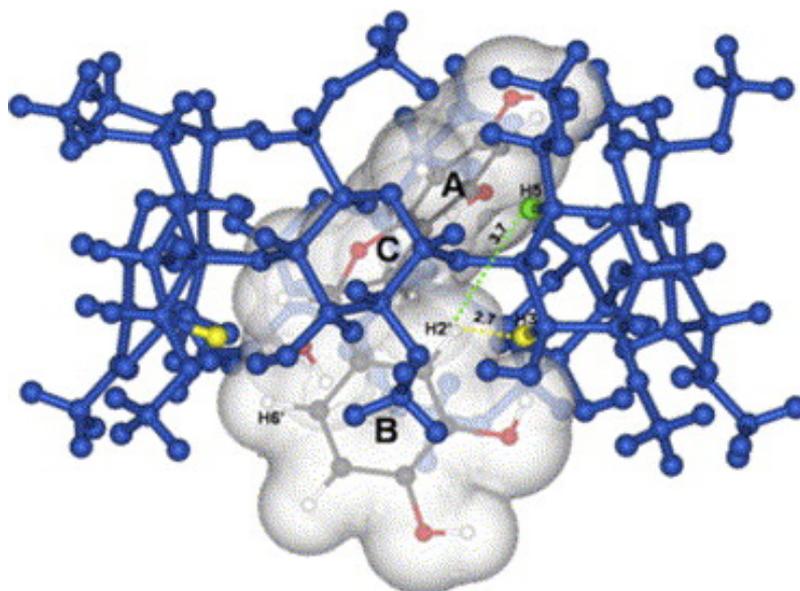


Figura I.22.: Complejo de inclusión catequina-CDs.

Los valores de K_C entre flavonoide-CDs pueden variar en función del pH del medio (Lucas-Abellán y col., 2008a; Wang y col., 2009; Tommasini y col., 2004a).

4. 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 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, 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 y Ferris, 2001). En consecuencia, se ha hipotetizado que una dieta rica en fruta y verdura puede aumentar la defensa antioxidante del organismo contrarrestando 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, cuya 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.23.**) (Pannala y col., 2001).

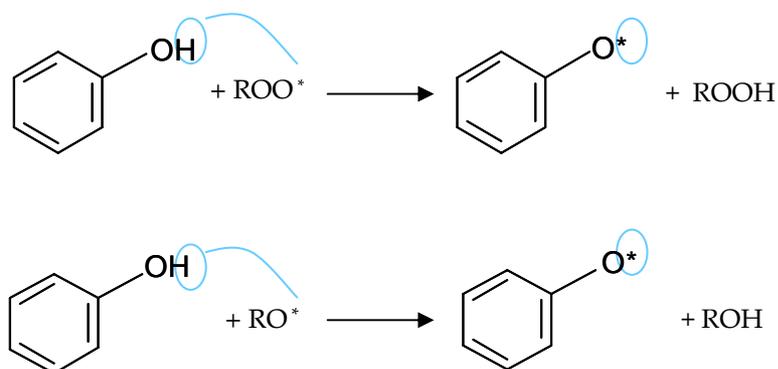


Figura I.23.: Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres

La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo presentes en su estructura (Cao y col., 1996). In *vitro* puede ser determinada por varios métodos (Cao y Prior., 2001; Dávalos y col., 2004):

- 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 y col., 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 y col., 1999). El radical ABTS^{•+} 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.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

Como se describe en la sección anterior (Capítulo I), los compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoles, poseen excelentes propiedades beneficiosas para la salud. Sin embargo, son compuestos bastante insolubles en agua y sensibles a la acción de agentes externos como aire, luz y enzimas oxidativas, constituyendo un inconveniente para su formulación y manipulación previa a su posible aplicación en diferentes sectores industriales (alimentación, cosmética, química o farmacéutica, entre otras).

El objetivo principal de esta Tesis se centra en el estudio de la complejación de los flavonoles miricetina, quercetina y kaempferol en ciclodextrinas (CDs), como una solución viable a los inconvenientes descritos.

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

1. Estudio de la solubilidad acuosa de miricetina, quercetina y kaempferol en presencia de diferentes tipos de CDs.
2. Estudio de la variación de fluorescencia de miricetina, quercetina y kaempferol en presencia de diferentes tipos de CDs.
3. Estudio de la estabilidad de miricetina, quercetina y kaempferol en presencia de diferentes tipos de CDs, frente a la oxidación enzimática.
4. Cálculo de las constantes de complejación (K_C) entre miricetina, quercetina y kaempferol y diferentes tipos de CDs, mediante el análisis de los cambios producidos en sus propiedades fisicoquímicas tras ser complejados.
5. Evaluación de los métodos empleados para el cálculo de las constantes de complejación. Selección del método óptimo para los flavonoles objeto de estudio.
6. Estudio del efecto de la inclusión de miricetina, quercetina y kaempferol en CDs, sobre su actividad antioxidante.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. CÁLCULO DE K_C

1.1.1. Reactivos

Peroxidasa de rábano picante (HPR) (246 unidades/mg), miricetina, quercetina y kaempferol fueron proporcionados por Sigma (Madrid, España). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fue suministrado por Aldrich (Madrid, España). Las ciclodextrinas (CDs) (α -, β -, γ -, G_2 - β -, y HP- β -CDs) fueron proporcionadas por TCI (Antwerp, Bélgica). El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

1.1.2. Método enzimático

El cálculo de K_C entre miricetina, quercetina ó kaempferol y diferentes tipos de CDs, se llevó a cabo estudiando el efecto de la presencia de CDs, en la velocidad de oxidación de cada uno de los flavonoles por HPR, en presencia de H_2O_2 .

La solución de H_2O_2 se preparó diariamente y su concentración fue calculada utilizando su coeficiente de extinción molar a 240 nm ($\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Nelson y Kiesow, 1972).

La actividad enzimática se midió en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV- 063, en el máximo de absorción de cada producto de oxidación, 300 nm en el caso de miricetina y quercetina (**Figuras III.1. y III.2.**) y 315 nm en el caso de kaempferol (**Figura III.3.**).

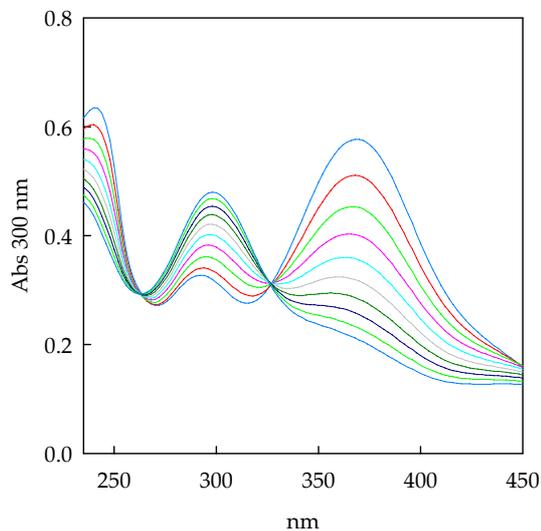


Figura III.1.: Oxidación de miricetina por HPR en presencia de H_2O_2 . El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μ M H_2O_2 , 0.1 unidades de HPR y concentraciones crecientes de miricetina.

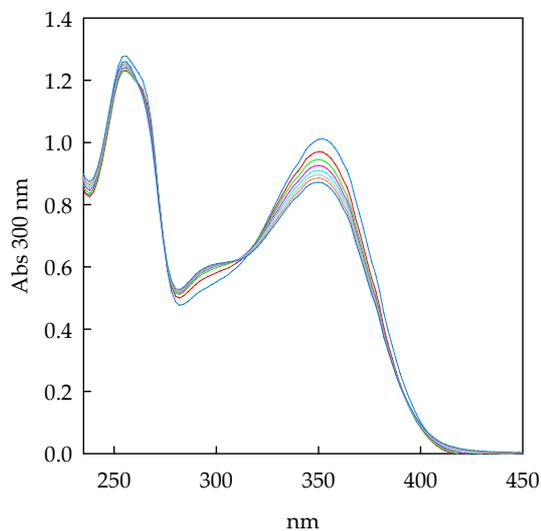


Figura III.2.: Oxidación de quercetina por HPR en presencia de H_2O_2 . El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μ M H_2O_2 , 0.037 unidades de HPR y concentraciones crecientes de quercetina.

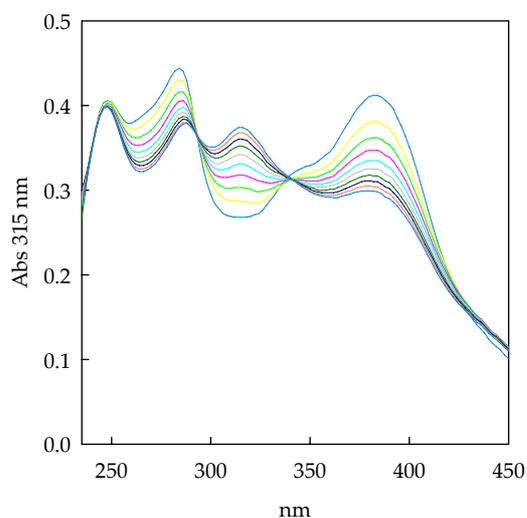


Figura III.3.: Oxidación de kaempferol por HPR en presencia de H_2O_2 . El medio de reacción contenía tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, 400 μM H_2O_2 , 0.37 unidades de HPR y concentraciones crecientes de kaempferol.

El pH óptimo para la oxidación de miricetina y quercetina por HPR en presencia de H_2O_2 fue 4.5, mientras que para kaempferol fue 9.0 (Figuras III.4.- III.6.).

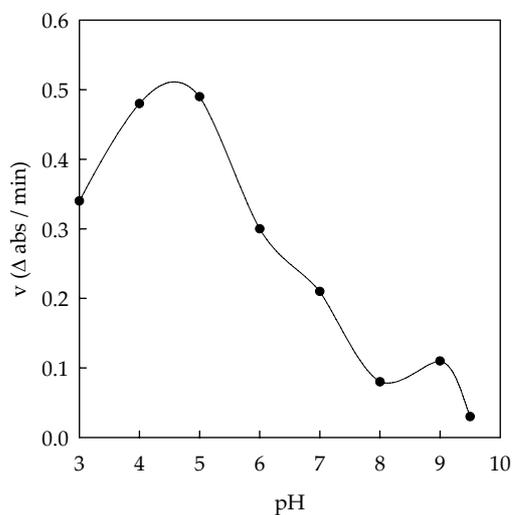


Figura III.4.: Efecto de la variación de pH en la oxidación de miricetina por HPR. Los tampones utilizados fueron acetato sódico 100 mM de pH 3.0 a 4.0, fosfato sódico 100 mM de pH 5.0 a 7.0 y borato sódico 100 mM de pH 8.0 a 9.5.

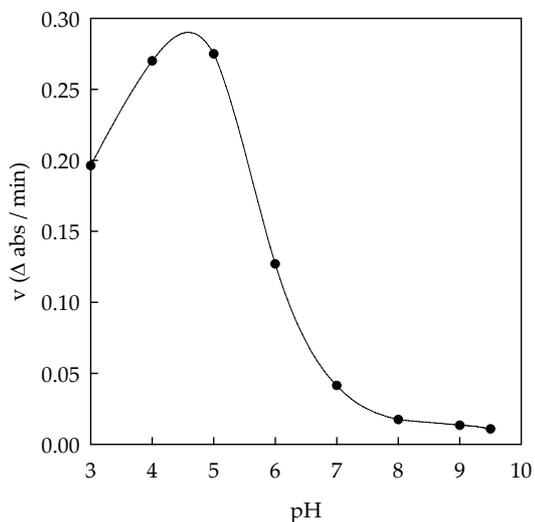


Figura III.5.: Efecto de la variación de pH en la oxidación de quercetina por HPR. Los tampones utilizados fueron acetato sódico 100 mM de pH 3.0 a 4.0, fosfato sódico 100 mM de pH 5.0 a 7.0 y borato sódico 100 mM de pH 8.0 a 9.5.

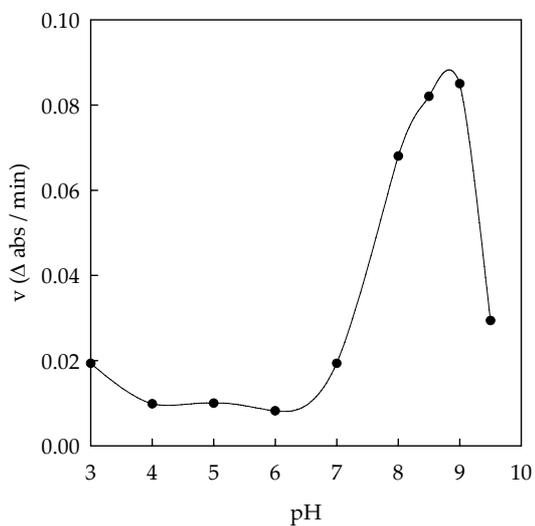


Figura III.6.: Efecto de la variación de pH en la oxidación de kaempferol por HPR. Los tampones utilizados fueron acetato sódico 100 mM de pH 3.0 a 4.0, fosfato sódico 100 mM de pH 5.0 a 7.0 y borato sódico 100 mM de pH 8.0 a 9.5.

El medio de reacción estándar a 25 °C para miricetina y quercetina contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μM de H_2O_2 , 60 μM de miricetina o quercetina y 0.1 unidades de HPR en el caso de miricetina ó 0.037 en el caso de quercetina, en un volumen final de 1 mL.

El medio de reacción estándar para la oxidación de kaempferol contenía tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, 400 μM de H_2O_2 , 21 μM de kaempferol y 0.37 unidades de HPR, en un volumen final de 1 mL.

La presencia de concentraciones crecientes de CDs en el medio de reacción provoca una inhibición en la velocidad de oxidación del flavonol. Suponiendo que el flavonol libre (miricetina, quercetina y kaempferol) es la única forma de sustrato que puede utilizar HPR, la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten puede expresarse en función de la concentración de flavonol libre ($[\text{flavonol}]_f$):

$$v = \frac{V_m [\text{flavonol}]_f}{K_M + [\text{flavonol}]_f} \quad \text{[III.1.]}$$

La $[\text{flavonol}]_f$ puede expresarse en función de los dos únicos parámetros conocidos $[\text{flavonol}]_t$ y $[\text{CD}]_t$, donde el subíndice t representa la concentración total de compuesto. Para ello, suponemos que sólo una molécula de flavonol se puede introducir en una molécula de CDs (estequiometría 1:1) y por lo tanto, el equilibrio puede ser expresado como:



donde la constante de complejación es definida como:

$$K_c = \frac{[\text{flavonol} - \text{CD}]}{[\text{flavonol}]_f [\text{CD}]_f} \quad \text{[III.3.]}$$

Teniendo en cuenta los balances de materia de $[\text{flavonol}]_t$ y $[\text{CD}]_t$:

$$[\text{flavonol}]_t = [\text{flavonol}]_f + [\text{flavonol} - \text{CD}] \quad \text{[III.4.]}$$

$$[\text{CD}]_t = [\text{CD}]_f + [\text{flavonol} - \text{CD}] \quad \text{[III.5.]}$$

y la ecuación [III.3.], $[\text{CD}]_f$ y $[\text{flavonol} - \text{CD}]$ puede ser expresada como:

$$[\text{CD}]_f = \frac{[\text{flavonol}]_t - [\text{flavonol}]_f}{K_c [\text{flavonol}]_f} \quad \text{[III.6.]}$$

$$[\text{flavonol} - \text{CD}] = K_c [\text{flavonol}]_f [\text{CD}]_f \quad \text{[III.7.]}$$

Sustituyendo estas dos ecuaciones en la ecuación [III.4.], se obtiene la siguiente relación cuadrática:

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

Despejando la $[\text{flavonol}]_f$, se obtiene:

$$[\text{flavonol}]_f = \left(-([\text{CD}]_t K_c - [\text{flavonol}]_t K_c + 1) + \sqrt{([\text{CD}]_t K_c - [\text{flavonol}]_t K_c + 1)^2 + 4K_c [\text{flavonol}]_t} \right) / 2K_c \quad \text{[III.9.]}$$

Esta $[\text{flavonol}]_f$ puede ser sustituida en la ecuación [III.1.], para dar:

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

[III.10.]

Esta ecuación [III.10.], se utilizará para ajustar los datos experimentales de inhibición de la oxidación de cada flavonol, en presencia de concentraciones crecientes de CDs.

1.1.3. Método de solubilidad

Los estudios de solubilidad de los 3 flavonoles, en presencia de CDs, se realizaron de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors, en 1965.

Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de concentraciones crecientes de α -, β -, γ -, G_2 - β -, y HP- β -CDs, hasta una concentración de 100 mM (en el caso de β -CDs hasta 15 mM que es su límite de solubilidad en agua), en un volumen total de 10 mL. En el caso de miricetina y quercetina las disoluciones se prepararon en tampón acetato sódico 100 mM, a pH 4.5 y en el caso de kaempferol, en tampón borato sódico 100 mM, a pH 9.0.

A cada una de las disoluciones se le adicionó una cantidad saturante de flavonol y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos, a 25 °C, hasta alcanzar el equilibrio. Una vez pasado este tiempo, las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.2 μ m para eliminar el exceso de flavonol (flavonol no disuelto).

Para cuantificar la cantidad de flavonol disuelta en cada filtrado, se rompieron los complejos flavonol-CDs adicionando el 80% de etanol. Posteriormente, cada una de las disoluciones se introdujo en el espectrofotómetro, midiendo su absorbancia en el máximo de absorción de cada flavonol. La concentración de flavonol en cada disolución se determinó mediante la ley de Lambert-Beer: Abs: ϵ .c.d, calculando los coeficientes de extinción molar al 80% de etanol, de cada uno de los flavonoles: Miricetina (ϵ_{378}) = 22370 M⁻¹ cm⁻¹) (**Figura III.7.**), quercetina (ϵ_{362}) = 12790 M⁻¹ cm⁻¹) (**Figura III.8.**) y kaempferol (ϵ_{370}) = 22890 M⁻¹ cm⁻¹) (**Figura III.9.**).

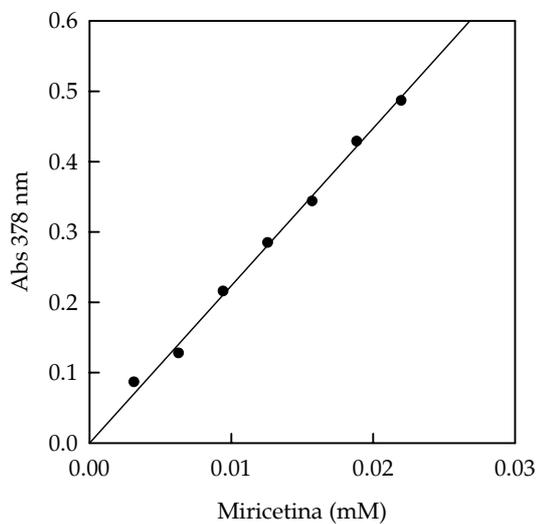


Figura III.7.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de miricetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 378 nm ($22370 M^{-1} cm^{-1}$).

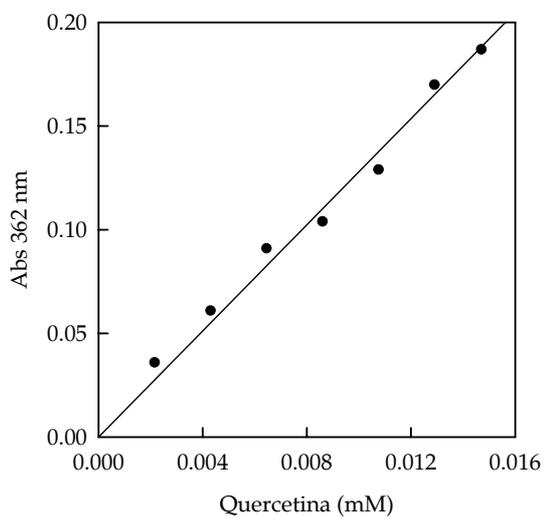


Figura III.8.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de quercetina al 80% de etanol en su máximo de absorción, 362 nm ($12790 M^{-1} cm^{-1}$).

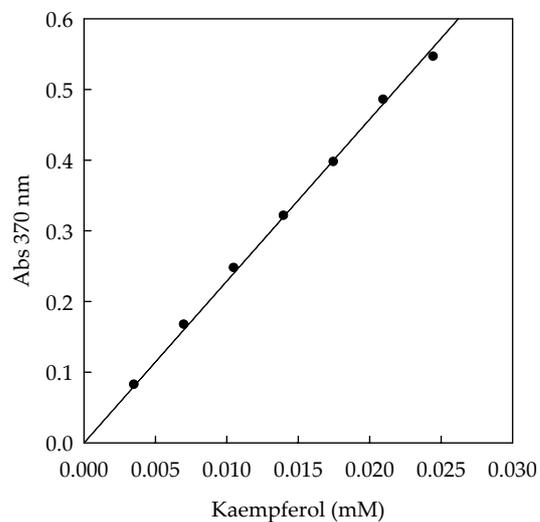


Figura III.9.: Cálculo del coeficiente de extinción molar de kaempferol al 80% de etanol en su máximo de absorción, 370 nm ($22890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Una vez calculadas las concentraciones de flavonol disueltas en cada muestra, se representaron frente a la concentración de CDs presente en cada caso (diagrama de fases).

El valor de K_c entre cada flavonol y CDs se calculó a partir de los diagramas de fases mediante la siguiente ecuación (Higuchi y Connors, 1965):

$$K_c = \frac{\text{pendiente}}{S_0(1 - \text{pendiente})} \quad \text{[III.11.]}$$

donde S_0 es la solubilidad del flavonol en el medio y "pendiente" es la pendiente de la recta obtenida en el diagrama de fases, derivada del estudio de solubilidad de cada uno de ellos.

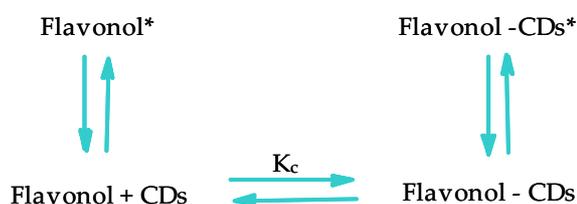
La eficacia de la complejación (CE), de cada flavonol se calculó utilizando la siguiente ecuación (Lucas-Abellán y col., 2008a):

$$CE = \frac{[flavonol - CD]}{[CD]} = S_o \times K_c \quad \text{[III.12.]}$$

1.1.4. Método fluorimétrico

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro RF Shimadzu 5301 PC. El medio de reacción contenía una concentración de miricetina, quercetina y kaempferol soluble en agua (10, 10 y 21 μM , respectivamente) y concentraciones crecientes de diferentes tipos de CDs (α -, β -, γ -, G_2 - β - y HP- β -CDs), preparadas en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5 en el caso de miricetina y quercetina y en tampón borato sódico 100 mM, pH 9.0 en el caso de kaempferol, en un volumen final de 3 mL. Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C. El espectro de emisión de fluorescencia de miricetina y quercetina se registró en el intervalo de 400-600 nm, utilizando una λ de excitación de 370 nm. En el caso del kaempferol, el espectro de emisión de fluorescencia se registró en el intervalo de 330-700 nm, utilizando una λ de excitación de 351 nm. La adición de CDs al medio de reacción, provocó un aumento de la intensidad de fluorescencia en el caso de miricetina y quercetina. Sin embargo, se registró una disminución de la intensidad de fluorescencia en el caso de kaempferol, debido a la formación de complejos de inclusión entre el flavonol y las CDs.

El proceso se puede describir mediante el siguiente equilibrio:



Flavonol* y Flavonol-CDs* son el flavonol libre y complejo en su estado excitado. Estas son las especies fluorescentes y no hay proceso de asociación-disociación en el estado excitado. K_c es la constante de complejación tal y como se define en el método enzimático.

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

$$F = F_0 + \frac{(F_\infty - F_0)K_c [CDs]_f}{1 + K_c [CDs]_f} \quad [\text{III.13.}]$$

donde F_∞ es la intensidad de la fluorescencia cuando todo el flavonol ha sido complejoado en CDs y F_0 es la fluorescencia del flavonol en ausencia de CDs. La ecuación de Benesi-Hildebrand (III.14.) o doble reciproca, permite linealizar la ecuación III.13., pudiendo obtener el valor de K_C dividiendo el corte con el eje de las Y entre la pendiente de la recta (Benesi y Hildebrand, 1949):

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{F_\infty - F_0} + \frac{1}{(F_\infty - F_0)K_c [CDs]_f} \quad [\text{III.14.}]$$

El valor de K_C también se puede calcular utilizando la ecuación de Scatchard (III.15.), que relaciona la intensidad de fluorescencia con la concentración total de CDs (Scatchard, 1949):

$$\frac{F - F_0}{[CDs]_f} = (F_\infty - F_0)K_c - (F - F_0)K_c \quad [\text{III.15.}]$$

El valor de K_C se obtiene de la pendiente de la recta.

1.2. MEDIDA DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

1.2.1. Reactivos

Fluoresceína (FL), 2, dihidrocloruro 2'-diazobis (2-aminopropano) (AAPH) y 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox C), fueron adquiridos a

Sigma (Madrid, España). El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

1.2.2. Método ORAC-FL

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

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

La concentración de la disolución stock de Trolox C utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0.25 mM y se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4. La concentración de flavonol fue de 15 μ M, diluido en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

El radical AAPH se preparó diariamente a una concentración 127 mM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

Las medidas de capacidad antioxidante por el método ORAC-FL se llevaron a cabo en un lector de placas Synergy-HT, Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, EE.UU.), utilizando placas de 96-pocillos de poliestireno con paredes negras y fondo claro (Nalge Nunc International). La fluorescencia de las muestras se leyó por el fondo claro de la placa, usando una longitud de onda de excitación de 485/20 nm, y un filtro de emisión de 528/20 nm. El lector de placas fue controlado por el software KC4, versión 3.4.

La capacidad de absorción del radical se determinó por el método descrito por Dávalos y col., en 2004, con ligeras modificaciones. La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4, en un volumen final de 200 μ L, compuesto por: 100 μ L de solución de FL (con una concentración final de 3 nM), 0-70 μ L de solución de flavonol en ausencia y presencia de CDs, 30 μ L de AAPH (con una concentración final de 19 mM) y el resto, hasta completar los 200 μ L, tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

La mezcla de reactivos en ausencia del radical AAPH, se incubó durante 30 minutos a 37 °C, dispensando inmediatamente después la solución del radical, usando para ello una pipeta multicanal. Seguidamente, la microplaca se colocó en el

lector y la fluorescencia fue registrada cada 1' y 14'' durante 2 horas. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura. En cada ensayo, se realizó un blanco que contenía FL y AAPH con tampón fosfato sódico y se prepararon ocho disoluciones de calibración, utilizando como antioxidante Trolox C (6.25, 12.5, 15.0, 18.75, 21.25, 25, 27.5 y 31.25 μM).

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

Los resultados fueron expresados como equivalentes de Trolox en μM , utilizando la curva de calibración de Trolox C ($y = 0.12 + 1.43 x$) (Figuras III.10. y III.11.).

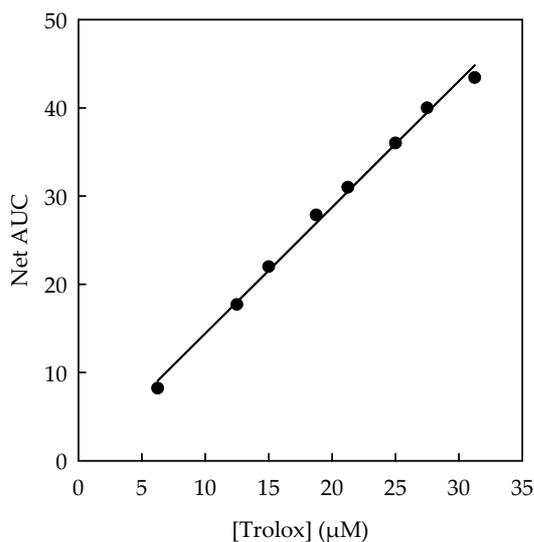


Figura III.10.: Regresión lineal de Net AUC con diferentes concentraciones de Trolox C. $\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}$.

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

$$AUC = 1 + \sum_{i=1.14}^{i=120} f_i / f_0 \quad [\text{III.16.}]$$

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

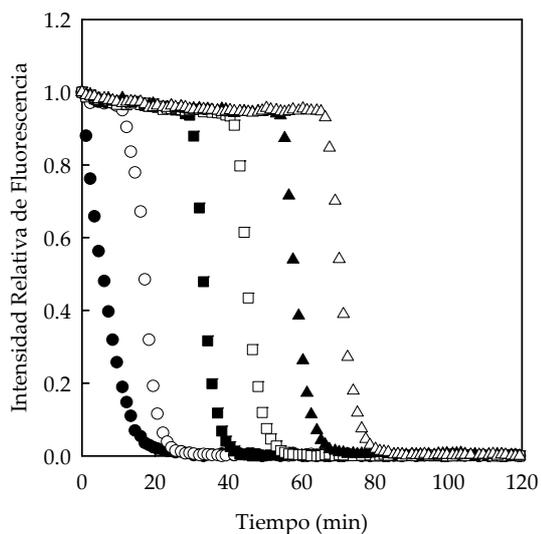


Figura III.11.: Curva de caída de la FL inducida por AAPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox C.

CAPÍTULO IV. MIRICETINA

1. MIRICETINA

1.1. INTRODUCCIÓN

Miricetina (3, 3', 4', 5, 5', 7-hexahidroxiflavona) (**Figura IV.1.**) es un flavonol natural de consumo habitual en nuestra dieta. Se encuentra principalmente en té, cebolla, bayas y uvas, así como en el vino tinto (German y Walzem, 2000; Hakkinen y col., 1999; Sellappan y col., 2002), sobre todo en forma de glucósidos (Canadá y col., 1990; Koeppen y Herrmann, 1977).

La ingesta de miricetina se ha estimado en 0.98 mg/día en mujeres y 1.1 mg/día en hombres (Lin y col., 2006).

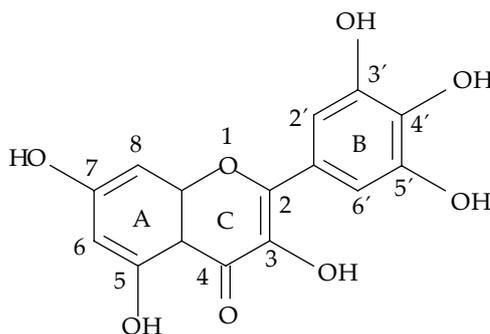


Figura IV.1.: Estructura química de miricetina.

1.1.1. Miricetina y salud

Se ha demostrado que este flavonol tiene muchas propiedades terapéuticas, atribuidas principalmente a su actividad antioxidante (Robak y Gryglewski, 1988).

Una de sus propiedades más estudiadas, es su actividad anticancerígena. Existen estudios que demuestran que inhibe tanto la transformación, como la proliferación celular e induce la apoptosis en células tumorales (Kumamoto y col., 2009; Ko y col., 2005; Siegelin y col., 2009). Aunque los efectos antiproliferativos de los

polifenoles en general, y los flavonoides e isoflavonoides en particular, están más que demostrados, en cultivos celulares existen relativamente pocos datos en relación con su actividad antiproliferativa *in vivo*, y no se conoce prácticamente nada de la relevancia clínica de esta bioactividad (Birt y col., 2001). En un estudio realizado en Finlandia, con 10054 voluntarios, se puso de manifiesto que los hombres con mayor ingesta de miricetina presentaban menor incidencia de cáncer de próstata (Knekt y col., 2002).

Se han descrito diferentes mecanismos por los que los flavonoides inducen la inhibición de la agregación plaquetaria. Las plaquetas tienen una función muy importante en el proceso de coagulación, ya que interaccionan con la red de fibrina, liberando mediadores que aceleran la coagulación y aumentan la retracción del coágulo sanguíneo. Para la formación de trombos sanguíneos, es necesario la activación y agregación de las plaquetas, efecto que puede ser contrarrestado por flavonoides como miricetina, ya que ejercen un efecto antiagregante plaquetario que puede ser debido tanto a la inhibición de la formación de tromboxano como al antagonismo de los receptores del mismo (Tzeng y col., 1991). El tromboxano A₂ (sintetizado por la enzima ciclooxigenasa 1 (COX1) en las plaquetas) es un potente vasoconstrictor, e inductor de la agregación plaquetaria (Hamberg y col., 1974; Hamberg y col., 1975); mientras que la prostaciclina (sintetizada por la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2) en células endoteliales vasculares) actúa como un antiagregante plaquetario y 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, se asocia a una mayor probabilidad de formación de trombos, incrementando el riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares (Mukherjee y col., 2001; Davies y Jamali, 2004). En la bibliografía, encontramos diferentes estudios que demuestran que miricetina y quercetina presentan efectos estimulantes directos sobre la actividad catalítica de COX1 y COX2 *in vivo*, revelando además que ambos flavonoles pueden actuar como estimuladores o co-sustratos de ambas enzimas (Bai y Zhu, 2010).

La oxidación de proteínas de baja densidad (LDL) está directamente asociada a la probabilidad de sufrir enfermedades coronarias e infarto de miocardio (Holvoet, 2004). Rankin y col., en 1993, describieron que altas concentraciones de miricetina pueden modificar la concentración de LDL a través de procesos que implican la modificación covalente de la apolipoproteína B100 (apo B100). La utilidad fisiológica

de estas proteínas es favorecer el transporte de los lípidos por el torrente sanguíneo, así como el anclaje a receptores celulares para que las células tengan capacidad de absorber los lípidos necesarios para su funcionamiento.

Recientemente, se ha descrito la actividad citoprotectora de miricetina frente al estrés oxidativo, ya que es una molécula muy efectiva en el atrapamiento de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shimmyo y col., 2008; Dajas y col., 2003; Fawcett y col., 2002; Molina-Jiménez y col., 2004; Molina-Jiménez y col., 2005). Así, miricetina puede minimizar los efectos adversos del estrés oxidativo, protegiendo a las células del daño que podrían ocasionarle los radicales libres, mediante la inhibición de los ROS y la inducción de los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante de la célula, lo que permite la reparación del ADN y de los lípidos dañados (Wang y col., 2010).

La resistencia a la insulina es un trastorno metabólico cuya prevalencia está aumentando de forma alarmante en las poblaciones de todo el mundo. Se ha descrito que miricetina puede ejercer beneficios terapéuticos en enfermedades cardiovasculares asociadas con diabetes mellitus, aumentando la síntesis de glucógeno hepático y normalizando la hiperglucemia en ratas (Ong y Khoo, 2000).

También se ha descrito a miricetina como agente antiviral y antibiótico. Se ha demostrado que miricetina inhibe la transcriptasa inversa de 2 tipos de virus de leucemia en ratones (leucemia murina Moloney y leucemia murina Rauscher) y del virus de inmunodeficiencia adquirida en humanos (VIH) (Ono y col., 1990).

Por los beneficios saludables que puede aportar miricetina, sería interesante poder elaborar alimentos funcionales que la contengan, pero el principal obstáculo que debemos solventar es su escasa solubilidad en agua, unido a su inestabilidad frente a diferentes factores como calor, luz y oxígeno; parámetros importantes para el procesado y conservación de alimentos. Estos inconvenientes podrían solventarse mediante la complejación de miricetina en CDs, ya que dicho proceso aumenta su solubilidad acuosa y la protege de la degradación por diferentes factores.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1. Cálculo de K_C

Las K_C entre miricetina y diferentes tipos de CDs, fueron calculadas usando diferentes métodos, con el fin de comparar los valores obtenidos con cada uno de ellos y determinar el método óptimo para dicho cálculo.

1.2.1.1. Método enzimático

En primer lugar, se utilizó el método enzimático para calcular el valor de K_C entre miricetina y distintos tipos de CDs. Para ello, se estudió el efecto de la adición de α -, β - y γ -CDs al medio de oxidación de miricetina por HPR en presencia de H_2O_2 , en medio ácido. La presencia de β -CDs en el medio de oxidación dio como resultado una disminución de la velocidad de oxidación de miricetina, mientras que en presencia de α - y γ -CDs, no se observó dicho comportamiento (**Figura IV.2.**).

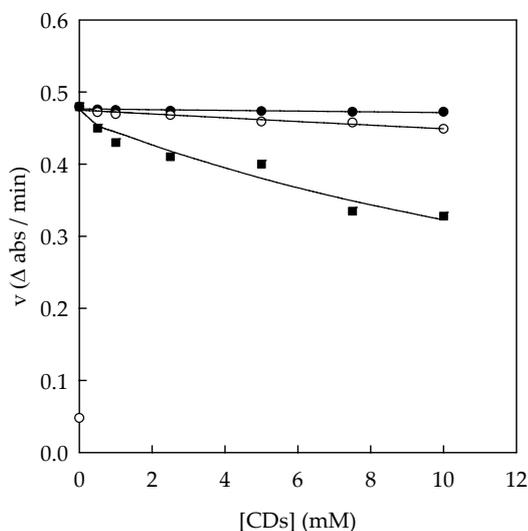


Figura IV.2.: Efecto de la adición al medio de diferentes tipos de CDs sobre la oxidación de miricetina por HPR ((●) α -CDs, (■) β -CDs, y (○) γ -CDs). El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 60 μ M de miricetina, 400 μ M H_2O_2 , 0.1 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs.

La disminución de la actividad enzimática observada en la **Figura IV.2.** nos indicó que miricetina estaba siendo complejada por β -CDs, dejando así de estar disponible para la enzima. Miricetina no fue complejada por α - y γ -CDs, probablemente debido al tamaño de la cavidad hidrofóbica de estos dos tipos de CDs y por ello no se vio afectada la velocidad de oxidación del flavonol (**Figura IV.2.**).

El efecto inhibitor de β -CDs fue estudiado a diferentes concentraciones de miricetina, obteniendo como resultado una disminución en la actividad de la enzima a medida que aumentaba la concentración de CDs en el medio de reacción en todas las concentraciones de miricetina estudiadas (**Figura IV.3.**).

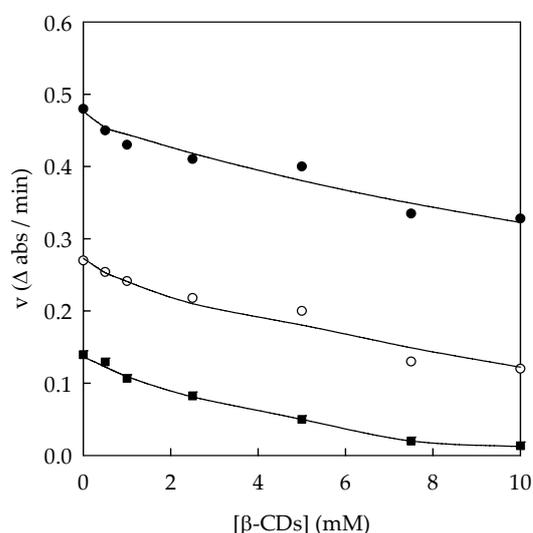


Figura IV.3.: Efecto de diferentes concentraciones de β -CDs en la oxidación de miricetina por HPR. El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μ M H_2O_2 , 0.1 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs: (●) 60 μ M, (○) 30 μ M, y (■) 15 μ M de miricetina.

El valor de K_C entre β -CDs y miricetina fue calculado ajustando los datos experimentales obtenidos en la **Figura IV.3.** a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten modificada (**Ecuación III.10.**). Esta ecuación nos muestra una relación no lineal entre la velocidad de reacción y la concentración de CDs presentes en el medio, al igual que los datos experimentales mostrados en la **Figura IV.3.** El valor de K_C obtenido para miricetina y β -CDs fue de $125 \pm 25 M^{-1}$ (**Tabla IV.1.**).

Tabla IV.1.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, obtenidos por el método enzimático.

Flavonol	β -CDs $K_C M^{-1}$	HP- β -CDs $K_C M^{-1}$	G ₂ - β -CDs $K_C M^{-1}$
Miricetina	125 \pm 25	830 \pm 98	335 \pm 55

Una vez estudiada la complejación de miricetina en CDs nativas, pasamos a estudiar la complejación del flavonol con CDs modificadas de β -CDs. Para este estudio se utilizaron 2-hidroxipropil- β -CDs (HP- β -CDs) y maltosil- β -CDs (G₂- β -CDs), ya que son más solubles que su parental β -CDs.

Cuando se llevó a cabo la oxidación de miricetina por HPR en presencia de HP- β y G₂- β -CDs, se observó un efecto inhibitor mayor al descrito previamente para β -CDs (Figuras IV.4. y IV.5.).

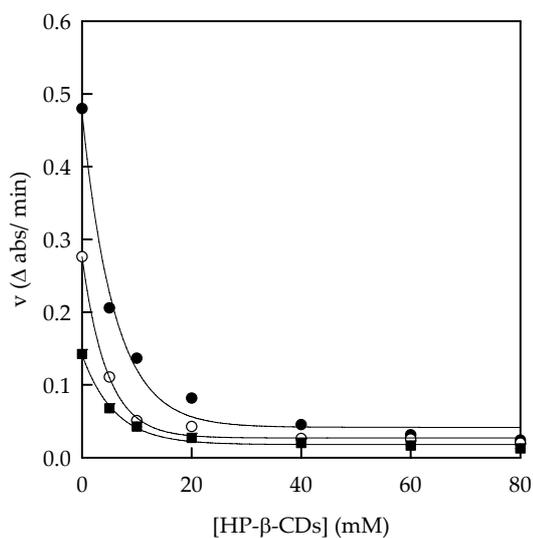


Figura IV.4.: Efecto de diferentes concentraciones de HP- β -CDs en la oxidación de miricetina por HPR. El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μ M H₂O₂, 0.1 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs. (●) 60 μ M miricetina, (○) 30 μ M miricetina, (■) 15 μ M miricetina.

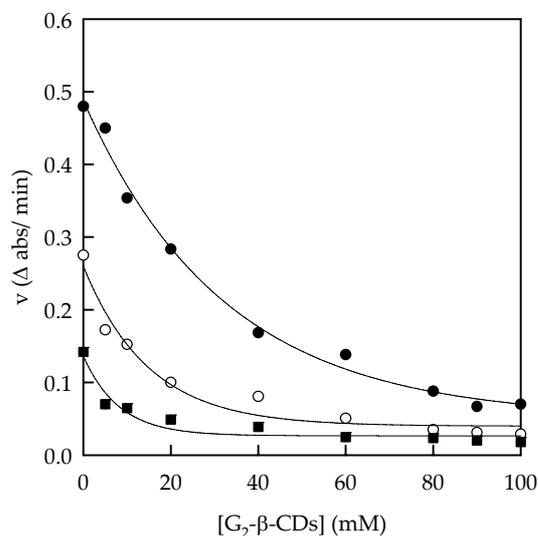


Figura IV.5.: Efecto de diferentes concentraciones de G_2 - β -CDs en la oxidación de miricetina por HPR. El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μ M H_2O_2 , 0.1 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs. (●) 60 μ M miricetina, (○) 30 μ M miricetina, (■) 15 μ M miricetina.

Los valores de K_C fueron calculados ajustando los datos experimentales de las **Figuras IV.4.** y **IV.5.** por regresión no lineal, utilizando la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten modificada (**Ecuación III.10.**), y los valores obtenidos se presentan en la **Tabla IV.1.**

Tal y como se observa en la **Tabla IV.1.**, los valores de K_C obtenidos para HP- β - y G_2 - β -CDs fueron superiores a los obtenidos para su parental β -CDs. Esto refleja que miricetina presenta una mayor afinidad por las CDs modificadas que por β -CDs, siendo HP- β -CDs las que presentaron mayor valor de K_C (6 veces superior que β -CDs).

Llegados a este punto nos quedaba por aclarar si HPR sólo estaba utilizando como sustrato miricetina libre o si por el contrario, también trabajaba sobre el complejo miricetina-CDs. Para ello, se calculó la concentración de miricetina libre en cada uno de los puntos de las **Figuras IV.4.** y **IV.5.**, utilizando la **Ecuación III.9.**, y se representó frente a la velocidad de reacción en la **Figura IV.6.**

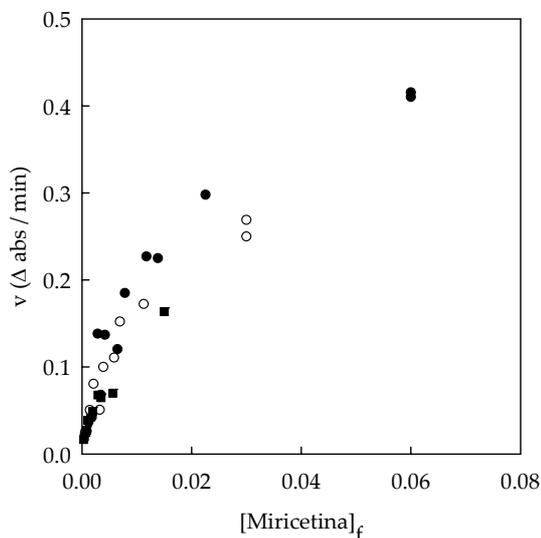


Figura IV.6.: Efecto de la concentración de miricetina libre en la actividad HPR. (●) 60 μM miricetina total, (○) 30 μM miricetina total y (■) 15 μM miricetina total.

Esta representación mostró que los puntos de las diferentes curvas de las Figuras IV.4. y IV.5. que presentaban la misma actividad enzimática, tenían la misma concentración de miricetina libre, indicando claramente que la enzima utiliza como sustrato sólo miricetina libre.

1.2.1.2. Método de solubilidad

Con el fin de establecer la validez del método enzimático para la determinación de K_C , se llevaron a cabo estudios de solubilidad, utilizando el método descrito por Higuchi y Connors, en 1965.

El diagrama de fases de miricetina se realizó en tampón acetato sódico 100 mM a pH 4.5 con β -, HP- β - y G₂- β -CDs, con el fin de comparar los valores de K_C , con los obtenidos por el método enzimático. Para ello, se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de β -, HP- β - y G₂- β -CDs y se saturaron con miricetina. Estas disoluciones se mantuvieron en un baño de ultrasonidos, a 25 °C, hasta que se alcanzó el equilibrio y se cuantificó la concentración de miricetina soluble en cada caso, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos (Capítulo III).

El diagrama de fases de miricetina presentó una tendencia lineal para los 3 tipos de CDs, entre el aumento de la concentración de miricetina y el aumento de la concentración de CDs (Tipo A_L), indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados era 1:1 en todos los casos (**Figura IV.7.**).

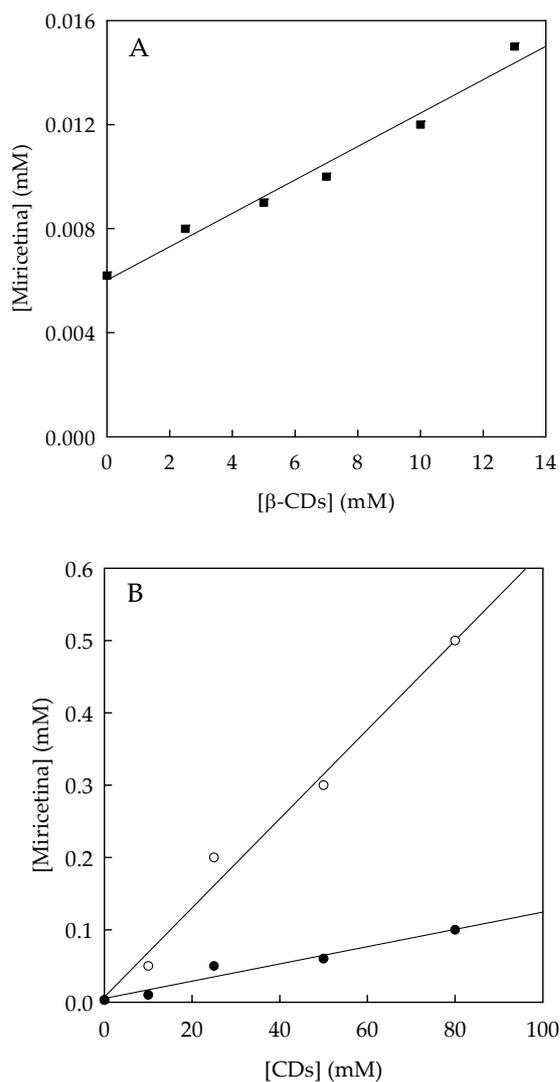


Figura IV.7.: (A) Diagrama de fases de miricetina con (■) β -CDs en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5 a 25 °C. (B) Diagrama de fases de miricetina con (○) HP- β -CDs y (●) G₂- β -CDs en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5 a 25 °C.

Para calcular el valor de K_C en cada caso utilizamos la ecuación descrita por Higuchi y Connors, en 1965 (**Ecuación III.11.**) y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.2.**

Tabla IV.2.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, calculados mediante el método de solubilidad.

Flavonol	β -CDs $K_C M^{-1}$	HP- β -CDs $K_C M^{-1}$	G ₂ - β -CDs $K_C M^{-1}$
Miricetina	110 ± 12	850 ± 99	380 ± 32

Los valores de K_C obtenidos usando el método de solubilidad (**Tabla IV.2.**) fueron similares a los obtenidos usando el método enzimático (**Tabla IV.1.**) (β -, 125 ± 25, HP- β -, 830 ± 98 y G₂- β -CDs, 335 ± 55), lo que indica la validez de ambos métodos.

Sin embargo, es importante señalar que el valor de K_C no depende solo del aumento de la solubilidad de miricetina al ser complejado con CDs, sino que también depende del producto solubilidad (S_0) de miricetina en dicho medio. Por ello determinamos la eficacia de la complejación (CE) para cada tipo de CDs. Para los complejos con estequiometría 1:1, la CE puede ser calculada a partir de la pendiente del diagrama de fases (**Ecuación III.12.**), ya que tiene en cuenta tanto la solubilidad de miricetina como la K_C . El valor de CE obtenido para miricetina con los diferentes tipos de CDs se presenta en la **Tabla IV.3.**, siendo el valor más alto el de HP- β -CDs.

Tabla IV.3.: Eficacia de complejación (CE) entre miricetina y distintos tipos de CDs.

Flavonol	S_0 (mM)	CE β -CDs	CE HP- β -CDs	CE G ₂ - β -CDs
Miricetina	0.00625	0.68 ± 0.08	5.3 ± 0.63	2.3 ± 0.27

Tal y como indica la **Tabla IV.3.**, HP- β son las CDs que poseen una mayor eficacia de complejación.

1.2.1.3. Método fluorimétrico

Otro método utilizado para calcular la K_C entre miricetina y distintos tipos de CDs, fue el método fluorimétrico. En la encapsulación molecular, la mayoría de los métodos utilizados para determinar la K_C entre el agente complejante y el analito, se basan en los cambios producidos en las propiedades físico-químicas del analito complejoado. Uno de estos métodos consiste en estudiar los cambios en la intensidad de fluorescencia del analito cuando ha sido complejoado (Muñoz de la Peña y col., 2007).

En este método la K_C se calculó mediante el estudio de la modificación del espectro de fluorescencia de miricetina tras adicionar CDs al medio de complejación en tampón acetato sódico 100 mM a pH 4.5.

En primer lugar se estudió el efecto de la presencia de CDs nativas (α -, β - y γ -CDs), en el espectro de fluorescencia del miricetina. La adición de estos tipos de CDs al medio no varió la intensidad de fluorescencia de miricetina (datos no mostrados). En el caso de α - y γ -CDs, este resultado confirma que estas CDs no forman complejos con miricetina, tal y como observamos al hacer el estudio con el método enzimático. En el caso de β -CDs, tampoco se produjo ningún cambio en la intensidad de fluorescencia de miricetina. Como hemos comprobado con los métodos enzimático y de solubilidad, estas CDs sí son capaces de formar complejos con miricetina, pero los valores de K_C que presenta son bajos (125 ± 25 y 110 ± 12), de ahí que, la cantidad de complejos que se forman es pequeña, y no causa la suficiente variación en la intensidad de fluorescencia para poder ser detectada. Por lo tanto, este método no nos sirve para calcular la K_C entre β -CDs y miricetina.

En cambio cuando se adicionaron CDs modificadas de β -CDs (HP- β -y G₂- β -CDs) al medio de reacción, se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia de miricetina conforme aumentó la concentración de CDs en el medio (**Figura IV.8.**).

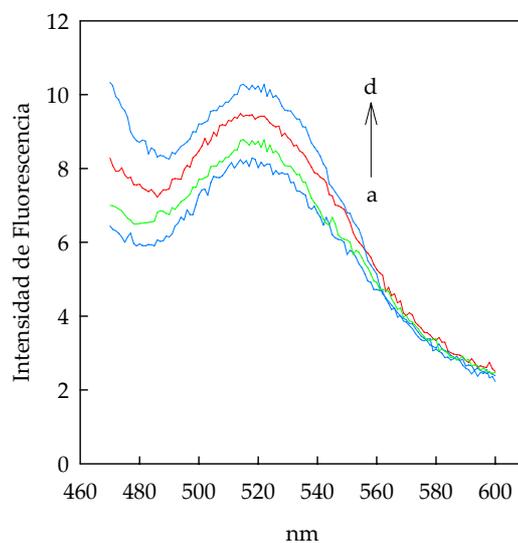


Figura IV.8.: Espectro de fluorescencia de miricetina en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, con concentraciones crecientes de HP- β -CDs, λ_{exi} 370 nm: (a) 0, (b) 1, (c) 5 y (d) 10 mM HP- β -CDs.

Este aumento en la intensidad de fluorescencia fue mayor en el caso de HP- β -CDs (**Figura IV.9.**), probablemente debido a una mayor afinidad de este tipo de CDs para formar complejos de inclusión con miricetina.

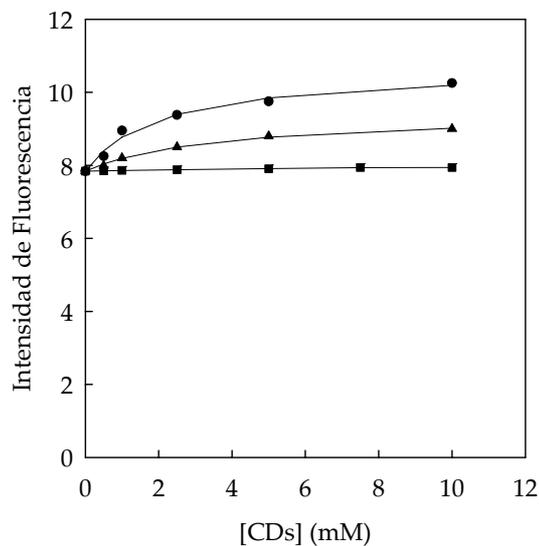


Figura IV.9.: Intensidad de fluorescencia de miricetina a 524 nm y diferentes concentraciones de CDs: (■) β -CDs, (●) HP- β -CDs y (▲) G₂- β -CDs.

El aumento de la fluorescencia fue de 1.3 y 1.1 veces para HP- β - y G₂- β -CDs, respectivamente.

La intensidad de fluorescencia de miricetina aumentó conforme aumentaba la concentración CDs hasta que todo el flavonol estuvo complejado, para permanecer constante a partir de esa concentración de CDs (**Figura IV.9.**).

Tal y como se observa en la **Figura IV.9.** la intensidad de fluorescencia de miricetina en presencia de β -CDs no mostró ninguna variación, en cambio con HP- β - y G₂- β -CDs la intensidad de fluorescencia de miricetina aumentó conforme aumentaba la concentración de CDs hasta alcanzar una meseta y permanecer constante.

Tanto la estequiometría de los complejos de inclusión formados entre miricetina y HP- β - y G₂- β -CDs, como la magnitud de sus correspondientes constantes de complejación (K_C), se pueden obtener del análisis de los datos experimentales de la **Figura IV.9.** Para calcular el valor de K_C mediante el método fluorimétrico se utilizaron las siguientes ecuaciones: Connors (**Ecuación III.13.**), Benesi-Hildebrand (**Ecuación III.14.**) y Scatchard (**Ecuación III.15.**) (Connors, 1987; Benesi y Hildebrand, 1949; Scatchard, 1949).

En primer lugar, el valor de K_C entre β -CDs y miricetina fue calculado ajustando los datos experimentales obtenidos en la **Figura IV.9.** a la ecuación de Connors (**Ecuación III.13.**) (**Tabla IV.4.**).

Tabla IV.4.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, obtenidos por el método fluorimétrico

Flavonol	Método Fluorimétrico	HP- β -CDs K_C M ⁻¹	G ₂ - β -CDs K_C M ⁻¹
	Connors	460 ± 35	255 ± 26
Miricetina	Benesi-Hildebrand	432 ± 41	250 ± 35
	Scatchard	506 ± 45	269 ± 25

Esta representación nos muestra una relación no lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de CDs presentes en el medio, al igual que los datos experimentales mostrados en la **Figura IV.9**. Los valores de K_C obtenidos para miricetina y HP- β - y G₂- β -CDs fueron de $460 \pm 35 \text{ M}^{-1}$ y $255 \pm 26 \text{ M}^{-1}$ respectivamente (**Tabla IV.4**).

Con la ecuación Benesi-Hildebrand (**Ecuación III.14**) también se puede calcular el valor de K_C . La representación doble recíproca de Benesi-Hildebrand, de los datos experimentales de la **Figura IV.9**, permite calcular el valor de K_C por división del valor de la pendiente por el intercepto con el eje Y (**Figura IV.10**).

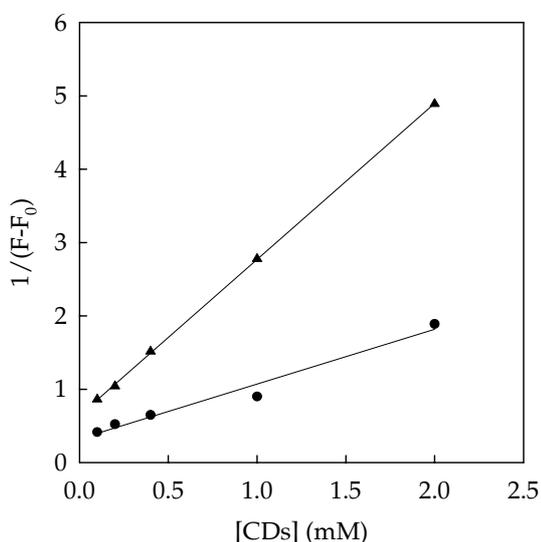


Figura IV.10.: Representación de Benesi-Hildebrand para miricetina con (●) HP- β -CDs y (▲) G₂- β -CDs.

Esta representación dio lugar a dos líneas rectas, indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados, entre miricetina y las CDs estudiadas, era 1:1.

El problema de este tipo de representación es su sensibilidad a concentraciones bajas de CDs, pudiendo variar mucho el valor de K_C obtenido.

El valor de K_C para HP- β -CDs fue $432 \pm 41 \text{ M}^{-1}$, mientras que G₂- β -CDs presentó un valor menor de K_C ($250 \pm 35 \text{ M}^{-1}$) (**Tabla IV.4**).

Los datos experimentales de fluorescencia (**Figura IV.9.**), también se utilizaron para determinar los valores de K_C entre miricetina y CDs, utilizando la ecuación de Scatchard (Scatchard, 1949). En este caso la relación entre el aumento de la intensidad de fluorescencia ($F - F_0$) y la concentración de CDs está dada por la **Ecuación III.15.**

La representación de los datos de la **Figura IV.9.** como $(F - F_0) / [CDs]$ frente $(F - F_0)$ dio lugar a 2 líneas rectas, indicando nuevamente que la estequiometría de los complejos de inclusión formados entre miricetina y HP- β - y G₂- β -CDs era 1:1 (**Figura IV.11.**).

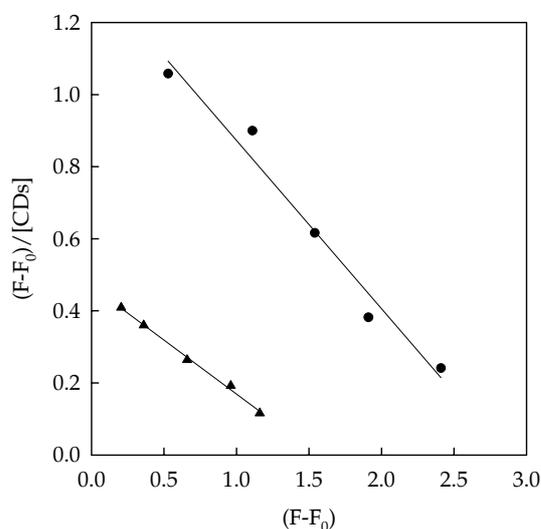


Figura IV.11.: Representación de Scatchard para miricetina con (●) HP- β -CDs y (▲) G₂- β -CDs.

Los valores de K_C obtenidos, fueron similares a los obtenidos por Connors y Benesi-Hildebrand (**Tabla IV.4.**), corroborando que HP- β -CDs, con un valor de K_C de $506 \pm 45 \text{ M}^{-1}$, tiene mayor afinidad por miricetina que G₂- β -CDs ($269 \pm 25 \text{ M}^{-1}$).

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.

En todos los casos, los valores de K_C obtenidos usando el método fluorimétrico fueron inferiores a los obtenidos mediante el método enzimático y el de solubilidad (**Tabla IV.5.**), que entre ellos fueron muy similares.

Tabla IV.5.: Constantes de complejación (K_C) entre miricetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, calculados mediante los métodos fluorimétrico, enzimático y solubilidad.

Método	β -CDs $K_C M^{-1}$	HP- β -CDs $K_C M^{-1}$	G ₂ - β -CDs $K_C M^{-1}$
Fluorimétrico:			
Connors	–	460 ± 35	255 ± 26
Benesi-Hildebrand	–	432 ± 41	250 ± 35
Scatchard	–	506 ± 45	269 ± 25
Enzimático	125 ± 25	830 ± 98	335 ± 55
Solubilidad	110 ± 12	850 ± 99	380 ± 32

Con el fin de determinar cual de los 3 métodos (enzimático, solubilidad o fluorimétrico) era el más adecuado para el cálculo de K_C , se llevó a cabo un ensayo (Lucas-Abellán y col., 2007; Lucas-Abellán y col., 2008d) en el que se varió tanto la concentración de miricetina, como la de CDs totales, para que al utilizar los valores de K_C obtenidos por los tres métodos y la **Ecuación III.9.**, se mantuviera constante la concentración de miricetina libre ($[miricetina]_f$) y que la tasa de oxidación de miricetina por HPR también permaneciera constante, independientemente de la concentración de miricetina total.

Como podemos observar en la **Figura IV.12.**, cuando utilizamos los valores de K_C obtenidos mediante el método enzimático o de solubilidad, los resultados fueron los esperados, ya que la actividad enzimática era independiente de las concentraciones totales de CDs y miricetina. Sin embargo cuando utilizamos los valores de K_C obtenidos mediante el método fluorimétrico, la actividad enzimática no se mantiene constante, lo que indica que la concentración de miricetina libre no es la misma en todos los casos, por lo tanto, los valores de K_C utilizados no son los correctos.

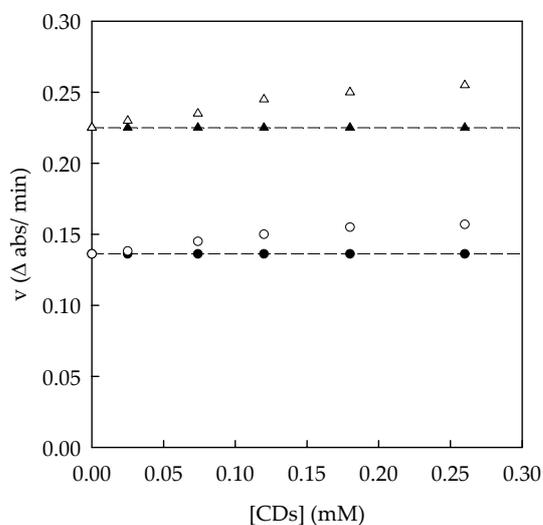


Figura IV.12.: Ensayo de CDs. La oxidación de miricetina libre se llevó a cabo en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5 y 0.1 unidades de HPR. Las concentraciones de CDs y miricetina totales usadas en cada caso para obtener 4.1 ó 13.8 μM miricetina libre fueron calculadas sustituyendo los valores de K_C en la Ecuación III.9., (●) 4.1 μM miricetina libre en presencia de HP- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (○) 4.1 μM miricetina libre en presencia de HP- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente; (▲) 13.8 μM miricetina libre en presencia de G₂- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (△) 13.8 μM miricetina libre en presencia de G₂- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente.

En conclusión, este estudio muestra claramente que miricetina puede ser complejada en CDs en medio ácido, protegiéndola de su oxidación enzimática. El estudio de inhibición de la oxidación de miricetina permite calcular su K_C con diferentes tipos de CDs. De los métodos utilizados para determinar la K_C entre miricetina y CDs, el menos idóneo ha resultado ser el método fluorimétrico, ya que infravalora el valor de K_C . De las CDs estudiadas, es importante subrayar que α - y γ -CDs no forman complejos con miricetina. HP- β -CDs fueron las más efectivas en la complejación de miricetina, mostrando un mayor valor de K_C y por tanto una mayor CE.

CAPÍTULO V. QUERCETINA

1. QUERCETINA

1.1. INTRODUCCIÓN

Entre los flavonoles de la dieta, quercetina es el más abundante y está presente de forma natural en vegetales, frutas, bebidas no alcohólicas y plantas medicinales, constituyendo aproximadamente el 60% de la ingesta total de flavonoides (Hertog y col., 1993). Es el principal flavonol presente en cebolla, manzana y té, alimentos que se han asociado, en diversos estudios epidemiológicos con propiedades saludables (Espín y Tomás-Barberán, 2005). En su estructura presenta grupos hidroxilo en las posiciones 3, 3', 4', 5 y 7 (Figura V.1.).

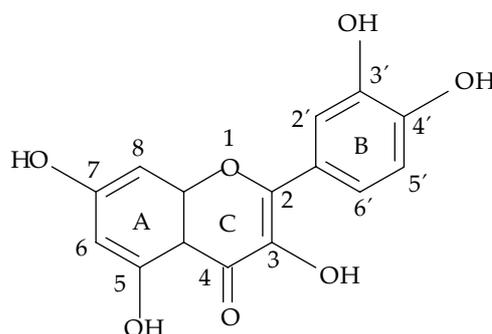


Figura V.1.: Estructura química de quercetina.

Los estudios llevados a cabo sobre su biodisponibilidad y metabolismo indican que los β -glucósidos de quercetina, presentes en la cebolla, pueden ser absorbidos en el intestino delgado, mientras que los rutinósidos de la manzana, té verde y muchos otros alimentos no se absorben en el intestino delgado, llegando al intestino grueso, donde se absorben en menor proporción al ser liberadas las agliconas, siendo degradados por la flora del colon en la mayor parte de los casos (Stahl y col., 2002).

1.1.1. Quercetina y salud

Quercetina es el flavonol que ha despertado mayor interés en relación con su actividad biológica, pues es el que está más ampliamente distribuido en alimentos de origen vegetal. Ésta actividad biológica, se ha asociado a su capacidad antioxidante debido a que muestra, *in vitro*, propiedades neutralizadoras de los radicales libres. Sin embargo, la evidencia sobre efectos antioxidantes o neutralizadores de radicales libres *in vivo* es muy escasa, y probablemente se deba a la escasa biodisponibilidad de sus metabolitos (Espín y Tomás-Barberán, 2005).

La actividad biológica de este flavonol se atribuye a la presencia de dos grupos antioxidantes en su estructura química, el grupo catecol en el anillo B y el grupo OH en posición 3 del anillo C, presentando la configuración óptima para captar radicales libres (Heijnen y col., 2002), que unido a su capacidad para formar complejos con metales (quelatos), le permite inhibir la peroxidación lipídica (Hollman y Katan, 1997; Sakanashi y col., 2008), proceso mediante el cual los ácidos grasos insaturados se convierten en radicales libres a través de la pérdida de hidrógeno (Young y McEneny, 2001), pudiendo desencadenar enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Este proceso puede ser interrumpido por compuestos antioxidantes, como quercetina, interfiriendo en las reacciones radicalarias propias del proceso oxidativo (Kahl y Hildebrandt, 1986; Hollman y Katan, 1997; Balazs y León, 1994).

Otro efecto nocivo causado por los radicales libres es la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), pudiendo dar lugar a la formación de placas de aterosclerosis, lo que lleva a enfermedad cardiovascular (Hollman y Katan, 1997). Varios estudios realizados en humanos han demostrado que quercetina inhibe la oxidación de LDL (Graf y col., 2005; Chopra y col., 2000), esto podría estar relacionado, al menos en parte, a un efecto directo de quercetina sobre las LDL, a las que se une a través de un enlace éter (R-O-R') (Hayek y col., 1997).

Los efectos que quercetina y otros polifenoles tienen sobre el metabolismo glucídico y lipídico son complejos y han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. Se ha demostrado que quercetina ejerce una acción beneficiosa sobre la homeostasis lipídica en hígado y tejido adiposo (Peluso, 2006), que puede verse reflejada en una mejora sustancial del perfil lipídico en el plasma sanguíneo de animales obesos (Juzwiak y col., 2005; Kamada y col., 2005; Zang y col., 2006). También se ha observado una mejora en la sensibilidad a la insulina tras el

tratamiento con altas dosis de quercetina (50 mg/kg/día) en humanos sanos y ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Kato y col., 2008). Los mecanismos propuestos para explicar estos efectos se centran en el poder antiinflamatorio y antioxidante del flavonol, ya que la obesidad y el síndrome metabólico se entienden como enfermedades inflamatorias crónicas (Hotamisligil, 2006). Este efecto antiinflamatorio, según se ha visto tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, resulta en una menor liberación de ácidos grasos al plasma, que a su vez reduce la respuesta inflamatoria y la resistencia a la insulina (Boden y col., 2005).

Por otro lado, quercetina interfiere con la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), reduciendo la producción de peroxinitrito (Shutenko y col., 1999). La óxido nítrico sintetasa (NOS) es la enzima responsable de transformar la L-arginina en óxido nítrico (NO) en las células, incluyendo células endoteliales y macrófagos. Es importante la liberación de NO para la dilatación de los vasos sanguíneos, pero a altas concentraciones produce daños oxidativos, ya que actúa con los radicales libres produciendo peroxinitrito, el cual oxida las LDL, produciendo daños irreversibles en la membrana celular. Se ha demostrado que quercetina actúa captando los radicales libres, evitando así que puedan reaccionar con el NO, reduciendo el daño por isquemia (sufrimiento celular causado por la disminución del riego sanguíneo) (Shoskes, 1998). Además, posee acción antihipertensiva y mejora la función endotelial (Romero y col., 2009; Duarte y col., 1993a, 1993b, 2001). Esta protección antioxidante y vascular previene accidentes cerebrovasculares (Knekt y col., 2000).

La inhibición del sistema xantina-deshidrogenasa/xantina-oxidasa es otro mecanismo importante por el que quercetina disminuye el daño oxidativo (Bindoli y col., 1985). Xantina deshidrogenasa (forma de la enzima en condiciones fisiológicas normales) cambia a xantina oxidasa en condiciones de isquemia, proceso que puede desencadenar un aumento en la generación de ácido úrico, ya que estas dos enzimas están involucradas en su metabolismo. Xantina oxidasa reacciona con el oxígeno molecular liberando radicales superóxidos. Se han llevado a cabo numerosos estudios que demuestran que quercetina actúa inhibiendo la actividad de xantina oxidasa, reduciendo así el daño oxidativo (Shoskes, 1998; Zeng y col., 1997).

Desde hace varios años, quercetina se ha presentado como un posible principio activo antiinflamatorio (Oršolić y col., 2004), ya que ha mostrado ser inhibidor de la liberación de histamina y de otros mediadores inflamatorios en respuesta a

lipopolisacáridos (LPS) en macrófagos aislados (Manjeet y Ghosh, 1999) y mastocitos (Theoharides y col., 2001). Los macrófagos son claves en el desarrollo de aterosclerosis y resistencia a la insulina. Dada la importancia de la acumulación de macrófagos en la aparición de inflamación en los tejidos, también se ha estudiado y puesto de manifiesto el efecto antiinflamatorio de quercetina en órganos como hígado (Dias y col., 2005), cerebro (Singh y col., 2008), intestino (Comalada y col., 2005; Camuesco y col., 2004) y en células del tejido adiposo (Rivera y col., 2008). Los mecanismos implicados en este proceso antiinflamatorio, no están totalmente definidos, pero existen numerosos estudios que proponen una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias (mensajeros fisiológicos de la respuesta inflamatoria) (Hämäläinen y col., 2007; Min y col., 2007) y la inhibición de la isoforma inducible de NOS (iNOS), ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX), bloqueando la ruta del ácido araquidónico y proteína C reactiva y aumentando la expresión de adiponectina (hormona sintetizada únicamente por el tejido adiposo que participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos) (Biesalski y col., 2007; García-Mediavilla y col., 2007; Rivera y col., 2008).

Otro de los efectos que presenta quercetina, al actuar como un “fármaco natural”, es una acción antialérgica, revelándose como un antihistamínico eficaz en el tratamiento y prevención del asma y la bronquitis (Chaabi y col., 2007). Varios estudios en modelos animales, tratados previamente con quercetina, han demostrado una reducción drástica de las reacciones adversas a las sustancias químicas que desencadenan ataques de asma (Jiang y col., 2007; Jung y col., 2007; Rogerio y col., 2007).

Tras ser ampliamente estudiados los principales efectos atribuidos a quercetina, como son el efecto antiinflamatorio y antioxidante, surgió la idea de que este flavonol también poseía actividad antitumoral. Más tarde, esta idea cobró sentido cuando diversos estudios epidemiológicos mostraron que las poblaciones en cuya dieta abundaban los alimentos ricos en flavonoides, como son las frutas y verduras, presentaban una menor incidencia de ciertos tipos de cáncer. Finalmente se realizaron estudios *in vitro* (van der Waude y col., 2005) e *in vivo* (Schlachterman y col., 2008) que confirmaron esta hipótesis. El mecanismo propuesto por el que quercetina ejerce su efecto antitumoral se basa en la inhibición de las ADN topoisomerasas I y II, induciendo así un daño en el ADN y la apoptosis (Yamashita y Kawanishi, 2000).

Realmente existen muchos mecanismos por los que tanto quercetina, como otros flavonoides puede ejercer su acción antitumoral (Havsteen, 2002).

También se ha demostrado que quercetina inhibe la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) (Ono y col., 1990; Spedding y col., 1989), sin embargo, dado que existen otras moléculas más eficaces contra este virus, no ha sido utilizado con este fin. En cambio, se ha empleado para tratar infecciones causadas por otros virus como Influenza (Neznanov y col., 2008) o Poliovirus (Davis y col., 2008).

Todos estos efectos beneficiosos para la salud atribuidos a quercetina, hacen que este compuesto natural resulte interesante para la elaboración de alimentos funcionales. El principal problema que se presenta es su baja solubilidad en agua y su inestabilidad frente a diferentes factores como oxígeno, luz y temperatura. En este capítulo estudiaremos el uso de CDs como agentes complejantes de quercetina, con el fin de aumentar su solubilidad, además de protegerla frente a la oxidación por diferentes agentes, haciéndola en consecuencia, más estable. Este efecto ya ha sido descrito para numerosos compuestos (Martín del Valle, 2004).

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1. Cálculo de K_C

Las K_C entre quercetina y diferentes tipos de CDs, fueron calculadas usando diferentes métodos, con el fin de comparar los valores obtenidos con cada uno de ellos y determinar el método óptimo para dicho cálculo.

1.2.1.1. Método enzimático

El cálculo de K_C entre quercetina y CDs se llevó a cabo en primer lugar, estudiando el efecto de la adición de CDs al medio de reacción en la velocidad de oxidación de quercetina por peroxidasa de rábano (HPR) en presencia de H_2O_2 , en medio ácido. En todos los casos estudiados, la adición de CDs al medio de reacción, dio como resultado una disminución en la velocidad de oxidación del flavonol por HPR (**Figura V.2**).

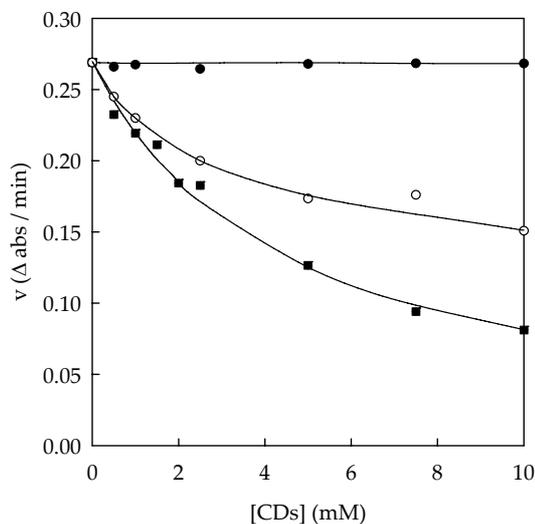


Figura V.2.: Efecto de la adición al medio de diferentes tipos de CDs sobre la oxidación de quercetina por HPR. ((●) α -CDs, (■) β -CDs, y (○) γ -CDs). El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM a pH 4.5, 60 μM de quercetina, 400 μM H_2O_2 , 0.037 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs.

Esta inhibición de la actividad enzimática, nos indicó que quercetina estaba siendo retirada del medio, dejando así de estar disponible para la enzima (Lucas-Abellán y col., 2007 y Lucas-Abellán y col., 2008a).

Cuando se estudió la actividad de HPR sobre quercetina, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CDs nativos (α -, β - y γ -CDs), a una concentración fija de flavonol, se observó una disminución en la actividad de HPR conforme aumentó la concentración de β - y γ -CDs en el medio, mientras que en presencia de α -CDs no se observó dicho efecto (**Figura V.2**). Este resultado indicó que quercetina estaba siendo secuestrada en la cavidad hidrofóbica de β - y γ -CDs, mientras que esto no ocurría en el caso de α -CDs, probablemente debido al menor tamaño de su cavidad hidrofóbica.

El efecto inhibitorio de β - y γ -CDs fue estudiado a diferentes concentraciones de quercetina, observándose un claro descenso en la actividad de HPR en todos los casos (**Figura V.3**).

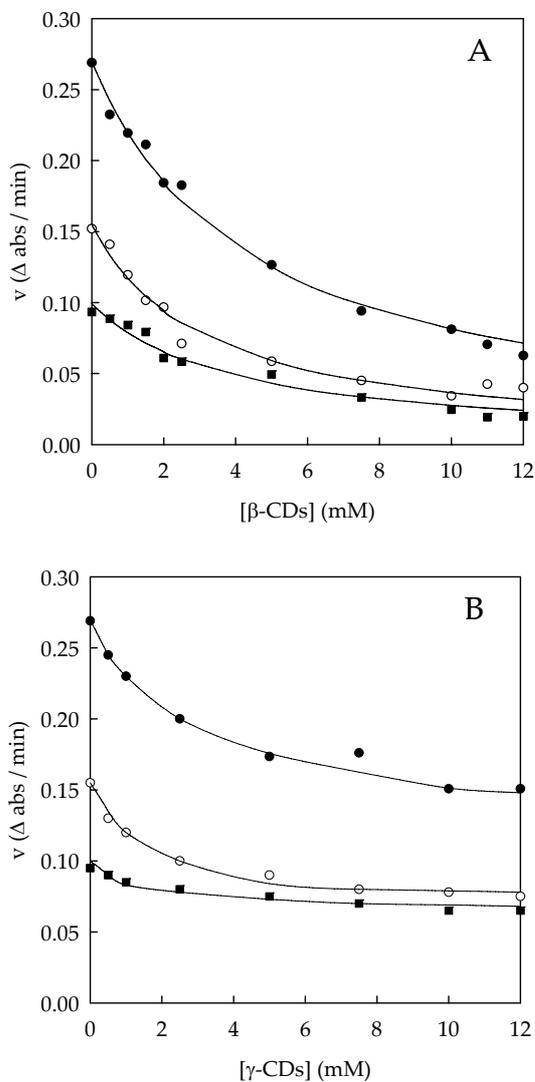


Figura V.3.: Efecto de diferentes concentraciones de CDs en la oxidación de quercetina por HPR. El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μ M H_2O_2 , 0.037 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs. (\bullet) 60 μ M quercetina, (\circ) 30 μ M quercetina, (\blacksquare) 15 μ M quercetina. (A) Oxidación de quercetina en presencia de β -CDs. (B) Oxidación de quercetina en presencia de γ -CDs.

Suponiendo que este efecto inhibitor se deba a la formación de complejos de inclusión quercetina-CDs, y a que quercetina libre es la única forma de sustrato que puede utilizar HPR, utilizaremos la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten modificada (**Ecuación III.10.**), que muestra una relación no lineal entre la velocidad de la reacción y la concentración de CDs, para ajustar los datos experimentales presentes en la **Figura V.3.** La **Tabla V.1.**, muestra los valores de K_C obtenidos para β - y γ -CDs. Como se puede observar en dicha tabla, el valor de K_C obtenido para el complejo formado entre quercetina y β -CDs (426 M^{-1}) fue mayor que el obtenido en el caso de γ -CD (233 M^{-1}), indicando un mejor acoplamiento entre quercetina y β -CDs, probablemente debido al tamaño de la cavidad hidrofóbica de las mismas. El valor de K_C entre quercetina y β -CDs fue similar al obtenido por Pralhad y Rajendrakumar, en 2004, mediante estudios de solubilidad (402 M^{-1}), pero inferior al calculado por Álvarez-Parrilla y col., en 2005, usando el método fluorimétrico (1138 M^{-1}).

Tabla V.1.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, obtenido por el método enzimático.

Flavonol	β -CDs	γ -CDs	HP- β -CDs	G ₂ - β -CDs
	$K_C \text{ M}^{-1}$	$K_C \text{ M}^{-1}$	$K_C \text{ M}^{-1}$	$K_C \text{ M}^{-1}$
Quercetina	426 ± 68	233 ± 44	1195 ± 112	650 ± 76

Una vez estudiada la complejación de quercetina en CDs nativas, se pasó a estudiar su complejación con CDs modificadas de β -CDs ya que, como se puede observar en la **Tabla V.1.**, son las que mostraron mayor valor de K_C .

Las CDs modificadas, presentan ciertas ventajas sobre sus respectivas parentales. En algunos casos son más solubles en agua y en disolventes orgánicos, y por lo tanto aumentan enormemente la solubilidad de compuestos insolubles en agua (De Caprio y col., 1992; Luong y col., 1993; Hocino y col., 1993; Núñez-Delicado y col., 1997). Entre las CDs modificadas más usadas industrialmente están 2-hidroxipropil- β -CDs (HP- β -CDs) y maltosil- β -CDs (G₂- β -CD), debido a su alta solubilidad y bajo coste.

Cuando se llevó a cabo la oxidación de quercetina por HPR en presencia de HP- β - y G₂- β -CDs, se observó un efecto inhibitor superior al descrito para su parental β -CDs (Figura V.4.).

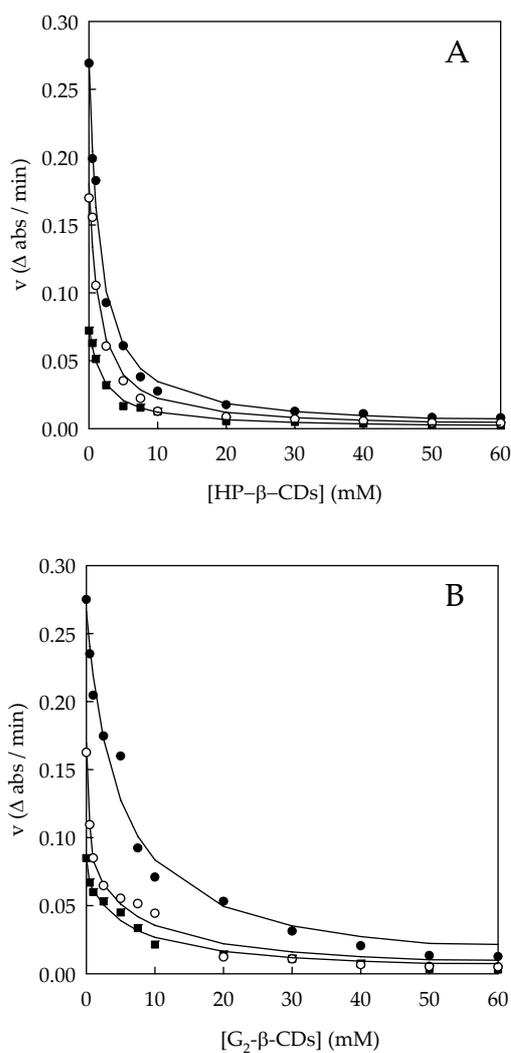


Figura V.4.: Efecto de diferentes concentraciones de CDs modificadas en la oxidación de quercetina por HPR. El medio de reacción contenía tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, 400 μM H₂O₂, 0.037 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs. (●) 60 μM quercetina, (○) 30 μM quercetina, (■) 15 μM quercetina. (A) Oxidación de quercetina en presencia de HP- β -CDs. (B) Oxidación de quercetina en presencia de G₂- β -CDs.

Los valores de K_C (Tabla V.1.) fueron calculados ajustando los datos experimentales de la Figura V.4., por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten modificada (Ecuación III.10.).

Los valores de K_C obtenidos para HP- β - (1195 \pm 112 M⁻¹) y G₂- β -CDs (650 \pm 76 M⁻¹) (Tabla V.1.), fueron superiores a los obtenidos para su parental β -CDs (426 \pm 68 M⁻¹). Los valores de K_C de los diferentes tipos de CDs, mostraron el siguiente orden: HP- β - > G₂- β - > β -CDs, reflejando una mayor afinidad de quercetina por las β -CDs modificadas que por su correspondiente parental (β -CDs). Es importante resaltar que HP- β -CDs fueron las que presentaron mayor K_C , debido a la presencia de los grupos hidroxipropil en la boca del cono favorece esta complejación.

Con el fin de asegurarnos de que HPR sólo estaba utilizando quercetina libre como sustrato y no la complejada, se calculó la concentración de quercetina libre en cada uno de los puntos de la Figura V.4., utilizando la Ecuación III.9. Los datos obtenidos fueron representados frente a la velocidad de la reacción en la Figura V.5., mostrando que los puntos de las diferentes curvas de la Figura V.4. que presentaban la misma actividad, tenían la misma concentración de quercetina libre, independientemente del tipo de CDs utilizadas.

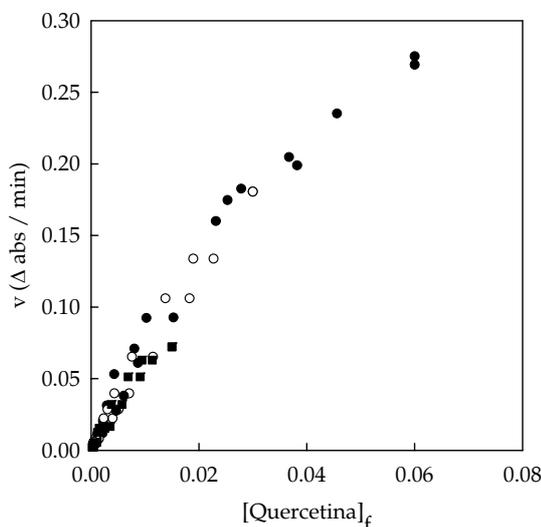


Figura V.5.: Efecto de la concentración de quercetina libre sobre la velocidad de la reacción. (●) 60 μ M quercetina total, (○) 30 μ M quercetina total y (■) 15 μ M quercetina total.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la enzima sólo actúa sobre la quercetina libre en el medio, como se ha descrito previamente para la oxidación por lipoxigenasa (LOX) de diferentes compuestos incluidos en CDs (Núñez-Delicado y col., 1997; Núñez-Delicado y col., 1999a; Núñez-Delicado y col., 1999b, Lucas-Abellán y col., 2007; Lucas-Abellán y col., 2008d).

1.2.1.2. Método de solubilidad

Otra característica interesante de las CDs es que pueden ser saturadas de flavonol, incrementando la concentración total de quercetina en disolución y permaneciendo constante la concentración de quercetina libre en el medio (su producto de solubilidad, S_0).

Los estudios de solubilidad de quercetina con CDs se llevaron a cabo utilizando el método descrito por Higuchi y Connors en 1965. Este estudio se realizó en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, utilizando β -, HP- β - y G₂- β -CDs, con el fin de poder comparar los valores de K_C obtenidos con este método con los obtenidos previamente mediante el método enzimático.

Se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de CDs y se saturaron con quercetina. Estas disoluciones se mantuvieron en un baño de ultrasonidos, a 25 °C, hasta que se alcanzó el equilibrio y se cuantificó la concentración de quercetina soluble en cada caso, tal y como se desarrolla en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**).

Se representó la concentración de quercetina total frente a la concentración de CDs y los diagramas de fases obtenidos se muestran en las **Figuras V.6.** y **V.7.**

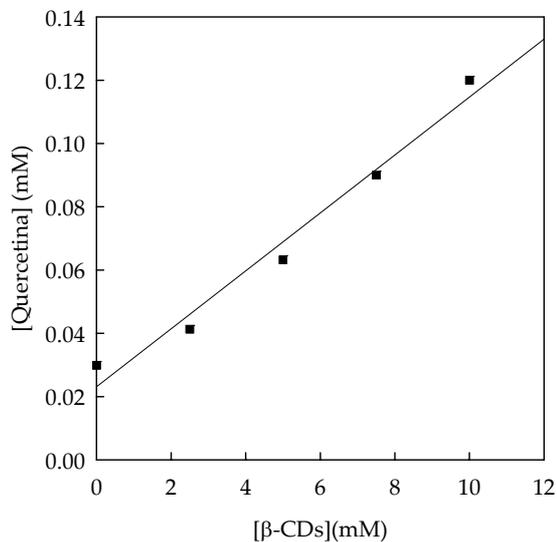


Figura V.6.: Diagrama de fases de quercetina con β -CDs en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5 a 25 °C.

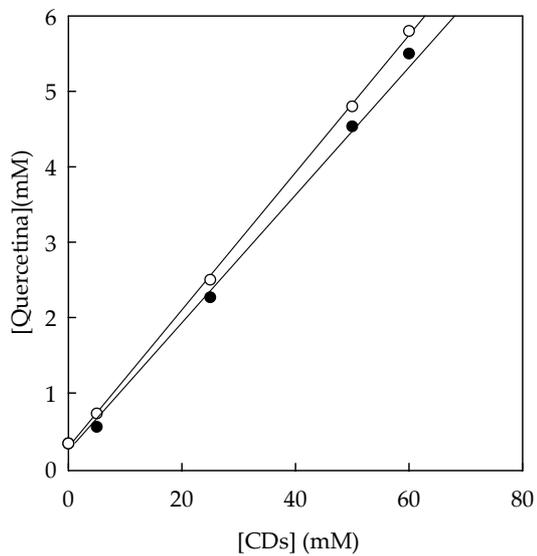


Figura V.7.: Diagrama de fases de quercetina con (O) HP- β -CDs y (●) G₂- β -CDs en tampón acetato sódico 100 mM, pH 4.5 a 25 °C.

Como se observa en las **Figuras V.6.** y **V.7.**, los diagramas de fases obtenidos para los tres tipos de CDs estudiados (β -, HP- β - y G₂- β -CDs), fueron de tipo A_L, mostrando una relación lineal entre la concentración de quercetina en disolución y la concentración de CDs en el medio, indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados era 1:1.

Usando la ecuación descrita por Higuchi y Connors, en 1965 (**Ecuación III.11.**), pudimos calcular el valor de K_C en cada uno de los casos (**Tabla V.2.**).

Tabla V.2.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM a pH 4.5, obtenidos por el método de solubilidad.

Flavonol	β -CDs K _C M ⁻¹	HP- β -CDs K _C M ⁻¹	G ₂ - β -CDs K _C M ⁻¹
Quercetina	398 ± 61	950 ± 82	917 ± 78

Como se puede observar en la **Tabla V.2.**, los valores de K_C obtenidos fueron similares a los calculados usando el método enzimático (**Tabla V.1.**) (β -, 426 ± 68, HP- β -, 1195 ± 112 y G₂- β -CDs, 650 ± 76).

Cuando se llevan a cabo estudios de saturación de CDs, es importante calcular la eficacia de complejación (CE). Este valor tiene en cuenta, además de K_C, la solubilidad en agua del compuesto encapsulado (S₀) (**Ecuación III.12.**). En el caso de quercetina, el valor de CE obtenido para cada tipo de CDs estudiadas se presenta en la **Tabla V.3.**

Tabla V.3.: Eficacia de complejación (CE) entre quercetina y distintos tipos de CDs.

Flavonol	S ₀ (mM)	CE β -CDs	CE HP- β -CDs	CE G ₂ - β -CDs
Quercetina	0.1281	50.9 ± 7.8	121.7 ± 10.4	117.4 ± 10.4

Tal y como indican los valores de CE, son HP- β - las CDs que poseen una mayor eficacia de complejación.

1.2.1.3. Método fluorimétrico

Con el fin de establecer la validez tanto del método enzimático, como el de solubilidad para la determinación de K_C entre quercetina y diferentes tipos de CDs, se llevaron a cabo estudios de fluorescencia. En este método la K_C se calculó mediante el estudio de la modificación del espectro de fluorescencia de quercetina tras adicionar CDs al medio de complejación en tampón acetato sódico 100 mM a pH 4.5.

En primer lugar se estudió el efecto de la presencia de CDs nativas (α -, β - y γ - CDs) en el espectro de fluorescencia de quercetina. La adición de β -CDs al medio dio como resultado un aumento en la intensidad de fluorescencia de quercetina, tal y como se observa en la **Figura V.8.**

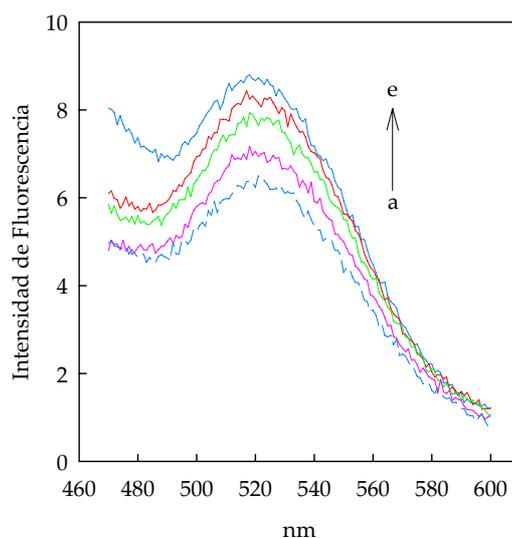


Figura V.8.: Espectro de fluorescencia de quercetina en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, con concentraciones crecientes de β -CDs, λ_{exc} 370 nm: (a) 0, (b) 1, (c) 2.5, (d) 5 y (e) 10 mM β -CDs.

Este resultado nos indicaba que la formación de complejos β -CDs-quercetina era la que provocaba el aumento de fluorescencia. Sin embargo, la adición de α - y γ -CDs no produjo ninguna variación en la intensidad de fluorescencia del flavonol

(datos no mostrados). En el caso de α -CDs, este resultado corroboraba que estas CDs no forman complejos con quercetina, tal y como observamos al hacer el estudio con el método enzimático. En el caso de γ -CDs, tampoco se produjo ningún cambio en la intensidad de fluorescencia de quercetina. Tal y como hemos comprobado con el método enzimático, estas CDs sí son capaces de formar complejos con quercetina, pero la K_C que presenta es baja (233 ± 44), por lo tanto, la cantidad de complejos que se forman es pequeña, y no causa la suficiente variación en la intensidad de fluorescencia para poder ser detectada. Por lo tanto, este método no nos sirve para calcular la K_C entre γ -CDs y quercetina.

También se estudió la complejación entre quercetina y CDs modificadas, HP- β - y G_2 - β -CDs. Cuando se llevó a cabo este estudio también se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia de quercetina conforme aumentó la concentración de CDs en el medio, siendo el aumento diferente para β -, HP- β - y G_2 - β -CDs (**Figura V.9.**).

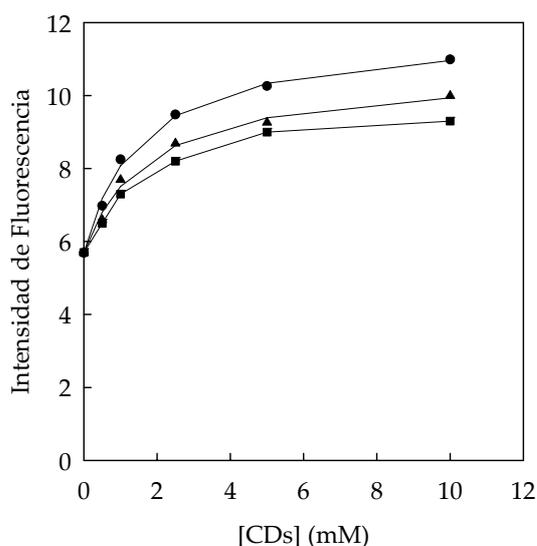


Figura V.9.: Intensidad de fluorescencia de quercetina a 520 nm y diferentes concentraciones de CDs: (■) β -CDs, (●) HP- β -CDs y (▲) G_2 - β -CDs.

En presencia de HP- β -CDs se produjo un mayor aumento en la intensidad de fluorescencia de quercetina (**Figura V.9.**), debido a una mayor afinidad de este tipo de CDs para formar complejos de inclusión con dicho flavonol. El aumento de la fluorescencia fue de 1.6, 1.9 y 1.7 veces para β -, HP- β - y G_2 - β -CDs, respectivamente.

Tal y como se observa en la **Figura V.9.** la intensidad de fluorescencia de quercetina aumentó conforme aumentaba la concentración de CDs hasta alcanzar una meseta y permanecer constante. Este aumento se produjo de forma progresiva hasta que todo el flavonol estuvo complejado en la cavidad hidrofóbica de las CDs, para permanecer constante a partir de una concentración de CDs 5 mM aproximadamente (**Figura V.9.**).

Analizando los datos experimentales de la **Figura V.9.** podemos obtener tanto la estequiometría de los complejos de inclusión formados entre quercetina y los distintos tipos de CDs estudiadas, como la magnitud de sus correspondientes K_C . Para calcular el valor de K_C mediante el método fluorimétrico se utilizaron las siguientes ecuaciones: Connors (**Ecuación III.13.**), Benesi-Hildebrand (**Ecuación III.14.**) y Scatchard (**Ecuación III.15.**) (Connors, 1987; Benesi y Hildebrand, 1949; Scatchard, 1949).

En primer lugar, el valor de K_C entre β -CDs y quercetina fue calculado ajustando los datos experimentales obtenidos en la **Figura V.9.** a la ecuación de Connors (**Ecuación III.13.**) (**Tabla V.4.**). Esta representación nos muestra una relación no lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de CDs presentes en el medio, al igual que los datos experimentales mostrados en la **Figura V.9.**

Tabla V.4.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, obtenidos por el método fluorimétrico.

Flavonol	Método Fluorimétrico	β -CDs K_C M ⁻¹	HP- β -CDs K_C M ⁻¹	G ₂ - β -CDs K_C M ⁻¹
Quercetina	Connors	320 ± 19	860 ± 93	600 ± 53
	Benesi-Hildebrand	313 ± 32	858 ± 81	575 ± 40
	Scatchard	334 ± 42	856 ± 90	616 ± 49

Otra de las ecuaciones utilizadas para obtener los valores de K_C por el método fluorimétrico es la ecuación de Benesi-Hildebrand (**Ecuación III.14**).

La representación de la doble recíproca de Benesi-Hildebrand, de los datos experimentales de la **Figura V.9**, mostró 3 líneas rectas, debido al aumento de la intensidad de fluorescencia con el aumento de la concentración de CDs en el medio de reacción (**Figura V.10**).

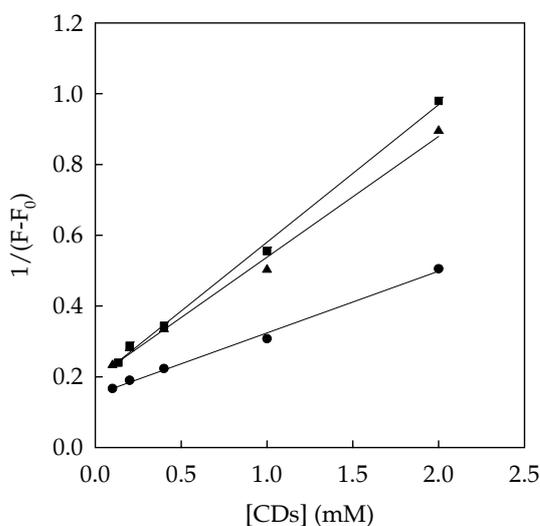


Figura V.10.: Representación de Benesi-Hildebrand para quercetina con (■) β -, (●) HP- β - y (▲) G₂- β -CDs.

Esta representación permite calcular el valor de K_C , dividiendo el valor de la pendiente de cada recta entre el intercepto con el eje Y. El inconveniente de este tipo de representación es su sensibilidad a concentraciones bajas de CDs, pudiendo variar mucho el valor de K_C obtenido.

El valor más alto de K_C se obtuvo para HP- β -CDs ($858 \pm 81 \text{ M}^{-1}$) mientras que β - y G₂- β -CDs presentaron valores inferiores de K_C ($313 \pm 32 \text{ M}^{-1}$ y $575 \pm 40 \text{ M}^{-1}$, respectivamente) (**Tabla V.4**).

Los datos experimentales de fluorescencia (**Figura V.9**), también se utilizaron para determinar los valores de K_C entre quercetina y CDs, utilizando la ecuación de Scatchard (Scatchard, 1949). En este caso la relación entre el aumento de la intensidad de fluorescencia ($F - F_0$) y la concentración de CDs está dada por la **Ecuación III.15**.

La representación de los datos de la **Figura V.9.** como $(F - F_0) / [\text{CDs}]$ frente $(F - F_0)$ dio lugar a 3 líneas rectas, indicando que la estequiometría de los complejos de inclusión formados entre quercetina y β -, HP- β - y G₂- β -CDs era 1:1 (**Figura V.11.**).

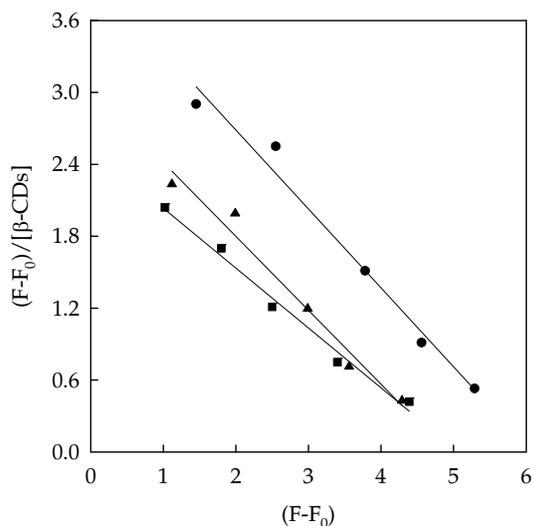


Figura V.11.: Representación de Scatchard para quercetina con (■) β -CD, (●) HP- β -CDs y (▲) G₂- β -CDs.

Los valores de K_C , fueron similares a los obtenidos por Connors y Benesi-Hildebrand (**Tabla V.4.**), corroborando que HP- β -CDs con un valor de K_C de $856 \pm 90 \text{ M}^{-1}$, tiene mayor afinidad por quercetina que β - y G₂- β -CDs, con valores de $334 \pm 42 \text{ M}^{-1}$ y $616 \pm 49 \text{ M}^{-1}$ respectivamente.

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 usando el método fluorimétrico fueron inferiores a los obtenidos mediante el método enzimático y el de solubilidad (**Tabla V.5.**), que entre ellos fueron muy similares.

Tabla V.5.: Constantes de complejación (K_C) entre quercetina y distintos tipos de CDs en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5, calculados mediante los métodos fluorimétrico, enzimático y solubilidad.

Método	β -CDs $K_C M^{-1}$	HP- β -CDs $K_C M^{-1}$	G ₂ - β -CDs $K_C M^{-1}$
Fluorimétrico:			
Connors	320 ± 19	860 ± 93	600 ± 53
Benisi-Hildebrand	313 ± 32	858 ± 81	575 ± 40
Scatchard	334 ± 42	856 ± 90	616 ± 49
Enzimático	426 ± 68	1195 ± 112	650 ± 76
Solubilidad	398 ± 61	950 ± 82	917 ± 78

Para comprobar que valores de K_C obtenidos por los métodos enzimático, solubilidad o fluorimétrico, eran los correctos se llevó a cabo un ensayo en el que se varió la concentración de quercetina y CDs totales, para que al utilizar los valores de K_C por los 3 métodos y la **Ecuación III.9.**, se mantuviera constante la concentración de quercetina libre ($[quercetina]_f$) y que la tasa de oxidación de quercetina por HPR también permaneciera constante, independientemente de la concentración de quercetina total.

Como podemos observar en la **Figura V.12.**, cuando utilizamos los valores de K_C obtenidos mediante el método enzimático o de solubilidad, los resultados fueron los esperados (la actividad enzimática era independiente de las concentraciones totales de CDs y quercetina). Sin embargo el resultado obtenido utilizando los valores de K_C por el método fluorimétrico, se desvió de lo esperado (la actividad enzimática no se mantenía constante), lo que indica que la concentración de quercetina libre no es la misma en todos los casos, por lo tanto, los valores de K_C utilizados no son los correctos.

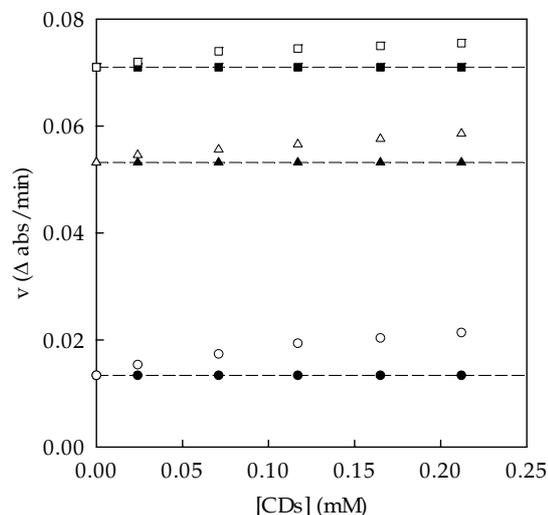


Figura V.12.: Ensayo de CDs. La oxidación de quercetina libre se llevó a cabo en tampón acetato sódico 100 mM pH 4.5 y 0.037 unidades de HPR. Las concentraciones de CDs y quercetina totales usadas en cada caso para obtener 1.8, 4.3 ó 8 μM quercetina libre fueron calculadas sustituyendo los valores de K_C en la *Ecuación III.9.*, (●) 1.8 μM quercetina libre en presencia de HP- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (○) 1.8 μM quercetina libre en presencia de HP- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente; (▲) 4.3 μM quercetina libre en presencia de G_2 - β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (△) 4.3 μM quercetina libre en presencia de G_2 - β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente; (■) 8 μM quercetina libre en presencia de β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (□) 4.3 μM quercetina libre en presencia de β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente.

En conclusión, este estudio muestra claramente que quercetina pueden ser complejada por CDs en medio ácido, estabilizándola frente a la oxidación enzimática. De entre las CDs estudiadas, las modificadas HP- β -CDs fueron las más efectivas en la complejación de quercetina. Es importante señalar que las CDs pueden utilizarse no

solo para disminuir la concentración de quercetina libre en el medio, mientras que la concentración de quercetina total se mantiene constante, sino también para aumentar la concentración total de quercetina mientras que la concentración de quercetina libre permanece constante. En este último caso, la concentración total de quercetina depende de la eficacia de la complejación (CE). También es importante resaltar que el método fluorimétrico infravalora el valor de K_C , llegando en el caso de γ -CDs a no poder ser utilizado con este fin.

CAPÍTULO VI. KAEMPFEROL

1. KAEMPFEROL

1.1. INTRODUCCIÓN

Kaempferol (3, 4', 5, 7-tetrahidroxiflavona) (**Figura VI.1.**) es un flavonol ampliamente distribuido en diferentes fuentes naturales como cebolla, zanahoria y té negro, alimentos en los que alcanza concentraciones de 832, 140 y 118 mg/kg de peso seco, respectivamente (Miean y Mohamed, 2001). Además, podemos encontrarlo también en manzana, brócoli, puerro, cítricos, uva y vino tinto (Park y col., 2006; Schubert y col., 1995; Ahn y col., 2004).

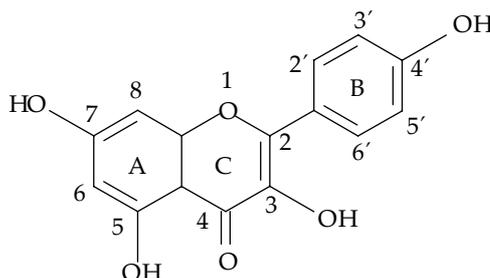


Figura VI.1.: Estructura química de kaempferol.

En Japón, representa el 35,3% del consumo total de flavonoides en las mujeres (Arai y col., 2000) y en Estados Unidos, el 22% de flavonoles/flavonas para las mujeres y el 20% para los hombres (Sampson y col., 2002).

1.1.1. Kaempferol y salud

A este flavonol se le ha prestado mucha atención en los últimos años debido a sus propiedades anticancerígenas (Bestwick y col., 2007; Sharma y col., 2007),

antiaterogénicas, antioxidantes (López-Sánchez y col., 2007), antiinflamatorias (Hämäläinen y col., 2007) y osteogénicas (Trivedi y col., 2008).

Se ha demostrado que inhibe la proliferación celular en cáncer pancreático induciendo la apoptosis de células cancerosas, lo que puede sensibilizar a las células tumorales frente a la quimioterapia (Zhang y col., 2008) y neutralizar los efectos tóxicos de los fármacos y agentes químicos utilizados en su tratamiento (Leung y col., 2007; Nadova y col., 2007). El consumo de kaempferol también se ha asociado con un menor riesgo de padecer cáncer colorrectal (Bobe y col., 2008), de ovario (Gates y col., 2007), gástrico (García-Closas y col., 1999) y pulmonar, además de tener efectos sobre la progresión del ciclo celular y la apoptosis de células humanas en procesos de leucemia (Rusak y col., 2005; Bestwick y col., 2007).

Se ha investigado sobre los efectos combinados de kaempferol y quercetina, ya que parecen actuar sinérgicamente en la reducción de la proliferación de las células cancerosas, apoyando así el empleo de tratamientos combinados por ser más efectivos que por separado (Ackland y col., 2005). En un estudio realizado en células hepáticas, se ha demostrado que kaempferol y quercetina pueden modular la actividad de iNOS, COX-2 y proteína C reactiva, consiguiendo así efectos antiinflamatorios (García-Mediavilla y col., 2007).

También se ha demostrado la posible modulación del metabolismo de lípidos, la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la formación de plaquetas en sangre, llegando a la conclusión de que el kaempferol previene la arterioesclerosis (Kowalski y col., 2005).

Trivedi y col., en 2008, llevaron a cabo un estudio realizado en ratas ovariectomizadas (OVX), demostrando la acción preventiva de kaempferol en la osteoporosis, ya que promueve las funciones de los osteoblastos en la remodelación del hueso e inhibe la función de los osteoclastos (célula multinucleada que degrada y reabsorbe hueso).

A pesar de sus excelentes propiedades, es bastante insoluble en agua (0.046 mM), y muy sensible a la acción de agentes externos como aire, luz y enzimas oxidativas, constituyendo un grave problema para su formulación y manipulación en la elaboración de alimentos funcionales. Con el fin de paliar, en la medida de lo posible, los inconvenientes descritos, se ha estudiado la inclusión de kaempferol en ciclodextrinas (CDs).

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1. Cálculo de K_C

Las K_C entre kaempferol y diferentes tipos de CDs fueron calculadas usando diferentes métodos, con el fin de comparar los valores obtenidos con cada uno de ellos y determinar el método óptimo para dicho cálculo.

1.2.1.1. Método fluorimétrico

El método fluorimétrico consiste en estudiar los cambios en la intensidad de fluorescencia del analito cuando ha sido complejoado.

Para calcular la K_C entre kaempferol y diferentes tipos de CDs, en tampón borato sódico 100 mM a pH 9.0, se estudió la modificación de su espectro de fluorescencia tras adicionar las CDs al medio.

En primer lugar, se estudió el efecto de la adición de CDs nativas (α -, β - y γ -CDs) a una disolución de kaempferol. La adición de β -CDs dio como resultado una disminución en la intensidad de fluorescencia del kaempferol, tal y como se observa en la **Figura VI.2.**, mientras que la presencia de α - y γ -CDs no produjo ningún efecto.

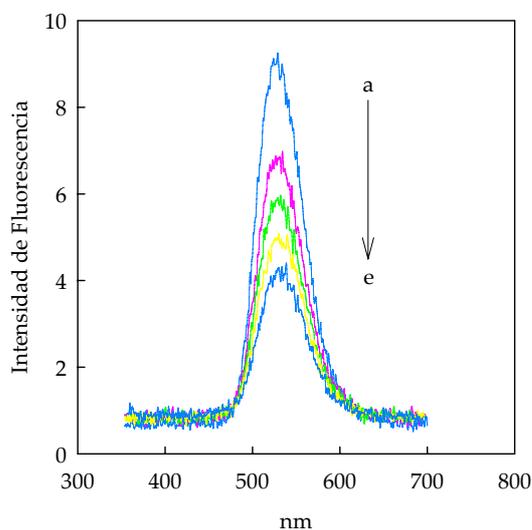


Figura VI.2.: Espectro de fluorescencia de kaempferol con concentraciones crecientes de β -CDs λ_{ex} 351 nm: (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, (d) 2 y (e) 5 mM β -CDs.

Esta es la primera vez que se ha observado una disminución en la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la complejación de un analito en CDs, en contraste con el aumento descrito tras la complejación de otros compuestos (Álvarez-Parrilla y col, 2005; Mahedero y col, 2002; Wagner y Fitzpatrick, 2000; Muñoz de la Peña y col, 2007; Lucas-Abellán y col, 2008a).

También se estudió la complejación de kaempferol en β -CDs modificadas (HP- β - y G₂- β -CDs). Cuando se llevó a cabo este estudio también se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia del kaempferol conforme aumentó la concentración de CDs en el medio, siendo este descenso de diferente magnitud para los tres tipos de CDs estudiadas (β -, HP- β - y G₂- β -CDs) (**Figura VI.3.**).

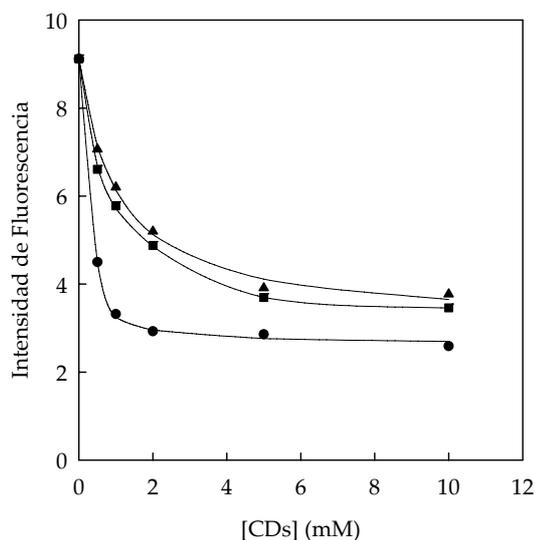


Figura VI.3.: Intensidad de fluorescencia de kaempferol a 539 nm y diferentes concentraciones de CDs: (■) β -CDs, (●) HP- β -CDs y (▲) G₂- β -CDs.

Esta disminución en la intensidad de fluorescencia fue mayor en el caso de HP- β -CDs (**Figura VI.3.**) debido a una mayor afinidad de este tipo de CDs para formar complejos de inclusión con kaempferol. La reducción de la fluorescencia fue de 2.6, 3.5 y 2.4 veces para β -, HP- β - y G₂- β -CDs, respectivamente. Para HP- β -CDs, la intensidad de fluorescencia del kaempferol disminuyó conforme aumentó la concentración de CDs, hasta una concentración de 2 mM, concentración a partir de la

cual la intensidad de fluorescencia de kaempferol permaneció constante (**Figura VI.3.**). En el caso de β - y G_2 - β -CDs, el valle se alcanzó aproximadamente a una concentración de CDs 5 mM (**Figura VI.3.**). A partir de esta concentración de CDs todo el kaempferol estaba formando complejos de inclusión.

Tanto la estequiometría de los complejos de inclusión formados entre kaempferol y los distintos tipos de CDs estudiadas, como la magnitud de sus correspondientes constantes de complejación (K_C), se pueden obtener del análisis de estos datos experimentales. Para calcular el valor de K_C por el método fluorimétrico se utilizaron las siguientes ecuaciones: Connors (**Ecuación III.13.**), Benesi-Hildebrand (**Ecuación III.14.**) y Scatchard (**Ecuación III.15.**) (Connors, 1987; Benesi y Hildebrand, 1949; Scatchard, 1949).

El valor de K_C entre β -CDs y kaempferol fue calculado en primer lugar, ajustando los datos experimentales obtenidos en la **Figura VI.3.** a la ecuación de Connors (**Ecuación III.13.**) (**Tabla VI.1.**). Esta representación, al igual que los datos experimentales mostrados en la **Figura VI.3.**, nos muestra una relación no lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de CDs presentes en el medio,

Tabla VI.1.: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, obtenidos por el método fluorimétrico.

Flavonol	Método Fluorimétrico	β -CDs K_C M ⁻¹	HP- β -CDs K_C M ⁻¹	G_2 - β -CDs K_C M ⁻¹
Kaempferol	Connors	1499 ± 199	9650 ± 288	984 ± 112
	Benesi-Hildebrand	1622 ± 259	9872 ± 332	1056 ± 120
	Scatchard	1555 ± 268	9367 ± 325	998 ± 109

Mediante la ecuación de Benesi-Hildebrand también se pueden obtener los valores de K_C .

La representación doble recíproca de Benesi-Hildebrand, de los datos experimentales de la **Figura VI.3.**, mostró valores negativos en la pendiente de las rectas obtenidas, debido a la disminución de la intensidad de fluorescencia con el aumento de la concentración de CDs en el medio de reacción (**Figura VI.4.**).

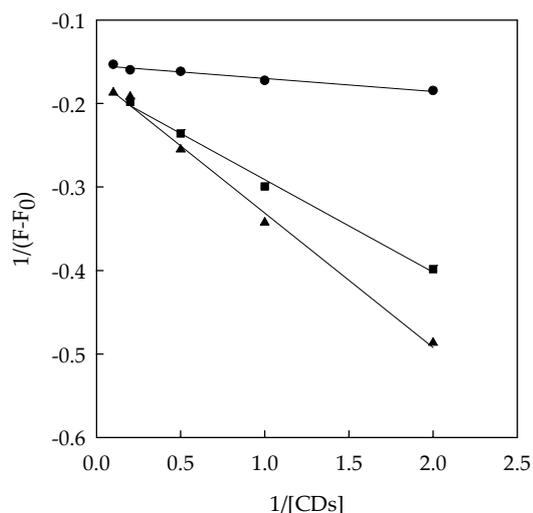


Figura VI.4.: Representación de Benesi-Hildebrand para kaempferol con (■) β-, (●) HP-β y (▲) G₂-β-CDs.

Esta representación permite calcular el valor de K_C , dividiendo del valor de la pendiente de cada recta entre el intercepto con el eje Y.

El inconveniente de este tipo de representación es su escasa sensibilidad a concentraciones bajas de CDs, pudiendo variar mucho el valor obtenido de K_C .

El valor más alto de K_C se obtuvo para HP-β-CDs ($9872 \pm 332 \text{ M}^{-1}$) mientras que β- y G₂-β-CDs presentaron valores inferiores de K_C ($1622 \pm 259 \text{ M}^{-1}$ y $1056 \pm 120 \text{ M}^{-1}$, respectivamente) (**Tabla VI.1.**).

Los datos experimentales de fluorescencia (**Figura VI.3.**), también se utilizaron para determinar los valores de K_C entre kaempferol y CDs, utilizando la ecuación de Scatchard (Scatchard, 1949). En este caso, la relación entre el aumento de la intensidad de fluorescencia ($F - F_0$) y la concentración de CDs viene dada por la **Ecuación III.15.**

La representación de los datos de la **Figura VI.3.** como $(F - F_0) / [CDs]$ frente a $(F - F_0)$ dio lugar a 3 líneas rectas, indicando que la estequiometría de los complejos de

inclusión formados entre kaempferol y β -, HP- β - y G_2 - β -CDs era 1:1 en todos los casos (**Figura VI.5**).

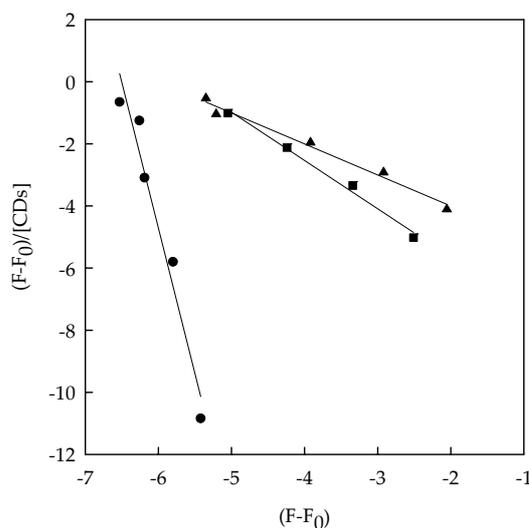


Figura VI.5.: Representación de Scatchard para kaempferol con (■) β -CDs, (●) HP- β -CDs y (▲) G_2 - β -CDs.

Los valores de K_C , fueron similares a los obtenidos usando las ecuaciones de Connors y de Benesi-Hildebrand (**Tabla VI.1**), corroborando que HP- β -CDs tiene mayor afinidad por kaempferol que β - y G_2 - β -CDs.

1.2.1.2. Método enzimático

Con el fin de establecer la validez del método fluorimétrico para la determinación de K_C midiendo la disminución de la intensidad de fluorescencia producida por la complejación de kaempferol en CDs, se utilizó el método enzimático para calcular la K_C entre kaempferol y CDs, utilizando HPR en presencia H_2O_2 , en medio básico.

En primer lugar, se estudió la oxidación de kaempferol por HPR, observándose la formación de un producto de oxidación con un máximo a 315 nm (**Figura III.3**).

Cuando se estudió la oxidación de kaempferol por HPR en presencia de diferentes tipos de CDs, se observó una disminución en la velocidad de oxidación del flavonol, en todos los casos estudiados (**Figura VI.6.**).

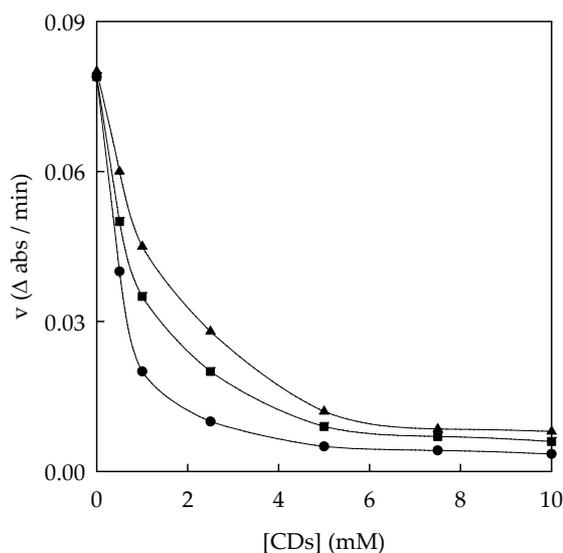


Figura VI.6.: Efecto de la adición al medio de concentraciones crecientes de CDs sobre la oxidación de kaempferol por HPR ((■) β-, (●) HP-β- y (▲) G₂-β-CDs). El medio de reacción contenía tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, 21 μM de kaempferol, 400 μM H₂O₂, 0.37 unidades de HPR y concentraciones crecientes de CDs.

Esta inhibición de la actividad enzimática nos indicó que kaempferol estaba siendo encapsulado en la cavidad hidrofóbica de las CDs, dejando así de estar disponible para enzima.

El efecto inhibitorio de los diferentes tipos de CDs (β-, HP-β- y G₂-β-CDs) fue estudiado a diferentes concentraciones de kaempferol, observándose en todos los casos un claro descenso en la actividad de HPR (**Figuras VI.7.- VI.9.**).

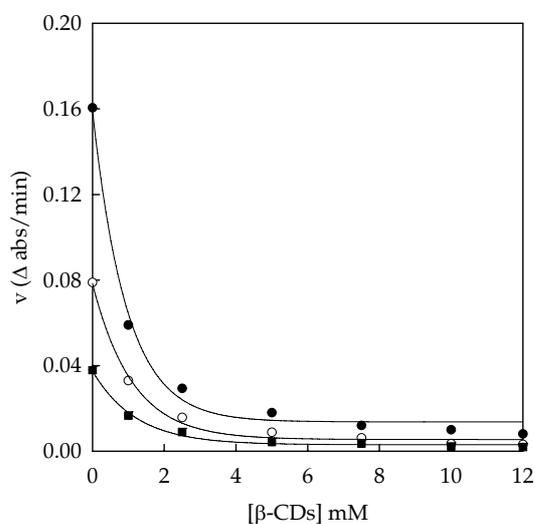


Figura VI.7.: Efecto de diferentes concentraciones de $\beta\text{-CDs}$ en la oxidación de kaempferol por HPR. El medio de reacción contenía tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, 400 μM H_2O_2 , 0.37 unidades de HPR y concentraciones crecientes de $\beta\text{-CDs}$. (●) 35 μM kaempferol, (○) 21 μM kaempferol, (■) 10.4 μM kaempferol.

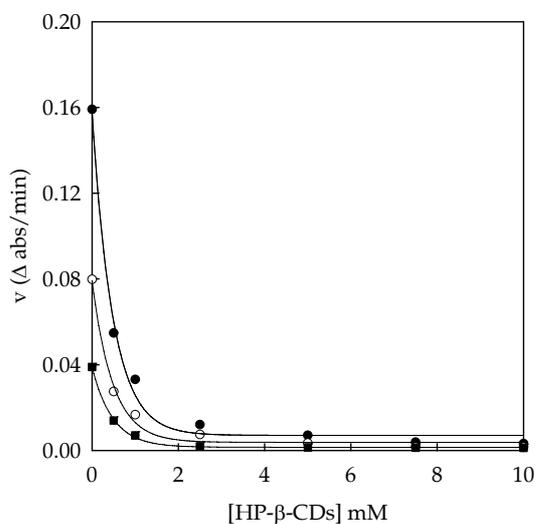


Figura VI.8.: Efecto de diferentes concentraciones de $\text{HP-}\beta\text{-CDs}$ en la oxidación de kaempferol por HPR. El medio de reacción contenía tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, 400 μM H_2O_2 , 0.37 unidades de HPR y concentraciones crecientes de $\text{HP-}\beta\text{-CDs}$. (●) 35 μM kaempferol, (○) 21 μM kaempferol, (■) 10.4 μM kaempferol.

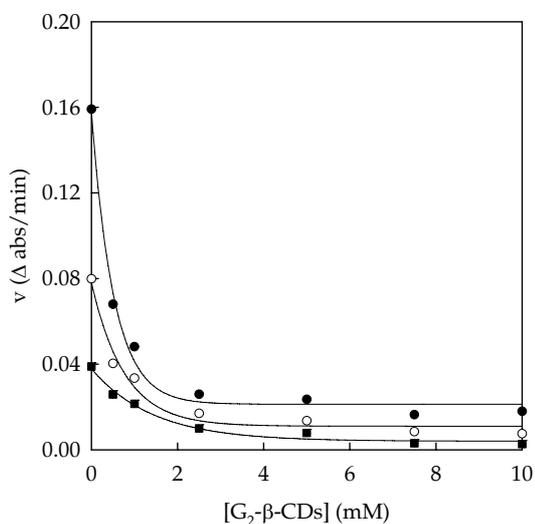


Figura VI.9.: Efecto de diferentes concentraciones de G₂-β-CDs en la oxidación de kaempferol por HPR. El medio de reacción contenía tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, 400 μM H₂O₂, 0.37 unidades de HPR y concentraciones crecientes de G₂-β-CDs. (●) 35 μM kaempferol, (○) 21 μM kaempferol, (■) 10.4 μM kaempferol.

Suponiendo que este efecto inhibitorio se debía a la formación de complejos de inclusión, y que el kaempferol libre es la única forma de sustrato que puede utilizar la enzima, utilizamos la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten modificada (**Ecuación III.10.**), que muestra una relación no lineal entre la velocidad de la reacción y la concentración de CDs, para ajustar los datos experimentales presentes en las **Figuras VI.7.- VI.9.**

La **Tabla VI.2.**, muestra los valores de K_C obtenidos para β-, HP- β- y G₂-β-CDs. Como se puede observar en dicha tabla, el valor de K_C obtenido fue mayor en el caso de HP-β-CDs, como ocurre en el caso de quercetina, miricetina (Lucas-Abellán y col, 2008a) y resveratrol (Lucas-Abellán y col, 2008d).

Tabla VI.2.: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, obtenido por el método enzimático.

Flavonol	β -CDs $K_C M^{-1}$	HP- β -CDs $K_C M^{-1}$	G ₂ - β -CDs $K_C M^{-1}$
Kaempferol	2670 \pm 245	11848 \pm 258	2325 \pm 312

1.2.1.3. Método de solubilidad

También se realizaron estudios de solubilidad, utilizando el método descrito por Higuchi y Connors en 1965.

Este estudio también se llevó a cabo en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, en presencia de concentraciones crecientes de β -, HP- β - y G₂- β -CDs (**Figuras VI.10.** y **VI.11.**). Para ello, se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de CDs y se saturaron con kaempferol, tal y como se describe en materiales y métodos (**Capítulo III**).

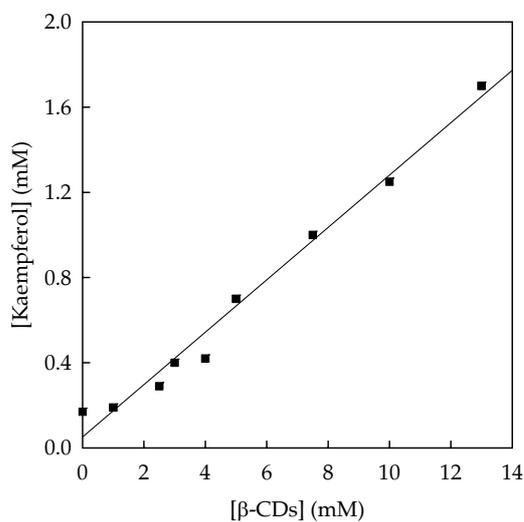


Figura VI.10.: Diagrama de fases de kaempferol con β -CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0 a 25 °C.

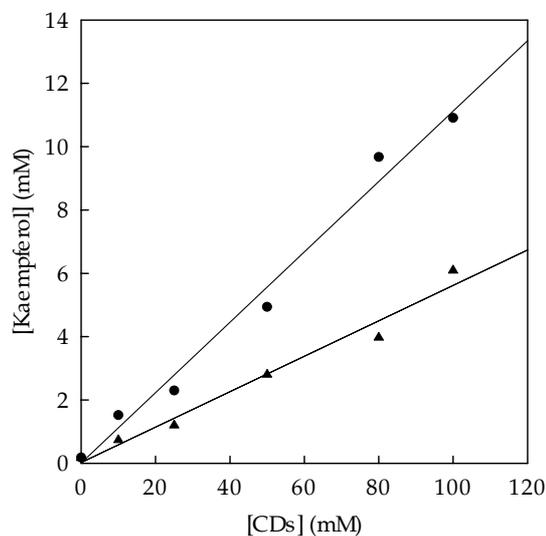


Figura VI.11.: Diagrama de fases de kaempferol con (●) HP-β-CDs y (▲) G₂-β-CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0 a 25 °C.

Los diagramas de fases obtenidos mostraron una relación lineal, tipo A_L, entre la concentración de kaempferol en disolución y la concentración de CDs, indicando una estequiometría 1:1 de los complejos de inclusión, en todos los casos estudiados.

Para calcular la K_C en cada caso, se utilizó la ecuación descrita por Higuchi y Connors, en 1965 (**Ecuación III.11.**). Los valores de K_C obtenidos usando el método de solubilidad (**Tabla VI.3.**) fueron similares a los obtenidos mediante el método enzimático (**Tabla VI.2.**) y superiores a los obtenidos por el método fluorimétrico (**Tabla VI.1.**).

Tabla VI.3.: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, obtenidos mediante el método de solubilidad.

Flavonol	β-CDs K _C M ⁻¹	HP-β-CDs K _C M ⁻¹	G ₂ -β-CDs K _C M ⁻¹
Kaempferol	2747 ± 210	11161 ± 302	2508 ± 150

Es importante señalar que el valor de K_C , depende del aumento de la solubilidad del analito al ser complejado en CDs y, del producto de solubilidad (S_0) del analito en el medio. La eficacia de complejación (CE), tiene en cuenta tanto el valor de K_C como la solubilidad en agua del compuesto encapsulado (S_0) (**Ecuación III.12.**). Para los complejos con estequiometría 1:1, la CE puede ser calculada utilizando la pendiente del diagrama de fases. Los valores de CE obtenidos para kaempferol, con cada una de las CDs estudiadas se muestran en la **Tabla VI.4.**

Tabla VI.4.: Eficacia de complejación (CE) entre kaempferol y distintos tipos de CDs.

Flavonol	S_0 (mM)	CE β -CDs	CE HP- β -CDs	CE G ₂ - β -CDs
Kaempferol	0.046	126.3 \pm 9.7	513.4 \pm 13.9	115.4 \pm 6.9

Para determinar cual de los 3 métodos (enzimático, solubilidad o fluorimétrico) era el más adecuado para el cálculo del valor de K_C entre kaempferol y CDs, se llevó a cabo un ensayo (Lucas-Abellán y col., 2007; Lucas-Abellán y col., 2008d) en el que se varió tanto la concentración de kaempferol, como la de CDs totales, para que al utilizar los valores de K_C obtenidos por los tres métodos y la **Ecuación III.9.**, se mantuviera constante la concentración de kaempferol libre ($[kaempferol]_f$) y que la tasa de oxidación de kaempferol por HPR también permaneciera constante, independientemente de la concentración de kaempferol total.

Como podemos observar en la **Figura VI.12.**, cuando utilizamos los valores de K_C obtenidos mediante el método enzimático o de solubilidad, los resultados fueron los esperados (la actividad enzimática era independiente de las concentraciones totales de CDs y kaempferol). Sin embargo, el resultado obtenido utilizando los valores de K_C obtenidos mediante el método fluorimétrico, se desvió de lo esperado (la actividad enzimática no se mantiene constante), lo que indica que la concentración de kaempferol libre no es la misma en todos los casos, por lo tanto, los valores de K_C utilizados no son los correctos.

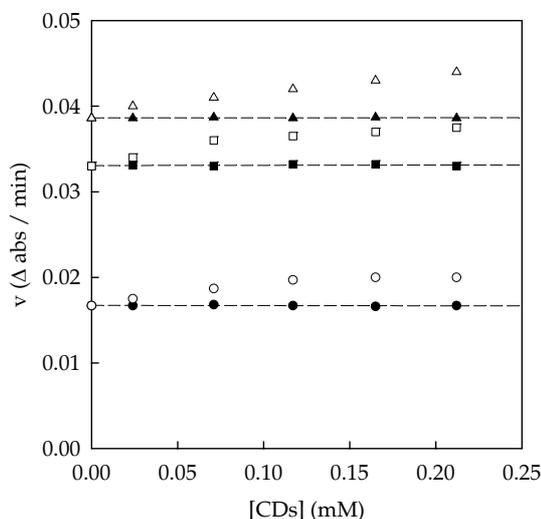


Figura VI.12.: Ensayo de CDs. La oxidación de kaempferol libre se llevó a cabo en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0 y 0.37 unidades de HPR. Las concentraciones de CDs y kaempferol totales usadas en cada caso para obtener 1.6, 5.7 ó 6.3 μM kaempferol libre fueron calculadas sustituyendo los valores de K_C en la Ecuación III.9., (●) 1.6 μM kaempferol libre en presencia de HP- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (○) 1.6 μM kaempferol libre en presencia de HP- β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente; (■) 5.7 μM kaempferol libre en presencia de β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (□) 5.7 μM kaempferol libre en presencia de β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente; (▲) 6.3 μM kaempferol libre en presencia de G_2 - β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido enzimáticamente; (△) 6.3 μM kaempferol libre en presencia de G_2 - β -CDs calculado usando el valor de K_C obtenido fluorimétricamente.

Como conclusión podemos decir que si se utiliza la disminución de fluorescencia de kaempferol, el valor de K_C se infravalora y la concentración de kaempferol libre será mayor de lo esperado, lo que podría explicar el aumento de la actividad de HPR observada en la Figura VI.12. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la complejación de resveratrol por Lucas-Abellán y col., en 2008d. Por

otro lado, al comparar K_C obtenida mediante el método enzimático con la obtenida por el método de solubilidad, podemos ver que ambos métodos presentan valores similares, pudiendo afirmar que ambos métodos son fiables, mientras que los valores de K_C obtenidos por el método fluorimétrico son menores y, en consecuencia, no pueden ser comparados (**Tabla VI.5**).

Tabla VI.5: Constantes de complejación (K_C) entre kaempferol y distintos tipos de CDs en tampón borato sódico 100 mM pH 9.0, calculados mediante los métodos fluorimétrico, enzimático y solubilidad.

Método	β -CDs $K_C M^{-1}$	HP- β -CDs $K_C M^{-1}$	G ₂ - β -CDs $K_C M^{-1}$
Fluorimétrico:			
Connors	1499 ± 199	9650 ± 288	984 ± 112
Benesi-Hildebrand	1622 ± 259	9872 ± 332	1056 ± 120
Scatchard	1555 ± 268	9367 ± 325	998 ± 109
Enzimático	2670 ± 245	11848 ± 258	2325 ± 312
Solubilidad	2747 ± 210	11161 ± 302	2508 ± 150

Por lo tanto, en el caso de kaempferol y otros compuestos que pueden ser oxidados por diferentes enzimas, el mejor método para el cálculo de su K_C es el método enzimático, debido a la alta especificidad de las enzimas, que sólo actúan sobre el sustrato libre. Cuando el método enzimático no se pueda utilizar, el estudio de solubilidad es un método opcional para calcular los valores de K_C . De las CDs utilizadas, HP- β -CDs fueron las más efectivas para complejar kaempferol, independientemente de los métodos utilizados para calcular el valor de K_C .

CAPÍTULO VII. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

1. EFECTO DE LA COMPLEJACIÓN DE MIRICETINA, QUERCETINA Y KAEMPFEROL EN HP- β -CDs, SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

1.1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoles son los flavonoides más frecuentes de nuestra dieta (Manach y col., 2004). Son inducidos por la luz solar (360 nm), atenuando así el efecto de los rayos ultravioleta en la planta (Price y col., 1995; Kolb y col., 2001). Por este motivo, los más de 200 flavonoles agliconas descritos, se suelen encontrar en los tejidos externos de muchas frutas y hortalizas (Williams y Harborne, 1994). También se inducen en productos vegetales procesados en fresco, como consecuencia del daño mecánico (Tudela y col., 2002).

En frutas, se encuentran alrededor de 50 flavonoles distintos, fundamentalmente los glicósidos de 3 agliconas: miricetina, quercetina y kaempferol (Figura VII.1).

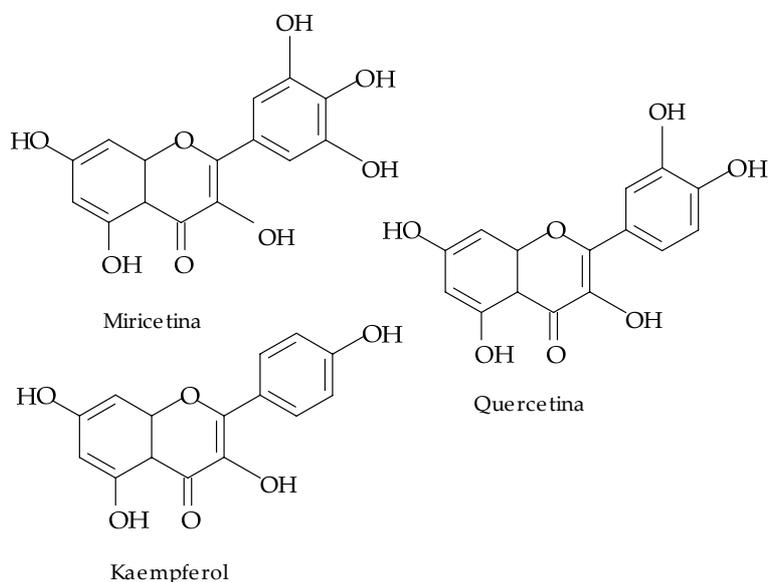


Figura VII.1.: Estructuras de los flavonoles: miricetina, quercetina y kaempferol.

Quercetina y kaempferol son los flavonoles más ampliamente distribuidos, encontrándose en el 80% de las frutas (albaricoque, fresa, ciruela, higos, etc.). Aproximadamente el 30% de las frutas contiene la combinación de agliconas miricetina, quercetina y kaempferol (**Tabla VII.1.**). La ingesta diaria de flavonoles (principalmente quercetina) se ha estimado entre 6 y 60 mg/día, dependiendo del país (Hollman y Arts, 2000).

Tabla VII.1.: *Contenido en flavonoles de diferentes alimentos (mg/100 g de porción comestible).*

Alimento	Miricetina	Quercetina	Kaempferol
Albaricoque		2.55	
Alcaparras		180.77	135.56
Arándano	1.09	3.04	
Arándano amargo	4.33	14.02	0.09
Brócoli		1.06	1.38
Cebolla		13.27	0.18
Cebollino		4.77	10
Cereza		3.20	
Ciruela		1.20	
Endibia			4.04
Espárragos		12.40	
Grosella negra	1.86	1.15	
Judías verdes		2.73	
Lechuga (iceberg)		2.47	0.07
Lechuga (matecosa)		1.19	0.02
Manzana		4.42	
Pimiento dulce		0.65	
Pimiento picante		16.80	
Sidra		0.48	
Té	0.45	2.07	1.34
Uva blanca	0.45	0.87	
Uva tinta	0.45	2.54	
Vino tinto	0.73	0.84	0.05

Fuente: USDA <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav02-1.pdf>

Los flavonoles poseen una gran capacidad antioxidante como resultado de su estructura química. Así el grupo *o*-difenoil en el anillo B, el doble enlace en las posiciones 2 y 3 conjugados con la función 4-oxo, y los grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5 (**Figura VII.2.**), presentan capacidad para secuestrar radicales libres (Bravo, 1998; Vinson y col., 1995; Hollman y Katan, 1997). Quercetina, con todas estas características en su estructura química, constituye uno de los antioxidantes naturales más potentes.

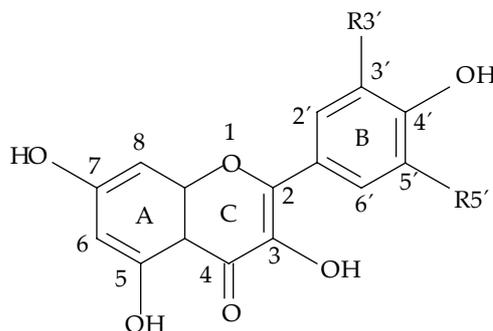


Figura VII.2.: Estructura general de los tres flavonoles.

1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1. Medida de actividad antioxidante

En este capítulo, se estudió el efecto de la inclusión de miricetina, quercetina y kaempferol en CDs sobre su actividad antioxidante, utilizando el método ORAC-FL. Estos tres flavonoles fueron seleccionados para su estudio por sus características químicas, biológicas, disponibilidad y abundancia en las plantas de tipo alimentario.

Por otra parte, los 3 flavonoles tienen diferente número de grupos hidroxilo en el anillo B (**Figura VII.1.**), hecho que influye en la capacidad de cada uno de ellos para deslocalizar electrones, y por consiguiente, en su capacidad antioxidante.

En primer lugar se midió la actividad antioxidante de miricetina, quercetina y kaempferol mediante el método ORAC-FL en ausencia de CDs, utilizando el método descrito por Dávalos y col., en 2004. El estudio se realizó en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4, con un volumen final de reacción de 200 μ L. La capacidad de inhibición en la oxidación de la FL se expresó como equivalentes de Trolox (μ M) y se cuantificó

mediante la integración del área bajo la curva de caída de FL (AUC) obtenida (**Figura VII.3.**), utilizando la Ecuación **III.16.**, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos (**Capítulo III**).

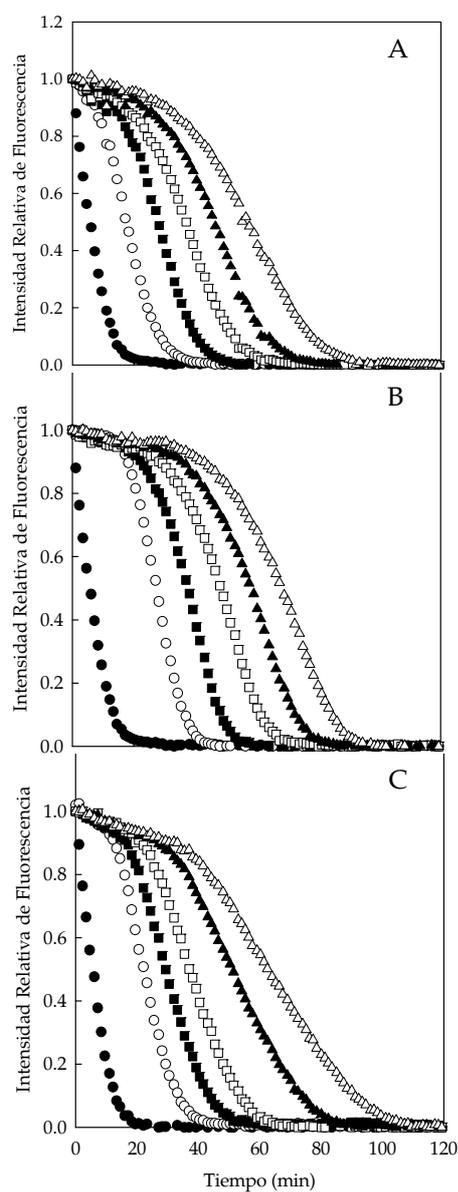


Figura VII.3.: Área bajo la curva de caída de la FL inducida por el radical AAPH de miricetina (**A**), quercetina (**B**) y kaempferol (**C**) a diferentes concentraciones: blanco (\bullet), $0.5 \mu\text{M}$ (\circ), $0.75 \mu\text{M}$, (\blacksquare), $1 \mu\text{M}$ (\square), $1.5 \mu\text{M}$ (\blacktriangle) y $2 \mu\text{M}$ (\triangle).

El análisis de los datos experimentales mostró una relación lineal entre la concentración de cada flavonol y su actividad antioxidante (**Figura VII.4.**).

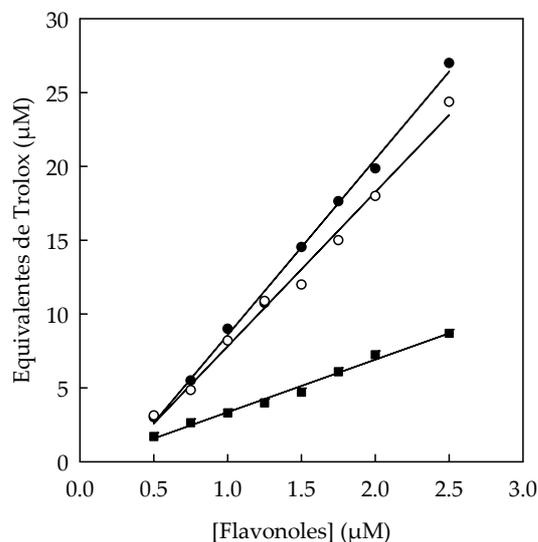


Figura VII.4.: Regresión lineal de miricetina (■), quercetina (○) y kaempferol (●) a diferentes concentraciones, expresados en equivalentes de Trolox (μM).

Teniendo en cuenta que una pendiente de 1.0 en la **Figura VII.4.**, significa que la actividad antioxidante de una concentración 1 μM de flavonol es equivalente a 1 μM de Trolox, miricetina (pendiente de 3.56), quercetina (pendiente de 10.45) y kaempferol (pendiente de 11.9) presentaron una actividad antioxidante de 3 a 12 veces mayor que la de Trolox C.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Tabart y col., en 2009.

La actividad antioxidante obtenida para cada una de ellos (kaempferol > quercetina > miricetina), fue inversamente proporcional al número de grupos hidroxilo en el anillo B. Kaempferol, que sólo presenta un grupo OH en posición C4' del anillo B, mostró ser un antioxidante ligeramente superior a quercetina (con un grupo catecol), y ambos muy superiores a miricetina que posee 3 OH en dicho anillo.

Una vez establecida la actividad antioxidante de cada uno de los flavonoles en ausencia de CDs, pasamos a estudiar el efecto de la presencia de HP-β-CDs en la actividad antioxidante de dichos flavonoles.

La presencia de CDs en el medio de reacción, dio como resultado un aumento en el área bajo la curva de caída de FL en todos los casos estudiados (**Figuras VII.5.-VII.7.**).

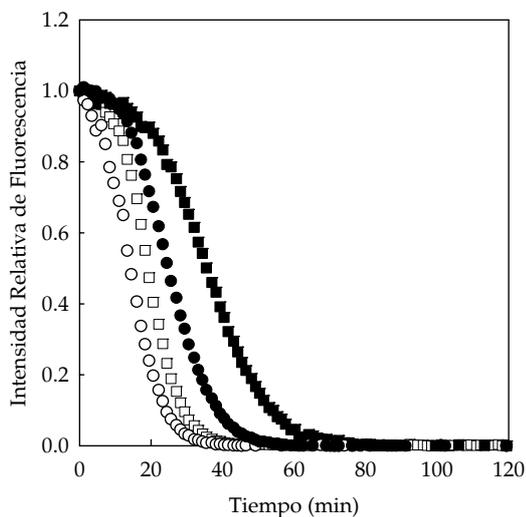


Figura VII.5.: Área bajo la curva de caída de la FL, en presencia de miricetina (0.5 (O) y 0.75 (\square) μM) y miricetina con 1.75 mM de HP- β -CDs (0.5 (●) y 0.75 (■) μM).

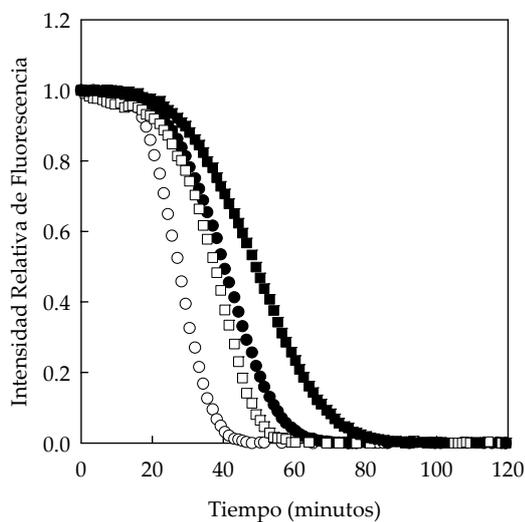


Figura VII.6.: Área bajo la curva de caída de la FL, en presencia de quercetina (0.5 (O) y 0.75 (\square) μM) y quercetina con 1.75 mM de HP- β -CDs (0.5 (●) y 0.75 (■) μM).

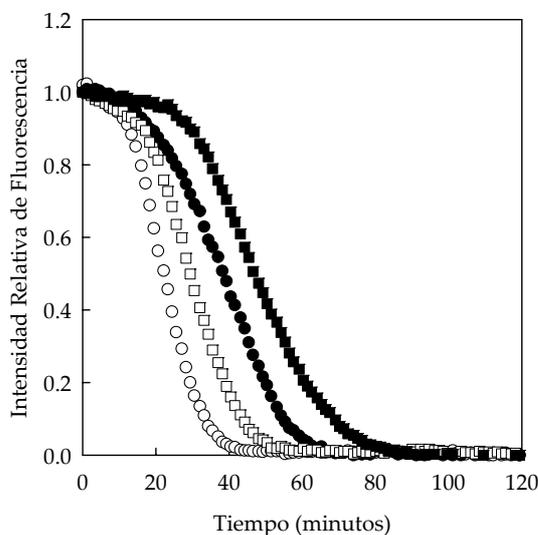


Figura VII.7.: Área bajo la curva de caída de la FL, en presencia de kaempferol (0.5 (○) y 0.75 (□) μM) y kaempferol con 1.75 mM de HP- β -CDs (0.5 (●) y 0.75 (■) μM).

Los valores de actividad antioxidante obtenidos mediante el método ORAC-FL, combinan el tiempo con el grado de inhibición de la curva en un solo dato.

Cuando se adicionaron concentraciones crecientes de HP- β -CDs al medio de reacción y se calculó el Net AUC en cada caso usando la **Ecuación III.16.**, los resultados obtenidos mostraron que conforme aumentó la concentración de CDs en el medio, también aumentaba la capacidad antioxidante, hasta llegar a saturación en todos los casos (**Figuras VII.8.- VII.10.**).

Tal y como se observa en las **Figuras VII.8.- VII.10.** a una concentración de HP- β -CDs aproximadamente 1 mM, todo el flavonol ha sido complejado por las CDs, dejando de estar disponible para el radical y por lo tanto, la actividad antioxidante que presenta a partir de ahí es independiente de la concentración de HP- β -CDs en el medio. En el nivel de saturación, se observó que los flavonoles presentaban aproximadamente el doble de capacidad antioxidante en presencia de CDs, que en su ausencia (**Figuras VII.8.-VII.10.**). Este aumento en la actividad antioxidante viene dado por la protección que ejercen las CDs sobre los flavonoles frente al ataque por los radicales libres.

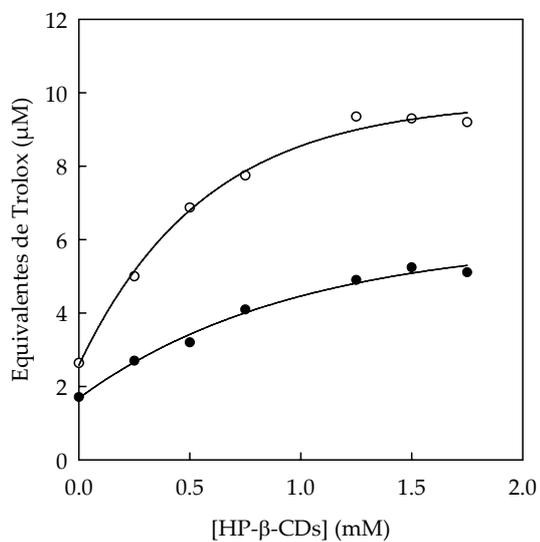


Figura VII.8: Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la capacidad antioxidante de miricetina. (●) 0.5 μM y (O) 0.75 μM de miricetina.

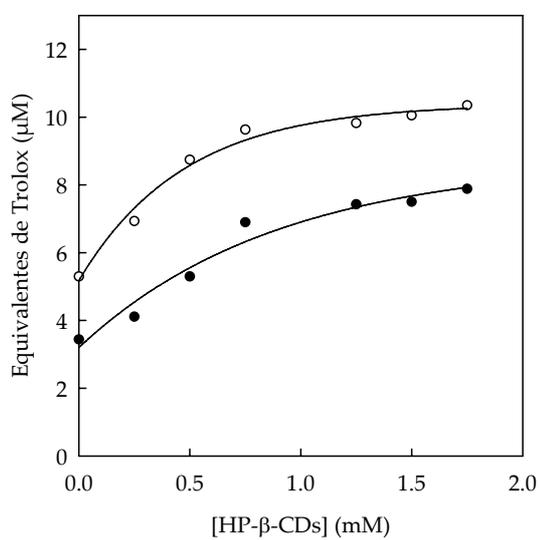


Figura VII.9: Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la capacidad antioxidante de quercetina. (●) 0.5 μM y (O) 0.75 μM de quercetina.

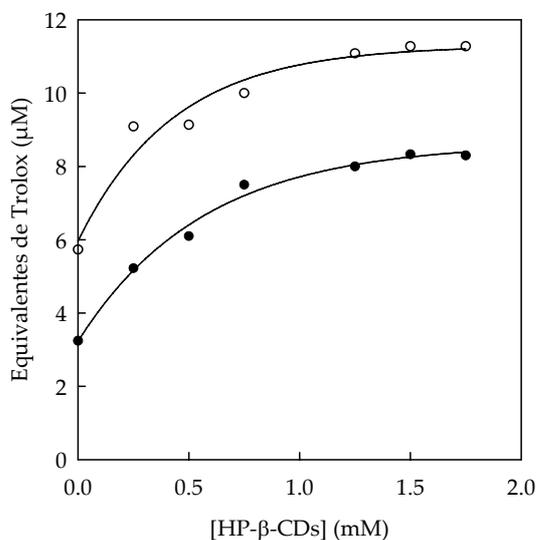


Figura VII.10.: Efecto de la concentración de HP-β-CDs en la capacidad antioxidante de kaempferol. (●) 0.5 μM y (○) 0.75 μM de kaempferol.

El Net AUC de miricetina, quercetina y kaempferol, no fue posible medirlo a concentraciones superiores a 0.75 mM, ya que los tiempos de medida superaban las 2 horas, tiempo óptimo establecido para el método ORAC por Lucas Abellán y col., en 2008.

A continuación se realizó un estudio en el que se midió la actividad antioxidante de miricetina, quercetina y kaempferol, a una concentración de 0.75 μM, en ausencia y presencia de 2 concentraciones diferentes de CDs.

Como podemos ver en la **Figura VII.11.**, a una concentración de HP-β-CDs 1.75 mM, situación en la que todos los flavonoles están complejados, kaempferol presentó la mayor actividad antioxidante (**Figura VII.11**, barras blancas) y miricetina los valores más bajos, al igual que en ausencia de HP-β-CDs (**Figura VII.11**, barras negras).

Cuando se adicionó una concentración de CDs en la que parte de los flavonoles permanecían libres (0.25 mM de HP-β-CDs), las diferencias entre las actividades antioxidantes de los tres flavonoles fueron mayores (**Figura VII.11**, barras grises). El aumento de la capacidad antioxidante de kaempferol a una concentración de HP-β-CDs 0.25 mM (1.7 veces), fue ligeramente inferior al aumento sufrido en presencia de

HP- β -CDs 1.75 mM (2 veces). Sin embargo, en el caso de miricetina y quercetina, la capacidad antioxidante de ambos flavonoles en presencia de HP- β -CDs 0.25 mM fue mucho menor (quercetina 1.4 veces y miricetina 1.8 veces) que en presencia de HP- β -CDs 1.75 mM (quercetina 2.1 veces y miricetina 3 veces).

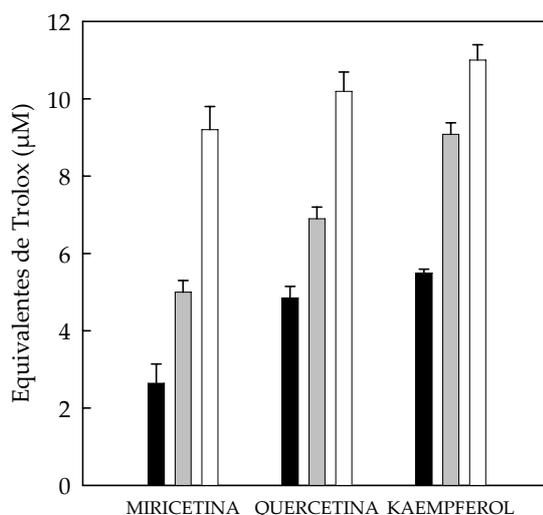


Figura VII.11.: Efecto de la concentración de HP- β -CDs en la actividad antioxidante de miricetina, quercetina y kaempferol en ausencia (0.75 μ M de flavonol (barras negras)) y presencia de 0.25 mM (barras grises) o 1.75 mM (barras blancas) de HP- β -CDs.

El aumento que se produce en la actividad antioxidante de los flavonoles (**Figuras VII.8.- VII.10.**) al aumentar la concentración de CDs en el medio de reacción, no puede atribuirse a la mayor solubilización de estos flavonoles, como se ha descrito anteriormente para licopeno (Bangalore y col., 2005) y α -tocoferol (Huang y col., 2002). En este caso, las CDs actúan como un reservorio de dosis controlada de sustrato, protegiéndolo frente al ataque de los radicales libres (AAPH) y prolongando así, su actividad antioxidante (teniendo en cuenta que tiene que haber siempre flavonol libre, ya que el fenómeno de complejación está gobernado por una dinámica de equilibrio).

En resumen, la actividad antioxidante de los tres flavonoles estudiados (miricetina, quercetina y kaempferol) aumenta al ser complejados por HP- β -CDs. Kaempferol presentó la mayor actividad antioxidante en ausencia y en presencia de HP- β -CDs, mientras que miricetina mostró el valor más bajo.

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES

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

1. Los tres flavonoles estudiados, miricetina, quercetina y kaempferol, pueden ser complejados en CDs, aumentando su solubilidad acuosa por la formación de complejos 1:1.
2. La complejación de miricetina, quercetina y kaempferol en CDs, provoca una variación en la intensidad de fluorescencia de los 3 flavonoles. En el caso de miricetina y quercetina, la fluorescencia aumenta con la complejación en CDs, mientras que, en el caso de kaempferol, la fluorescencia disminuye como consecuencia de la complejación.
3. La oxidación de miricetina, quercetina y kaempferol por HPR en presencia de H_2O_2 es inhibida en la medida en que estos compuestos son complejados por CDs, indicando que el flavonol libre, es el único sustrato disponible para la enzima.
4. La variación en la solubilidad, velocidad de oxidación enzimática y espectro de fluorescencia, permite calcular el valor de las constantes de complejación (K_c) de los tres flavonoles objeto de estudio con diferentes tipos de CDs.
5. El método enzimático y los estudios de solubilidad nos proporcionan valores reales de las constantes de complejación entre flavonoles y CDs. Sin embargo, el método fluorimétrico infravalora el valor de dichas constantes en los tres flavonoles estudiados.

6. De las CDs estudiadas, HP- β -CDs son las más efectivas en la complejación de miricetina, quercetina y kaempferol, ya que presentan mayor valor de K_C , independientemente del método utilizado para el cálculo de la misma.
7. La capacidad antioxidante de miricetina, quercetina y kaempferol aumenta tras su complejación en HP- β -CDs. Cada flavonol complejo presenta aproximadamente el doble de actividad antioxidante que cuando está libre en el medio, indicando que la complejación lo protege frente al ataque por radicales libres.

CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA

1. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamse, S. L., Kloots, W. J., Amelsvoort, J. M. M. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. *Nutri. Res.* **2005**, *25*, 305-317.
- Ackland, M. L., van de Waarsenburg, S., Jones, R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo.* **2005**, *19*, 69-76.
- Aggett, P. J., Antoine, J. M., Asp, N. G., Bellisle, F., Contor, L., Cummings, J. H., Howlett, J., Muller, D. J., Persin, C., Pijls, L. T., Rechkemmer, G., Tuijelaars, S., Verhagen, H. PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 5-30.
- Ahmad N., Gupta S., Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. *Archs. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 338-346.
- Ahmad, N., Feyes, D. K., Nieminen, A. L., Agarwal, R., Mukhtar, H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 1881-1886.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S., Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7286-7292.
- Akiyama, Y., Miyao, K. Microencapsulation of royal jelly. *Jpn. Kokai JP 77 80 463.* **1979.**
- Álvarez, E., Orallo, F. Los flavonoides (I): biodisponibilidad, acción antiinflamatoria e inmunorreguladora. *El Farmacéutico.* **2004**, *313*, 60-69.
- Álvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Torres-Rivas, F., Rodrigo-García, J., González-Aguilar, G. A. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -ciclodextrins. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2005**, *53*, 121-129.
- Angell, W. F., France, P. A. Detergent composition having granular cyclodextrin. *PCT Int Appl WO 01 18,163.* **2001.**
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., Biondi, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus

- cultures. *Fitoterapia*. **2007**, 78, 345-352.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimmira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2243–2250.
- 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.
- Astray, G., González-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., Simal-Gándera, L. A review on the use of 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.
- Bai, H. W., Zhu, B. T. Myricetin and quercetin are naturally occurring co-substrates of cyclooxygenases in vivo. *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids*. **2010**, 82, 45-50
- Balazs, L., Leon, M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem. Res.* **1994**, 19, 1131-1137.
- Bangalore, D. V., McGlynn, W., Scott, D. D. Effect of β -cyclodextrin in improving the correlation between lycopene concentration and ORAC values. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1878-1883.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., Marzona, M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with beta-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 27, 709–713.
- Barr, R. C., Spach, M. S. Inverse calculation of QRS-T epicardial potentials from body surface potential distributions for normal and ectopic beats in the intact Dog. *Circ. Res.* **1978**, 42, 661-675.
- Basan, C. Quantitative determination of piroxicam in a new formulation (piroxicam- β -cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *J. Pharm. Medical Anal.* **2001**, 26, 171-178.
- 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.
- Bestwick, C. S., Milne, L., Duthie, S. J. Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations. *Chem. Biol. Interact.* **2007**, 170, 76–85.
- 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.
- Biesalski, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2007**, 10, 724–728.
- Bindoli, A., Valente, M., Cavallini, L. Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity. *Pharmacol. Res. Commun.* **1985**, 17, 831-839.
- Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther.* **2001**, 90, 157-177.
- Bobé, G., Weinstein, S. J., Albanes, D., Hirvonen, T., Ashby, J., Taylor, P. R., Virtamo, J., Stolzenberg-Solomon, R. Z. Flavonoid Intake and Risk of Pancreatic Cancer in Male Smokers (Finland). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2008**, 17, 553-562.
- Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., Ruderman, N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes.* **2005**, 54, 3458-3465.
- Borghetti, S., Sinisterra, D., Bassani, L. Quercetin/ β -Cyclodextrin Solid Complexes Prepared in Aqueous Solution Followed by Spray-drying or by Physical Mixture. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2009**, 10, 235-242.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 343-355.
- 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.

- Buschmann, H. J., Schollmayer, E. Application of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53*, 185-191.
- Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors*. **1997**, *6*, 391-397.
- Cadenas, E. Revisión temática. Sustancias flavonoides. **2008**.
www.antioxidantes.com.ar/Art020.htm.
- Caesar, G. V. Dextrins and dextrinisations. In: Radley, J.A. Ed., starch and its derivatives, 4th edn., Chapman & Hall, London. **1968**, 282-289.
- Calabrò, M. L., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., Ficarra, R., Costa, C., Catania, S., Rustichelli, C., Gamberini, G., Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *J. Pharma. Biomed. Ana.* **2004**, *35*, 365-377.
- Camuesco, D., Comalada, M., Rodríguez-Cabezas, M. E., Nieto, A., Lorente, M. D., Concha, A., Zarzuelo, A., Gálvez, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143*, 908-918.
- Canadá, A. T., Giannella, E., Nguyen, T. D., Mason, R. P. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radical Biol. Med.* **1990**, *9*, 441-449.
- Cannavà, C. Crupi, V. Ficarra, P. Guardo, M. Majolino, D. Mazzaglia, A. Stancanelli, R. Venuti, V. Physico-chemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin/genistein complex. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 1064-1068
- 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.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3426-3431.
- Cassidy, A., Hanley, B., Lamuela-Reventos, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1044-1062.
- Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalaín, J., Mateo, C., Micol, V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Rad. Biol. Med.* **2003**, *34*, 648-662.

- Chaabi, M., Freund-Michel, V., Frossard, N., Randriantsoa, A., Andriantsitohaina, R., Lobstein, A. Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, 109, 134-139.
- Chopra, M., Fitzsimons, P. E. E., Strain, J. J., Thurnham, D. I., Howard, A. N. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clinical Chem.* **2000**, 46, 1162-1170.
- Clausen, T. P., Reichardt, P. B., Bryant, J. P., Provenza, F. Condensed tannins in plant defense: a perspective on classical theories. In: *Plant Polyphenols. Synthesis, properties, significance.* Hemingway, R.W., Lanks, P.E., Eds.; Plenum Press: *New York*, **1992**, 639-652.
- Clifford, M. N. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1063-1072.
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., Zarzuelo, A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur. J. Immunol.* **2005**, 35, 584-592.
- Comini, S., Mentink, L. Refining mixtures containing complexes of cyclodextrins with lipophilic compounds such as fatty acids. *Eur Pat. Appl. EP 440539.* **1991**.
- Connors, K. A. *Binding Constants.* Wiley: *New York*, **1987**, 103-108.
- Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 4, 564-582.
- Craig, W. J. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, 70, 491-499.
- 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.
- Croft, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolics acids. *Ann. NY Acad. Sci.* **2004**, 854, 435-442.
- Crupi, V., Ficarra, R., Guardo, M., Majolino, D., Stancanelli, R., Venuti, V. UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with beta-cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 44, 110-117.

- Dajas, F., Rivera, F., Blasina, F., Arredondo, F., Echeverry, C., Lafon, L., Morquio, A. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids, *Neurotox. Res.* **2003**, 5, 425–432.
- Daruházi, A. E., Szente, L., Balogh, B., Mátyus, P., Béni, S., Takács, M., Gergely, A., Horváth, P., Szőke, E., Lemberkovics, E. Utility of cyclodextrins in the formulation of genistein: Part 1. Preparation and physicochemical properties of genistein complexes with native cyclodextrins. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2008**, 48, 636-640.
- 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.
- Davies, N. M., Jamali, F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: Getting to the heart of the matter. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2004**, 7, 332–336.
- Davis, J. M., Murphy, E. A., McClellan, J. L., Carmichael, M. D., Gangemi, J. D. Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, 295, 505-509.
- Day, J. L., Donovan, C., Manach, G. Williamson. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 80, 15–21.
- De Caprio, J., Yun, J., Javitt, N. B. Bile acid and sterol solubilization in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Lipid Res.* **1992**, 33, 441-443.
- De Smett, P. A. G. M. An introduction to herbal pharmacoepidemiology. *J. Ethnopharmacol.* **1993**, 38, 197-208.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **1997**, 324, 1-18.
- Dias, A. S., Porawski, M., Alonso, M., Marroni, N., Collado, P. S., González-Gallego, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* **2005**, 135, 2299-2304.
- Dias, K., Nikolaou, S., De Giovanni, W. F. Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/ β -cyclodextrin and Al(III) quercetin/ β -cyclodextrin inclusion compounds. *Spectrochim. Acta Part Mol. Biomol. Spectros.* **2008**, 70, 154-161.
- Dijsselbloem, N. Van den Berghe, W., Naeyer, A.D., Haegeman, G. Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections. Multipurpose

- nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anticancer and anti-inflammatory therapy. *Biochem. Pharm.* **2004**, 68, 1171-1185.
- 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.
- Dixon, R. A. Phytoestrogens. *Annu Rev. Plant Biol.* **2004**, 55, 225-261.
- Dixon, R., Steele, C. "Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering". *Trends Plant Sci.* **1999**, 4, 394-400.
- Dreosti, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition.* **2000**, 16, 692-694.
- Duarte, J., Pérez Vizcaíno, F., Utrilla, P., Jiménez, J., Tamargo, J., Zarzuelo, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. pharmacol.* **1993a**, 24, 857-862.
- Duarte, J., Pérez-Palencia, R., Vargas, F., Ocete, M. A., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Tamargo, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 133, 117-124.
- Duarte, J., Pérez-Vizcaíno, F., Zarzuelo, A., Jiménez, J., Tamargo, J. Vasodilator effects of quercetin on isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **1993b**, 239, 1-7.
- Dufosse, L., Souchon, I., Feron, G., Latrassé, A., Spinnler, H. E. In situ detoxification of the fermentation medium during gamma-decalactone production with the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol. Prog.* **1999**, 15, 135-139.
- Duthie, G. G., Gardner, P.T., Kyle, J. A. M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, 62, 599-603.
- Duthie, G., Crozier, A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Lipidol.* **2000**, 11, 43-47.
- Eastburn, S. D., Tao, B. Y. Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* **1994**, 12, 325-339.
- Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop. *J. Nutr.* **2007**, 137, 718-737.
- Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.* **2004**, 38, 1311-1320.

- Espín, J. C., Tomás-Barberán A. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales. En "Alimentos funcionales". Ed. Fundación Española para la Ciencia y Tecnología (FECYT). Madrid. **2005**, 101-166.
- Fawcett, J. R., Bordayo, E. Z., Jackson, K., Liu, H., Peterson, J., Svitak, A., Frey, W. H. Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer's brain is prevented by pyrophosphate analogs, bioflavonoids and other antioxidants. *Brain Res.* **2002**, 950, 10–20.
- Feucht, W., Treutter, D. in: Inderjit, S., Dakshini, K. M. M., Foy, C. L. (Eds.), Principles and Practices of Plant Ecology, CRC Press, Boca Raton, FL, **1999**, 307–338.
- 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**.
- Formica, J. V., Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem. Toxicol.* **1995**, 33, 1061–1080.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 519-525.
- French, D. The Schardinger dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, 12, 189-260.
- 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**.
- Frömming, K. H., Szejtli, J. Cyclodextrins in pharmacy. Topics in inclusion science. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. **1994**.
- Fujimura, Y., Tachibana, H. Maeda-Yamamoto, M. Miyase, T. Sano, M. Yamada, K. Antiallergic Tea Catechin, (-)-Epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate, Suppresses FcεRI Expression in Human Basophilic KU812 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5729–5734.
- 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.
- García-Closas, R., Gonzalez, C. A., Agudo, A., and Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control.* **1999**, 10, 71–75.
- García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esterller, A., Sánchez-Campos, S., Tunon, M. J., Gonzalez-Gallego, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 557, 221–229.
- Gates, M. A., Tworoger, S. S., Hecht, J. L., De Vivo, I., Rosner, B., Hankinson, S. E. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer.* **2007**, 121, 2225–2232.
- German, J. B., Walzem R. L. The health benefits of wine. *Ann. Rev. Nut.* **2000**, 20, 561–593.
- Gerster, H. β -Carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1995**, 49, 155–168.
- Graf, B. A., Milbury, P. E., Blumberg, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J. Med. Food.* **2005**, 8, 281–290.
- Häkkinen, S. H., Karenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkanen, H. M., Törrönen A. R. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2274–2279.
- Halliwell, B. Antioxidant Characterization - Methodology and Mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49, 1341–1348.
- Halliwell, B. Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radic. Res.* **1996**, 25, 57–74.
- Halliwell, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23 suppl. **1993**, 1, 118–126.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, 280, 1–8.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB

- activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* **2007**, 2007, 45673-45683.
- 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.
- Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., Samuelsson, B. Isolation and structure of two postaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1974**, 71, 345-349.
- Haqqi, T. M., Anthony, D. D., Gupta, S., Ahmad, N., Lee, M. S., Kumar, G. K., Mukhta, H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**, 96, 4524-4529.
- Hara, H., Hashimoto, 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.
- Harborne, J. B. y Baxter, H. The Handbook of Natural Flavonoids. **1999**. Vol. 1 and 2 (Chichester: John Wiley and Sons).
- Harborne, J. B., Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* **2000**, 55, 481-504.
- Hatae, S., Nakajima, K. Skin whitening cosmetics. *Jpn Kokai JP 86109 705.* **1986**.
- Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 96, 67-202.
- Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice after consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, 17, 2744-2752.
- Hedges, R. A. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2035-2044.

- Heijnen, C. G., Haenen, G. R., Oostveen, R. M., Stalpers, E. M., Bast, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic. Res.* **2002**, 36, 575-581.
- Hendrich, S. Bioavailability of isoflavones. *J. Chromatogr. B.* **2002**, 777, 203-210
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer.* **1993**, 20, 21-29.
- Higuchi, T., 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. *Prog. Theor. Phys.* **1977**, 58, 706-708.
- Hirose, T., Yamamoto, Y. Hinokitol containing cyclo-olefin polymer compositions and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties. *Japanese Patent JP 55480.* **2001**.
- Hocino, T., Uekama, K., Pitha, J. Increase in temperature enhances solubility of drugs in aqueous solutions of hydroxypropylcyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **1993**, 98, 239-242.
- Holland, L., Rizzi, G., Malton, P. Cosmetic compositions comprising cyclic oligosaccharides and fragrance. *PCT Int Appl WO 67,716.* **1999**.
- Hollman P. C. H., Arts, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1081-93.
- Hollman, P. C., Katan, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* **1997**, 51, 305-310.
- Holvoet, P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol.* **2004**, 59, 479-484.
- Hotamisligil, G. S. Inflammation and Metabolic Disorders. *Nature.* **2006**, 444, 860-867.
- 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 β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1815-1821.
- Hurtubise, E. U. Phosphorimetry. Theory, instrumentation and Applications. U.O.H. Nueva York, **1990**.

- Hussain, M. A., Diluccio, R. C., Maurin, M. B. Complexation of moricizine with nicotinamide and evaluation of the complexation constants by various methods. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 77–79.
- Inane, Y., Kuan, F. H., Takahashi, Y., Ohújó, A., Structure and molecular dynamics of solid-state inclusion complexes of cyclodextrin and permethylated cyclodextrin with benzaldehyde studied by high-resolution CP/MAS ¹³C NMR. *J. Incl. Phen.* **1986**, *4*, 281–290.
- Irie, T., Uekama, K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 101–123.
- Irie, T., Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147–162.
- 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.
- Jarho, P., Urtti, A., Pate, D. W., Suhonen, P., Järvinen, T. Increase in aqueous solubility. *Int. J. Pharm.* **1996**, *137*, 209–217.
- Jiang, J. S., Chien, H. C., Chen, C. M., Lin, C. N., Ko, W. C. Potent suppressive effects of 3-O-methylquercetin 5, 7, 3', 4'-O-tetraacetate on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1156–1162.
- Jiménez, C. I. E., Cuevas Martínez, E. Y., Guevara Fonseca, J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev. Fac. Med.* **2009**, *52*, 73–75.
- Jullian, C., Miranda, S., Zapata-Torres, G., Mendizábal, F., Olea-Azar, C. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3217–3224.
- Julsing, M. K., Koulman, A., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J., Kayser, O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 265–279.
- Jung, C. H., Lee, J. Y., Cho, C. H., Kim, C. J. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 1599–1607.
- Jung, T. H., Ha, H. J., Kwak, H. S. Development of cholesterol-reduced mayonnaise with crosslinked β -cyclodextrin and added phytosterol. *Korean J. Food Sci. animal Res.* **2008**, *28*, 211–217.
- Juzwiak, S., Wojcicki, J., Mokrzycki, K., Marchlewicz, M., Bialecka, M., Wenda-Rozewicka, L., Gawronska-Szklarz, B., Drozdziak, M. Effect of quercetin on

- experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol. Rep.* **2005**, 57, 604-609.
- Kahl, R., Hildebrandt, A. G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **1986**, 24, 1007-1014.
- Kamada, C., da Silva, E. L., Ohnishi-Kameyama, M., Moon, J. H., Terao, J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res.* **2005**, 39, 185-194.
- Kamal, A., Rabalingum, T., Venugopalan, N. Enantioselective hydrolysis of aryloxypropionic esters by bovine serum albumin: enhancement in selectivity by β -CD. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1991**, 2, 39-42.
- 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.
- Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, A. A., Nash, R. J. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8206-8211.
- Katsenis, K. Micronized purified flavonoid fraction (MPFF): a review of its pharmacological effects, therapeutic efficacy and benefits in the management of chronic venous insufficiency. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2005**, 3, 1-9.
- Kawashima, K. Prevention of discoloration of food colorants. *Jpn. Kokai JP 8071464.* **1980**.
- Kim, H. O., Hill, R. D. Modification of wheat flour dough characteristics with cyclodextrins. *Cereal Chem.* **1984**, 61, 406-407.
- Knekt, P., Isotupa, S., Rissanen, H., Heliövaara, M., Järvinen, R., Häkkinen, S., Aromaa, A., Reunanen, A. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, 54, 415-417.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 76, 560-568.
- Ko, C. H., Shen, S. C., Hsu, C. S., Chen, Y. C. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 15, 913-927.

- Koeppen, B. H., Herrmann, K. Flavonoid glycosides and hydroxy-cinnamic acid esters of blackcurrants (*Ribes nigrum*). 9. Phenolics of fruits. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*. **1977**, 164, 263–268.
- Kolb, C., Käser, M. A., Kopecky, J., Zotz, G., Reiderer, M., Pfündel, E. E. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology*. **2001**, 127, 863–875.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem*. **2003**, 64, 923-933.
- Kowalski, J., Samojedny, A., Paul, M., Pietsz, G., Wilczok, T. Effect of kaempferol on the production and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in J774.2 macrophages. *Pharmacol. Rep*. **2005**, 57, 107-112.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med*. **2002**, 113, 715-885.
- Kristmundsdóttir, T., Loftsson, T., Holbrook, W. P. Formulation and clinical evaluation of a hydrocortisone solution for treatment of oral disease. *Int. J. Pharm*. **1996**, 139, 63–68.
- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Donovan, J. L., Manach, C., Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*?. *Am. J. Clin. Nutr*. **2004**, 80, 15-21.
- Kublik, H., Bock, T. K., Schreier, H., Müller, B. W. Nasal absorption of 17 β -estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. **1996**, 42, 320–324.
- Kumamoto, T., Fujii, M., Hou, D.-X. Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. *Cancer lett*. **2009**, 275, 17-26
- Kundu, J. K., Na, H. K., Chun, K. S., Kim, Y. K., Lee, S. J., Lee, S. S., Lee, O. S., Sim, Y. C., Surh, Y. J. Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. *J. Nutr*. **2003**, 133, 3805–3810.
- Kwak, H. S., Kim, J. H., Choi, H. J., Kang, J. Immobilized β -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk. *Arch. Pharmacol. Res*. **2004**, 27, 873-877.

- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., Engelhardt, U. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agri. Food Chem.* **2000**, *48*, 2848–2852.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G., Liao, J., Yang, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 284-291.
- Lambert, J. D., Sang, S., Yang, C. S. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 583-585.
- Laranjinha, J. Caffeic acid and related antioxidant compounds: biochemical and cellular effects. In: Cadenas E, Packer L, editors. Handbook of antioxidants. 2nd edition. Nueva York: Marcel Dekker. **2002**, 279-302.
- Larrosa, M., Llorach, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable by product extracts. *Lebens Wiss Technol.* **2002**, *35*, 532-542.
- Lath, J. L., Chin, T. F. Schardinger dextrin interaction IV. Inhibition of hydrolysis by means of molecular complex formation. *J. Pharm. Sci.* **1964**, *53*, 924-927.
- 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.
- Lea, A. G. H., Arnold, G. M. The phenolics of ciders, bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29*, 478–483.
- Leung, H. W., Lin, C. J., Hour, M. J., Yang, W. H., Wang, M. Y., Lee, H. Z. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 2005-2013.
- Lin, J., Zhang, S. M., Wu, K., Willett, W. C., Fuchs, C. S., Giovannucci, E. Flavonoid intake and colorectal cancer risk in men and women. *Am. J. Epidemiol.* **2006**, *1*, 644–651.
- Liu, C. J., Blount, J. W., Steele, C. L., Dixon, R. A. Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 14578–14583.
- Loftsson, T. Effects of cyclodextrins on chemical stability of drugs in aqueous solutions. *Drug Stabil.* **1995**, *1*, 22–33.

- Loftsson, T., Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017–1025.
- Loftsson, T., Leeves, N., Bjornsdottir, B., Duffy, L., Masson, M. Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1254–1258.
- Loftsson, T., Ólafsdóttir, B. J., Fridriksdóttir, H., Jónsdóttir, S. Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1993**, *1*, 95–101.
- Loftsson, T., Stefánsson, E. Effect of cyclodextrins on topical drug delivery to the eye. *Drug. Devel. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 473–481.
- López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Pérez-López, A. J., Carbonell-Barrachina, A., Cuadra-Crespo, P. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β -cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chrom.* **2006**, *1135*, 158-165.
- López-Sánchez, C., Martín-Romero, F. J., Sun, F., Samhan-Arias, A, K., García-Martínez, V., Gutiérrez-Merino, C. Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in rat brain. *Brain Res.* **2007**, *1182*, 123–137.
- Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Düsterhöft, T., Baumann, G., Stangl K., Stangl, V. A Constituent of Green Tea, Epigallocatechin-3-gallate, Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase by a Phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent Protein Kinase-, and Akt-dependent Pathway and Leads to Endothelial-dependent Vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6190-6195.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E. Complexation of resveratrol by native modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food Chem.* **2008d**, *111*, 262-267.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón-Hernández, J. A., Núñez-Delicado, E. Encapsulation of quercetina and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *J. Agric. Food Chem.* **2008a**, *56*, 255-259.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., López-Nicolás, J. M., Nuñez-Delicado, E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chem.* **2007**, *104*, 39–44.

- Lucas-Abellán, C., Gabaldón-Hernández, J. A., Penalva, J., Fortea, M. I., Núñez-Delicado, E. Preparation and Characterization of the inclusion complex of chlorpyrifos in cyclodextrins to improve insecticide formulations. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, 56, 8081-8085.
- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E. ORAC-Fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* **2008c**, 56, 2254-2259.
- Luong, J. H. T., Male, K. B., Zhao, S. Electrochemical preparation of 1, 1'-dimethylferricinium from water-soluble 1, 1'-dimethylferrocene-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex and its applications in enzyme assay. *Anal. Biochem.* **1993**, 212, 269-276.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. Fruit Phenolics. Boca Raton, USA: CRC Press. **1990**.
- Mahedero, M. C., Muñoz de la Peña, A., Bautista, A., Aaron, J. J. An investigation of inclusion complexes of cyclodextrins with phenylurea herbicides by photochemically induced fluorescence. Analytical applications. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2002**, 42, 61-70.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. Polyphenols. Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727-47.
- Manach, C., Texier, O., Morand, C., Crespy, V., Régéat, F., Demigné, C., Rémésy, C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 27, 1259-1266.
- Manjeet, K. R., Ghosh, B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* **1999**, 21, 435-443.
- 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 quinolininium salts. *Anal. Chim. Acta.* **1985**, 170, 95-100.
- Martínez-Flórez, S. J., González-Gallego, J. M., Culebras, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **2002**, 17, 271-278.

- Martínez-Tomé, M., Jimenez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R. Murcia, M. A. "Evaluation of the antioxidant properties of mediterranean spices compared with common additives for use as functional foods". *J. Food Protection*. **2001**, 64, 1412-1419.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2000**, 50, 5-18
- Másson, M., Loftsson, T., Jónsdóttir, S., Fridriksdóttir, H., Petersen, D.S. Stabilisation of drugs through complexation with non-ionic and ionic cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **1998**, 164, 45-55.
- Matito, C., Mastorakou, F., Cantelles, J. J., Torresm J. L., Cascante, M. Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur. J. Nutr.* **2003**, 42, 43-49.
- Mazza, G. Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesados, Ed. Acribia, **2000**.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. Anthocyanins from red wine their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochem.* **2005**, 66, 2540-2548.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52, 673-751.
- Miean, K. H., Mohamed, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3106-3112.
- Min, Y. D., Choi, C. H., Bark, H., Son, H. Y., Park, H. H., Lee, S., Park, J. W., Park, E. K., Shin, H. I., Kim, S. H. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm. Res.* **2007**, 56, 210-215.
- Molina-Jiménez, M. F., Sánchez-Reus, M. I., Andres, D., Cascales, M., Benedi, J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Brain Res.* **2004**, 1009, 9-16.
- Molina-Jiménez, M. F., Sánchez-Reus, M. I., Cascales, M., Andrés, D., Benedí, J. Effect of fraxetin on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma cell model of rotenone neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N-acetylcysteine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, 209, 214-225.

- Moncada, S., Needleman, P., Bunting, S., Vane, J. R. Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition. *Prostaglandins*. **1976**, 12, 323–336.
- Moon, Y. J., Wang, X., Morris, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro*. **2006**, 20, 187–210.
- Morris, M. E., Zhang, S. Flavonoid–drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci*. **2006**, 7, 2116–2130.
- 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., Mora-Diez, N., Mahedero-García, M. C., Bohoyo-Gil, D., Cañada-Cañada, F. A chemometric sensor for determining sulphaguanidin residues in Money simples. *Talanta*. **2007**, 73, 304–313.
- Muñoz de la Peña, A., Ndou, T. T., Anigbogu, V. C. Warner, I. M. Solution studies of beta-cyclodextrin-pyrene complexes under reversed-phase liquid chromatographic conditions: effect of alcohols as mobile-phase comodifiers. *Anal. Chem*. **1991**, 63, 1018–1023.
- Muñoz-Botella, S., del Castillo, B., Martín, M. A. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars. Pharm*. **1995**, 36, 187–198.
- Na, H. K., Surh, Y. J. Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol. Nutr. Food. Res*. **2006**, 50, 152–159.
- Nadova, S., Miadokova, E., Cipak, L. Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis. *Neoplasma*. **2007**, 54, 202–206.
- Nakai, Y., Nakajima, S., Yamamoto, K., Terada, K., Kanno, T. Effects of grinding on the physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose V: Comparison with Tri-O-methyl- β -cyclodextrin Ground Mixtures. *Chem. Pharm. Bull*. **1980**, 28, 1552–1558.
- Nakajima, J., Tanaka, Y., Yamazaki, M., Saito, K. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3 glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J. Biol. Chem*. **2001**, 276, 25797–25803.
- Nelson, D. P., Kiesow, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem*. **1972**, 49, 474–478.

- Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K. M., Neznanova, L., Kondratov, R., Banerjee, A. K., Gudkov, A. V. Quercetinase pirin makes poliovirus replication resistant to flavonoid quercetin. *DNA Cell. Biol.* **2008**, *27*, 191-198
- Nijveldt, J. R., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 418-425.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Brownlee, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int; 58 Suppl.* **2000**, *77*, 26-30.
- Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2830-2835.
- Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A. J., López-Nicolás, J. M. Polyphenol oxidase from dominga table grape. *J. Agri. Food Chem.* **2005**, *53*, 6087-6093.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. Cyclodextrins as Diethylstilbestrol carrier system: Characterization of Diethylstilbestrol-Cyclodextrins complexes. *Pharma. Res.* **1999a**, *16*, 854-858.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. Hidroperoxidase activity of lipoxygenase in the presence of cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999b**, *367*, 274-280.
- Olea-Azar, C., Abarca, B., Norambuena, E., Opazo, L., Jullian, C., Valencia, S., Ballesteros, R., Chadlaoui, M. ESR, electrochemical and cyclodextrin-inclusion studies of triazolopyridyl pyridyl ketones and dipyrindyl ketones derivatives. *Mol. Biomol. Spe.* **2008**, *71*, 703-709.
- Ong, K. C., Khoo, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sciences.* **2000**, *67*, 1695-1705.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J. C., Barré-Sinoussi, F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *190*, 469-476
- Oršolić, N., Horvat, K. A., Šver, L., Terzić, S., Bašić, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J. ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 307-315.
- Ota, T., Takeda, F. Cyclodextrins as cheese additives. *Jpn. Kokai JP* 8175060. **1981**.

- 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, J. S., Rho, H. S., Kim, D. H. Chang, I. S. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2951-2956.
- 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.
- Peluso, M. R. Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. *Exp. Biol. Med.* **2006**, 231, 1287-1299.
- Pérez-Trueba, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **2003**, 22, 48-57.
- Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035-1042.
- 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.
- Poyrazoglu, E., Gokmen, V., Aruk, N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J. Food Comp. Anal.* **2002**, 15, 567-575.
- Pralhad, T., Rajendrakumar, K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 34, 333-339.
- Prasad, N., Strauss, D., Reichart, G. Cyclodextrins inclusion for food, cosmetics and pharmaceuticals. *European Patent. 1,084,625.* **1999**.
- Price, S. F., Breen, P. J., Valladao, M., Watson, B. T. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, 187-194.
- Pszczola, D. E. Getting more fruits and vegetables into foods. *Food Tech.* **2003**, 57, 52-63
- Punyasiri, P. A. N., Abeysinghe, I. S. B., Kumar, V., Treutter, D., Duy, D., Grosch, S., Martens, S., Forkmann, G., Fischer, T. C. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 431, 22-30.

- Rafter, J. J. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 219-224.
- Rajewski, R. A., Stella, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1142-1168.
- Rankin, S. M., de Whalley, C. V., Houtt, J. R., Jessup, W., Wilkins, G. M., Collard, J., Leake, D. S. The modification of low density lipoprotein by the flavonoids myricetin and gossypetin. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 67-75.
- Rao, B. P., Zurréis, S., Balasangameshwer, C. N. Caracterización fisicoquímica de los complejos de hidroxietil- β -ciclodextrina y β -ciclodextrina de rifampicina. *Ars Pharm*, **2006**, *47*, 37-59.
- Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., Peppard, T. L. Flavour release from cyclodextrins complex: comparison of alpha, beta and gamma types. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 1234-1239.
- Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., Peppard, T. L. The effect of solvent interactions on α -, β - and γ -cyclodextrins/flavour molecular inclusion complexes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 388-392.
- Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., Peppard, T. L. Encapsulation of flavours using cyclodextrins: comparison of flavour retention in alpha, beta and gamma types. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 3271-3279.
- Reineccius, T. A., Risch, S. J. Encapsulation of artificial flavours by β -cyclodextrin. *Perfumer of flavorist.* **1986**, *11*, 1-11.
- Renaud, S., de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* **1992**, *339*, 1523-1526.
- Rice-Evans, A., Packer, L. Flavonoids in health and disease. New York: Marcel Dekker Inc; **1998**.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant. Sci.* **1997**, *2*, 152-159
- Rice-Evans, C. A., Packer, L. Flavonoids in health and disease. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc; **2003**.
- Rice-Evans, C. Flavonoid Antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 797-807.
- Rimm, E. R., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M., Willet, W. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* **1996**, *125*, 384-389.

- Rivera, L., Moron, R., Sanchez, M., Zarzuelo, A., Galisteo, M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity*. **2008**, 16, 2081-2087.
- Robak, J., Gryglewski, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmac.* **1988**, 37, 837-841.
- Robards, K., Antolovich, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *A review, Analyst*. **1997**, 122, 11-34.
- Robards, K., Prentzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**, 66, 401-436
- Roberfroid, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71, 1660-1664.
- Roberfroid, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. *Br. J. Nutr.* **2002**, 88, 133-138.
- Rogerio, A. P., Kanashiro, A., Fontanari, C., da Silva, E. V. G., Lucisano-Valim, Y. M., Soares, E. G., Faccioli, L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm Res.* **2007**, 56, 402-408.
- Romero, M., Jiménez, R., Sánchez, M., López-Sepúlveda, R., Zarzuelo, M. J., O'Valle, F., Zarzuelo, A., Pérez-Vizcaíno, F., Duarte, J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis*. **2009**, 202, 58-67
- Rusak, G., Gutzeit, H. O., Muller, J. L. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. *Nutr. Res.* **2005**, 25, 143-155.
- Saenger, W. Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. *In Inclusion Compounds*, edited by Atwood, U. L., Davies, J. E., McNicol, D. D. Academic Press, Londres, **1984**, 2, 231-259.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, 19, 481-486.
- Saitô, H., Izumi, G., Mamizuka, Suzuki, S., Tabeta, R. A ¹³C cross polarization-magic angle spinning (CP-MAS) n.m.r. study of crystalline cyclohexa-amylose inclusion complexes. Conformation-dependent ¹³C chemical shifts

- are related to the dihedral angles of glycosidic linkages. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 1386-1388.
- Sakanashi, Y., Oyama, K., Matsui, H., Oyama, T. B., Oyama, T. M., Nishimura, Y., Sakai, H., Oyama, Y. Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: a model experiment. *Life Sciences.* **2008**, 83, 164-169.
- Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P. C. H., de Vries, J. H. M., Katan, M. B. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J. Am. Diet Assoc.* **2002**, 102, 1414-1420.
- Scalbert, A., Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of phenols. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2073-2085.
- Scalia, S., Villani, S., Casolari, A. Inclusion complexation of the sunscreen agent 2-ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: effect on photostability. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, 51, 1367-1374.
- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 660-672.
- Schardinger, F. Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Microben. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II.* **1911**, 29, 188-197.
- Schardinger, F. Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* **1903**, 6, 865-880.
- Schardinger, F., *Wien. Klin. Wochenschr.* **1904**, 17, 207-209.
- Schlachterman, A., Valle, F., Wall, K. M., Azios, N. G., Castillo, L., Morell, L., Washington, A. V., Cubano, L. A., Dharmawardhane, S. F. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl. Oncol.* **2008**, 1, 19-27.
- 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.
- Schroeder, E. K., Kelsey, N. A., Doyle, J., Breed, E., Bouchard, R. J., Loucks, A., Harbison, A., Linseman, D. A. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect

- against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid. Redox. Signal.* **2008**, 11, 469-480.
- Schubert, W., Eriksson, U., Edgar, B., Cullberg, G., Hedner, T. Flavonoids in grapefruit juice inhibit the in vitro hepatic metabolism of 17 beta-estradiol. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1995**, 20, 219-224.
- Sellappan, S., Akoh, C. C., Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* Chicago, **2002**, 50, 2432-2438.
- Sharma, V., Joseph, C., Ghosh, S., Agarwal, A., Mishra, M. K., Sen, E. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6, 2544-2553.
- Shaw, P. E., Wilson, C. W. Debittering of citrus juices with cyclodextrin polymer. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 646-647.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., Sugimoto, H. Three distinct neuroprotective functions of myricetin against glutamate-induced neuronal cell death: involvement of direct inhibition of caspase-3. *J. Neurosci. Res.* **2008**, 86, 1836-1845.
- Shoskes, D. A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation.* **1998**, 66, 147-152.
- Shutenko, Z., Henry, Y., Pinard, E., Seylaz, J., Potier, P., Berthet, F., Girard, P., Sercombe, R. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol.* **1999**, 57, 199-208.
- Siegelin, M. D., Gaiser, T., Habel, A., Siegelin, Y. Myricetin sensitizes malignant glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by down-regulation of the short isoform of FLIP and bcl-2. *Cancer Letters.* **2009**, 283, 230-238.
- Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **1991**, 91, 31-39.
- 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., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., Ramassamy, C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease:

- bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4855–4873.
- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 341–359.
- Skibola, C. F., Smith, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 375–383.
- 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**.
- Spedding, G., Ratty, A., Middleton, E. Jr. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* **1989**, *12*, 99–110.
- Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S. K. S., Debnam, E. S., Tyrrell, R. M., Hahn U., Rice-Evans, C. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative stress-induced apoptotic cell death involving caspase-3 activation. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 493–500.
- Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., Saito, K. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 288–303.
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F. J., Polidori, M. C., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Viña-Ribes, J., Williamson, G., Astley, S. B. Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.* **2002**, *23*, 39–100.
- Stancanelli, R., Ficarra, R., Cannavà, C., Guardo, M., Calabrò, M.L., Ficarra, P., Ottanà, R., Maccari, R., Crupi, V., Majolino, D., Venuti, V. UV-vis and FTIR-ATR characterization of 9-fluorenon-2-carboxyester/(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin inclusion complex *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 704–709.
- Stancanelli, R., Mazzaglia, A., Tommasini, S., Calabrò, M. L., Villari, V., Guardo, M., Ficarra, P., Ficarra, R. The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: A spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 980–984.

- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X., Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7449-7454.
- Suzuki, M., Ito, K., Fushimi, C., Kondo, T. The freezing point depression method for the determination of binding parameters of drugs by polyvinylpyrrolidone and polyoxyethylene *n*-dodecylether. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41, 1616-1620.
- Szejtli, J. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Akadémiai Kiadó, Budapest. **1982**, 213-214
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743-1753.
- Szejtli, J., Szente, L., Banky-Elod, E. Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable flavor substances by cyclodextrins. *Acta Chimica Sci. Hung.* **1979**, 101, 27-46.
- Szente, L., Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Food Sci. Technol.* **2004**, 15, 137-142.
- Szente, L., Szejtli, J. Stabilization of flavors by cyclodextrins. Eds., Flavor Encapsulation Am. Chem. Soc. Symp. S. Risch, S., Reineccius, G. New Orleans: ACS. **1987**, Series 370, 148-158.
- Szente, L., Szejtli, J., Kis, G. L. Spontaneous opalescence of aqueous γ -cyclodextrin solutions: complex formation or self-aggregation. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 778-781.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Dommes, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **2009**, 113, 1226-1233.
- Tatsuya, S. Stabilisation of fragrance in bathing preparations. *Japanese Patent* 11,209,787. **1999**.
- Taylor, A. Cataract: relationship between nutrition and oxidation. *J. Am. Coll. Nutr.* **1993**, 12, 138-146.
- Theoharides, T. C., Alexandrakis, M., Kempura, J. D., Lytinas, M. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2001**, 14, 119-127.
- Thompson, D. O. Cyclodextrins-enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. *Crit Rev. Ther Drug Carrier Syst.* **1997**, 14, 1-104.
- Tomás-Barberán, F. A. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación. *Nutrición y Salud.* **2003**, 10, 41-53.

- Tomás-Barberán, F. A., Clifford, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1073-1080.
- Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C. Phenolic compounds and related enzyme as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 81, 853-876.
- Tomás-Lorente, F. "Aportación al estudio de los flavonoides". Ed. Real Academia de Doctores de España. Madrid XXI. **2004**.
- Tommasini, S., Calabrò, M. L., Raneri, D., Ficarra, P., Ficarra, R. Combined effect of pH and polysorbates with cyclodextrins on solubilization of naringenin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004a**, 36, 327-333.
- Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabrò, M. L., Stancanelli, R., Ficarra, P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β -cyclodextrin *J. Pharma. Biomed. Ana.* **2004b**, 35, 379-387.
- Torres-Labandeira, J. J., Davignon, P., Pitha, J. Oversaturated solutions of drug in hydroxypropylcyclodextrins: parenteral preparation of pancratistatin. *J. Pharm. Sci.* **1990**, 80, 384-386.
- Trayler, R. J. Nucleosynthesis and the origin of the elements. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1988**, 325, 391-403.
- Trinh, J., Dodd, T. M., Bartolo, R., Lucas, J. M. Cyclodextrin based compositions for reducing body odour. *US Patent 5,897,855*. **1999**.
- Trivedi, R., Kumar, S., Kumar, A., Siddiqui, J. A., Swarnkar, G., Gupta, V., Kendurker, A., Dwivedi, A. K., Romero, J. R., Chattopadhyay, N. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2008**, 289, 85-93.
- Tudela, J. A., Cantos, E., Espín, J. C. Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I. Induction of antioxidant flavonol biosynthesis in fresh-cut potatoes. Effect of domestic cooking. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5925-5931.
- Turnbull, J., Nakajima, J., Welford, R. W., Yamazaki, D., Saito, M., Schofield, K. Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3 β -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 1206-1216.
- Tzeng, S. H., Ko, W. C., Ko, F. N., Teng, C. M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res.* **1991**, 64, 91-100.

- Uekama, K., Adachi, H., Irie, T., Yano, T., Saita, M. Improved transdermal delivery of prostaglandin E 1 through hairless mouse skin: combined use of carboxymethyl-ethyl- β -cyclodextrin and penetration enhancers. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, *44*, 119–121.
- Uekama, K. Inclusion complexes of cyclodextrins with organic drug molecules. *Jpn. J. Antibiot.* **1979**, *32*, 103–111.
- Uekama, K., Hirayama, F., Nasu, S., Matsuo, N., Irie, T. Determination of the stability constants for inclusion complexes of cyclodextrins with various drug molecules by high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **1978b**, *26*, 3477–3484.
- Uekama, K., Irle, T., Hirayama, P. Participation of cyclodextrins inclusion catalysis in photolysis of chlorpromazine to give promazine in aqueous solution. *Chem. Lett.* **1978a**, *7*, 1109–1112.
- Uekama, K., Narisawa, S., Hirayama, F., Otagiri, M., Kawano, K., Ohtani, T., Ogino, H. Improvement of thermal and photochemical stability of benzaldehyde by cyclodextrin complexation. *Inter. J. Pharm.* **1983**, *13*, 253–261.
- Ujhazy, A., Szejtli, J. Removal of naringin from aqueous solutions with cyclodextrin bead polymer. *Gordian.* **1989**, *89*, 43–45.
- Urquiaga, I., Leighton, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.* **2000**, *33*, 55–64.
- van der Woude, H., Ter Veld, M. G., Jacobs, N., van der Saag, P. T., Murk, A. J., Rietjens, I. M. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 763–771.
- van Dorne, H. Interaction between cyclodextrins and ophthalmic drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 133–139.
- Vidhyasekaran, P. *Physiology of Disease Resistance in Plants*, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, **1988**.
- Villiers A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1891**, *112*, 536–538.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., Jang, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2800–2802.

- Wagner, B. D., Fitzpatrick, S. J. A comparison of the host-guest inclusion complexes of 1, 8,-ANS in parent and modified cyclodextrins. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, 38, 467–478.
- Wagner, C. W., Wilson, C. W., Shaw, P. E. Reduction of grape fruit bitter components by cyclodextrin polymers. *J. Food Sci.* **1988**, 53, 516-518.
- Wang, H., Provan, G. J., Helliwell, K. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trend. Food. Sci. Tech.* **2000**, 11, 152-160.
- Wang, Y., Qiao, X., Li, W., Zhou, Y., Jiao, Y., Yang, C., Dong, C., Inoue, Y., Shuang, S., Study on the complexation of isoquercitrin with β -cyclodextrin and its derivatives by spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.* **2009**, 650, 124-130.
- Wang, Z. H., Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Jo, S. H., Kim, J. S., Kang, S. S., Lee, J. S., Park, D. H., Hyun, J. W. Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action. *Environ. Toxicol. Pharm.* **2010**, 29, 12-18.
- Waterhouse, A. L. Wine Phenolics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2002**, 95, 21-36.
- Williams, C. A., Harborne, J. B. Flavone and flavonol glycosides. In: J.B. Harborne, Editor. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London. **1994**, 337–385.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, 36, 838-849.
- Willits, M. G., Giovanni, M., Prata, R. T. N., Kramer, C. M., Luca, V. D., Steffens, J. C., Grase, G. Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites. *Phytochem.* **2004**, 65, 31-41.
- Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, 126, 485–493.
- Wittemer, S. M., Ploch, M., Windeck, T., Müller, S. C., Drewelow, B., Derendorf, H., Veit, M. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extracts in humans. *Phytomed.* **2005**, 12, 28-38.
- 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**.

- Yajun, Y., Abhijeet, K., Mattheos, A. G. Koffas. Biosynthesis of Natural Flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 5610–5613
- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral. Res.* **2002**, 53, 19-34.
- Yamashita, N., Kawanishi, S. Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin. *Free. Radic. Res.* **2000**, 33, 623-633.
- Yan, C., Xiu, Z., Li, X., Hao, C. Molecular modeling study of β -cyclodextrin complexes with (+)-catechin and (-)-epicatechin. *J. Mol. Graph.s Model.* **2007**, 26, 420-428.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M-T., Newmark, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, 21, 381-406.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I., Nishioka, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharm.* **1998**, 56, 213–222.
- Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A., Abbott, N. J. Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood–brain barrier. *Free Rad. Biol. Med.* **2004**, 36, 592-604.
- Young, I. S., McEneny, J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Transactions.* **2001**, 29, 358-362.
- Yu, E. K. Novel decaffeination process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, 28, 546-552.
- Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Cohen, R. A. Polyphenols stimulate AMP-activated protein Kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherogenesis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes.* **2006**, 55, 2180-2191.
- Zeng, L. H., Wu, J., Fung, B., Tong, J. H., Mickle, D., Wu, T. W. Comparative protection against oxyradicals by three flavonoids on cultured endothelial cells. *Biochem. Cell Biol.* **1997**, 75, 717-20.
- Zhang, Q., Zhao, X. H., Wang, Z. J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 2042-2053.
- Zhao, T., Tamsamani, J., Agarwal, S. Use of cyclodextrin and its derivatives as carriers for oligonucleotide delivery. *Antisense. Res.* **1995**, 5, 185–192.

Diario oficial de la Unión Europea 5.6.2008.

<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav02-1.pdf>

