

MONOTERPENOS AROMÁTICOS TIMOL Y CARVACROL: APROXIMACIONES DE SU POSIBLE PAPEL EN PROCESOS CLAVES DE LA PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

RESUMEN

Un evento imperativo en la generación de células espumosas en la aterosclerosis es la oxidación de la LDL; cuando estas partículas son oxidadas se convierten en epítopes para macrófagos los cuales se comienzan a transformar en células muy reactivas produciendo promotores de crecimiento e induciendo la replicación de células musculares lisas. Los procesos de glicación u oxidación aumentan la electronegatividad de las LDL aumentando así su efecto inflamatorio, por lo tanto la inhibición de estos procesos tanto a nivel de la parte protéica como del contenido lipídico pueden retardar los eventos aterogénicos mediados por esta partícula. Las velocidades de reducción de un radical libre por los monoterpenos aromáticos timol y carvacrol se compararon contra el BHT. La protección de esta partícula por los monoterpenos fue analizada por diferentes metodologías para proponer posibles mecanismos de su incidencia sobre blancos claves de esta patología.

PALABRAS CLAVES: Timol, Carvacrol, Cinética de reacción, DPPH, TBARS, lipoproteínas de baja densidad (LDL), LDL oxidadas (oxLDL), monocitos.

ABSTRACT

An imperative event in foam cells generation in the atherosclerosis is the LDL oxidation. When this particle is oxidized they are recognized by macrophage which begins to convert on reactive cells producing growing factor and inducing replication of smooth muscle cells. The glycation and oxidative processes increase the LDL electronegativity and its inflammatory effect; therefore inhibit that process as much proteic part as lipid content can retard atherogenic events carried out by this particle. The reduction kinetics of a free radical by the aromatic monoterpenes thymol and carvacrol were compare against BHT. Different methodologies were employing to compare the protection activity of monoterpenes to propose possible mechanism on its incidence on key targets about this pathology.

KEYWORDS: Thymol, Carvacrol, Kinetic reaction, DPPH, TBARS, low density lipoprotein (LDL), oxidized LDL (oxLDL), monocytes.

1. INTRODUCCIÓN

En instancias tempranas en la aterosclerosis, los macrófagos que son células que captan el colesterol de las LDL, comienzan acumulándolo hasta generar células espumosas. [1]. Un evento imperativo que antecede a la generación de células espumosas es la oxidación de esta partícula; cuando las LDL son oxidadas (oxLDL) se convierten en epítopes para macrófagos [2,3] los cuales se comienzan a transformar en células muy reactivas produciendo promotores de crecimiento e induciendo la replicación de más células musculares lisas.

Varios estudios sobre la actividad antioxidante de aceites esenciales han reportado que algunas plantas ricas en timol y carvacrol, tiene un considerable efecto antioxidante. Además del orégano (*Origanum vulgare L.*), en otras plantas (*Satureja hortensis L.*, *Satureja*

montana L., *Satureja spicigera*, *Thymbra spicata*) [4-6] los isómeros timol (5-metil-2-isopropilfenol) y carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) son los principales componentes. Es ampliamente aceptado que la inhibición de los procesos oxidativos tanto a nivel de la parte protéica como del contenido lipídico pueden retardar los eventos aterogénicos mediados por la LDL [3]. Adicionalmente recientes hallazgos demuestran que algunos antioxidantes reconocidos como la vitamina E presentan adicionales mecanismos tales como la disminución en la expresión de receptores CD36 in vivo, presentándose así rutas alternas a las cuales se le atribuía su actividad biológica [7,8]. El objetivo del trabajo fue determinar posibles mecanismos a través de los cuales los isómeros timol y carvacrol actúan sobre la oxidación y captación de oxLDL por monocitos humanos.

GUILLERMO MONTOYA

Químico Farmacéutico.
Est. Doctorado Ccias. Químicas.
Universidad de Antioquia
montoya.guillermo@gmail.com

JULIÁN LONDOÑO

Químico Farmacéutico.
Est. Doctorado Ccias. Químicas.
Universidad de Antioquia
jalondo@gmail.com

LINA YASSIN

Bióloga.
Est. Doctorado Ccias. Biomédicas.
Universidad de Antioquia
yascatorce@yahoo.com

GLORIA VÁSQUEZ

Profesor. MD. PhD.
Universidad de Antioquia
glomavas@gmail.com

MAURICIO ROJAS

Biólogo.
Profesor. PhD.
Universidad de Antioquia
mrojasl@une.net.co

ROBINSON RAMIREZ

Bacteriólogo.
Profesor. PhD.
Universidad de Antioquia
ramirezpineda@guajiros.udea.edu.co

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Ácido Tiobarbitúrico (TBA), Agarosa Tipo II, Sudan Black B, Buffer barbital, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Hidroxitolueno Butilado (BHT), Timol (5-metil-2-isopropilfenol) y Carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), se adquirieron de Sigma Chemical Co, Etanol grado reactivo fue adquirido de Merck – EMD, y el Kit Rápido para cuantificación de proteínas de Fluka. Medio suplementado RPMI1640 fue obtenido de Gibco y los Anticuerpos monoclonales antiCD14 y su respectivo isotipo IgG2ak-FITC de BD Pharmingen.

2.2 ESI LC/MS/MS

Las separaciones fueron realizadas en una columna Lichrospher RP18 5µm, ácido fórmico 0.1 % fue adicionado a la fase móvil para favorecer la ionización a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min y temperatura de 30°C. El control del sistema y la evaluación de los datos fueron analizados en el software de la quimioestación Agilent LC/MSD tanto para los resultados del analizador de cuadrupolo como para la trampa de iones. Las condiciones de ESI/MS fueron las siguientes: Voltaje del capilar fue 4 kV en modo positivo y 3.5 kV en modo negativo, en ambos el voltaje del fragmentor se utilizó entre 70 y 150 V. Los espectros fueron obtenidos en el rango de 100 y 500 m/z. Nitrógeno fue usado como gas

2.3 Cinética de Reducción del radical libre DPPH

Una alícuota (500 µL) de las soluciones conteniendo diferentes concentraciones de antioxidantes fue agregada a 1000 µL de una solución metanólica de DPPH (0.02 mg/mL). La absorbancia a 517 nm fue tomada a través del tiempo en un espectrofotómetro CaryBio 50 hasta que la reacción se estabilizó. La concentración de DPPH en el medio de reacción $[DPPH]_T$ fue calculada de acuerdo con la ecuación:

$$A_{517nm} = 31.63 [DPPH]_T - 0.01686 \quad r^2 = 0.999, \text{ Sy.x } 0.004351 \quad (1)$$

El porcentaje de DPPH remanente fue calculado por la siguiente expresión:

$$\%[DPPH]_{REM} = ([DPPH]_T / [DPPH]_0) * 100 \quad (2)$$

Para una concentración de antioxidante de 50 µg/mL los parámetros de velocidad (K (mmol DPPH/segundo)), tiempo necesario para disminuir en un 50% la concentración de DPPH (T_{50} (segundos)) y concentración de DPPH en el estado estable ($DPPH_{ss}$ (mmol DPPH)), fueron calculados mediante el paquete estadístico GraphPad Prism® (Ver tabla 1). El modelo de curva dosis – respuesta obtenido al graficar el porcentaje de DPPH remanente contra la concentración de antioxidante

permite calcular la cantidad de antioxidante necesaria para estabilizar en un 50% el radical libre (EC_{50}).

2.4 Inhibición de la oxidación de LDL

2.4.1 Aislamiento de LDL

La fracción de LDL fue obtenida por ultracentrifugación, aplicando gradiente discontinuo de densidad en un equipo Beckman XL-100 utilizando rotor SW-55Ti y tubos ultraclear 5 mL. 50 mL de plasma fue obtenido de voluntarios sanos, no fumadores (20-25 años), por centrifugación a 2500 rpm y 4°C con citrato de sodio como anticoagulante (10.6 µmol citrato de sodio/mL de sangre). La fracción Quilomicrones-VLDL fue obtenida adicionando 1.6 mL de NaCl (1,006 g/mL) sobre 3.2 mL de plasma y centrifugando a 5 °C por un periodo de 12 horas a 49500 rpm con desaceleración lenta. La fracción superior (1.6 mL) fue retirada y 1.6 ml de KBr (1.182 g/mL) fue adicionado y centrifugado nuevamente a 5 °C por un periodo de 18 horas a 49500 rpm con desaceleración lenta. SDS-PAGE fue usada para confirmar la pureza de las fracciones colectadas (Quilomicrones, VLDL, LDL, y HDL).

2.4.2 Cuantificación del contenido protéico

La fracción LDL obtenida por ultracentrifugación fue cuantificada por el ensayo estándar para espectrofotometría del Protein Quantification Kit-Rapid de Fluka

2.4.3 Oxidación de la LDL

LDL (400 µL) a 373 µg/mL se preincuba con 180 µg/mL de timol, carvacrol y BHT durante 15 minutos, la oxidación se inicia con la adición de $CuSO_4$ (100 µM) a 37°C durante 90 minutos. La oxidación es detenida por la adición de 25 µL de una solución 1% de EDTA y enfriamiento en un baño de hielo por 15 minutos.

2.5 Determinación TBARS

Las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico fueron medidas en un espectrofotómetro CaryBio50. Se adicionó 1 mL de una solución al 0.67% TBA (Ácido Tiobarbitúrico), 15 % TCA (Ácido Tricloroacético) y 0.1N HCl, el cromóforo es formado a 95°C por 60 minutos. Las soluciones son pasadas a través de filtros de esteres de metilcelulosa (MFS 0.20 micrones). Las lecturas de tres experimentos independientes fueron realizadas a 532 nm, la cantidad de equivalentes de MDA formados fue calculada usando un coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [10].

2.6 Movilidad electroforética

80 µL de LDL (373 µg/mL) se preincuba con 180 µg/mL de timol, carvacrol y BHT (10 µL) durante 15 minutos, la oxidación se inicia con la adición de $CuSO_4$

(100 μM) a 37°C durante 15 horas. La oxidación es detenida por la adición de 5 μL de una solución 1% de EDTA y enfriamiento en un baño de hielo por 15 minutos.

El daño de la fracción proteica (Apo B 100) fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) en buffer barbital 0.05 M, pH 8.6, 100 V por 2 horas y revelado con sudan black B.

nebulizador 13 L/min a 350°C.

2.7 Citometría de Flujo

2.7.1. Ensayo de Captación.

En orden para cuantificar la captación de LDL oxidada y marcada con DiI (1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato), mononucleares de sangre periférica fueron purificados por gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque (Biowhitaker). En un volumen de final de 1 ml de RPMI 1640 suplementado con estreptomycin/penicilina 10 Unidades y 10 % de pull de suero humano inactivado, se agregaron 5×10^5 mononucleares de sangre periférica y OxLDL-DiI para una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de timol, carvacrol o BHT e incubado durante 1 hora a 37°C con 90% de humedad y 5 % de CO_2 . El marcaje se realizó con el anticuerpo monoclonal antiCD14 o su respectivo isotipo por 30 min a 4°C. Las lecturas fueron realizadas en un Citómetro de flujo Coulter Epics XL. [9]

3. RESULTADOS

La disminución de la concentración del radical libre DPPH por la acción de antioxidantes fenólicos fue evaluada mediante el análisis de su comportamiento cinético. (Ver figura 1). Se aplica una regresión no lineal con una ecuación de decaimiento exponencial de una fase en el paquete estadístico GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, con el cual se calculan los valores de K (Velocidad de reacción) a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ver tabla 2) obtenidos de la siguiente ecuación:

$$[\text{DPPH}] = \text{Span} e^{-(K t)} + \text{Plateau}$$

Dónde:

Plateau es la concentración de DPPH remanente en el estado estable ($[\text{DPPH}]_{\text{REM}}$).

Span es la diferencia entre el punto máximo y mínimo de la variable y, determinado por: $[\text{DPPH}]_{\text{inicial}} - [\text{DPPH}]_{\text{REM}}$

La concentración de antioxidante necesaria para disminuir en un 50 % la concentración inicial de DPPH se define como EC_{50} y es un parámetro ampliamente utilizado para medir el poder antioxidante. A menor EC_{50} mayor es el poder antioxidante. Los valores encontrados para cada uno de los compuestos se calcularon a partir de los porcentajes de DPPH remanentes (Ver ecuación 2)

graficados contra las transformaciones logarítmicas de las concentraciones de antioxidantes; una prueba F determinó el mejor ajuste para los modelos de regresión no lineal sigmoideal dosis respuesta y dosis respuesta pendiente variable. Un valor $P < 0.05$ fue considerado significativo.

En los resultados mostrados en tabla 1 se evidencia que a pesar de presentar isomería, las concentraciones efectivas 50 de timol y carvacrol difieren considerablemente.

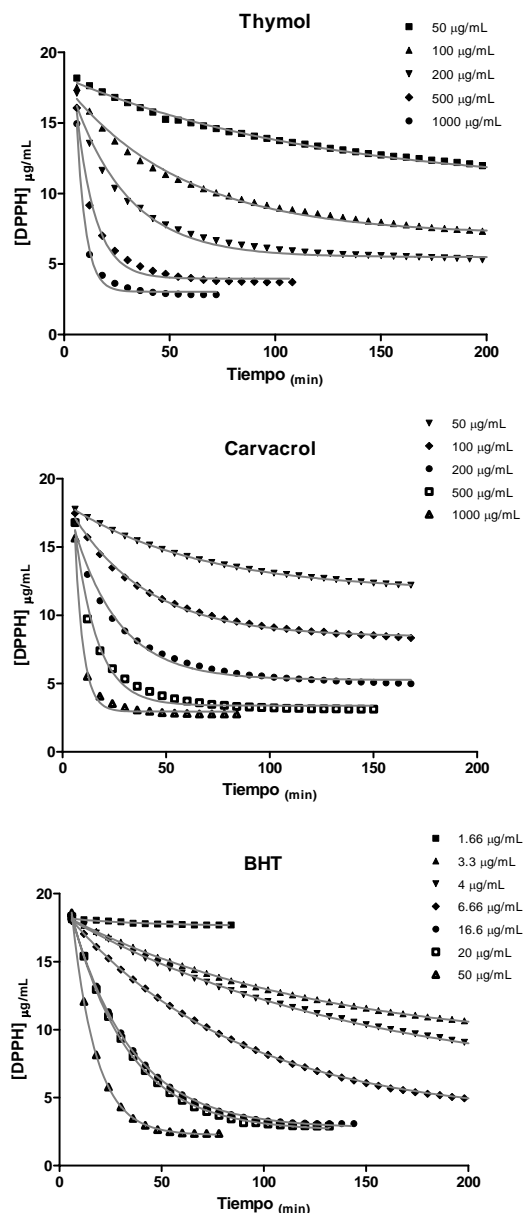
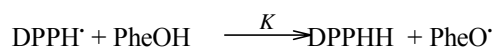


Figura 1. Actividad captadora de radicales libres de compuestos evaluados a diferentes concentraciones.

El gran efecto inductor de electrones hacia el anillo aromático de los grupos Terbutilo en la estructura de BHT favorecen en gran medida que el nuevo radical de

BHT formado y que se estabiliza por resonancia sea mas estable, adicionalmente la energía del enlace O-H es mas débil y puede romperse homolíticamente para favorecer la generación de un radical de hidrógeno. Estudios farmacocinéticos del timol permiten evidenciar que las modificaciones que sufre esta molécula en su metabolismo son realizadas por reacciones de adición gracias a la alta reactividad y bajas energías de enlace del mismo grupo[11]. La presencia de grupos terbutilo activantes que no están presentes en el timol y carvacrol son reemplazados por grupos menos activantes como los isopropilo que favorecen en mayor medida en la actividad al timol. Las estructuras aromáticas se activan en posiciones orto y para de acuerdo con la posición del sustituyente del anillo. Es claro que la posición meta del grupo hidroxilo del carvacrol no se ve tan claramente favorecida por este grupo voluminoso e inductor de electrones hacia el anillo como la posición orto de este mismo en la estructura del timol. A pesar de estas diferencias en la potencia del timol y carvacrol, es evidente que el carvacrol presenta mayor velocidad de reacción justificado en los parámetros K y T₅₀ (ver tabla 1).

Se propone emplear la cuantificación de la relación molar compuesto/DPPH como un parámetro estequiométrico independiente de la velocidad de la reacción y concentraciones iniciales de reactivos según la ecuación:



Por lo tanto el parámetro n (mmol compuesto/mmol DPPH), es un valor propio de cada sustancia, útil para comparar la capacidad captadora de radicales libres de diferentes compuestos y estrechamente relacionado con la concentración efectiva 50 (ver tabla 1).

	BHT	Thy	Carv
^a [DPPH] _{ss}	1,975 x 10 ⁻⁵	1,036 x 10 ⁻²	1,176 x 10 ⁻²
^b K	1,424 x 10 ⁻³	1,380 x 10 ⁻⁴	2,617 x 10 ⁻⁴
^c T ₅₀	486.6	5023	2648
^d n	3.29	7.89	8.73
^e EC ₅₀	3.013 ± 1.9	47.47 ± 2.8	72.42 ± 2.6

^a Concentración de DPPH en el estado estable (mg/mL)

^b Velocidad de reacción (mg/mL de DPPH/segundo)

^c Tiempo necesario para disminuir en un 50% la concentración de DPPH (segundos)

^d Relación molar Compuesto / DPPH

^e Cantidad de antioxidante (µg/mL) necesaria para estabilizar el 50 % del DPPH. ± SD

Tabla 1. Cinética de decoloración del DPPH por los compuestos fenólicos BHT, Timol y Carvacrol a 50 µg/mL. A través de un modelo de decaimiento exponencial de una fase se han calculado algunos parámetros cinéticos.

La potencia de los antioxidantes contra la oxidación de lipoproteínas y membranas esta determinada por muchos factores, entre ellos la localización y movilidad del antioxidante en el ambiente de reacción. Los valores del coeficiente de partición de los compuestos evaluados (valores de Log P de 3.4 (Carvacrol), 3.3 (Timol) y 5.1 (BHT) [12,13]) coinciden con los resultados acerca de la capacidad de inhibir el daño a lípidos medidos por la metodología TBARS (ver gráfico2).

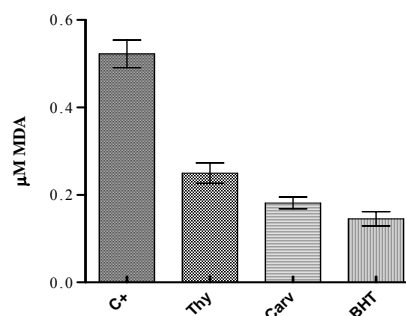


Figura 2. Efecto de terpenos aromáticos sobre la oxidación de Lipoproteína de Baja Densidad LDL. La oxidación fue determinada por el método TBARS y los resultados expresados como µM de MDA, mostrados como media ± SD (n = 3). (C+) control positivo.

El BHT debido a su alta lipofiliidad presenta mayor protección de fosfolípidos y ácidos grasos contenidos en la partícula de LDL. Sin embargo existe evidencia que en pacientes diabéticos las lipoproteínas mas cargadas electronegativamente presentan mayor efecto inflamatorio[14,15] favoreciéndose así la quimioatracción y reclutamiento de mas monocitos-macrófagos. A pesar de no poseer tan marcado efecto en la inhibición de oxidación por los métodos DPPH y TBARS, el análisis de la electronegatividad en geles de agarosa muestran a los terpenos timol y carvacrol con mejores agentes protectores en la formación de partículas de LDL cargadas electronegativamente cuando se evaluaron a una misma concentración. (Ver gráfica 3)

	Thy	Carv	BHT
(µg/mL)	50.00	50.00	50.00
K	1.380 x 10 ⁻⁴	2.617 x 10 ⁻⁴	1.424 x 10 ⁻³
r ²	0.9935	0.9997	0.9999

Tabla 2. Características fisicoquímicas de reacción de monoterpenos aromáticos con el DPPH

El análisis LC/MSD evidenció que el mecanismo de reducción del radical se realiza por producción de radical de hidrógeno. No hubo presencia de aductos entre los diferentes radicales generados por reacciones de terminación.

La captación de LDL oxidada marcada con DiI mostró que tanto el timol como el carvacrol disminuyen considerablemente la captación de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ver figura 4), los porcentajes de captación fueron 77.6% de células CD14+ que captaron oxLDL en presencia del solvente (STE) a un 52, 58.7 y 76.43% para los compuestos timol, carvacrol y BHT respectivamente.

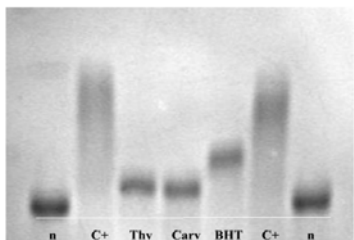


Figura 3. Efecto de monoterpenos aromáticos sobre la modificación oxidativa de lipoproteínas de baja densidad. Timol (Thy), carvacrol (Carv), BHT, (C+) control positivo y (n) lipoproteína en condiciones nativas.

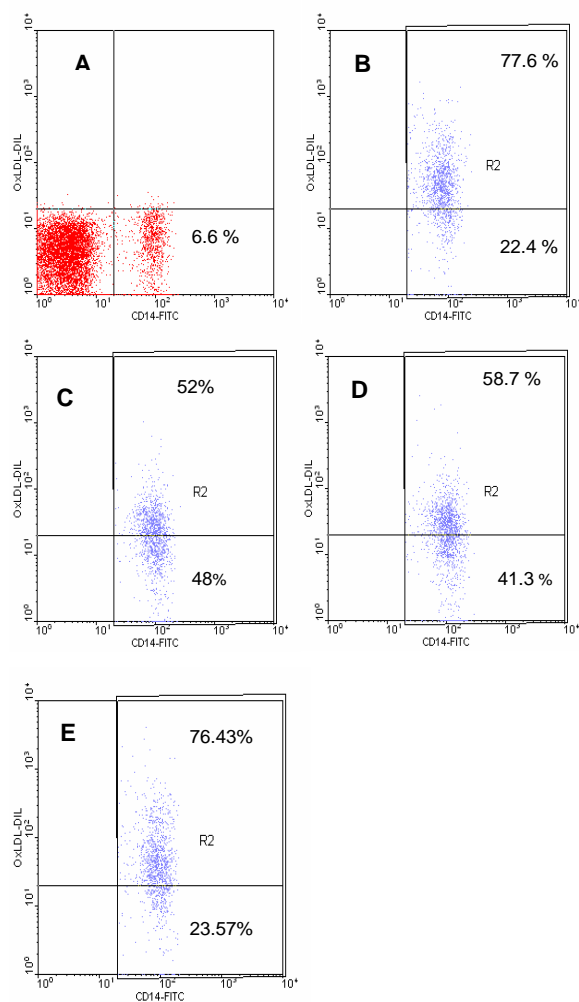


Figura 4. Efecto de los monoterpenos aromáticos en la captación de oxLDL-DiI. (A) PBMC + CD14-FITC + STE. (B)

PBMC + oxLDL-DiI + CD14-FITC + STE. (C) PBMC + oxLDL-DiI + CD14-FITC + THYMOL. (D) PBMC + oxLDL-DiI + CD14-FITC + CARVACROL. (E) PBMC + oxLDL-DiI + CD14-FITC + BHT. Los compuestos se evaluaron a una concentración de 50 µg/mL.

Además se observó una importante reducción en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las OxLDL en las células CD14+ que pasaron de 63.1 con el solvente a 37.4 para timol, 39.6 carvacrol y 64,9 BHT.

4. CONCLUSIONES

Se evidenció que las velocidades de reacción en un medio polar como el presentado en la metodología del radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl pueden modificarse cuando las reacciones se llevan a cabo en matrices con mayor lipofiliidad. A pesar de la gran protección conferida del BHT frente a la peroxidación lipídica verificada en las metodologías TBARS y en las cinéticas de reducción de DPPH, no se evidenció esta misma en la porción proteica ó en la disminución de la electronegatividad de toda la partícula, teniendo presente que altas concentraciones de esta en plasma esta asociada a mayores riesgos de enfermedades cardiovasculares[16].

A pesar de la gran homología estructural entre el timol y el carvacrol se pudo determinar una marcada diferencia no solo en las cinéticas de reducción tanto como en su potencia, también se evidenció que el coeficiente de partición de una sustancia puede predecir con cierta destreza como posiblemente interactúa una sustancia en una matriz lipídica en comparación con el mismo proceso en un medio más polar. Las diferencias estructurales entre ambos monoterpenos le confieren al timol mayor potencia en comparación con su isómero debido a la posición orto del grupo hidroxilo activado por el efecto de los electrones introducidos al anillo del grupo isopropilo, una probable disminución en la energía del enlace O-H y mayor facilidad para generarse una ruptura homolítica del mismo. Los mecanismos a través de los cuales se realiza la protección de la parte proteica de la LDL son aun inciertos, sin embargo los análisis de movilidad electroforética de las LDL permiten ver claramente un incremento de electronegatividad de las mismas protegidas por el BHT en comparación a las protegidas por los monoterpenos.

Una amplia gama de receptores están involucrados en la internalización de las LDL. Estas partículas pueden pasar de la circulación a la intima debido a su tamaño, una vez son atrapadas en la intima arterial por proteoglicanos son sometidas a modificaciones mediadas por células ya residentes de la intima. Estos cambios que sufre la apoB100 le permiten a la partícula ser reconocidas por receptores CD36, SRA1 y SRA2

ampliamente expresados en macrófagos ya quimioatraídos en el espacio intimal[1]. Los resultados en las citometrías donde los compuestos timol, carvacrol y BHT son ensayados en su capacidad de inducir o inhibir la captación de partículas marcadas y evaluadas a 50 µg/mL permiten concluir que a parte del efecto protector de eventos oxidativos existe una disminución en la captación de las oxLDL-DiI sin tener claridad de cual mecanismo pueda explicar esta reducción. Investigaciones posteriores permitirán esclarecer mecanismos exactos a través de los cuales estos monoterpenos están impidiendo que las LDL oxidadas ingresen a los macrófagos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. J. A. R. OSTERUD and E. I. R. I. BJORKLID, Role of Monocytes in Atherogenesis, *Physiol. Rev.*, 83 (2003) 1069-1112.
- [2] D. Steinberg, Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 20963-20966.
- [3] K. Nakajima, T. Nakano, and A. Tanaka, The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma, *Clinica Chimica Acta*, 367 (2006) 36-47.
- [4] M. Gulluce, M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal, M. Polissiou, A. Sokmen, and F. Sahin, In Vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L., *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 3958-3965.
- [5] S. S. L. Y. Serap Hanc, Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation, *Nahrung/Food*, 47 (2003) 252-255.
- [6] L. G. Angelini, G. Carpanese, P. L. Cioni, I. Morelli, M. Macchia, and G. Flamini, Essential Oils from Mediterranean Lamiaceae as Weed Germination Inhibitors, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 6158-6164.
- [7] N. K. Ozer, Y. Negis, N. Aytan, L. Villacorta, R. Ricciarelli, J. M. Zingg, and A. Azzi, Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits, *Atherosclerosis*, 184 (2006) 15-20.
- [8] R. Ricciarelli, J. M. Zingg, and A. Azzi, Vitamin E Reduces the Uptake of Oxidized LDL by Inhibiting CD36 Scavenger Receptor Expression in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells, *Circulation*, 102 (2000) 82-87.
- [9] D. E. Sanctis, Blanca, Rivera, and Bianco, Expression of low-density lipoprotein receptors in peripheral blood and tonsil B lymphocytes, *Clinical & Experimental Immunology*, 113 (1998) 206-212.
- [10] N. Rojstaczer and D. J. Triggle, Structure-function relationships of calcium antagonists : Effect on oxidative modification of low density lipoprotein, *Biochemical Pharmacology*, 51 (1996) 141-150.
- [11] C. Kohlert, G. Schindler, R. W. Marz, G. Abel, B. Brinkhaus, H. Derendorf, E. U. Grafe, and M. Veit, Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans, *J Clin Pharmacol*, 42 (2002) 731-737.
- [12] A. F. El-Kattan, C. S. Asbill, N. Kim, and B. B. Michniak, The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities, *International Journal of Pharmaceutics*, 215 (2001) 229-240.
- [13] A. Ultee, M. H. J. Bennik, and R. Moezelaar, The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2002) 1561-1568.
- [14] J. L. Sánchez-Quesada, S. Benítez, A. P+, A. M. Wagner, M. Rigla, G. Carreras, L. Vila, M. Camacho, R. Arcelus, and J. Ordóñez-Llanos, The inflammatory properties of electronegative low-density lipoprotein from type 1 diabetic patients are related to increased platelet-activating factor acetylhydrolase activity, *Diabetologia*, 48 (2005) 2162-2169.
- [15] Sónia Benítez, Antonio Pérez, José Luis Sánchez-Quesada, and Ana María Wagner. Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycemic control. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 23[1], 26-34. 2007. Ref Type: Journal (Full)
- [16] J. W. Gaubatz, B. K. Gillard, J. B. Massey, R. C. Hoogeveen, M. Huang, E. E. Lloyd, J. L. Raya, C. y. Yang, and H. J. Pownall, Dynamics of dense electronegative low density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A2, *J. Lipid Res.*, 48 (2007) 348-357.