



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DESARROLLO DE UN NUEVO ACARICIDA BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE MICROPARTICULAS DE SILICE

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: RAFAEL MATEO TALAVERA

TUTOR/A ACADEMICO: José Manuel Barat Baviera

COTUTOR: Raúl Grau Meló

DIRECTOR/A EXPERIMENTAL: María Ruiz Rico

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, Septiembre 2016

DESARROLLO DE UN NUEVO ACARICIDA BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE MICROPARTICULAS DE SILICE

Rafael Mateo Talavera, María Ruiz Rico, Samuel Verdú Amat, Raúl Grau Meló, José Manuel Barat Baviera¹

Resumen: Los aceites esenciales y sus componentes bioactivos presentan reconocida actividad antimicrobiana, insecticida y acaricida, pero su aplicación en alimentos se ve limitada por su escasa solubilidad acuosa, baja estabilidad e intenso olor que afecta las características organolépticas de los alimentos. Con el fin de evitar estos inconvenientes se han propuesto diversos sistemas de encapsulación y/o inmovilización de los compuestos bioactivos. En este sentido, el presente trabajo evaluó la actividad acaricida de micropartículas de óxido de silicio funcionalizadas con componentes de aceites esenciales. Para ello, se evaluó la viabilidad de ácaros del jamón (*Tyrophagus putrescentiae*) frente a los diferentes compuestos libres e inmovilizados en estudios *in vitro* mediante el análisis de imagen como alternativa a las técnicas clásicas de detección basadas en microscopía. La caracterización de los soportes desarrollados se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), potencial zeta, análisis termogravimétrico y análisis elemental, permitiendo comprobar el correcto anclado del carvacrol, eugenol y timol sobre la superficie del soporte de óxido de silicio. La presencia de los compuestos bioactivos libres e inmovilizados mostró una reducción de la movilidad de los individuos alcanzando una inhibición completa de la movilidad tras 1-2 h de incubación. Por tanto, los bioensayos de toxicidad confirmaron el mantenimiento y mejora de la actividad acaricida del carvacrol, eugenol y timol tras el anclado covalente al soporte inorgánico. Este estudio muestra resultados prometedores para el desarrollo de un agente alternativo a los tratamientos tradicionales, que podría ser usado como sistema de tratamiento de plagas o repelente en superficies y alimentos.

Palabras clave: ácaros, aceites esenciales, análisis de imagen, jamón curado, inmovilización, micropartículas de óxido de silicio.

Resum: Els olis essencials i els seus components bioactius presenten activitat antimicrobiana, insecticida i acaricida reconeguda, però la seua aplicació en aliments es veu limitada per la seua escassa solubilitat aquosa, baixa estabilitat i intens olor que afecta les característiques organolèptiques dels aliments. Per tal d'evitar aquests inconvenients s'han proposat diversos sistemes d'encapsulació i/o immobilització dels compostos bioactius. En aquest sentit, el present treball va avaluar l'activitat acaricida de

¹ Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, España

micropartícules d'òxid de silici funcionalitzades amb components d'olis essencials. Per a això, es va avaluar la viabilitat d'àcars del pernil (*Tyrophagus putrescentiae*) enfront dels diferents compostos lliures i immobilitzats en estudis *in vitro* mitjançant l'anàlisi d'imatge com a alternativa a les tècniques clàssiques de detecció basades en microscòpia. La caracterització dels suports desenvolupats es va realitzar per mitjà de microscòpia electrònica de rastreig d'emissió de camp (FESEM), potencial zeta, anàlisi termogravimètric i anàlisi elemental, que va permetre comprovar el correcte ancorat del carvacrol, eugenol i timol sobre la superfície del suport d'òxid de silici. La presència dels compostos bioactius lliures i immobilitzats va mostrar una reducció de la mobilitat dels individus aconseguint una inhibició completa de la mobilitat després de 1-2 h d'incubació. Per tant, els bioassaigs de toxicitat van confirmar el manteniment i millora de l'activitat acaricida del carvacrol, eugenol i timol després del ancorat covalent al suport inorgànic. Aquest estudi mostra resultats prometedors per al desenvolupament d'un agent alternatiu als tractaments tradicionals, que podria ser utilitzat com a sistema de tractament de plagues o repel·lent en superfícies i aliments.

Paraules Clau: àcars, olis essencials, anàlisi d'imatge, pernil curat, immobilització, micropartícules d'òxid de silici.

Summary: Essential oils and their bioactive components have recognized antimicrobial, insecticidal and acaricidal activity, but food application is limited by its low aqueous solubility, low stability and intense odor that affects the food organoleptic properties. Different encapsulation and/or immobilization systems of bioactive compounds have been proposed in order to avoid these disadvantages. In this regard, the present study evaluated the acaricidal activity of microparticles of silicon oxide functionalized with of essential oils components. For that, the viability of ham mites (*Tyrophagus putrescentiae*) was evaluated against different free and immobilized compounds, in *in vitro* studies using image analysis as an alternative to classical detection techniques based on microscopy. The characterization of the developed supports by field emission scanning electron microscopy (FESEM), zeta potential, thermogravimetric analysis and elemental analysis allowed verifying the correct anchoring of carvacrol, eugenol and thymol on the surface of silicon oxide support. The presence of free and immobilized bioactive compounds showed reduced mobility achieving complete inhibition of mobility of individuals after 1-2 h of incubation. Therefore, toxicity bioassays confirmed the maintenance and improvement of the acaricidal activity of carvacrol, eugenol and thymol after covalently attachment to the inorganic support. This study shows promising results for the development of an alternative agent to traditional treatments, which could be used as a treatment system or pest repellent in surfaces and food.

Keywords: mites, essential oils, image analysis, cured ham, immobilization, silicon oxide microparticles.

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales están formados por compuestos bioactivos naturales sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios que se caracterizan por su volatilidad e intenso olor. Las plantas sintetizan los aceites esenciales en su superficie para protegerse de enfermedades e infecciones que les afectan, ahuyentar a los insectos depredadores y atraer a los beneficiosos (polinizadores). Los aceites esenciales así como diversos de sus componentes activos han sido usados durante años como antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, así como su uso en fragancias o como saborizantes en la industria alimentaria (Burt, 2004).

Además del uso de estos aceites como aromas y saborizantes, en los últimos años la capacidad antimicrobiana e insecticida ha captado gran interés por su alto potencial en un amplio espectro de usos. Los AE contienen un 85-99% de sustancias volátiles y un 1-15% de componentes no volátiles. La parte volátil está constituida principalmente por terpenos, terpenoides y otros compuestos aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Sánchez-González et al., 2011). Numerosas investigaciones han demostrado que los componentes de estos aceites esenciales son capaces de ejercer una acción bactericida, antifúngica, además de poseer propiedades insecticidas o acaricidas, por lo que se ha planteado su uso como sustituto de métodos químicos o físicos de conservación (Miyazaki et al., 1989; McDonald y Tovey, 1993; Tovey y McDonald, 1997; Kim et al., 2003b; Rezk y Gadelhak, 2004).

El impacto medioambiental y la resistencia desarrollada por diversas plagas como consecuencia del uso de pesticidas químicos justifican el desarrollo de tratamientos alternativos para control de plagas principalmente basados en el uso de compuestos bioactivos de origen natural (Macchioni et al., 2002).

Tyrophagus putrescentiae es una especie de ácaro ampliamente distribuido que comúnmente infecta numerosas variedades de semillas y alimentos almacenados con un alto contenido en grasas y proteínas, como por ejemplo huevo deshidratado, jamón, queso y numerosos tipos de nueces (Sinha et al., 1979; Gulati y Mathur, 1995), frutas deshidratadas y especias (Rentfrow et al., 2008), así como en comida para mascotas (Brazis et al., 2008; Thind et al., 2005). Los ácaros viven normalmente en las capas más externas de este tipo de productos, aunque a veces son capaces de penetrar y vivir en capas más internas, pudiendo causar importantes pérdidas económicas (Zdarkova et al., 1991). Además, se ha relacionado la presencia de *T. putrescentiae* con reacciones alérgicas en agricultores (Terho et al., 1985), trabajadores en factorías de producción de jamón curado con un uso elevado de sal (Armentia et al., 1994), y consumidores tras la ingestión de comida contaminada por este ácaro (Matsumoto et al., 1996).

La infección de ácaros en el jamón ocurre mayoritariamente en la superficie del producto, pero también es posible que los ácaros sean capaces de penetrar en la pieza creando galerías en su interior. Una vez infectada la superficie puede verse un continuo movimiento del ácaro en ésta, debido a la alta población de ácaros, pudiendo también observarse un residuo en forma de polvo o arena procedente del metabolismo de los ácaros (Sánchez-

Molinero y Arnau, 2014). La infección con esta plaga no suele producirse en procesos de curado inferiores a 3-4 meses. Sin embargo, a medida que el periodo de curado se alarga, buscando ciertas propiedades organolépticas en el jamón, el riesgo de infección por ácaros se ve incrementado (Rentfrow et al., 2006).

Los métodos de control de los ácaros del jamón se basan la fumigación con bromuro de metilo y el recubrimiento con manteca caliente. El bromuro de metilo es un gas inodoro e incoloro que se ha estado utilizando para el control de plagas en establecimientos y edificios desde principios del siglo XX por su amplio espectro de aplicación y rápida acción (Fields y White, 2002). Sin embargo, el uso de este compuesto para el control de ácaros está prohibido en la Unión Europea, dada su relación con la destrucción de la capa de ozono (Marriott y Schilling, 2004). Por otra parte, el recubrimiento de los jamones curados con manteca de cerdo caliente suele ser la práctica más común en España, pero aumenta el periodo de secado y curado de las piezas al reducir la permeabilidad acuosa del jamón, lo que provoca un impacto económico sobre los productores (Sánchez-Molinero y Arnau, 2014).

Dados los problemas que presentan los tratamientos tradicionales, los compuestos bioactivos de origen natural como los aceites esenciales son una buena alternativa al tratamiento de esta plaga. La actividad acaricida de diversos aceites esenciales frente a *Tyrophagus putrescentiae* ha sido previamente establecida en diversos estudios (Jeong et al., 2008; Kim et al., 2003a; Lee et al., 2006; Macchioni et al., 2002).

A pesar de sus propiedades acaricidas, el uso de los aceites esenciales o sus componentes activos en la industria alimentaria presenta ciertos inconvenientes dada su alta volatilidad e inestabilidad de sus componentes, su baja solubilidad en disolventes polares, así como la alteración de las propiedades organolépticas (olor y sabor) de los productos alimentarios en los que se incorporan (Burt, 2004).

Debido a la problemática que presentan los aceites esenciales para su uso en altas concentraciones en alimentación, en los últimos años se está recurriendo a la encapsulación o inmovilización de estos compuestos bioactivos con el objetivo de prevenir los aspectos negativos de su uso en forma libre y con la posibilidad de liberarlos de forma controlada (Bachtsi y Kiparissides, 1996; Chang et al., 2006; Yuliani et al., 2006; Scarfato et al., 2007; Li et al., 2008). Además, la encapsulación/inmovilización presenta diversas ventajas añadidas ya que disminuyen la concentración efectiva del principio activo, reducen las pérdidas de compuestos volátiles aumentando la duración del efecto, todo ello incrementando la biocompatibilidad de los mismos (Scarfato et al., 2007; Jyothi et al., 2010).

En los últimos años diversos soportes orgánicos e inorgánicos han sido usados en la encapsulación o inmovilización de compuestos bioactivos (Chang et al., 2006, Chen et al., 2009; Nazzaro et al., 2012; Ruiz-Rico et al., 2015; Scarfato et al., 2007). Uno de estos posibles soportes son las partículas óxido de silicio (SiO_2) las cuales presentan una elevada superficie específica con grupos reactivos que permite el anclado covalente de moléculas orgánicas de forma eficiente. Este material es un soporte comercial usado

como aditivo (E-551) en la industria alimentaria para clarificar bebidas, anti-apelmazante y espesante (Contado et al., 2013).

En un estudio realizado recientemente por el grupo de investigación que ha desarrollado este trabajo, se llevó a cabo la inmovilización de compuestos activos de aceites esenciales sobre la superficie de diversas partículas de sílice, obteniéndose partículas funcionalizadas con gran actividad bactericida contra patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Ruiz-Rico et al., 2016, datos no publicados).

Como un nuevo avance en esa línea de investigación, en este trabajo se propone la aplicación de componentes de aceites esenciales (carvacrol, eugenol y timol) inmovilizados sobre micropartículas de sílice amorfa sobre el control del crecimiento del ácaro *Tyrophagus putrescentiae*, en comparación con la actividad acaricida de dichos compuestos en su forma libre.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales y reactivos

Para la preparación de los sólidos funcionalizados 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), trimetilamina, paraformaldehído, dietil éter, cloroformo, n-butanona, carvacrol, eugenol y timol obtenidos en Sigma-Aldrich (Madrid, España); acetonitrilo, ácido clorhídrico (HCl), sulfato de magnesio (MgSO₄), hidróxido de potasio (KOH) y ácido sulfúrico (H₂SO₄) proporcionados por Scharlab (Barcelona, España); y micropartículas de óxido de silicio amorfo (SYLYSIA ® SY350/FCP) obtenidas en Silysiamont (Milán, Italia).

2.2. Preparación de los sólidos acaricidas

La preparación de los materiales acaricidas se llevó a cabo mediante una síntesis en tres etapas. En primer lugar, el carvacrol, eugenol y timol fueron transformados sus derivados aldehídos. En una segunda etapa, se llevó a cabo la reacción entre los aldehídos de carvacrol, eugenol y timol, y 3-aminopropiltriétoxissilano para formar los correspondientes derivados de alcóxissilano. Por último, se realizó el anclado de los 3 derivados de alcóxissilano sobre la superficie externa de las micropartículas de sílice amorfa obteniendo así tres sólidos diferentes.

2.2.1. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS ALDEHÍDOS DE LOS COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES

Los derivados aldehídos de carvacrol, eugenol y timol fueron sintetizados con el objetivo de añadir un segundo grupo reactivo a la molécula capaz de reaccionar con el grupo amino del APTES manteniendo así libre el grupo hidroxilo de los compuestos activos cuya presencia parece esencial para la actividad inhibitoria (Regnault-Roger y Hamraoui, 1995).

Los aldehídos de carvacrol y timol fueron sintetizados mediante la formilación en la posición orto respecto al grupo hidroxilo. En una síntesis típica, 150 mL de acetonitrilo, 40 mmol de carvacrol o timol, 150 mmol de trimetilamina y 40 mmol de MgSO₄ anhidro fueron introducidos en un balón de fondo redondo. La mezcla se mantuvo en atmósfera de argón y en agitación durante 15 min a temperatura ambiente. Tras esto, se añadieron 270 mmol de paraformaldehído, y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 3,5 h a 83 °C. Posteriormente la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La disolución obtenida se acidificó con una disolución de HCl al 5% (320 mL) y se mantuvo en agitación durante 30 min en atmósfera inerte. Finalmente, la fase orgánica fue extraída con dietil éter y los volátiles se eliminaron mediante una atmósfera de presión reducida para obtener los aldehídos carvacrol y timol.

El aldehído de eugenol se sintetizó usando una reacción general Reimer-Tiemann según se describe en Chen et al. (2009). Para ello, 150 mL de agua destilada fueron calentados hasta 80 °C en un balón de fondo redondo, y una vez alcanza dicha temperatura se adicionaron 22 mmol de eugenol para su disolución. Tras enfriar la mezcla a 60 °C, se adicionaron 400 mmol de KOH y 88 mmol de cloroformo. Debido a que la reacción es exotérmica, el cloroformo se añadió en un ratio de 1 mL/h durante un periodo de 7 h por razones de seguridad. Tras este período, la mezcla obtenida se mantuvo a 60 °C durante 8 h. Posteriormente, la disolución se acidificó con una solución de H₂SO₄ al 10 %. Finalmente, la fase orgánica fue extraída con n-butanona y los volátiles se eliminaron bajo presión reducida.

2.2.2. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS ALCOXISILANOS

Los correspondientes derivados alcoxisilanos de los tres componentes de aceites esenciales fueron sintetizados para poder llevar a cabo el correcto anclado covalente de los compuestos activos al soporte de sílice. Los aldehídos de carvacrol, timol y eugenol fueron reaccionados con 2,3 mL del 3-aminopropiltrióxido en presencia de diclorometano (20 mL) y MgSO₄. La mezcla se mantuvo en reflujo con agitación durante 1 h. Tras esto, la mezcla fue filtrada y el exceso de disolvente fue evaporado bajo presión reducida obteniendo un líquido transparente.

2.2.3. PREPARACIÓN DE LOS SÓLIDOS FUNCIONALIZADOS

Los correspondientes derivados alcoxisilanos del carvacrol, eugenol y timol se anclaron a las micropartículas de sílice amorfa. En una síntesis típica, 1 g de partículas desnudas fueron suspendidas en 40 mL de acetonitrilo en un balón de fondo redondo bajo atmósfera inerte. A continuación, un exceso del derivado alcoxilano fue adicionado y la mezcla final se mantuvo en agitación durante 5,5 h a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla fue filtrada y los sólidos resultantes se lavaron con acetonitrilo y agua destilada, y se secaron a vacío durante 12 h a temperatura ambiente.

2.3. Caracterización de los materiales

El material de partida y los sólidos sintetizados fueron caracterizados mediante técnicas instrumentales estándar: microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), potencial zeta, análisis termogravimétrico (TGA) y análisis elemental. Las imágenes de FESEM fueron adquiridas en un microscopio Zeiss Ultra 55 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania) siendo observadas en el modo de electrón secundario. Para la determinación del potencial zeta se utilizó un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Los sólidos se dispersaron en agua destilada en una concentración de 1 mg/mL y fueron sometidos a un ciclo de ultrasonidos durante 2 minutos para evitar la agregación de las partículas. El potencial zeta se calculó a través de los valores de movilidad de partícula mediante la aplicación del modelo de Smoluchowski. La obtención del valor de potencial zeta se estimó a partir de 5 repeticiones. El grado de anclaje de las distintas partículas se determinó mediante análisis termogravimétrico y análisis elemental. El análisis termogravimétrico se llevó a cabo en un equipo TGA/SDTA 851e Mettler Toledo (Mettler Toledo Inc., Schwarzenbach, Suecia), mediante un programa de calentamiento con una rampa de calentamiento de 10°C por minuto desde 0 °C a 100 °C, seguido por una etapa de calentamiento isotérmico a esta temperatura durante 60 min bajo una atmósfera de nitrógeno (80 mL/min). A continuación, el programa continuó con un segmento de calentamiento dinámico desde 100 °C hasta 1000 °C usando una atmósfera oxidante (aire, 80 mL/min) y una etapa de calentamiento isotérmico a esta temperatura durante 30 min.

2.4. Obtención de los ácaros

Los especímenes de ácaros usados en los bioensayos fueron obtenidos de un jamón curado contaminando con *Tyrophagus putrescentiae*. El jamón se mantuvo almacenado en oscuridad a temperatura ambiente durante el período de duración del estudio para favorecer el desarrollo de la plaga. Para el aislamiento de los ácaros desde la pieza de jamón se utilizó un pincel de punta fina con el que poder transportar de forma segura los ácaros individualmente hasta la placa donde se llevaron a cabo los bioensayos de toxicidad.

2.5. Bioensayos de toxicidad de los componentes de aceites esenciales

El estudio actividad acaricida de los componentes de aceites esenciales libres e inmovilizados sobre las partículas de sílice amorfa se llevó a cabo mediante ensayos de viabilidad *in vitro*. Placas Petri de plástico (55 mm de diámetro) fueron usadas como cámaras de incubación. Dos concentraciones de cada componente de aceite esencial libre o anclado disueltos en etanol fueron aplicadas a las cámaras. Las concentraciones de estudio de los compuestos libres fueron establecidas en función de los resultados de la dosis letal del 50% de la población (DL₅₀) establecida en estudios previos (Jeong et

al., 2008; Kim et al., 2003a), empleando así esta dosis (C2) y una concentración inferior a la misma (C1). Las diferentes concentraciones de estudio se resumen en la Tabla 1. Las dispersiones fueron adicionadas a las cámaras y extendidas de forma homogénea sobre la superficie de la placa. Las placas fueron secadas en una estufa a 20 °C durante 1 min. Tras esto, 5 ácaros adultos fueron transferidos a la placa, la cual fue cubierta con parafilm. Las placas se mantuvieron a 25 °C en oscuridad. La viabilidad de los ácaros fue evaluada a tiempo 0, 30 y 60 min mediante análisis de imagen. Las muestras control fueron tratadas con cantidades equivalentes de etanol o una suspensión de partículas desnudas suspendidas en etanol para los componentes libres o inmovilizados, respectivamente. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

TABLA 1. Concentraciones (C1 y C2) de los componentes de aceites esenciales usadas en los bioensayos de toxicidad sobre *Tyrophagus putrescentiae*.

| <i>Compuesto bioactivo</i> | <i>C1 (μg/cm²)</i> | <i>C2 (μg/cm²)</i> |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Carvacrol | 2,25 | 4,50 |
| Eugenol | 6,05 | 12,11 |
| Timol | 5,55 | 11,10 |

2.6. Análisis de imagen

El impacto de los aceites esenciales, tanto libres como anclados, sobre la supervivencia de *Tyrophagus putrescentiae*, se determinó mediante análisis de imagen, como alternativa a las técnicas clásicas de detección basadas en microscopía óptica (Lee et al., 2006). Dicho análisis se basó en el estudio de los desplazamientos de los individuos en contacto con el compuesto en cuestión mediante la captura de videos a diferentes tiempos. Los individuos son localizados en cada imagen del vídeo en base a su forma, color y tamaño, rastreando su movimiento hasta el final de la grabación para así obtener su desplazamiento total.

El desplazamiento registrado, entendido como el sumatorio de desplazamientos de todos los individuos durante cada vídeo, es el dato a partir del cual se evalúa el impacto del compuesto. Las trayectorias se miden en píxeles acumulados, los cuales son transformados a centímetros en base a un calibrado previo del sistema de visión.

2.7. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos fue procesado utilizando Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA). La influencia de los compuestos utilizados sobre la

actividad de los ácaros se analizó usando el análisis de la varianza con una significación estadística del 95% (ANOVA simple).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diseño de los materiales acaricidas

En este estudio se usaron tres componentes bioactivos de aceites esenciales: carvacrol (componente mayoritario de la planta de orégano), eugenol (componente mayoritario del aceite de clavo y canela), y timol (componente mayoritario de la planta de tomillo). Dichos compuestos han sido seleccionados debido a su reconocida actividad acaricida, su biocompatibilidad, baja solubilidad en agua, alta volatilidad, así como su limitado uso en ciertas aplicaciones en la industria alimentaria como consecuencia de intenso sabor y aroma picante/medicinal (Burt, 2004; Abouhosseini et al., 2015).

Esta última característica pone de manifiesto la necesidad de desarrollar sistemas de encapsulación o inmovilización para intentar enmascarar dichas propiedades sensoriales. Por tanto, en este trabajo se han desarrollado materiales acaricidas usando como soporte inorgánico micropartículas de sílice amorfa. Estas partículas son estructuras no cristalinas de óxido de silicio con diferentes tamaños que están siendo ampliamente usados en cosmética (cremas solares), odontología (pastas de dientes), pinturas, así como en aditivos para la alimentación animal y humana (E-551) (Uboldi et al., 2012).

3.2. Caracterización de los sólidos funcionalizados con componentes de aceites esenciales

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización de la morfología del material de partida (partículas desnudas) y los materiales funcionalizados con carvacrol, eugenol y timol. En la Figura 1 se puede observar la forma y el tamaño de las partículas de sílice amorfa desnudas (a) y las partículas funcionalizadas (b) a través de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Para esta caracterización se escogieron las partículas funcionalizadas con carvacrol como soporte de referencia. Las partículas de sílice amorfa desnudas se asemejan a una esfera con una morfología rugosa y un tamaño de partícula en la microescala (tamaño de partícula primario aproximadamente de 4 μm). Tras la inmovilización del componente de aceite esencial, las partículas no mostraron modificaciones en su apariencia. Las partículas funcionalizadas con eugenol y timol mostraron una morfología similar (resultados no mostrados).

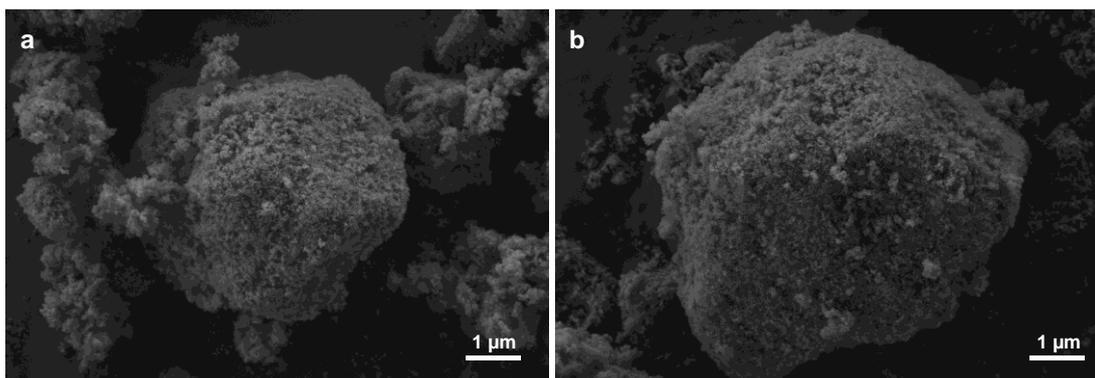


FIGURA 1. Caracterización mediante FESEM de la morfología y el tamaño de partícula de las partículas de óxido de silicio desnudas (a) y funcionalizadas con carvacrol (b).

Así mismo, con el fin de determinar la carga superficial y la estabilidad de las partículas en suspensión se llevó a cabo la determinación del potencial zeta (Tabla 2). Por lo general, la estabilidad de las partículas en suspensión es mayor cuando el potencial zeta se sitúa fuera del rango comprendido entre los valores -30 y $+30$ mV. En este rango las suspensiones tienden a agregarse, por lo que las propiedades y funciones de las partículas funcionalizadas pueden verse afectadas. Los valores de potencial zeta de las partículas desnudas y funcionalizadas suspendidas en agua destilada se muestran en la Tabla 1. Las partículas desnudas mostraron valores de potencial zeta negativos debido a la presencia de grupos silanol en su superficie. Los valores de potencial zeta de estas partículas se encontraron en el rango de inestabilidad (-30 y $+30$ mV). Sin embargo, los sólidos mostraron valores de potencial zeta superiores a $+30$ mV tras la inmovilización, lo que confirma la estabilidad de dichos sólidos en suspensión. Además, la modificación del potencial zeta de las partículas desde valores negativos a valores positivos confirma la eficiencia del método de síntesis propuesto.

TABLA 2. Potencial zeta de las partículas de óxido de silicio amorfo no funcionalizadas y funcionalizadas con carvacrol, eugenol y timol (Media y desviación estándar, $n = 3$).

| Sólido | Potencial zeta (mV) |
|-------------------------|---------------------|
| Sílice amorfa desnuda | $-22,6 \pm 0,6$ |
| Carvacrol-sílice amorfa | $35,8 \pm 2,6$ |
| Eugenol-sílice amorfa | $39,6 \pm 1,1$ |
| Timol-sílice amorfa | $38,1 \pm 1,3$ |

Con el fin de confirmar la funcionalización y cuantificar la cantidad de compuestos activos anclados al soporte de óxido de silicio se llevó a cabo el

análisis termogravimétrico y análisis elemental de los diferentes sólidos. En la Tabla 3 se muestra el contenido de APTES y del componente de aceite esencial para cada uno de los sólidos sintetizados. Estos valores fueron empleados para calcular la cantidad necesaria de sólido con el objetivo de evaluar concentraciones equivalentes de compuestos bioactivos libres e inmovilizados en los bioensayos de toxicidad.

TABLA 3. Contenido (α) en gramos de componente de aceite esencial (carvacrol, eugenol y timol) y (3-aminopropil)trietoxisilano por gramo de SiO₂.

| Sólido | α_{EOC} (g/g SiO ₂) | α_{APTES} (g/g SiO ₂) |
|-------------------------|--|--|
| Carvacrol-sílice amorfa | 0,0368 | 0,1015 |
| Eugenol-sílice amorfa | 0,0585 | 0,1274 |
| Timol-sílice amorfa | 0,0149 | 0,0994 |

3.3. Actividad acaricida de los componentes de aceites esenciales

Las concentraciones de trabajo de los bioensayos de toxicidad se establecieron de acuerdo a los resultados de estudios previos (Jeong et al., 2008; Kim et al., 2003a) donde se estableció la DL₅₀ para diversos compuestos activos de aceites esenciales. Teniendo en cuenta estos datos, se evaluó la actividad acaricida de las siguientes concentraciones: 2,25 y 4,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de carvacrol, 6 y 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de eugenol, y 5,5 y 11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de timol. La cantidad de sólido funcionalizado para alcanzar una concentración equivalente a la de los compuestos bioactivo libre fue previamente calculada teniendo en cuenta los resultados del análisis termogravimétrico y el análisis elemental (valores entre 0,02 y 0,1 mg/cm^2 para los diferentes sólidos).

Además, se llevó a cabo el estudio del efecto del soporte inorgánico sobre la viabilidad de *Tyrophagus putrescentiae*. Para ello, se llevó a cabo el estudio de la viabilidad de los especímenes en presencia de partículas de sílice desnudas a concentraciones de 0,05 y 0,1 mg/cm^2 .

La determinación de la viabilidad de los ácaros se realizó mediante análisis de imagen como alternativa a la técnicas tradicional de detección basada en la estimulación de los especímenes con una aguja y la observación de la movilidad de los mismos mediante microscopía (Machioni et al., 2002). La nueva técnica se basó en el registro de los movimientos de los especímenes con una cámara a diferentes tiempos y el procesamiento de las imágenes para establecer las trayectorias de los individuos tal y como se muestra en la Figura 2. La mortalidad se estableció como la ausencia de movimiento persistente.

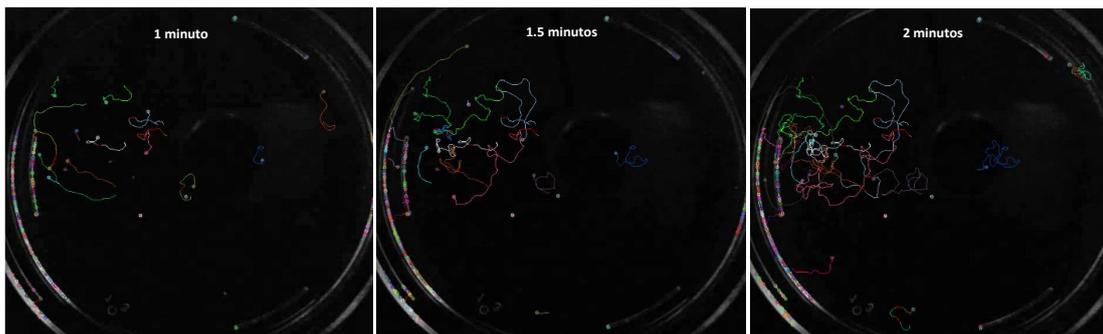


FIGURA 2. Detección de trayectorias de ácaros durante 2 minutos. Líneas de colores indican el recorrido total para 1, 1,5 y 2 minutos de captura.

3.3.1. ESTUDIO DE ACTIVIDAD ACARICIDA DE LOS COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES LIBRES

En primer lugar, se llevaron a cabo los bioensayos de toxicidad de carvacrol, eugenol y timol libre sobre *Tyrophagus putrescentiae*. La Figura 3 muestra el movimiento de los ácaros en ausencia de tratamiento (etanol) y en presencia los compuestos activos de aceites esenciales libres en función del tiempo de tratamiento.

Tal y como se observa en la Figura 3a la presencia de carvacrol en la cámara de incubación reduce la movilidad de los individuos desde el tiempo 0 e incrementa su toxicidad en función del tiempo de exposición. Por otra parte, el tratamiento con eugenol y timol incrementa el movimiento de los ácaros respecto al control hasta los 30 min, tras lo cual el eugenol produjo gran toxicidad alcanzando valores de movimiento similares a los especímenes tratados con carvacrol. En el caso del timol se observó una movilidad similar a las muestras control a los 60 min de tratamiento. Con lo que respecta a la dosis más concentrada (C2), la Figura 3b muestra un efecto heterogéneo de los compuestos bioactivos a tiempo 0, pero una clara disminución del movimiento de los ácaros a los 30 min de tratamiento. Se observa una ausencia de movilidad a los 60 min para los individuos tratados con carvacrol y eugenol, y baja movilidad en presencia de timol.

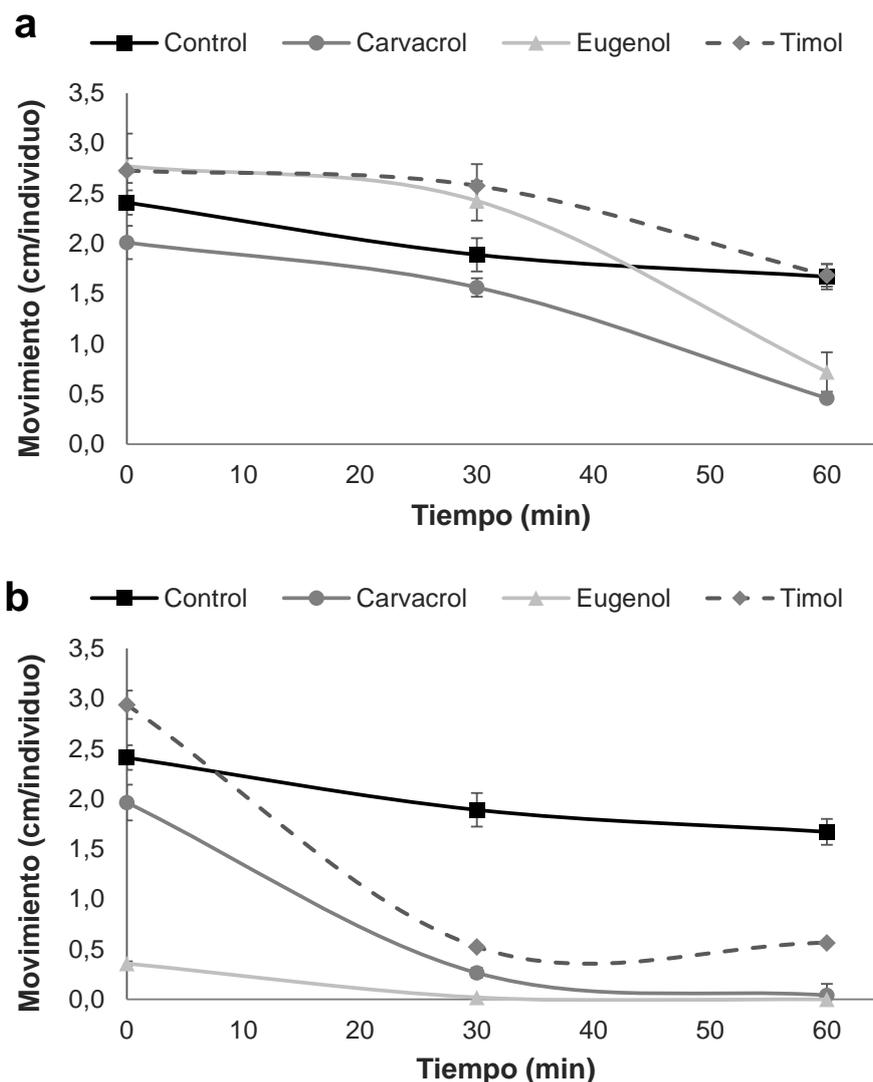


FIGURA 3. Evolución del movimiento de *Tyrophagus putrescentiae* en ausencia de tratamiento y en presencia de carvacrol, eugenol y timol libres a las dos concentraciones de trabajo C1 (a) y C2 (b).

Los resultados obtenidos muestran la elevada actividad acaricida del carvacrol respecto a otros compuestos activos de aceites esenciales, tal y como se ha establecido en otros estudios (Abouhosseini et al., 2015; Jeong et al., 2008). Los ensayos de toxicidad confirman la capacidad acaricida de los aceites esenciales, y en concreto sus principales componentes activos, sobre la especie *Tyrophagus putrescentiae*. Estudios previos han mostrado la actividad acaricida del carvacrol, eugenol y timol sobre otras especies de ácaros como *Dermanyssus gallinae*, *Dermanyssus pteronyssinus* y *Sarcoptes scabiei* con resultados similares (Abouhosseini et al., 2015; Kim et al., 2003b; Pasay et al., 2011). Así mismo, la actividad acaricida demostrada por los aceites esenciales ha propuesto el uso de éstos como alternativa a los tratamientos químicos tradicionales basados en el uso de benzilbenzoato (acaricida sintético). Diversos estudios han comparado el uso de los

acaricidas sintéticos y el uso de aceites esenciales o componentes activos de éstos observando una toxicidad similar o incluso mayor tras el tratamiento con los compuestos naturales (Jeong et al., 2008; Kim et al., 2003a; Lee, 2004; McDonald y Tovey, 1993).

El mecanismo de acción de los componentes activos de aceites esenciales no se conoce con exactitud pero la hidrofobicidad, el tiempo de exposición y la fase vapor de estos compuestos parece jugar un papel crucial en la toxicidad sobre los ácaros (El-Nahal et al., 1989; Kim et al., 2003b, Pontes et al., 2007). Los compuestos de los aceites esenciales tienen un amplio espectro de actuación en la actividad de insectos y ácaros debido a numerosos mecanismos de actuación, donde se incluyen actividad repelente y de inhibición del apetito, inhibición del sistema respiratorio, reducción del crecimiento y fecundidad, y disrupción de la formación de cutícula (Enan, 2001; Akhtar and Isman, 2004). También presentan toxicidad en el organismo al penetrar en el cuerpo del ácaro a través del sistema respiratorio (Kim et al., 2003b).

3.3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ACARICIDA DE LOS COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES INMOVILIZADOS

Tal y como se ha comentado en la introducción los principales componentes activos de los aceites esenciales son compuestos volátiles y lábiles sensibles a la oxidación, a la luz y a la humedad (Albarracín et al., 2012). Es por ello que la actividad acaricida de los aceites esenciales y sus componentes se ve reducida durante su aplicación o almacenamiento, por lo que es necesario proteger estos componentes frente a la volatilización y la degradación de agentes externos. Por ello, en este trabajo se propone la inmovilización de carvacrol, eugenol y timol en un soporte inorgánico con el objetivo de mantener e incluso mejorar la actividad acaricida de los mismos y prevenir la volatilización y degradación.

Una vez establecida la toxicidad del carvacrol, eugenol y timol libres, se llevó a cabo el estudio de la actividad acaricida de los compuestos anclados sobre las micropartículas de sílice amorfa. La Figura 4 presenta la evolución del movimiento de los ácaros tras el tratamiento con sílice amorfa desnuda y los sólidos funcionalizados con carvacrol, eugenol y timol a los dos rangos de concentración establecidos.

Tal y como se observa en la figura se produce un claro descenso del movimiento de los individuos tratados con las partículas control en comparación con los resultados mostrados en la Figura 3 con valores iniciales entre 1,25 y 2 cm/individuo respecto a los valores de 2,5 cm/individuo de los ácaros en presencia únicamente de etanol. Por tanto, la presencia del sólido de sílice dificulta el movimiento de los ácaros reduciendo el desplazamiento de los mismos desde tiempo 0. Así mismo, se observa una mayor toxicidad de los compuestos activos inmovilizados desde el inicio del bioensayo respecto a los especímenes tratados con partículas desnudas (muestra control). Los diferentes compuestos inmovilizados muestran un efecto similar entre ellos y a lo largo del período de tratamiento, lo cual difiere de los resultados obtenidos para los compuestos libres (Figura 3) donde se

observaba una mayor actividad acaricida para el carvacrol, seguido del eugenol, y por último el timol con escasa toxicidad. La concentración más alta ensayada (Figura 4b) produce una mayor reducción del movimiento entre los 30 y 60 min de tratamiento, con ausencia de movimiento total a tiempos mayores.

El gran incremento de la toxicidad de los compuestos inmovilizados puede deberse a un efecto sinérgico entre el efecto de las partículas de sílice sobre la movilidad y la toxicidad de los compuestos activos anclados. Los resultados revelan que la actividad acaricida se mantiene tras el anclado del compuesto activo de aceite esencial, lo cual es ciertamente prometedor ya que hasta ahora se ha descrito la actividad acaricida de este tipo de compuestos tras su volatilización pero no tras la inmovilización en un soporte inorgánico.

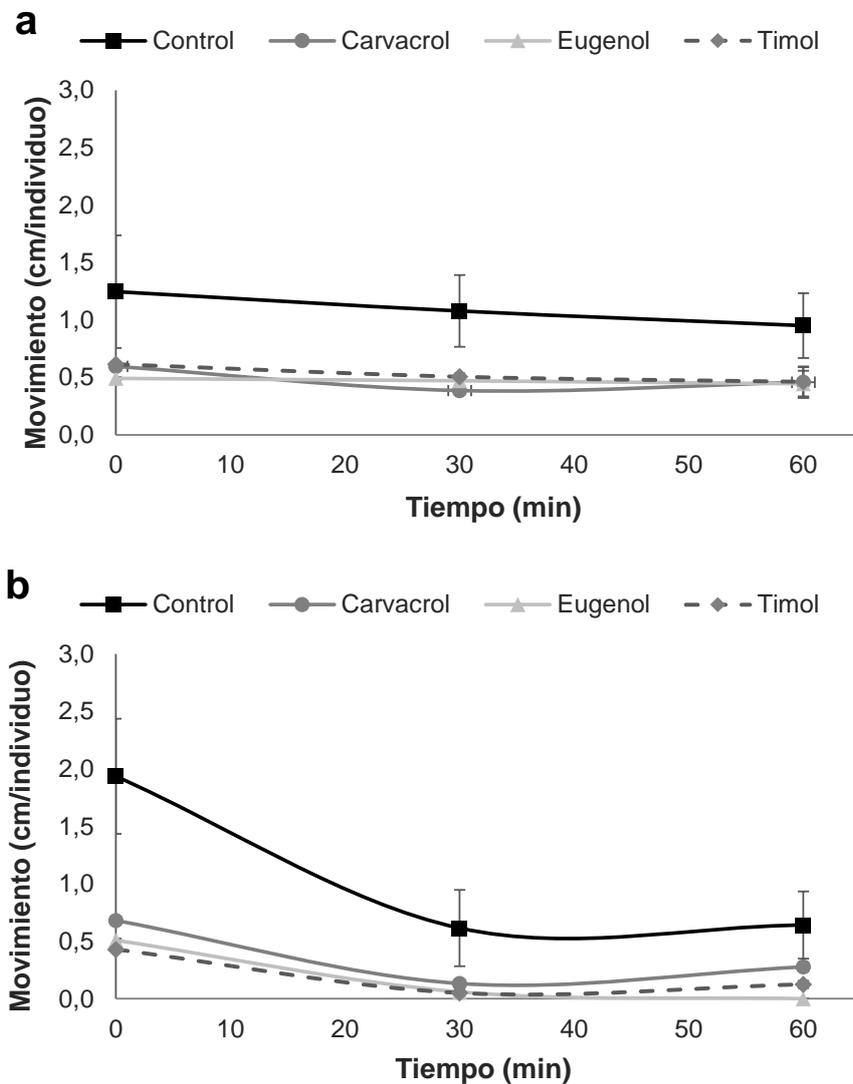


FIGURA 4. Evolución del movimiento de *Tyrophagus putrescentiae* en presencia de partículas desnudas y partículas funcionalizadas con carvacrol, eugenol y timol a las dos concentraciones de trabajo C1 (a) y C2 (b).

4. CONCLUSIONES

Este trabajo es una prueba de concepto para el desarrollo de nuevos agentes acaricidas para el tratamiento de plagas en alimentos, como los ácaros del jamón. Los soportes acaricidas están basados en el anclado covalente de diversos componentes activos de aceites esenciales sobre micropartículas de sílice amorfa. La comparación de la actividad acaricida de los componentes de aceites esenciales libres e inmovilizados ha mostrado que los soportes mantienen la actividad acaricida de los compuestos bioactivos frente a *Tyrophagus putrescentiae*, mejorando además el efecto inhibitorio de los mismos.

Este estudio demuestra que los soportes desarrollados tiene un amplio potencial en el tratamiento de plagas de ácaros, con ciertas ventajas como el fácil manejo, la mejora de la efectividad y la potencial mayor estabilidad. Sin embargo, para el uso práctico de estos nuevos agentes acaricidas es necesario realizar futuros estudios sobre el mecanismo de acción de los mismos, la eficacia en sistemas reales, la estabilidad de los compuestos inmovilizados, así como la toxicidad de estos agentes sobre la salud humana.

5. REFERENCIAS

- Abouhosseini, M.; Reza, M.; Barimani, A.; Araghi, A. 2015. Carvacrol as a potent natural acaricide against *Dermanyssus gallinae*. *Parasitology Research*, **114**(10):3801-3806.
- Akhtar, Y., and M. B. Isman. 2004. Comparative growth inhibitory and antifeedant effect of plant extracts and pure allelochemicals on four *phytophagous* insect species. *Journal of Applied Entomology*, **128**:32-38.
- Albarracin, W.H.; Alfonso, C.A.; Sanchez, I.C. 2012. Application of essential oils as a preservative to improve the shelf life of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*). *Vitae*, **19**:34-40.
- Armentia, A.; Fernandez, A.; Perez-Santos, C; De la Fuente, R.; Sanchez, D.; Sanchis, F.; Mendez, J. y Stoller, R. 1994. Occupational allergy to mites in salty ham, chorizo and cheese. *Allergol Immunopathol*, **22**:152-154.
- Bachtsi A. R.; Kiparissides, C. 1996. Synthesis and release studies of oil containing poly (vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. *Journal of Controlled Release*, **38**:49-58.
- Brazis, P.; Serra, M. A. S.; Dethioux, F.; Biourge, V.; Puigdemont, A. 2008. Evaluation of storage mite contamination of commercial dry dog food. *Veterinary Dermatology*, **4**:209-214.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in food – A review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**:223-253.
- Chang, C. P.; Leung T. K.; Linc, S. M.; Hsu, C. C. 2006. Release properties on gelatin gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **50**:136-40.
- Chen, F.; Shi, Z.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. 2009. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnol Bioeng*, **104**(1):30-39.
- Contado, C.; Ravani, L.; Passarella, M. 2013. Size characterization by sedimentation field flow fractionation of silica particles used as food additives. *Analytica Chimica Acta*, **788**:183-192.
- El-Nahal, A. K. M.; Schmidt, G. H.; Risha, E. M. 1989. Vapours of *Acorus calamus* oil—a space treatment for stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, **25**:211-216.
- Enan, E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **130**(3):325-337.

- Fields, P.G.; & White, N. D. 2002. Alternatives to methyl bromide treatments for stored product and quarantine insects. *Annual Review of Entomology*, **47**:331-359.
- Gulati, R.; Mathur, S. 1995. Effect of Eucalyptus and Mentha leaves and Curcuma rhizomes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae) in Wheat. *Experimental & Applied Acarology*, **19(9)**:511-518.
- Jeong, E. Y.; Lim, J. H.; Kim, H. G.; Lee, H. S. 2008. Acaricidal activity of *Thymus vulgaris* oil and its main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *Journal of Food Protection*, **71(2)**:351-355.
- Jyothi, V. N.; Prasanna, P. M.; Sakarkar, N. ; Prabha K. S.; Ramaiah, P. S. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, **27(3)**:187-197.
- Kim, F. H.; Kim, H. K.; Choi, D. H.; Ahn, Y.J. 2003a. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Applied Entomology and Zoology*. **38(2)**:261-266.
- Kim, S.; Parka, C.; Ohhb, M.; Choc, H.; Ahn, Y. 2003b. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). *Journal of Stored Products Research*, **39(1)**:11-19.
- Lee, B.; Peter, C.; Tumaaliia, F.; Choi, W. 2004. Fumigant toxicity of essential oils from the *Myrtaceae* family and 1, 8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, **40(5)**:553-564.
- Lee, C. H.; Sung, B. K.; Lee, H. S. 2006. Acaricidal activity of fennel seed oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored-food mite. *Journal of Stored Products Research*, **42(1)**:8-14.
- Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D. 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, **363**:26-39.
- Macchioni, F.; Cioni, P. L.; Flamini, G.; Morelli, I.; Perrucci, S.; Franceschi, A. Macchioni, G.; Ceccarini, L. 2002. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**:4586-4588.
- McDonald, L.G.; Tovey, E. 1993. The effectiveness of benzyl benzoate and some essential plant oils as laundry additives for killing house dust mites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **92**:771-2.
- Marriott, N. G.; Schilling, M. W. 2004. Dry cured pork research review white paper. Paper presented at the Annual Meeting. Morehead City, NC: National Country Ham Association, Inc. National Country Ham Association.
- Matsumoto, T.; Hisano, T.; Hamaguchi, M.; Mike, T. 1996. Systemic anaphylaxis after eating storagemite contaminated food. *International Archives of Allergy and Immunology*, **109**:197-200.
- Miyazaki, Y.; Yatagai, M.; Takaoka, Y. 1989. Effect of essential oils on the activity of house dust mites. *Japan Journal of Biometeor*, **26**:105-108.
- Nazzaro, F.; Orlando, P.; Fratianni, F.; Coppola, R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion of Biotechnology*, **23**:182-186.
- Pasay, C.; Mounsey, K.; Stevenson, G.; Davis, R.; Arlian, L.; Morgan, M. 2011. Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. *Plos One Journal*, **5(8)**: e12079
- Pontes, W. J. T.; de Oliveira, J. C. G.; da Camara, C. A. G.; Lopes, A. C. H. R., Gondim Júnior, M. G. C.; de Oliveira, J. V.; Barros, R.; Schwartz, M. O. E. 2007. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amazonica*, **37(1)**:103-110.
- Regnault-Roger, C.; Hamraoui, A. 1995. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Stored Products Research*, **31**:291-299.
- Rentfrow, G.; Hanson, D.; Schilling, M.; Mikel, W. 2006. Methyl bromide use to combat mite infestation in dry-cured ham during production. *National Institute of Food and Agriculture*, **5-9**:108.

- Rentfrow, G., Hanson, D., Schilling, M., Mikel, W. 2008. The use of methyl bromide to control insects in country hams in the Southeastern United States. University of Kentucky Extension/National Country Ham Association (Extension Publication # ASC-171).
- Rezk, H. A.; Gadelhak, G. G. 2004. Acaricidal activity of two plant essential oils on the adult stage of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* Trouessart (Acari: Pyroglyphidae). *Phytophaga*, **14**:667-673.
- Ruiz-Rico, M.; Fuentes, C.; Pérez-Esteve, É.; Jiménez-Belenguer, A. I.; Quiles, A.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J. M. 2015. Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. *Food Control*, **56**:77-85.
- Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Bernardos, A.; Sancenón, F.; Martínez-Mañez, R.; Marcos, M. D.; Barat, J. M. 2016. Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized in silica particles (*En revisión*).
- Sinha, R. N.; White, N. D.; Henderson, L.P. 1979. Effects of infestations by three stored-product mites on fat acidity, seed germination, and microflora of stored wheat. *Journal of Economic Entomology*: 763-766.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Engineering reviews*, **3**:1-16.
- Sánchez-Molinero, F.; Arnau, J. 2014. Effects of the applications of oil drip onto surface and of the use of a temperature of 35 °C for 4 days on some physiochemical, microbiological and sensory characteristics of dry-cured ham. *Meat Science*, **98**:81-87.
- Scarfato, P.; Avallone, E.; Iannelli, P.; De Feo, V.; Acierno, D. 2007. Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity. *Journal of Applied Polymer Science*, **105**:3568-77.
- Terho, E. O.; Husman, K.; Vohlonen, I.; Rautalahti, M.; Tukiainen, H. 1985. Allergy to storage mites or cow dander as a cause of rhinitis among Finnish dairy farmers. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **40(1)**:23-26.
- Thind, B. 2005. A new versatile and robust trap for detection and monitoring of stored product pests in the cereal and allied industries. *Experimental and Applied Acarology*, **35**:1-15.
- Tovey, E. R.; McDonald, L. G. 1997. A simple washing procedure with eucalyptus oil for controlling house dust mites and their allergens in clothing and bedding. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **100(4)**:464-466.
- Uboldi, C.; Giudetti, G.; Broggi, F.; Gilliland, D.; Ponti, J.; Rossi, F. 2012. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **745(1)**:11-20.
- Yuliani, S.; Torley, P. J.; D'Arcy, B.; Nicholson, T.; Bhandari, B. 2006. Extrusion of mixtures of starch and d-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavor retention and physical properties. *Food Research Institution*, **39**:318-31.
- Zdárková, E. 1998. Biological control of storage mites by *Cheyletus eruditus*. *Integrated Pest Management Reviews*, **3(2)**:111-116.