

A photograph showing several cinnamon sticks of varying shades (light brown and dark brown) and a glass filled with a golden-brown liquid, likely cinnamon tea, with a cinnamon stick inside. The background is a light green gradient.

Efecto biológico de los aceites esenciales de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) sobre enfermedades degenerativas

Luis Mario Ayala-Guerrero¹, Jazmín Ruiz-García¹, Rubí Guadalupe Galindo-Ferrer², Patricia Ibarra-Torres^{1,3}, Víctor Eric López y López¹ y Aarón Mendieta-Moctezuma¹

¹ Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla, Km 1.5, Tepetitla de Lardizábal, 90700, Tlaxcala, México.

² TecNM - Campus Altiplano de Tlaxcala. Km. 7.5 Carretera Federal San Martín Texmelucan-Tlaxcala. San Diego Xocoyucan, 90122, Tlaxcala, México

³ Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Guanajuato, Av. Universidad Sur 1001, 38496 Cortázar, Guanajuato, México

Correo electrónico: luis.marioni.a@gmail.com, mendietam@ipn.mx



RESUMEN

Las enfermedades crónico-degenerativas son padecimientos que deterioran la salud de las personas de forma progresiva. Algunas de las más comunes en México son diabetes, cáncer, osteoartritis, cardiocerebrovasculares y Alzheimer.

En los últimos años los aceites esenciales han cobrado relevancia en la industria química y farmacéutica, ya que han presentado propiedades analgésicas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antitumorales, antioxidantes y neuroprotectores. Los aceites esenciales de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y del fruto seco de pimienta negra (*Piper nigrum*) mostraron actividad antidiabética al inhibir la enzima α -amilasa ($CI_{50} = 1.8$ y 1.2 mg/mL, respectivamente) con valores similares al fármaco acarbose ($CI_{50} = 1.55$ mg/mL). Además, el aceite esencial de *C. zeylanicum* presentó potencial neuroprotector inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa ($CI_{50} = 0.57$ mg/mL) con respecto al fármaco tacrina ($CI_{50} = 0.011$ mg/mL). Esto sugiere que representan una alternativa para el tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la inhibición de blancos terapéuticos.

Palabras clave: Diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer, α -amilasa, acetilcolinesterasa, aceites esenciales.

ABSTRACT

Chronic-degenerative diseases are ailments that progressively deteriorate people's health. Some of the most common in Mexico are diabetes, cancer, osteoarthritis, cerebrovascular disease and Alzheimer's.

In recent years, essential oils have gained relevance in the chemical and pharmaceutical industry, as they have shown analgesic, antidiabetic, anti-inflammatory, antitumor, antioxidant and neuroprotective properties. The essential oils of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper fruit (*Piper nigrum*) showed antidiabetic activity by inhibiting the enzyme α -amylase ($IC_{50} = 1.8$ and 1.2 mg/mL, respectively) with similar values to the drug acarbose ($IC_{50} = 1.55$ mg/mL). Furthermore, *C. zeylanicum* essential oil showed neuroprotective potential by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase ($IC_{50} = 0.57$ mg/mL) with respect to the drug tacrine ($IC_{50} = 0.011$ mg/mL). This suggests that these EOs represent an alternative for the treatment of degenerative diseases by inhibiting therapeutic targets.

Keywords: Diabetes mellitus, Alzheimer diseases, α -amylase, acetylcholinesterase, essential oils.

Introducción

En México, las enfermedades crónicas no transmisibles son las primeras causas de mortalidad siendo entre ellas de corazón, diabetes mellitus Tipo 2 (DM2) y tumores malignos (INEGI, 2021). Además, en las últimas décadas, en personas mayores de 70 años se aprecia un aumento constante de pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas, lo que incrementa el número de tratamientos farmacológicos. De acuerdo con el Instituto Nacional de Geriátrica (INGER), a nivel nacional se estima que alrededor de 1.3 millones de personas viven con demencia lo que representa un 7.9% de la población (INGER, 2024), siendo la enfermedad de Alzheimer la causa más común de demencia (Organización Mundial de la Salud, 2024).

Una enfermedad degenerativa es una afección generalmente crónica durante la cual tiene lugar un proceso continuo degenerativo en las células afectando paulatinamente la función, estructura de los tejidos u órganos. Estas enfermedades degradan física y/o mentalmente a las personas que las padecen y pueden ser congénitas o hereditarias siendo las más conocidas las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), respiratorias crónicas (pulmonar obstructiva crónica y asma), cardiovasculares (infartos de miocardio y cerebrovasculares), esclerosis múltiple,

osteoartritis, osteoporosis, cáncer, diabetes, entre otras (González et al., 2015). Estas enfermedades también se ven propiciadas por factores como el rápido desarrollo urbano no planificado, la generalización de modos de vida poco saludables, envejecimiento de la población, alimentación poco saludable y falta de actividad física (González et al., 2015).

La DM2 es una enfermedad donde los niveles de glucosa en la sangre son altos ya sea en ayuno (superior a 130 mg/dL) o después de comer (superior a 180 mg/dL) y se debe a un progresivo defecto de la secreción de insulina generando resistencia a esta misma. Algunos estudios epidemiológicos sugieren que la resistencia a la insulina aumenta el riesgo de demencia (deterioro de memoria), incluso en poblaciones no diabéticas (Nguyen et al. 2020). La α -amilasa es una enzima que se encuentra en el organismo (páncreas y glándulas salivares) e hidroliza enlaces α -glucosídicos de los polisacáridos de alto peso molecular como el almidón liberando glucosa y maltosa. Un tratamiento farmacológico para DM2 es el uso de inhibidores de α -glucosidasas (acarbose, miglitol y voglibosa), los cuales interfieren con la digestión y absorción de los carbohidratos de la dieta controlando los niveles de glucosa postprandial (después de comer) (Figura 1).

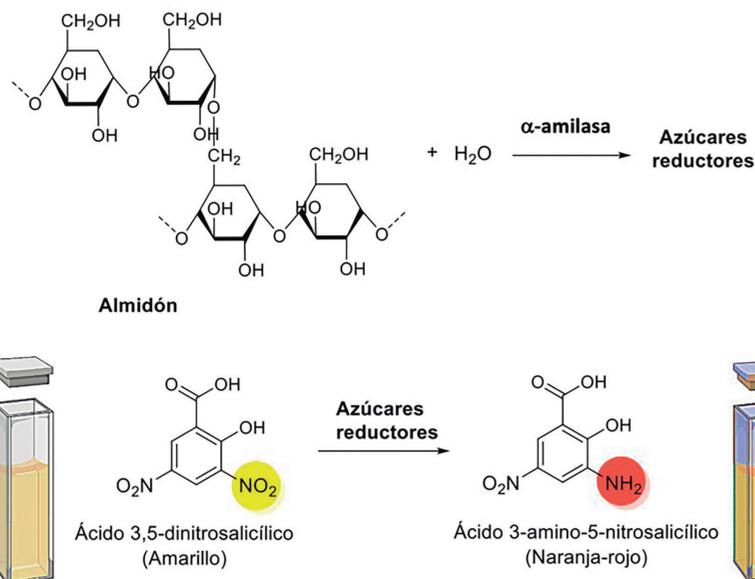


Figura 1. Ensayo *in vitro* de inhibición de α -amilasa relacionada con DM2.

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa crónica y es la causa más común de demencia, cuyas características principales son la disminución de la capacidad cognitiva, deterioro de la memoria, cambios en la personalidad y el comportamiento (Gan et al. 2018). En esta enfermedad, la concentración de acetilcolina suele ser baja, la cual es un neurotransmisor que participa en la memoria, aprendizaje y concentración. Un tratamiento farmacológico para la AD es mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, ya que retrasa la degradación de acetilcolina,

lo que mejora la neurotransmisión colinérgica (Figura 2). Los inhibidores de acetilcolinesterasa (donepezilo, galantamina, rivastigmina) si bien ayudan a reducir o controlar síntomas cognitivos y conductuales presentan problemas digestivos en pacientes (Majidazar et al., 2022). Además, se ha propuesto que una enfermedad crónica (DM2) precede o aumenta el riesgo de presentar otra (AD), lo que conduce a un tratamiento polifarmacológico aumentando el número de reacciones adversas por cada fármaco (Nguyen et al., 2020; Majidazar et al., 2022).

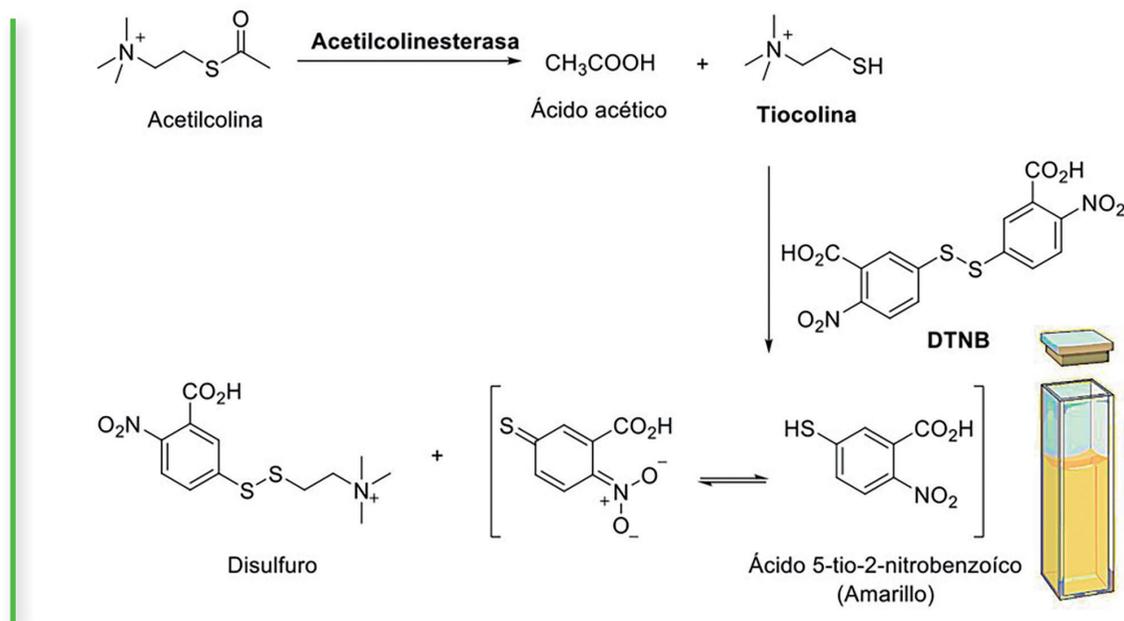


Figura 2. Ensayo *in vitro* de inhibición de acetilcolinesterasa relacionada con AD.

Se ha reportado la interacción entre la señalización de la insulina y AD observando mejoras en la función cognitiva en pacientes con AD después de la administración de fármacos antidiabéticos (insulina intranasal, metformina, tiazolidinedionas e incretinas) (Ciudin 2016; Michailidis et al., 2022), lo que surge un interés en el desarrollo de nuevas alternativas de origen natural con propiedades antidiabéticas y un enfoque neuroprotector para AD sin efectos adversos o mínimos.

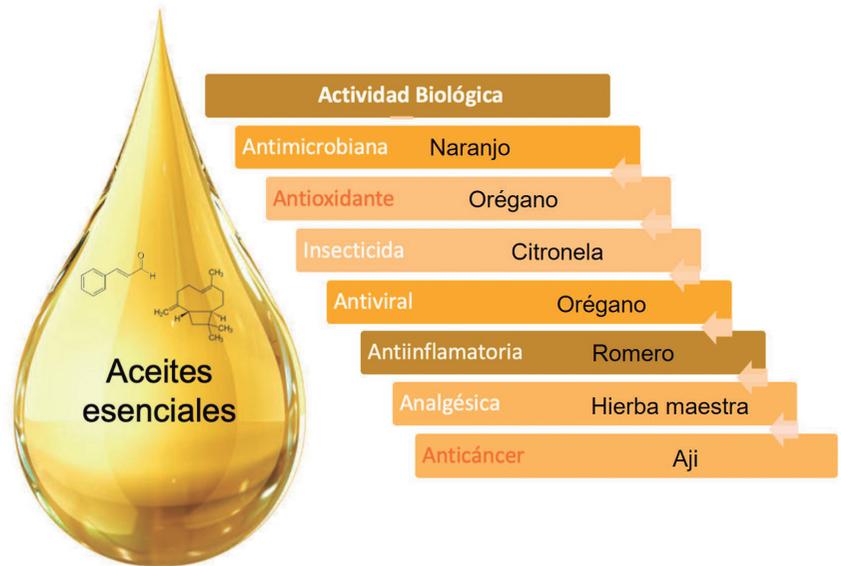
Los aceites esenciales (AEs) son sustancias hidrofóbicas volátiles que se extraen de plantas

y cuya composición química varía de acuerdo con la especie vegetal presentando hasta 200 compuestos por aceite esencial. Estos AEs tienen aplicación en aromaterapia, aditivos en alimentos y tratamientos farmacológicos naturales (Mohamed y Alotaibi, 2023). En consecuencia, se han reportado estudios *in vitro* e *in vivo* de sus propiedades anticancerígenas (*Curcuma aeryginosa*), antidiabéticas (*Melissa officinalis*), antimicrobianas (*Citrus sinensis*), antiinflamatorias (*Salvia rosmarinus*), cardioprotectores (*Acorus calamus* L.), anticoagulantes (*Artemisia dracunculus* L.), analgésicas (*Lippia alba*), antioxidantes (*Ori-*

ganum vulgare L.) y neuroprotectores (*Salvia officinalis* L.) observando que sus derivados terpenoides y fenilpropanoides responsables del efecto biológico actúan mediante inhibición de diversas dianas terapéuticas (Zhao et al. 2016; Barragán et al., 2017; Aziz et al. 2018; Agatonovic-Kustrin et al., 2019; Alves-Silva et al., 2021; Masyita et al. 2022; Panyajai et al., 2024) (Figura 3).

Recientemente, Agatonovic-Kustrin y col., (2019) evaluaron el efecto antidiabético, antienviejamiento y función cognitiva de AEs de salvia y orégano a través de su potencial antioxidante, inhibitorio sobre α -amilasa y acetilcolinesterasa. De acuerdo con estos datos, el presente trabajo describe el potencial antidiabético y neuroprotector de los AEs de la hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y del fruto seco de pimienta negra (*Piper nigrum*) mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa y acetilcolinesterasa.

Figura 3. Actividad biológica de los aceites esenciales (Mohamed et al., 2023).



2

Materiales y métodos

2.1 Materiales

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. LLC (st. Louis, MO): α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus*, almidón soluble, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), yoduro de acetiltiocolina (ATCI), 5,5'-ditiobis(2-ácido-nitrobenzoico) (DTNB), acarbosa y tacrina. Todos los reactivos químicos empleados son grado analítico.



2.2 Material vegetal y extracción del aceite esencial

La hoja fresca de canela (*C. zeylanicum*) (ovalada, lanceada y de verde intenso) se colectó de una zona de cultivo ubicada en el municipio de Cuetzalan, Puebla (20°02'02.4" N, 97°30'07.2" W), las cuales fueron identificadas taxonómicamente. El material vegetal (20 Kg) se deshidrató a temperatura ambiente y bajo sombra durante una semana. El fruto seco de pimienta negra (*P. nigrum*) (30 Kg) se adquirió en el

mercado del municipio de Cuetzalan, Puebla. El AE de cada especie se extrajo mediante destilación por arrastre de vapor (95-100 °C) utilizando un aparato de destilación de acero inoxidable con capacidad de 300 litros (Inoximexico™) durante 3 horas. Las muestras de AEs se deshidrataron con sulfato de sodio y se almacenaron en botellas de vidrio color ámbar a 4 °C.

2.3 Efecto inhibitorio *in vitro* sobre α -amilasa

La actividad inhibitoria se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La mezcla de reacción contenía 100 μ L de almidón soluble al 1 % (buffer de fosfato 0.1 M, pH 6.9), 100 μ L de AEs (en concentraciones de 0.1 a 10 mg/mL) y 100 μ L de α -amilasa (5.0 U/mL en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.9), se incubó a 20 °C durante 3 minutos. Después se agregaron 100 μ L de reactivo DNS y se llevó a ebullición durante 15 minutos. Finalmente se adicionó agua destilada filtrada para completar volúmenes de 1 mL y verter en las placas de 96 micropozos. La absorbancia de la mezcla resultante se determinó en un lector de microplacas de 96 pocillos (Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific) a 540 nm. Se prepararon dos mezclas (control

y blanco) empleando disolvente etanol y buffer de fosfatos respectivamente en lugar del inhibidor. El fármaco acarbosa se empleó como control positivo (0.5 – 6.5 mg/mL). El porcentaje de inhibición (%) de la muestra se calculó mediante la ecuación (1):

$$\text{Inhibición (\%)} = \left\{ \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

donde A_{muestra} es la absorbancia de la muestra que contiene el AEs y A_{control} es la absorbancia de la mezcla control. Se determinó la concentración del AEs para una inhibición del 50% de actividad enzimática (CI_{50}). Todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n = 4$) y se analizaron estadísticamente con el software MINITAB 19.

2.4 Efecto inhibitorio *in vitro* sobre acetilcolinesterasa

La actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa se determinó con el método de Ellman con ligeras modificaciones (Ellman et al., 1961). La mezcla de reacción con 275 μ L de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 8.0), 50 μ L de AEs (en concentraciones de 0.1 a 10 mg/mL), 50 μ L de ACTI (0.5 M) y 25 μ L de enzima acetilcolinesterasa (0.5 U/mL, en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 8.0) se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Después, se adicionaron 100 μ L de reactivo de Ellman (DTNB, 2.52 mM).

La absorbancia de la mezcla resultante se leyó a 412 nm en un lector de microplacas (Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific). Se prepararon dos mezclas (control y blanco) empleando el disolvente etanol y buffer de fosfatos respectivamente en lugar del inhibidor. El fármaco tacrina se empleó como control positivo (1.0 – 0.001 mg/mL). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición (%) de la muestra se calculó mediante la ecuación (1).



3

Resultados y discusión

3.1 Rendimiento del AE del material vegetal

Los materiales vegetales sometidos a destilación al vapor dieron AEs de color amarillo pálido con 28.66 g (0.36%, p/p) para AE de hoja de canela y 164.56 g (0.55%, p/p) de AE de pimienta negra.

3.2 Inhibición *in vitro* sobre α -amilasa

El potencial antidiabético de los AEs se muestra en la Tabla 1 mediante la inhibición de la enzima α -amilasa obteniendo su valor de CI_{50} a diferentes concentraciones (0.1 – 10.0 mg/mL) de cada AE. Los resultados se compararon con el fármaco acarbosa (inhibidor de α -amilasa). Ambos AEs (hoja de canela y fruto seco de pimienta negra) mostraron actividad inhibitoria similar sobre α -amilasa con valores de $CI_{50} = 1.8$ y 1.2 mg/mL, respectivamente. La composición química de estos aceites esenciales se caracteriza por su contenido de terpenoides de tipo oxigenado y fenilpropanoides, los cuales no interactúan con los azúcares reductores generados durante la reacción enzimática lo que corrobora el efecto inhibitorio enzimático.

Estos datos concuerdan con lo reportado por Sri-ramavaratharajan y Murugan, (2018), quienes observaron el potencial antidiabético del aceite esencial de las hojas de *Cinnamomum wightii* sobre enzimas digestivas reduciendo la liberación de glucosa con una CI_{50} respecto a α -amilasa de 1.26 mg/mL. Por su parte, Oboh y col., (2013) reportaron la actividad inhibitoria dosis-dependiente del AE de pimienta negra sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa relacionadas con DM2. Por tanto, los AEs de estas dos especies *Cinnamomum* y *Piper* presentan potencial antidiabético al inhibir la enzima α -amilasa.

Tabla 1. Efecto inhibitorio de AEs de *C. zeylanicum* y *P. nigrum* sobre α -amilasa y acetilcolinesterasa.

Aceite esencial	α -Amilasa CI_{50} (mg/mL) [†]	Acetilcolinesterasa CI_{50} (mg/mL)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	1.8 ± 0.01 ^b	0.57 ± 0.37 ^b
<i>Piper nigrum</i>	1.2 ± 0.12 ^a	21.4 ± 0.65 ^c
acarbosa	1.55 ± 0.02 ^{ab}	---
tacrina	---	0.011 ± 0.13 ^a

[†] Los valores están expresados como la media ± SD. Los valores seguidos de letras iguales en la misma columna no difieren significativamente entre sí (ANOVA, $p < 0.05$, Tukey's Test).

3.3 Inhibición *in vitro* sobre acetilcolinesterasa

Se evaluó el potencial neuroprotector de los AEs sobre AChE y se comparó con tacrina como control positivo (Tabla 1). Se evaluaron concentraciones de 0.1 a 25 mg/mL observando que el AE de la hoja de canela presentó buen efecto inhibitorio con CI_{50} de 0.57 mg/mL, siendo un valor similar con respecto a tacrina ($CI_{50} = 0.011$ mg/mL). Por su parte, el AE del fruto seco de pimienta negra no mostró actividad significativa con CI_{50} de 21.4 mg/mL. Aumeeruddy-Elalfi y col., (2018) reportaron el efecto inhibitorio del AE de corteza de *C. zeylanicum* sobre AChE con CI_{50} de 16 μ g/

mL. Por su parte, Xiang y col., (2017) evaluaron la actividad de los AEs de 16 especies del género *Piper* sp. sobre la AChE con valores de CI_{50} de 1.51 a 13.9 mg/mL. Estos datos son similares con lo reportado en este trabajo, sugiriendo que los componentes mayoritarios de los AE de hoja de canela (fenilpropanoide y terpenoides) y del fruto seco de pimienta negra (terpenoides) tienen un efecto significativo en la actividad biológica relacionadas con la DM2 y salud mental, siendo de interés para futuros estudios farmacológicos como alternativas de la medicina tradicional.

4

Conclusiones

Los AEs presentan una alternativa en el tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la inhibición de blancos terapéuticos y con esto, reducir los niveles de glucosa postprandial manteniendo los niveles de acetilcolina. El AE del fruto seco de pimienta negra (*P. nigrum*) mostró actividad antidiabética al inhibir la enzima α -amilasa mientras que, el AE de la hoja de canela (*C. zeylanicum*) presentó mejor actividad biológica al inhibir las enzimas α -amilasa y acetilcolinesterasa con valores similares a los fármacos comerciales.



5

Agradecimientos

A la Secretaría de Investigación y Posgrado-IPN (20240224, 20242920) y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAH-CyT) (CF-2023-I-2072) por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Ameeruddy-Elalfi Z, Lall N, Fibrich B, Blom van Staden A, Hosenally M, Fawzi M (2018) Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties *in vitro*. *J. Food Drug Anal.* 26:232-243.
- Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, Rafatullah M, Ganash M, Kamal MA, Ashraf GM. (2018) Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. *Curr. Drug Metab.* 19(13):1100-1110.
- Alves-Silva MJ, Zuzarte M, Girao H, Salgueiro L (2021) The role of essential oils and their main compounds in the management of cardiovascular disease risk factors. *Molecules.* 26:3506.
- Agatonovic-Kustrin S, Kustrin E, Morton WD (2019) Essential oils and functional herbs for healthy aging. *Neural. Regen. Res.* 14:441-445.
- Barragán Torres VA, García Prada LM, Mateus Dueñez LM, Mateus Mateus LC, Rodríguez Sanabria FR (2017) Aceites esenciales, obesidad y diabetes tipo 2. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 46:289-302. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n3.69459>
- Ciudin A (2016) Diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad de Alzheimer: una relación para no olvidar. *Endocrinol. Nutr.* 63:191-193.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, and Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric termination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.
- Gan L, Cookson MR, Petrucelli L, La Spada AR. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat Neurosci.* 2018 Oct;21(10):1300-1309.
- González GR, Dávila HA, Santana PJA (2015) Visión panorámica de las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Int. Acupuntura* 9:57-69.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Comunicado de prensa num 600/22 Estadísticas de defunciones registradas 2021. México: INEGI, disponible en https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/EDR/EDR2021_10.pdf
- Instituto Nacional de Geriátría (2024) Plan nacional de Demencia 2024. Secretaría de Salud, México.
- Majidazar R, Rezazadeh-Gavgani E, Sadigh-Eteghad S, Naseri A (2022) Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: an overview of systematic reviews. *E. J. Clin. Pharmacol.* 78:1567-1587. <https://doi.org/10.1007/s00228-022-03363-6>
- Masyita A, Mustika Sari R, Dwi Astuti A, Yasir B, Rahma Rumata N, Emran TB, Nainu F, Simal-Gandara J. (2022) Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chem X.* 13:100217.
- Mohamed AA, Alotaibi BM (2023) Essential oils some medicinal plants and their biological activities: a mini review. *J. Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci.* 9:40-49. <https://doi.org/10.1007/s43994-022-00018-1>
- Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TKO, Nguyen TTD, Giau VV (2020) Type 3 diabetes and its role implications in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3165.
- Michailidis M, Tata AD, Moraitou D, Kavvas D, Karachrysafi S, Papamitsou T, Vareltzis P, Papaliagkas V (2022) Antidiabetic drugs in the treatment of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 23:4641.
- Oboh G, Ademosun AO, Odubanjo OV, Akinbola IA (2013) Antioxidative properties and inhibition of key enzymes relevant to type-2 diabetes and hypertension by essential oils from black pepper. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013:926047.
- Organización Mundial de la Salud (2024) Fact sheets: Dementia. Recuperado el 20 de octubre de <https://www.who.int/news/factsheets/detail/dementia>
- Panyajai P, Viriyaadhmaa N, Tima S, Chiampanichayakul S, Dejkriengkraikul P, Okonogi S, Anuchapreeda S (2024) Anticancer activity of Curcuma aeruginosa essential oil and its nano-formulations: cytotoxicity, apoptosis and cell migration effects. *BMC Complement. Med. Ther.* 24:16. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04261-9>
- Sriramavaratharajan V, Murugan R (2018) Screening of chemical composition, *in vitro* antioxidant, α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of the leaf essential oils of *Cinnamomum wightii* from different populations. *Nat. Prod. Commun.* 13:1539-1542.
- Xiang CP, Han JX, Li XC, Li YH, Zhang Y, Chen L, Qu Y, Hao CY, Li HZ, Yang, CR, Zhao, SJ, Xu M. (2017) Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils from *Piper* species. *J. Agric. Food Chem.* 65:3702-3710.
- Zhao DD, Jiang LL, Li HY, Yan PF, Zhang YL. (2016) Chemical components and pharmacological activities of terpene natural products from the genus *Paeonia*. *Molecules.* 21:1362.