

EFFETS DES SUBSTITUANTS DE PHÉNYLPROPÈNES SUR LA STABILITÉ D'ENCAPSULATION DANS LES CYCLODEXTRINES

Miriana Kfoury^{1,2,3}, Sophie Fourmentin^{1,2}, Lizette Auezova³ et Hélène Greige-Gerges³

¹ Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

² ULCO, UCEIV, F-59140 Dunkerque, France

³ Équipe de recherche des molécules bioactives, faculté des sciences, section II, université libanaise, Liban
hgreige@ul.edu.lb

RÉSUMÉ

Les complexes d'inclusion de 5 cyclodextrines (CDs) avec 4 phénylpropènes ont été caractérisés en solution et à l'état solide. La stœchiométrie et les constantes de formation (K_f) des complexes ont été déterminées en solution par headspace statique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et par spectroscopie UV-Visible. L'effet du tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4) sur la stabilité des complexes d'inclusion a également été évalué. L'ensemble des complexes hôte/invité étudiés présente une stœchiométrie 1:1. La présence du tampon PBS ne semble pas affecter la stabilité des complexes qui dépend de la nature et de la position des substituants présents sur le noyau aromatique. Les complexes à l'état solide ont été préparés par lyophilisation et caractérisés par calorimétrie différentielle à balayage (differential scanning calorimetry, DSC). La DSC illustre la réalité de l'inclusion des phénylpropènes à l'intérieur de la cavité des CDs. Finalement, les efficacités d'encapsulation (EE%) ont été déterminées et ont montré que la nature de l'invité joue un rôle prédominant sur son encapsulation et sa solubilisation.

Mots-clés: cyclodextrine, phénylpropène, complexe d'inclusion, constante de formation, efficacité d'encapsulation

ABSTRACT

The inclusion complexes of 5 cyclodextrins (CDs) with four phenylpropenes were characterized in solution and in solid state. The stoichiometry and formation constants (K_f) of inclusion complexes in solution were determined via static headspace-gas chromatography and UV-Visible spectroscopy. The effect of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) on the stability of inclusion complexes was also evaluated. All complexes exhibited a 1:1 stoichiometry. No considerable differences were found between the stability of inclusion complexes in water or in PBS. The stability of complexes depended on the nature and the position of phenyl ring substituents. Solid inclusion complexes were prepared by the freeze-drying method and characterized using the differential scanning calorimetry (DSC). DSC proved that phenylpropenes are included inside the cavity of CDs. Finally, encapsulation efficiencies (EE%) were determined and showed that the encapsulation and solubilization effects of CDs depended mainly on the guest properties.

Keywords: cyclodextrin, phenylpropene, inclusion complex, formation constant, encapsulation efficiency

INTRODUCTION

Les phénylpropanoïdes sont des composants naturels des huiles essentielles et des précurseurs de nombreux produits phénoliques. Les phénylpropènes (PPs) constituent une sous-classe des phénylpropanoïdes, pour laquelle le squelette de base est un noyau benzénique substitué par un groupe propényle (Vogt, 2010). Les PPs sont connus pour leurs activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Korkina, 2007; Korkina *et al.*, 2011). Quatre PPs rencontrés fréquemment dans l'alimentation sont les sujets de notre étude: le *trans*-anéthol (anis étoilé), l'estragole (estragon, fenouil), l'eugénol (clou de girofle) et l'isoeugénol (noix de muscade). L'utilisation de ces PPs dans le domaine médical est limitée du fait de leur volatilité et de leur faible solubilité dans l'eau. L'utilisation des cyclodextrines (CDs) pour la vectorisation de ces molécules suscite un intérêt croissant dans les différents milieux scientifiques (Del Valle, 2004). En effet, l'encapsulation par les CDs de composants d'huiles essentielles peut aboutir à une augmentation considérable de leur solubilité et de leur stabilité, tout en conservant ou améliorant leurs activités biologiques (Marques, 2010; Pinho *et al.*, 2014). De plus, les CDs permettent l'obtention de systèmes à libération prolongée (Ciobanu *et al.*, 2012).

Les CDs (Fig. 1) sont des oligosaccharides cycliques obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon. Les CDs natives α -, β - et γ -CD sont constituées de 6, 7 et 8 unités α -D-glucopyranose, respectivement. Les CDs possèdent la structure d'un cône tronqué dont les dimensions varient selon le nombre d'unités de glucose. La particularité des CDs est que ces molécules hôtes ont une cavité interne hydrophobe et une surface externe hydrophile. Ceci leur confère la propriété de former des complexes d'inclusion (hôte/invité) avec une variété de composés organiques ou inorganiques. De nombreux dérivés de CDs ont été synthétisés pour améliorer la capacité d'encapsulation des cyclodextrines et/ou augmenter leur solubilité aqueuse (Szejtli, 1998).

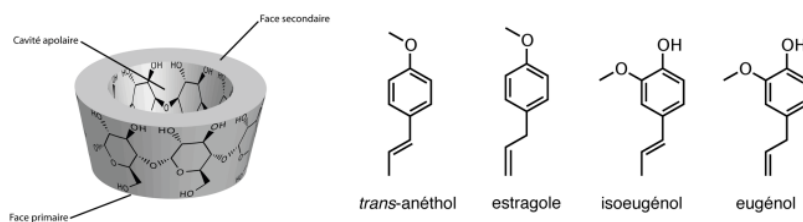


Figure 1. Structure de la β -CD (à gauche) et des phénylpropènes étudiés (à droite).

Dans ce travail, nous avons étudié les complexes d'inclusion de 5 CDs : deux CDs natives (α -CD, β -CD), deux dérivés méthylés (RAMEB, CRYSMEB) et un dérivé hydroxypropylé (HP- β -CD) avec 4 PPs (*trans*-anéthol, estragole, eugénol et isoeugénol) (Fig. 1). Les dérivés de la β -CD sont obtenus par substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthyles ou hydroxypropyles. Ces dérivés ont une très bonne solubilité aqueuse et possèdent une bonne capacité d'inclusion pour les produits faiblement solubles dans l'eau (Kfoury *et al.*, 2014a; 2014b). Les constantes de formation (K_f) ainsi que la stœchiométrie des

complexes ont été déterminées par headspace statique couplé à la chromatographie en phase gazeuse (HS-GC) et/ou par spectropscopie UV-Visible. L'effet du tampon phosphate salin (PBS, 1 M ; pH 7,4) sur la complexation et les valeurs de K_f a été étudié. Les complexes d'inclusion (CD/PP) ont été également préparés à l'état solide par lyophilisation et caractérisés par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). L'efficacité d'encapsulation a finalement été évaluée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels

Le *trans*-anéthol et l'esragole sont fournis par Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), l'eugénol, l'isoeugénol, l'orange de méthyle (OM), le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, l'hydrogénophosphate de sodium et le dihydrogénophosphate de potassium sont fournis par Acros Organics (Geel, Belgique). L' α -CD, le β -CD, l'HP- β -CD (DS = 5,6) et la RAMEB (DS = 12,6) proviennent de Wacker-Chemie (Lyon, France). La CRYSMEB (DS = 4,9) provient de Roquette Frères (Lestrem, France).

Constantes de formation (K_f)

Headspace statique couplé à la chromatographie en phase gazeuse (HS-CG)

La stœchiométrie et les constantes de formation (K_f) des complexes d'inclusion pour les composés les plus volatils (*trans*-anéthol et estragole) ont été préalablement déterminées *via* HS-CG. Des solutions de CD (0,5 ; 2 ; 4 et 7 mM) ont été préparées dans l'eau ou dans le tampon phosphate (1 M, pH 7,4) dans un volume final de 10 ml et introduites dans des *vials* de 22 ml. 10 ppm de l'invité sont ensuite ajoutés dans chacun des *vials*. Pour la référence les 10 ppm de l'invité ont été ajoutés à une solution ne contenant pas de CD. Les *vials* sont ensuite scellés et mis à l'équilibre 24 h avant l'analyse. Après équilibre, 1 mL de la phase gazeuse est prélevé par une seringue et injecté directement dans la colonne *via* une ligne de transfert chauffée. Les analyses ont été réalisées en utilisant un headspace Agilent G1888 couplé à une chromatographie en phase gazeuse (CPG) Perkin-Elmer Autosystem XL. Le détecteur à ionisation de flamme (FID) et la colonne chromatographique (DB624) sont maintenus à 280 °C et 160 °C, respectivement. L'azote est utilisé comme gaz vecteur. Les valeurs de K_f sont calculées par un traitement algorithmique développé au laboratoire en utilisant les valeurs des aires des pics chromatographiques en présence et en absence de CDs (Blach *et al.*, 2008).

UV-Visible

Les K_f ont été déterminées par spectroscopie UV-Visible selon la méthode par compétition (Landy *et al.*, 2000). Le compétiteur utilisé est un indicateur coloré, l'orange de méthyle (OM). Cette méthode implique la caractérisation préalable des complexes CD/OM par une simple méthode de titration. L'invité (0,25 mM) est ensuite ajouté à une solution de CD et OM de titres connus. Cela aboutit à l'expulsion des molécules de l'OM de la cavité de CD, ce qui induit un changement de l'absorbance proportionnel à la quantité de OM expulsé. Les données issues des différences spectrales sont traitées par un algorithme qui permet de remonter à la valeur de K_f du complexe CD/invité (Landy *et al.*, 2000). La quantité de OM est fixée à 0,1 mM. L'analyse est réalisée dans le domaine du visible dans l'intervalle 520-530

nm (intervalle optimal pour observer les différences spectrales du OM sous sa forme libre ou complexée (Decock *et al.*, 2006).

Préparation des complexes à l'état solide

Les complexes à l'état solide ont été préparés par lyophilisation. À une solution aqueuse de CD (10 mM), une quantité d'invité correspondant à un rapport molaire 1:1 est ajoutée. Les mélanges sont agités à 150 rpm à 25 °C pendant 24 h puis filtrés sur une membrane de cellulose (0,45 µm). Les filtrats sont congelés puis lyophilisés à -85 °C à 0 Pa à l'aide d'un lyophilisateur (Christ Alpha 2-4 LD). Les mélanges physiques sont préparés en mélangeant simplement la CD et l'invité à l'aide d'une spatule au même rapport molaire.

Étude par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Cette technique consiste à comparer le thermogramme du complexe à l'état solide à ceux des espèces libres et du mélange physique correspondant. Les thermogrammes ont été enregistrés à l'aide d'un appareil Mettler-Toledo DSC821 (Mettler-Toledo S.P.A., Milan, Italy). L'indium est utilisé pour la calibration. Les échantillons sont pesés (3-5 mg) puis placés dans un creuset en aluminium percé sous flux d'azote (flux de 40 ml/ min). L'analyse balaye une gamme de températures entre 50 °C et 250 °C avec un gradient de 10 °C/min. L'analyse est répétée trois fois pour vérifier la reproductibilité.

Détermination de l'efficacité d'encapsulation EE%

La quantité d'invité encapsulée dans le complexe a été quantifiée par UV-Visible après une étape d'extraction par l'éthanol. 10 mg de complexe solide ont été dissouts dans 10 ml d'éthanol. Un aliquote de chaque solution est ensuite quantifié par spectroscopie UV-Visible. Les longueurs d'onde d'absorption maximales des invités étudiés sont 258, 225, 280 et 261 nm pour le *trans*-anéthol, l'estragole, l'eugénol et l'isoeugénol, respectivement. L'EE% est calculée selon l'équation suivante:

$$EE \% = \frac{PP_{exp} (mg)}{PP_t (mg)} \times 100 \quad (1)$$

Avec

PP_{exp}: la quantité de phénylpropène dosée expérimentalement

PP_t: la quantité de phénylpropène théorique (ajoutée dans le milieu réactionnel durant la préparation des complexes d'inclusion).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Constantes de formation (K_f)

Headspace statique couplé à la chromatographie en phase gazeuse (HS-CG)

Les complexes CD/*trans*-anéthol et CD/estragole ont été étudiés par HS-CG dans l'eau et dans le tampon phosphate. Pour l'ensemble des complexes étudiés, nous avons obtenu

une stœchiométrie 1 : 1 (CD : invité). Les valeurs de K_f calculées par traitement algorithmique sont regroupées dans le Tableau 1.

TABLEAU 1
Constantes de Formation (M^{-1}) Obtenues par HS-CG. Écart Type < 10%

K_f (M^{-1})	<i>t</i> -anéthol		estragole	
	Eau	PBS	Eau	PBS
α -CD	710, 1163 ^a	957	478	418
β -CD	497, 630 ^a	441	939	992
HP- β -CD	981, 1042 ^a	1083	1581	1300
RAMEB	1110, 1553 ^a	1209	1761	1527
CRYSMEB	877, 740 ^a	759	1661	1436

^aCiobanu *et al.*, 2013

D'après les résultats présentés dans le Tableau 1, aucune différence considérable n'est observée pour les valeurs de K_f calculées dans l'eau et le tampon pour un même complexe. Cela peut être attribué à la faible concentration en NaCl dans le tampon (137 mM), et donc à la faible force ionique de la solution, ainsi qu'au caractère hydrophobe des invités (Log P du *trans*-anéthol et de l'estragole sont de 3,110 et 2,818, respectivement (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>). En effet, dans la littérature, les effets de la force ionique sont observés principalement pour des composés plus hydrophiles et pour des concentrations en sel plus élevées (Fourmentin *et al.*, 2013; Kolb & Ettre, 2006). Les valeurs déterminées dans cette étude pour les complexes CD/*trans*-anéthol sont cohérentes avec celles de la littérature (Ciobanu *et al.*, 2013). Notre étude est la première qui étudie la complexation de l'estragole avec les CDs.

D'après les valeurs de K_f , nous remarquons que la RAMEB est la meilleure CD pour l'encapsulation de ces composés. Cela peut être dû au fait que la méthylation augmente l'hydrophobie de la cavité et par la suite son interaction avec l'invité. De plus, nous pouvons observer que l' α -CD forme avec le *trans*-anéthol un complexe plus stable qu'avec l'estragole. Cela peut être attribué à la structure allongée et planaire du *trans*-anéthol complémentaire à la cavité de l' α -CD plus petite que celle de la β -CD. Cette structure résulte de la conjugaison de la double liaison de la chaîne propényle avec le noyau aromatique. La libre rotation du groupement vinyle de l'estragole autour de la liaison C-C confère quant à elle un encombrement stérique plus important. Cela rend la β -CD et ses dérivés plus adaptés pour son inclusion.

UV-Visible

Avant de calculer les K_f des complexes CD/invité, les K_f des complexes CD/OM doivent être déterminées. Tous les complexes étudiés présentent une stœchiométrie 1 : 1. Les valeurs de K_f calculées pour les complexes CD/OM et CD/invité sont regroupées dans le

Tableau 2. Ces valeurs sont cohérentes avec celles de la littérature (Ciobanu *et al.*, 2013; Decock *et al.*, 2006; 2008; Zhan *et al.*, 2008).

TABLEAU 2

Constantes de Formation (M^{-1}) Obtenues par UV-Visible en Comparaison avec les Valeurs de la Littérature. Écart Type < 10%

(K_f) M^{-1}	α -CD	β -CD	HP- β -CD	RAMEB	CRYSMEB
OM	7810	2386	5597	15400	3594
<i>t</i> -Anéthol	927, 1163 ^b	542, 630 ^b	845, 740 ^b	1815, 1553 ^b	1039, 1042 ^b
Estragole	335	987	1508	1916	1584
Eugénol	350, 94 ^c	462, 264 ^c , 357 ^d , 322 ^e	436, 462 ^c , 445 ^e	568 ^c , 521 ^e	454 ^c , 401 ^e
Isoeugénol	178, 85 ^c	364, 255 ^c , 304 ^e	418, 441 ^c , 452 ^e	514 ^c , 547 ^e	263 ^c , 240 ^e

^bCiobanu *et al.*, 2013; ^cDecock *et al.*, 2008; ^dZhan *et al.*, 2008; ^eDecock *et al.*, 2006.

Nous remarquons que pour les complexes CD/*trans*-anéthol et CD/estragole les valeurs de K_f sont cohérentes avec les valeurs déterminées par HS-CG. Cela montre que ces deux méthodes aboutissent à de vraies constantes de formation ou de stabilité et non pas à des valeurs de constantes apparentes et confirme les valeurs des constantes de formation du complexe CD/estragole, jamais étudié auparavant.

En comparant les invités entre eux, nous observons que les invités *p*-monosubstitués (*trans*-anéthol et estragole) forment des complexes d'inclusion plus stables avec les CDs que les invités *m-p*-disubstitués (eugénol et isoeugénol) suggérant que la substitution du noyau aromatique augmente l'encombrement stérique de l'invité et gêne son accommodation dans la cavité de la CD. Cet encombrement réduit les interactions entre la CD et l'invité et aboutit à la formation de complexes d'inclusion possédant une stabilité réduite. L' α -CD semble être plus adéquate pour l'encapsulation du *trans*-anéthol que la β -CD alors que cette dernière et ses dérivés (HP- β -CD, RAMEB et CRYSMEB) sont plus adéquats pour l'encapsulation des autres composés.

Étude par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La Figure 2 montre les thermogrammes DSC pour les systèmes β -CD/*trans*-anéthol et β -CD/estragole.

Les thermogrammes des invités purs, *trans*-anéthol et estragole, montrent des pics exothermiques à 236 et 220 °C, respectivement. Ces pics correspondent à leur température d'ébullition. La β -CD présente un large pic à 186 °C qui correspond à sa température de fusion.

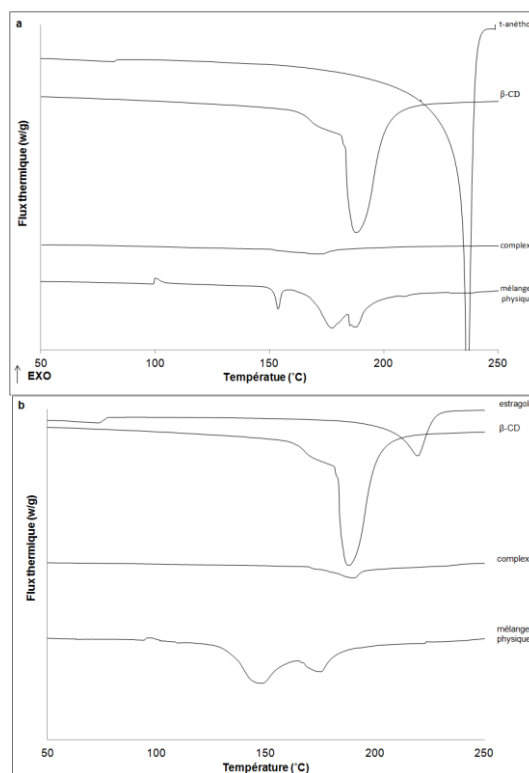


Figure 2. Thermogrammes DSC des systèmes a) β -CD/*trans*-anéthol et b) β -CD/*estragole*.

Les thermogrammes des complexes ont un aspect différent de celui des composés purs. Nous observons ainsi une disparition du pic caractéristique du *trans*-anéthol et de l'*estragole* dans les thermogrammes correspondant à leurs complexes d'inclusion avec la CD. La disparition du pic de l'invité est considérée comme une évidence de son encapsulation dans la cavité de la CD (Nieddu *et al.*, 2014).

Les spectres des mélanges physiques montrent une superposition des pics caractéristiques de la β -CD et de l'invité en question mais avec un déplacement de température. Cela est dû aux interactions entre la β -CD et l'invité durant le chauffage qui accompagne l'analyse. Les mêmes observations ont été faites pour les autres complexes d'inclusion étudiés dans ce travail (résultats non présentés).

Efficacité d'encapsulation (EE%)

La quantité d'invité encapsulée dans les complexes d'inclusion à l'état solide a été déterminée par spectroscopie UV-Visible. Les résultats (Tableau 3) sont exprimés en terme d'efficacité d'encapsulation (EE%), calculée selon l'équation (1).

TABLEAU 3

Efficacité d'Encapsulation (EE%). Ecart Type < 10%

EE%	<i>t</i> -anéthol	estragole	eugénol	isoeugénol
α -CD	25	14	82	57
β -CD	17	21	94	64
HP- β -CD	24	40	99	55
RAMEB	33	40	99	73
CRYSMEB	26	38	96	53

Les EE% varient entre 14 et 99 %. Les EE% les plus élevées sont obtenues avec l'eugénol. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Seo *et al.*, 2010). Les valeurs de EE% sont plus faibles pour le *trans*-anéthol et l'estragole en comparaison avec l'eugénol et l'isoeugénol quelle que soit la CD utilisée. Cela pourrait être dû au fait que l'eugénol et l'isoeugénol possèdent une solubilité intrinsèque plus importante que le *trans*-anéthol et l'estragole. La solubilité aqueuse de ces composés a été déterminée dans l'eau par les études de phase de solubilité (résultats non présentés). Cela prouve que la nature de l'invité a un effet prédominant sur son encapsulation et sa solubilisation par les CDs.

Une relation linéaire entre les valeurs de K_f et les EE% a été observée uniquement dans le cas du *trans*-anéthol et de l'estragole ($R^2 = 0,9111$ et $0,9213$, respectivement). Cela montre qu'une discrimination des CDs n'est observée que dans le cas des composés les moins hydrosolubles pour lesquels les interactions avec les CDs sont largement nécessaires pour apporter ces molécules en solution.

CONCLUSION

Dans cette étude nous avons caractérisé les complexes d'inclusion entre 5 CDs et 4 phénylpropènes en solution et sous forme solide. Nous avons montré que la force ionique du tampon phosphate utilisé n'avait aucune influence sur la stabilité des complexes. Nous avons également prouvé que la nature et la position des substituants du noyau aromatique affectaient la stabilité des complexes obtenus. L'efficacité d'encapsulation varie selon la solubilité intrinsèque de l'invité et la stabilité du complexe pour les produits les plus hydrophobes. Des études complémentaires sont à réaliser pour montrer l'effet de l'encapsulation sur les propriétés biologiques des composés encapsulés.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le CNRS-L (Conseil National de Recherche Scientifique Libanais) pour la bourse de thèse attribuée à M. Kfoury. Les auteurs remercient également l'école doctorale des sciences et technologie à l'université libanaise pour le support financier

de l'équipe des molécules bioactives (ER 28). L'UCEIV participe à l'institut de recherche en environnement industriel (IRENI) financé par la communauté urbaine de Dunkerque, la région Nord Pas-de-Calais, le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, le CNRS et la fondation européenne du développement régional (FEDER).

RÉFÉRENCES

- Blach, P., Fourmentin, S., Landy, D., Cazier, F. and Surpateanu, G. 2008. Cyclodextrins: a new efficient absorbent to treat waste gas streams. *Chemosphere*, 70(3): 374-380.
- Ciobanu, A., Landy, D. and Fourmentin, S. 2013. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Res. Int.*, 53(1): 110-114.
- Ciobanu, A., Mallard, I., Landy, D., Brabie, G., Nistor, D. and Fourmentin, S. 2012. Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil. *Carbohydr. Polym.*, 87(3): 1963-1970.
- Decock, G., Fourmentin, S., Surpateanu, G.G., Landy, D., Decock, P. and Surpateanu, G. 2006. Experimental and theoretical study on the inclusion compounds of aroma components with β -cyclodextrins. *Supramol. Chem.*, 18(6): 477-482.
- Decock, G., Landy, D., Surpateanu, G. and Fourmentin, S. 2008. Study of the retention of aroma components by cyclodextrins by static headspace gas chromatography. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 62(3-4): 297-302.
- Del Valle, E.M.M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.*, 39(9): 1033-1046.
- Fourmentin, S., Ciobanu, A., Landy, D. and Wenz, G. 2013. Space filling of β -cyclodextrin and β -cyclodextrin derivatives by volatile hydrophobic guests. *Beilstein J. Org. Chem.*, 9: 1185-1191.
- Kfoury, M., Auezova, L., Fourmentin, S. and Greige-Gerges, H. 2014a. Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 1-10.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Ruellan, S. and Fourmentin, S. 2014b. Cyclodextrin, an efficient tool for trans-anethole encapsulation: chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies. *Food Chem.*, 164: 454-461.
- Kolb, B. and Ettre, L.S. 2006. *Static headspace-gas chromatography theory and practice*. (2nd ed.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Korkina, L.G. 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.*, 53(1): 15-25.
- Korkina, L., Kostyuk, V., de Luca, C. and Pastore, S. 2011. Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini Rev. Med. Chem.*, 11(10): 823-835.
- Landy, D., Fourmentin, S., Salome, M. and Surpateanu, G. 2000. Analytical improvement in measuring formation constants of inclusion complexes between β -cyclodextrin and phenolic compounds. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 38(1-4): 187-198.
- Marques, H.M.C. 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Frag. J.*, 25(5): 313-326.
- Nieddu, M., Rassu, G., Boatto, G., Bosi, P., Trevisi, P., Giunchedi, P., Carta, A. and Gavini, E. 2014. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: In vitro and in vivo studies. *Carbohydr. Polym.*, 102(1): 393-399.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G. and Henriques, M. 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.*, 101(1): 121-135.

- Seo, E.J., Min, S.G. and Choi, M.J. 2010. Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with β -cyclodextrin by molecular inclusion method. *J. Microencapsul.*, 27(6): 496-505.
- Szejtli, J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrins chemistry. *Chem. Rev.*, 98(5): 1743-1753.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.*, 3(1): 2-20.
- Zhan, H., Jiang, Z.T., Wang, Y., Li, R. and Dong, T.S. 2008. Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with β -cyclodextrin and its derivatives. *Eur. Food Res. Technol.*, 227(5): 1507-1513.
- <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>