

V. Los antioxidantes de los alimentos

MANUEL ORTEGA MATA

Académico de Número

1. INTRODUCCIÓN

La relación evidente entre el estrés oxidativo y numerosas patologías en el organismo humano, justifica el que se preste la máxima atención a los antioxidantes que, de forma natural, se pueden encontrar en los alimentos, con objeto de poder establecer las normas de consumo adecuadas, orientadas en su aspecto preventivo.

El trabajo se ha centrado de manera preferente en los antioxidantes derivados de compuestos fenólicos, cuyas actividades pueden ser cuantificadas haciendo uso de variados sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*, entre los que se destaca el que nos mide la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL).

Los polifenoles presentes en el aceite de oliva se estudian en primer lugar, por la implicación que tiene en la denominada **dieta mediterránea** siguiendo a continuación el grupo de verduras y legumbres. Otro capítulo está dedicado a las frutas con una especial atención a los pomelos, por presentar compuestos con actividades inhibitorias para enzimas de la familia de los citocromos p450, involucrados en el metabolismo de los medicamentos, así como frente a las glicoproteínas responsables de la resistencia de las células tumorales a los medicamentos quimioterápicos.

El siguiente capítulo lo ocupa las bebidas alcohólicas, en especial los vinos, cuyo contenido en polifenoles antioxidantes son los responsables al parecer, de lo que ha venido en denominarse **paradoja francesa**.

A las infusiones de té en sus distintas variedades se dedica otro capítulo, en el que se trata de establecer las posibles relaciones entre los compuestos antioxidantes que contienen y las demostradas actividades antimutagénicas.

El capítulo final es una breve descripción de la importancia para la industria alimentaria de la utilización de antioxidantes naturales en los procesos de manipulación y conservación de los alimentos.

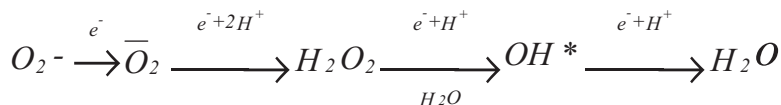
* * *

En el momento actual, nadie duda que procesos incluidos en el área de la toxicología están afectando a nuestra vida diaria. Por citar sólo tres, nos fijaríamos en la calidad del agua, del aire y los componentes de los alimentos, en este último caso actuando positiva o negativamente en la salud humana. Una cuestión crítica al estudiar dichos procesos, es la de establecer con toda claridad los mecanismos que los regulan, lo que nos permitirá actuar positivamente en su control.

Procesos metabólicos en nuestro organismo humano pueden conducir a la formación de los denominados **radicales libres**, de los cuales pueden derivarse consecuencias de índole toxicológico potencialmente negativas, que podrían resumirse en las siguientes: a) uniones covalentes a macromoléculas celulares, b) escisión de las cadenas de ADN, c) generación de radicales oxígeno, y d) procesos de peroxidación lipídica.

Nuestro interés quedará circunscrito a los dos últimos aspectos que representaremos esquemáticamente.

Los radicales oxígeno se van a producir a partir del oxígeno molecular por sucesivos procesos de reducción monoeléctronica, con formación de radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.



El radical hidroxilo (OH*) es una especie química extremadamente reactiva que protagoniza procesos tanto de adición como de sustracción

con las moléculas constituyentes de los sistemas biológicos, lo que puede llevar consigo la alteración del equilibrio prooxidante/antioxidante que se desplaza hacia estados más oxidados. Ello puede afectar a cofactores enzimáticos, a proteínas y a los ácidos nucleicos, lo que tendrá su reflejo en alteraciones fisiológicas de índole diversa.

Está demostrado que numerosos productos químicos ejercen su acción tóxica en nuestro organismo por esta vía de producción de radicales oxígeno, y por citar algunos nos fijaremos en medicamentos del tipo de la nitrofurantoina, doxorubicina, dietil-estilbestrol, metronidazol, bleomicina, etc.

La peroxidación lipídica tiene también su explicación precisamente en la intervención de los radicales libres quienes, en presencia de oxígeno, pueden sustraer un átomo de hidrógeno de una molécula lipídica lo que conduce a la formación de hidroperóxidos lipídicos, de especial significación en la alteración de las membranas celulares, además de producir otros productos de degradación potencialmente tóxicos del tipo del dialdehído malónico.

De la producción de los radicales libres en los sistemas biológicos no sólo hay que responsabilizar a determinados xenobióticos, a los que antes hemos hecho referencia, sino que también son el resultado de procesos endógenos y como consecuencia de la reactividad de estos radicales libres son numerosas las patologías asociadas a los mismos, como por ejemplo determinados procesos cancerosos, inflamatorios, cardiopatías isquémicas, enfermedades neurodegenerativas, etc. También se postula, con el apoyo de datos experimentales, que la continuada producción endógena de los radicales, tiene un papel relevante en los procesos de envejecimiento (1).

Para contrarrestar los efectos nocivos de esta producción de radicales durante las funciones fisiológicas normales de nuestro organismo, se establecen en el mismo los correspondientes sistemas de defensa constituidos por los enzimas superóxido dismutasa, catalasas, glutatión peroxidasa, glutatión reductasas y el complejo de enzimas reparadoras de ADN.

A este sistema enzimático hay que añadir otra serie de moléculas antioxidantes entre las que se incluyen muy especialmente las proceden-

tes de nuestra alimentación como son: el α -tocoferol (vitamina E) el ácido ascórbico (vitamina C) el β -caroteno y ese complejo mundo de los flavonoides. El estudio de estos últimos junto a otros componentes fenólicos de las plantas constituye en la actualidad uno de los temas de investigación más candentes por los prometedores resultados, no sólo en lo relativo a sus actividades antioxidantes, sino también por sus otros efectos biológicos como la inhibición de la agregación plaquetaria, su acción antimicrobiana, su efecto antiinflamatorio y sus, ya más conocidos, efectos protectores en las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad cancerosa.

No es de extrañar pues que Harbone (2) en una publicación de 1988, manifieste que en las plantas vasculares han sido identificados más de 4.000 flavonoides, y que el interés por su estudio se ponga de manifiesto con sólo consultar las bases de datos y comprobar que en el Chemical Abstracts y bajo el epígrafe de flavonoides y polifenoles había ya en 1994 cerca del millar de citas bibliográficas.

Químicamente los citados flavonoides son unos derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados del 2 fenil benzo [α] pirano, constituyendo las seis clases de compuestos en que se subdividen: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavanos y antocianinas.

También se encuentran en los alimentos otros compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, y que en muchos casos aparecerán esterificando a los flavonoides, pero que no tienen la estructura del anillo del 2 fenil benzo [α] pirano.

2. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CLÍNICOS

Tres ensayos clínicos usando suplementos nutritivos tenían como objetivo final el estudio de la prevención del cáncer de pulmón.

En 1994 se publicaron los resultados de α -tocoferol y β -caroteno con la intervención de unos 29.000 hombres fumadores en Finlandia. Consistía en un suplemento diario de 20 mg de β -caroteno, o de 50 mg de Vitamina E o ambos, durante 6 años. A otro grupo se le suministraba un placebo. En este período de tiempo ocurrirán 876 nuevos casos de

cáncer de pulmón, con el inesperado resultado que la incidencia era un 18% más alta entre los que tomaban el suplemento de β -caroteno, e igualmente en lo referente a la mortalidad, que era un 8% superior en este último grupo. Para los otros grupos no había diferencias (3).

Otro estudio el PHS (Physicians' Health Study) (4) con 22.000 médicos de USA que recibieron al azar o 50 mg de β -caroteno en días alternos o placebo, durante unos 12 años, con una incidencia de 170 nuevos casos de cáncer de pulmón, 82 en el grupo suplementado con β -caroteno y 88 con placebo, diferencia que no es significativa. Tampoco se encontraba diferencia cuando se distinguía fumadores y no fumadores.

Un nuevo estudio el CARET (Carotene and Retino Efficacy Trial) (5) con 18.000 hombres y mujeres de alto riesgo, por ser fumadores o trabajadores con asbesto. Después de una media de 4 años con un suplemento diario de 30 mg de β -caroteno y 25.000 UI de retinol, el ensayo fue suspendido 21 meses antes de lo programado a causa de los resultados observados, al producirse 338 nuevos casos de cáncer, con un riesgo relativo para los individuos que recibían suplemento de 1,28. Al darse el suplemento en combinación, no se pudo establecer la influencia en los resultados achacables al β -caroteno o al retinol.

En otro estudio que comenzó en 1992 con 40.000 mujeres (Rower, 1996) se suprimió el suplemento de β -caroteno al conocerse los resultados con CARET y PHS.

Vistos en conjunto los resultados de los ensayos, parece evidente que los suplementos de β -caroteno, α -tocoferol y retinol no constituyen ningún beneficio preventivo, al menos para la incidencia del cáncer de pulmón, sino más bien lo contrario, especialmente en el β -caroteno cuando se trata de fumadores.

No resulta fácil explicar estos efectos adversos, sobre todo si se tiene en cuenta que la ingestión diaria de 150 a 300 mg de β -caroteno han sido perfectamente tolerados por más de quince años, para controlar los síntomas que caracterizan a la enfermedad de origen genético la protoporfiria eritropoyética.

Sin embargo, en el estudio ATBCCPS (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group) se pudo constatar que tras los

varios años de la ingestión suplementaria de β -caroteno, su concentración media en suero pasó de 0,18 mg a 3 mg por litro. Si además tenemos en cuenta lo ya conocido sobre la transformación en el organismo humano del β -caroteno a vitamina A (retinol) ello nos llevaría a que la concentración en el suero de los retinoides se vería incrementada, de manera muy especial en los grandes fumadores, lo que podría enlazar con los resultados de las experiencias en animales, que ponen de manifiesto que altas concentraciones de retinoides pueden promover más que prevenir el desarrollo del cáncer de pulmón (6).

El problema se complica todavía más pues en una revisión de los resultados, los autores del estudio llegan a la conclusión de que el aumento en la incidencia del cáncer de pulmón se produce únicamente en aquellos individuos de la cohorte que eran a la vez, grandes fumadores y grandes consumidores de alcohol. En otras palabras, que en los fumadores que no eran bebedores el suplemento de β -caroteno no incrementaba la incidencia del cancer de pulmón, aunque tampoco tenía efectos preventivos.

Pese a lo poco alentador de los resultados anteriores y tomando como antecedente el trabajo realizado en China por Blot (7) según el cual **se demostraba la eficacia de una suplementación nutricional con β -caroteno, vitamina E y selenio sobre la mortalidad total y por cáncer (especialmente carcinoma de esófago) en una población deficiente**, Vázquez (8) nos presenta el programa SUVIMAX (Suplementación con Vitaminas y Minerales Antioxidantes), para evaluar la efectividad frente al placebo, de una combinación de vitamina C, α -tocoferol, β -caroteno y minerales antioxidantes (selenio y zinc) sobre la morbimortalidad por cáncer y cardiopatía isquémica en la población general.

Como objetivos secundarios, no menos importantes que los anteriores, buscan conocer de qué manera influyen dichos suplementos en la incidencia de infecciones, cataratas, bienestar subjetivo y la utilización que hacen los participantes de los recursos sanitarios.

El trabajo tiene su origen en Francia, habiéndose adherido al mismo dentro de España, Cataluña en noviembre de 1997

La cohorte definitiva está constituida por 12.749 personas, de las cuales 7.679 son mujeres (de 35 a 60 años) y 5.056 hombres (de 45 a

60 años). De ellos, el 50% reciben una cápsula que contiene 6 mg de β -caroteno, 30 mg de vitamina E, 120 mg de vitamina C, 20 mg de zinc en forma de gluconato y 100 μ g de selenio. El otro 50% por el contrario, recibe un placebo.

Al no aportarse datos experimentales no es posible hacer ningún comentario, y nos limitamos a reflejar la conclusión que figura en el trabajo: *la envergadura del tamaño muestral, la estructura general del estudio y la magnitud de datos clínicos, biológicos, psicológicos, sociológicos y alimentarios que un seguimiento tan completo proporcionará contribuirán a aumentar los conocimientos científicos en muy diversas áreas y permitirán, con toda probabilidad, dar una respuesta sólida a los interrogantes actuales sobre los antioxidantes.*

3. MÉTODOS ANALÍTICOS RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD OXIDANTE Y LA ANTIOXIDANTE

A la hora de interpretar las conclusiones de cualquier trabajo de investigación, es evidente que en lo primero que debe uno fijarse es en las pruebas analíticas realizadas, lo que nos permitirá enjuiciar con criterio científico la aceptabilidad de tales conclusiones.

En el caso del tema que nos ocupa, se dispone en la actualidad de toda una serie de métodos analíticos que correctamente realizados, nos permiten conocer con toda precisión los dos aspectos fundamentales, la actividad oxidante de un determinado compuesto o, por el contrario, las actividades antioxidantes.

Ya conocemos a lo que conduce el daño oxidativo, por lo tanto los métodos analíticos nos tienen que permitir con precisión y exactitud, no sólo identificar la presencia de los compuestos resultantes sino también su valoración cuantitativa.

Es decir que si queremos conocer la existencia de un proceso de peroxidación en los lípidos de las membranas celulares, deberemos disponer de técnicas analíticas que nos permitan identificar los hidroperóxidos de fosfatidilcolina y de fosfatidiletanolamina. Y lo mismo si se trata de determinar los compuestos aldehídicos resultantes igualmente de dicha oxidación lipídica.

Para la valoración de las actividades antioxidantes se dispondrá de un sistema en el que se provoca la oxidación, en presencia o en ausencia de los compuestos a los que se les supone una acción protectora frente a la oxidación.

Resumiremos brevemente algunas de las técnicas más usadas en la actualidad.

Para el caso de la identificación y valoración cuantitativa de los hidroperóxidos de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, Suzuki y col. (9) hacen uso de un equipo de HPLC, que incorpora un detector de quimioluminiscencia. El paso previo de la extracción de los lípidos en las muestras problemas (por ejemplo membranas celulares), es de la máxima importancia, lo que puede efectuarse utilizando como solvente una mezcla de cloroformo y metanol, en la proporción de 2:1 v/v.

Los aldehidos, igualmente resultantes de los procesos oxidativos en los compuestos lipídicos, se valoran por técnicas espectrofotométricas usando como reactivo el ácido tiobarbitúrico, y expresando el resultado como un número que representa al conjunto de sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o como nanomoles de dialdehido malónico.

Para la determinación de la actividad antioxidante, como la que puede corresponder a los componentes de los alimentos, uno de los sistemas que se utiliza, es el que nos permite seguir paso a paso el proceso de oxidación de la lipoproteína sérica de baja densidad (LDL). Para ello (10) 0,1 mM de LDL se incubaba a 37° C en una solución salina de fosfatos, añadiendo para iniciar la oxidación 1,6 mM de SO₄Cu. La formación de los dienos conjugados, producto de la oxidación lipídica, es seguida a intervalos de 4 minutos, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro equipado con un termostato donde van alojadas las cubetas.

Cuando el proceso se verifica en presencia de los productos problemas, zumos, extractos de verduras, bebidas alcohólicas, etc., la actividad antioxidante puede conducir a la anulación del proceso de oxidación, a la amortiguación del mismo y también al alargamiento del periodo de tiempo transcurrido hasta que se inicia la oxidación.

Una variante de esta técnica es la que utiliza cloruro cúprico ($5 \mu\text{M}$) y tras la incubación a 37°C por 1 a 4 horas, se valoran los aldehídos formados en la oxidación de la LDL con el reactivo de ácido tiobarbitúrico, y tras los pasos sucesivos de incubación en baño maría por 30 minutos, y posterior centrifugación a 1.500 g durante 15 minutos, se mide la absorbancia de los sobrenadantes en un espectrofotómetro a 532 nm . Estos valores de absorbancia representan a los que hemos denominados TBA-RS.

Cuando los ensayos se verifican en presencia de los supuestos antioxidantes, es evidente que al menor número de TBA-RS, mayor será la actividad antioxidante del problema. También es frecuente representar dicha actividad por la IC_{50} , que no es más que la concentración del producto problema que es necesaria para inhibir en un 50% la oxidación de la LDL.

Otro sistema muy empleado, es aquel que hace un seguimiento de la oxidación de fosfolípidos, incorporados en liposomas multilamelares (11) que fueron preparados con los extractos problemas, o simplemente agua destilada para el ensayo control. A los liposomas así preparados, se le añaden $5 \mu\text{M}$ de $\text{SO}_4 \text{Fe}$ y se incuban a 25°C . A intervalos de tiempo convenientes, entre 0 y 36 horas, se determina la concentración de aldehídos formados, con el reactivo del ácido tiobarbitúrico. Los valores de la absorbancia representarían los número de TBA-RS, como muestra la figura 1

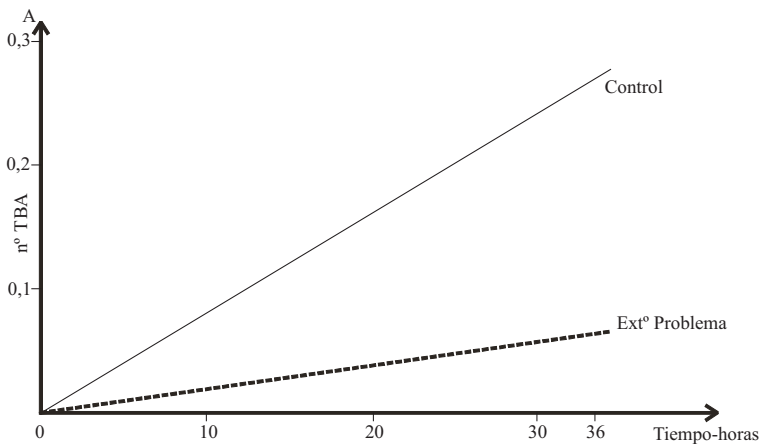


Figura 1.

Otro método ya clásico, es el que hace uso de la autooxidación térmica del β -caroteno (0,2 mg/litro en cloroformo) en un matraz de fondo redondo que contiene 0,02 ml de ácido linoleico, 0,2 ml de Tween 20 y 0,2 ml de metanol al 80%, todo lo cual constituirá el sistema control.

Idéntica preparación llevan los sistemas problemas con la única variante que los 0,2 ml de metanol se sustituyen por los extractos de los alimentos, cuya actividad antioxidante se pretende valorar.

Tras la evaporación a sequedad del contenido de los matraces, bajo vacío, se añade a cada uno 50 ml de agua destilada convenientemente oxigenada, agitando la mezcla para formar una suspensión tipo liposoma, las cuales se someten a una autooxidación térmica a 50° C por 2 horas. Durante este tiempo se hace un registro de la absorbancia de las suspensiones con un espectrofotómetro, a 470 nm, a intervalos de 10 minutos.

La representación gráfica de dichos valores nos permitirá conocer la velocidad de degradación del β -caroteno en ausencia [Vd(c)] y en presencia de los antioxidantes [Vd(p)]. Numéricamente se expresa la actividad antioxidante como el % de inhibición de la autooxidación en relación con el control.

$$AA\% = \frac{V_{d(c)} - V_{d(p)}}{V_{d(c)}} \times 100$$

En ocasiones (12) suele también representarse como un coeficiente de actividad antioxidante (CAA) por la fórmula:

$$CAA = \frac{A_{p(120)} - A_{c(120)}}{A_{c(0)} - A_{c(120)}} \times 1000$$

Donde:

$A_{p(120)}$ = absorbancia del sistema con antioxidantes a los 120 minutos

$A_{c(120)}$ = absorbancia del sistema control a los 120 minutos

$A_{c(0)}$ = absorbancia del sistema control a los 0 minutos

4. ACEITE DE OLIVA

La bien fundada hipótesis sobre los efectos beneficiosos que la denominada **dieta mediterránea** tiene en la salud humana, son atribuidos a que en la misma encontramos como uno de sus principales componentes el aceite de oliva. Ello significa la ingestión de grasas insaturadas en virtud de la alta proporción de monoinsaturados presentes en el aceite de oliva.

Con ser importante este hecho, no podemos en el momento actual dejar de significar el papel que otros componentes de la dieta pueden estar jugando en dicho efecto beneficioso, avalado todo ello por datos experimentales. Citemos entre ellos, la fibra alimentaria, las vitaminas y muy especialmente los flavonoides y demás componentes fenólicos.

Dado que estos últimos compuestos están presentes en el aceite de oliva, la elección de uno determinado rico en fenoles, contribuirá como preventivo en aquellas personas con riesgo de desarrollar enfermedad coronaria.

La concentración de compuestos fenólicos en un aceite de oliva es el resultado de la interacción de varios factores, destacando principalmente la variedad de la aceituna, su grado de maduración y las características climáticas de su cultivo. Los valores que se ven citados en la bibliografía sitúan su concentración alrededor de 1 g/kg, con gran variabilidad en dichos datos, debido especialmente a que para dicha valoración de compuestos fenólicos totales se recurre al empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu que, como es sabido, no es específico de fenoles.

Sin embargo, si se recurre al análisis instrumental con el empleo del HPLC, el cromatograma nos permite identificar no menos de once compuestos distintos (13): ácido gálico, hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríntrico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, un isómero de la oleuropeína, un dialdehído del ácido elenólico unido al hidroxitirosol, un dialdehído del ácido elenólico unido al tirosol y el ácido cinámico.

La arteriosclerosis es una enfermedad multifactorial y está reconocida como la primordial causa de muerte en el mundo. Un factor de

riesgo, como se sabe, es la existencia en la sangre circulante de un nivel elevado de la lipoproteína de baja densidad (LDL), pues la evidencia clínica parece coincidir en que la forma oxidada de esta lipoproteína (LDL_{ox}) es un componente esencial de las placas arteroscleróticas. Todo aquello que evite dicha oxidación contribuirá, como ya hemos indicado, a la prevención de una enfermedad coronaria.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de oliva está demostrada experimentalmente (14) en especial para el caso del hidroxitirosol y la oleuropeína, quienes inhiben la oxidación inducida por sulfato de cobre de la LDL, a concentraciones tan bajas como 10^{-6} M, conclusión a la que se llega por la valoración en el sistema experimental de las TBARS y de los correspondientes hidroperóxidos lipídicos.

Ensayos *in vivo* parecen confirmar el papel de los antioxidantes del aceite de oliva por la mayor resistencia a la oxidación de las LDL de conejos alimentados con aceite de oliva, en comparación con otro grupo alimentado con una preparación de triglicéridos que contiene una cantidad equivalente de ácido oleico (15).

Las concentraciones de estos compuestos antioxidantes en el aceite de oliva van a depender del proceso de elaboración, y se sabe, por ejemplo, que aquellos aceites obtenidos por centrifugación tiene contenidos más bajos de compuestos fenólicos al haber sido extraídos por las aguas calientes usadas en el proceso (16) de donde se deberían recuperar por el gran interés de dichos productos.

Es fácil de entender que los citados compuestos fenólicos contribuirán en la estabilidad frente a la oxidación de los propios aceites, hecho comprobado en la mayor estabilidad a la autooxidación del aceite de oliva virgen, rico en compuestos fenólicos. Resulta pues de interés, dada la complejidad de los compuestos fenólicos presentes en el aceite, el tratar de determinar la contribución de cada uno de aquellos en el citado proceso.

Gennaro y colaboradores (17) plantean la experiencia mediante el uso de un análisis termogravimétrico de las muestras de aceites, a los cuales se le adicionan los diferentes compuestos fenólicos en cantidades conocidas.

El fundamento de la técnica está en que en una termobalanza puede seguirse la variación en el peso de la muestra al aumentar la temperatura, de acuerdo con el programa de calentamiento. Lo que observaremos en un termograma tipo, será una ligera pérdida de peso por evaporación del solvente, y posteriormente, en el momento que se inicie la oxidación, un aumento de peso debido, precisamente, a la reacción de la muestra con el oxígeno durante dicho proceso.

Los datos numéricos que nos van a permitir valorar la resistencia a la oxidación serán: la temperatura en que se inicia el aumento de peso (T_i) y la temperatura en que la ganancia en peso es máxima (T_f). Con estos datos se calcula el % de ganancia en peso así:

$$\Delta\% = \frac{T_f - T_i}{T_i} \times 100$$

A título de ejemplo, reseñaremos los datos que figuran en dicho trabajo (17) para dos muestras de aceite:

Aceite de oliva pobre en fenoles (47,2 mg/kg):

$$T_i = 152,1^\circ\text{C} \quad T_f = 169,4^\circ\text{C} \quad \Delta\% = 0,22$$

Aceite de oliva extra virgen (139.5 mg/Kg):

$$T_i = 161,2^\circ\text{C} \quad T_f = 173,0^\circ\text{C} \quad \Delta\% = 0,12$$

En ellos puede observarse, como era de esperar, una mayor T_i para el aceite de oliva virgen, representativo de su mayor resistencia a la oxidación y un menor $\Delta\%$ igualmente demostrativo de la mayor resistencia a la autooxidación.

Los ensayos con la adición de los compuestos fenólicos permitieron comprobar el efecto protector de la oleuropeína, y del hidroxitirosol, caracterizados químicamente por ser compuestos difenólicos en posición orto, y la nula actividad de, por ejemplo, el tirosol y el ácido cafeico. Todo ello demostrativo de la estrecha relación entre estructura química y actividad antioxidante de los polifenoles.

A la vista de estos resultados es necesario insistir en el interés que puede tener la recuperación de estos polifenoles de las aguas residuales

de la elaboración de los aceites de oliva, precisamente ante la gran demanda de antioxidantes naturales por la industria alimentaria.

5. VERDURAS Y LEGUMBRES

Hay unos datos que se remontan a 1971, según los cuales la ingestión diaria de flavonoides en la dieta de los habitantes de los Estados Unidos era de 1 g, expresados en quercetina.

Sin embargo, estudios posteriores con técnicas analíticas más refinadas reducían esta cifra a 12,9 mg (18) y en otro estudio sobre la dieta en Holanda, en la que analizaban el contenido de cinco flavonoides concretos (quercetina, kaempferol, miricetina, luteolina y apigenina) la cifra media diaria del conjunto de ellos era de 23 mg (19).

Es evidente el papel importante que en la cantidad y calidad antioxidante de los compuestos fenólicos totales de nuestra dieta tendrán las verduras y legumbres, por su participación mayoritaria en la misma.

Hay un trabajo que puede servirnos de referencia para nuestra dieta, en el que se estudia el contenido en compuestos fenólicos totales de una serie de verduras y legumbres, y teniendo en cuenta el consumo medio en la dieta de estos componentes en Estados Unidos, llegan a la conclusión de que los compuestos fenólicos ingeridos diariamente a través de ellos era de 218 mg, expresados en este caso en equivalentes a catequina (20).

Las muestras obtenidas de los supermercados convenientemente tratadas, les permite determinar los compuestos fenólicos totales en las muestras en su estado natural, y tras la desecación de las mismas. Igualmente la técnica de extracción les permite conocer los compuestos fenólicos libres, y conocido el total de ellos establecer el % de dichos compuestos conjugados.

A título de ejemplo, y ordenados en función de su contenido en compuestos fenólicos totales para el producto en su estado natural, tenemos los siguientes valores:

LOS ANTIOXIDANTES DE LOS ALIMENTOS

| | <i>Compuestos fenólicos totales</i> <i>μmol/g</i> |
|----------------------|--|
| Acelgas | 53,4 ± 7,6 |
| Cebolla (roja) | 41,0 ± 9,9 |
| Broccoli | 40,6 ± 22,3 |
| Espárragos | 40,2 ± 13,3 |
| Judías (arriñonadas) | 35,9 ± 8,2 |
| Ajos | 34,3 ± 11,0 |
| Judías (pintas) | 31,9 ± 5,7 |
| Espinacas | 27,6 ± 13,4 |
| Pimienta | 26,1 ± 6,0 |
| Cebolla (amarilla) | 22,9 ± 1,4 |
| Setas | 22,5 ± 3,7 |
| Coliflor | 20,9 ± 8,8 |

Con valores inferiores le siguen los cereales, las coles, el tomate, la lechuga, el pepino, la zanahoria, la batata, el apio y la patata.

Una forma de establecer la calidad del poder antioxidante de estos productos, es a través de la determinación del valor de IC_{50} , que representa como sabemos la concentración de fenoles en los correspondientes extractos que son capaces de inhibir el 50% de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL + VLDL). Un valor bajo de IC_{50} nos estará indicando un mayor poder antioxidante y así han encontrado que la cebolla (amarilla) con IC_{50} de 0,20 μM se situaría en primer lugar, y la patata con 0,25 μM en segundo lugar en cuanto a calidad, aunque el contenido en compuestos fenólicos era muy bajo. Valores mayores del IC_{50} tienen ya los espárragos (0,28 μM), la cebolla roja (0,38 μM), el tomate (0,39 μM), el ajo (0,41 μM), judías (0,58 μM), zanahoria (0,69 μM), etc.

Es interesante señalar que estos valores del IC_{50} son comparables con los que tienen flavonoides puros del tipo de la quercetina (0,224 μM) o la rutina (0,512 μM), y mejores que los de la vitamina C (1,45 μM), la vitamina E (2,40 μM) o el β -caroteno (4,30 μM).

Para profundizar más en la calidad de los antioxidantes los autores recurren a los ensayos efectuados en un trabajo anterior (27) en el que

utilizan lo que denominan un modelo *in vitro* de oxidación para las enfermedades cardiacas.

En esquema, el plasma humano al que se le añade los flavonoides en solución acuosa o metanólica, a concentraciones de 50, 100 y 200 μM , se incuba a 37° C durante una hora. Una muestra de plasma sólo con el solvente servirá de control.

Finalizada la incubación se procede a la extracción de las lipoproteínas LDL y VLDL, que se someten a oxidación por SO_4Cu , siguiendo el curso de la misma a 37° C mediante la medida de la absorbancia a 234 nm que nos registra la formación de dienos conjugados productos de la oxidación. Con estos datos, se puede determinar gráficamente el tiempo de latencia antes del inicio de la oxidación. Con ello se busca conocer la capacidad de enlace de los flavonoides a las LDL y VLDL, lo que puede ser indicativo de la posible acción protectora que pueden tener *in vivo* los citados flavonoides, representándolo por su índice, el CLT_{50} en μM . A título informativo citaremos que dicho índice para el galato de epigalocatequina (flavonol) es 41,7 μM ; el del resveratrol es de 59,1 μM , el de la quercetina (flavonol) es de 59,3 μM , y el de la vitamina E es de 54,4 μM .

La gran dificultad con la que nos vamos a encontrar a la hora de interpretar y comparar trabajos similares al anterior, es la gran variabilidad en los resultados, debido preferentemente a que se están utilizando variedades distintas de la misma especie botánica, recolectadas en diferentes épocas del año, en distintas fases de maduración, etc. Todo lo cual podrá influir en el contenido total de los compuestos fenólicos.

Confirmación de los anterior lo encontramos en el trabajo de Crozier y colaboradores (22) quienes al determinar los flavonoides contenidos en el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), en particular la quercetina en su forma conjugada, encontraron para los de procedencia holandesa (variedad Trust) unos valores que oscilaban entre 2,2 y 6,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, con los más altos para los adquiridos en el mes de agosto y el más bajo en el mes de junio.

En el caso de los tomates de procedencia española (variedades Assun y Daniella) los valores oscilaron entre 2 y 8,7 $\mu\text{g g}^{-1}$, mientras que los

encontrados en la variedad Paloma oscilaron entre $23 \mu\text{g g}^{-1}$ para unos adquiridos en el mes de agosto de 1995 y los $203 \mu\text{g g}^{-1}$ de los adquiridos en el mes de enero. Altos valores encontraron también en unos de procedencia inglesa, la variedad Favorita, con un contenido en quercetina entre 17 y $77 \mu\text{g g}^{-1}$.

Otra especie estudiada ha sido la cebolla (*Allium cepa* L.) en la que comprueban que la variedad roja tiene un contenido en quercetina de $205 \mu\text{g g}^{-1}$ en el producto fresco, mientras que la variedad blanca presentaba variaciones estacionales muy manifiestas con valores entre 185 y $634 \mu\text{g g}^{-1}$.

La lechuga (*Lactuca sativa* L) por su parte, al igual que el tomate y la cebolla, sus extractos no contienen flavonoides libres, pero sí quercetina tras la correspondiente hidrólisis. Aquí también se pone de manifiesto las grandes variaciones en el contenido de quercetina, según la variedad de que se trata. Así por ejemplo, cuando se considera la lechuga entera, y siempre referida a su estado fresco, la variedad Cortina tiene tan sólo $11 \pm 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que la denominada «Green Salad Bowl», su contenido en quercetina es de $147 \pm 5,2 \mu\text{g g}^{-1}$.

Otro dato interesante a señalar es que cuando se analizan separadamente las hojas exteriores de las interiores se encuentran variaciones muy significativas, como ocurre con la variedad que denominan «Marvel of Four Seasons», con un contenido de $228 \pm 29 \mu\text{g g}^{-1}$ en las hojas exteriores frente a $22 \pm 2,3$ para las interiores. Y lo mismo que para la denominada «Lollo Rosso» variedad Malibu, con hojas como la anterior variedad de color rojo, que sus concentraciones son respectivamente 911 ± 27 y 450 ± 17 .

Si bien es interesante el conocer el contenido en los alimentos frescos de determinados compuestos, la norma aceptada internacionalmente en el momento actual para establecer la verdadera ingestión por la dieta, es que la determinación de los contenidos debe hacerse en los alimentos cocinados listos para ser ingeridos. Con ese objeto los autores determinan el contenido en quercetina que permanece en el producto después de someter a 10 gramos de la muestra que se fríen en 10 ml de aceite de girasol durante 2,5 a 3 minutos para el tomate o 5 minutos para la cebolla. Igualmente otras muestras semejantes se mantienen en 250 ml

de agua en ebullición durante 15 minutos, y finalmente las mismas cantidades de los productos frescos se colocan en recipiente de vidrio con 10 ml de agua, que se introducen cerrados, en un horno de microondas con una potencia de 800 W, durante 1,3 minutos para el tomate y 2,5 minutos para la cebolla.

El comportamiento es similar tanto para el tomate como para la cebolla, al comprobarse que al ser hervidos el tomate pierde el 82% del contenido inicial en quercetina y la cebolla el 75%. En el horno de microondas las pérdidas respectivas fueron 65% y 64%, y finalmente, tras la fritura las pérdidas se reducían a sólo el 35% y al 21% respectivamente.

* * *

No debemos olvidar que el interés por estos compuestos fenólicos está centrado en sus actividades antioxidantes, de ahí la necesidad de conocer el comportamiento de los mismos frente a los radicales oxígeno y los radicales hidroxilos independientemente. A estas determinaciones dedican su trabajo Cao y colaboradores (23) mediante el uso de un sistema con el compuesto 2.2'-azobis(2-amidino-propano)dihidrocloruro (AAPH) como generador del radical peroxilo; de otro sistema con $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, como generador del radical hidroxilo y finalmente otro que utiliza sólo el Cu^{2+} . Este último se justifica por el hecho de que la formación en nuestro organismo de los radicales hidroxilos está catalizada por el hierro, de manera preferente y por el cobre en menor extensión. De ahí el interés por conocer la capacidad secuestrante de los compuestos fenólicos por estos cationes, inhibiendo por tanto la actividad oxidativa.

Lo destacable del trabajo es que no sólo podemos conocer la actividad antioxidante de las diferentes especies vegetales, por la inhibición que producen en los sistemas indicados, sino que también por la suma de las actividades se puede establecer un escalafón de mayor a menor actividad antioxidante.

La lista se inicia con el ajo y le siguen, espinacas, coles de Bruselas, bróccoli, acelgas, pimienta, cebolla, cereales, berenjenas, coliflor, patatas, coles, lechugas, zanahoria, apio y pepino.

Un aporte más en el estudio de este complejo campo de los antioxidantes en los productos alimenticios, lo tenemos en el trabajo de Gazzani y colaboradores (24) en el que se plantea conocer las variaciones de las actividades antioxidantes cuando el producto se mantiene a temperaturas diferentes durante tiempos programados.

En el trabajo, para evitar las alteraciones que puedan tener su origen en los procesos de extracción, opera simplemente con los jugos de las distintas especies vegetales obtenidos tras la homogeneización del producto, centrifugación para la separación de los jugos y posterior filtración. Se controlan tanto el volumen del jugo obtenido como el pH de los mismos. Todo el proceso se ha verificado a la temperatura de 2° C.

De los jugos obtenidos se hacen tres porciones, una de ellas se almacena a 2° C, la otra a temperatura ambiente (25° C) y la tercera en baño maría (102 ± 0,5° C) y a los tiempos de 10, 20 y 30 minutos se determinan las actividades antioxidantes con el sistema de β-caroteno-ácido linoleico.

Reseñaremos por su interés algunos de los resultados obtenidos en la tabla siguiente:

| <i>Muestra vegetal</i> | <i>Tratamiento térmico °C</i> | <i>% actividad antioxidante a los tiempos</i> | | |
|---|-------------------------------|---|---------------|---------------|
| | | <i>10 min</i> | <i>20 min</i> | <i>30 min</i> |
| Setas <i>(Psalliota campestris)</i> | 2 | 87 | 92 | 96 |
| | 25 | 78 | 92 | 94 |
| | 102 | 93 | 94 | 95 |
| Zanahoria <i>(Daucus carota L)</i> | 2 | —57 | 11 | 64 |
| | 25 | 24 | 37 | 75 |
| | 102 | 37 | 50 | 77 |
| Ajos <i>(Allium sativum L)</i> | 2 | —90 | —6 | 42 |
| | 25 | —89 | 11 | 56 |
| | 102 | 26 | 54 | 76 |
| Tomates <i>(Lycopersicon esculentum Mill.)</i> | 2 | —621 | —341 | —175 |
| | 25 | —648 | —319 | —106 |
| | 102 | —261 | —101 | —53 |

Además de las especies vegetales incluidas en la tabla, también figuran en el trabajo los resultados de otras especies como: coliflor (*Brassica oleracea* L) apio (*Apium graveolens* L.) berenjenas (*Solanum melongena* L.) cebolla (*Allium cepa* L.) col (*Brassica oleracea* L. var. alba) patata (*Solanum tuberosum* L.) pimiento (*Capsicum annuum* L.) y calabaza (*Cucurbita pepo* L.).

El análisis de los datos encontrados para la actividad antioxidante de los jugos, pone de manifiesto que, de manera general, dicha actividad se incrementa con el tiempo de incubación, al pasar de los 10 min a los 30 min, y también que la temperatura puede tener un marcado efecto en el valor final. Efectivamente, cuando el % de actividad aparece con signo negativo ello significa que la actividad del jugo vegetal es pro-oxidante, y en los ejemplos que hemos incluido en la tabla podemos ver que la zanahoria es pro-oxidante en los primeros 10 minutos a 2° C (-57%) para pasar a comportarse como antioxidante a los 20 minutos (11%) y más aún a los 30 minutos (64%). El mismo efecto puede verse en los ajos.

Sin embargo, en los tomates la actividad pro-oxidante de su jugo, se mantiene hasta el máximo tiempo estudiado y a todas las temperaturas, pues aunque disminuye sustancialmente no llega a desaparecer. Ello puede significar que mientras los compuestos oxidantes de las otras especies vegetales, del tipo de las peroxidasas, son termolábiles no lo son en el caso del tomate.

Es evidente que la gran incógnita que se plantea a la vista de estos resultados, es poder conocer si las actividades antioxidantes de los flavonoides *in vitro* frente a las LDL y VLDL, no se verán afectadas *in vivo* por los compuestos pro-oxidantes presentes en los vegetales utilizados en nuestra alimentación, con tan alta estabilidad de algunos, como la demostrada en el tomate.

Un ejemplo más de la dificultad que nos vamos a encontrar a la hora de establecer criterios válidos para el mejor aprovechamiento de las actividades antioxidativas de los productos vegetales que venimos estudiando, lo tenemos en un trabajo (25) con varias especies del género *Allium* (*A. sativum* L., *A. bakeri* L., *A. odorum* L. *A. tuberosum* Rottler, *A. fistulosum*, *A. cepa* L. y *A. ascalonicum* L.) en cuyos extractos acuo-

Los resultados demuestran que el tratamiento de los mismos a 25, 65 o 100° C, reduce sus respectivas actividades antioxidantes. Lo mismo ocurre si los productos convenientemente troceados son suspendidos en agua destilada acidificada hasta pH = 2 durante 15 minutos. Por el contrario si el pH se ajusta a valores de 4, 6 u 8, no hay variación de las actividades antioxidantes, y lo mismo ocurre si se sustituye el agua destilada por soluciones de ClNa de concentraciones 0,2 M o 0,4 M.

Si se hace el tratamiento combinado del calor y pH = 2, la disminución de la actividad antioxidante es bien manifiesta, y según los autores cabe la posibilidad de que con ello se esté aumentando la actividad prooxidante de estos productos vegetales, lo que volvemos a insistir, deberá tenerse en cuenta a la hora de la preparación de estos alimentos, como integrantes de posibles dietas protectoras.

6. FRUTAS

En las frutas, por lo general, vamos a encontrar una buena fuente de sustancias antioxidantes habiéndose fijado la atención preferente en el contenido de las mismas en vitamina C, vitamina E y β -caroteno.

Sin embargo, cuando se determina la actividad antioxidante de una serie de ellas (26) resulta evidente que no puede ser atribuida a los compuestos vitamínicos citados, sino que la mayor actividad debe ser responsabilidad de los compuestos fenólicos presentes en las mismas.

A título orientativo, según citan los autores del trabajo, la actividad antioxidante que puede ser atribuida a la vitamina C, es por lo general inferior al 15% de la actividad antioxidante total hallada para las distintas especies de frutas. De ahí el interés por identificar los flavonoides contenidos en las mismas, incluyendo flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas e isocatequinas, para así poder valorar el papel que están representando en nuestra dieta.

Para la preparación de las muestras para su análisis, se utilizaba la parte comestible de la fruta, es decir que se prescindía de la piel en las naranjas, pomelos, manzana, pera, kiwi, banana y melón, mientras que se usaban enteras en las uvas, fresas y ciruelas. Una porción de la fruta,

se homogeneizaba en una batidora con agua destilada en la proporción 1:2 p/v, y se centrifugaba a 4500 g durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante se utilizaba directamente para la determinación de la actividad antioxidante, y la pulpa sedimentada se sometía a una extracción con acetona a temperatura ambiente durante 30 minutos. El extracto acetónico se recogía centrifugando a 4.500 g por 15 minutos y 4° C. El sobrenadante se utilizaba para la determinación de la actividad antioxidante. La suma de ambos valores constituirá la actividad antioxidante total de la fruta en cuestión.

Los resultados obtenidos les permiten ordenar las frutas analizadas de mayor a menor capacidad antioxidante, de la siguiente forma: fresa, ciruela, naranja, uvas rojas, kiwi, pomelo rosado, uvas blancas, banana, manzana, pera y melón.

Los valores vienen a demostrar que sobre la base de frutas frescas, las fresas tienen una capacidad antioxidante total que es dos veces superior a la que corresponden a las naranjas y uvas rojas, siete veces superior a las de manzanas y bananas, once veces las de las peras y dieciséis veces la del melón, referido todo ello por gramo de material.

También es interesante señalar que en la mayoría de las frutas analizadas, el extracto acetónico de la pulpa insoluble apenas contribuye con el 10% de la capacidad antioxidante total.

No faltan trabajos destinados al estudio de compuestos pertenecientes a la gran familia de los flavonoides, que forman un grupo homogéneo. Tal es el caso de las antocianinas, colorantes naturales ampliamente distribuidos entre las frutas, constituidos químicamente por un aglicón (antocianidina) glicosilado, bien por glucosa o por ramnosa, xilosa, galactosa, arabinosa o fructosa. La mayor distribución de las antocianidinas, son las conocidas por delfinidina, cianidina, pelargonidina, malvidina y peonidina, quienes proporcionan a las frutas y otros vegetales colores y tonalidades diferentes.

Wang y colaboradores (27) estudian las actividades antioxidantes de un conjunto de 14 antocianinas, tratando de establecer relaciones entre la estructura química y las citadas actividades. Efectivamente, han podido demostrar que la pelargonidina, malvidina y peonidina, con un sólo

sustituyente OH, tienen menor actividad antioxidante que la cianidina con dos sustituciones OH en su anillo.

Del mismo modo, el tipo de glicosidación influye en la citada actividad antioxidante, pues por ejemplo para el caso de la cianidina, se aumenta su capacidad antioxidante por la unión con la glucosa o la ramnosa, mientras que la disminuye la galactosa.

Grandes cantidades de antocianinas se encuentran en la piel de las uvas rojas, siendo la principal la malvidina-3-glucósido, que luego encontraremos en los vinos tintos.

* * *

Una propiedad de la mayor importancia desde el punto de vista fisiológico, no citada hasta ahora en lo aquí tratado sobre los compuestos fenólicos, es el papel de inhibidores enzimáticos que, en ciertos casos con una gran selectividad, vamos a encontrar en las especies cítricas.

Nos vamos a referir concretamente a los enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas. La primera de ellas es la responsable de la formación en las plaquetas de los tres mayores metabolitos del ácido araquidónico, el tromboxano β_2 (TXB₂), el ácido 12-hidroxi 5,8,10,14-eicosatetraenoico (12HETE) y el ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoico. El paso posterior del TXB₂ a su forma activa tromboxano A₂ induce al proceso de agregación plaquetaria; de ahí que todo inhibidor de la ciclooxigenasa se comportará teóricamente como un antiagregante plaquetario.

Igualmente, metabolitos de la lipooxigenasa están involucrados al parecer en la formación de los ateromas y finalmente, metabolitos de ambas enzimas juegan el papel de inductores en determinados procesos cancerosos en la piel.

Es evidente a la vista de lo anterior, el importantísimo papel que pueden jugar los inhibidores enzimáticos presentes en las frutas incorporadas a nuestra dieta alimenticia, en la prevención de procesos trombóticos, arterioescleróticos y en la propia carcinogénesis.

Nogata y colaboradores (28) han realizado un estudio con 42 especies del género *Citrus* en los que determinan las actividades inhibitorias

frente a las ciclooxigenasas y lipooxigenasas en plaquetas procedentes de sangre de ratas Wister-King.

Para ello, diseccionan los frutos en cuatro partes, *albedo*, *flavedo*, pulpa y zumo, y tras el conveniente proceso extractivo, valoran la actividad inhibitoria utilizando un sustrato de (1-¹⁴C) ácido araquidónico, por la formación de sus metabolitos TXB₂ y 12-HETE.

A título informativo y para que pueda apreciarse la selectividad de las especies de citrus en su poder inhibitorio, representamos en la tabla siguiente, los valores de las capacidades inhibitorias (IC₅₀), para el extracto de *albedo*

| <i>Especie</i> | <i>IC₅₀ (µg/ml)</i> | |
|----------------------|--------------------------------|----------------------|
| | <i>Ciclooxigenasa</i> | <i>Lipooxigenasa</i> |
| <i>C. lumia</i> | 24 | 275 |
| <i>C. suhuiensis</i> | 50 | 592 |
| <i>C. limetta</i> | 66 | 302 |
| <i>C. medica</i> | 67 | >1000 |
| <i>C. aurantium</i> | 360 | 56 |
| <i>C. tachibana</i> | 810 | 80 |
| <i>C. leiocarpa</i> | >1000 | 89 |

El trabajo también aporta datos sobre la influencia del grado de maduración de la fruta en sus capacidades inhibitorias.

Dentro de estas actividades inhibitorias de enzimas, es obligado referirse a una muy particular, por su aparente especificidad, que presenta el pomelo al interferir en la actividad terapéutica de diferentes medicamentos.

La primera referencia bibliográfica pone de manifiesto la interacción con los bloqueadores de los canales de calcio, concretamente el felodipino y el nifedipino (Adalat) (29).

El mecanismo de esta interacción está en el hecho de que determinados flavonoides presentes en el pomelo, inactivan o inhiben a deter-

minadas isoenzimas del citocromo p450, concretamente la CYP1A2, CYP3A3 y la CYP3A4. Esta última en concreto la vamos a encontrar en las células de la pared del intestino delgado, siendo la responsable del proceso metabólico del primer paso de aquellos medicamentos que sean sustrato de dicha isoenzima.

En principio se ha supuesto que el principal flavonoide del pomelo la naringina, pudiese ser el responsable, aunque luego se comprobó que la actividad inhibidora corresponde a un metabolito del mismo producido por las bacterias intestinales, la naringenina. Sin embargo, al comprobar que dichos compuestos independientemente no manifiestan la misma actividad que cuando forman parte del zumo de pomelo, se siguieron nuevas investigaciones, que pusieron de manifiesto el papel que están jugando también en el proceso las furanocumarinas, potentes inhibidores específicos de la CYP3A4 en ensayos *in vitro*.

Para que se pueda tener una idea concreta de las consecuencias de la interacción, bastaría con fijarse en los datos farmacocinéticos que se han encontrado en grupos de pacientes y en voluntarios sanos, a los que se le administran los bloqueadores de canales de calcio, conjuntamente con zumo de pomelo. Se pudo comprobar que el dato del área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (AUC) y la concentración máxima (C_{\max}), variaban significativamente al compararlos con los que ingerían el medicamento simplemente con agua.

Concretamente, para el felodipino el valor medio de incremento del AUC era del 240%, con un valor máximo de un 600%, mientras que el C_{\max} se incrementaba entre 179% y 245%, sobre el valor de referencia. Para el nifedipino (Adalat) también derivado de la dihidropiridina, el incremento en AUC se situaba entre el 108% y 169%. Otros derivados presentaron los valores siguientes: amlodipino, entre el 80 y 155%, nitrendipino entre 64 y 158% y nisoldipino entre 81 y 682%. Datos que nos ponen de manifiesto las marcadas variaciones interindividuales para este proceso de interacción (29, 30, 31, 32, 33, 34) y que nos hablan de su importancia por las repercusiones clínicas que de ellas pueden derivarse.

En el grupo de medicamentos antihistamínicos encontramos otro ejemplo de interacción, que puede resultar muy peligrosa.

Se trata de la terfenadina (Seldane) muy usado por sus características de no producir somnolencia y actuar como sedante. Él es bien absorbido tras la ingestión y sufre una casi completa eliminación presistémica por el CYP3A4, con formación de dos principales metabolitos, el carboxilato de terfenadina y el azaciclónol. Por esta circunstancia, lo normal es que la terfenadina no pueda ser detectada en el plasma, y es precisamente el carboxilato el que confiere la actividad antihistamínica *in vivo*.

Con estas características era previsible que el zumo de pomelo aumentara sustancialmente la biodisponibilidad de la terfenadina. Efectivamente, hay una cita (35) referida a un paciente de 29 años con una rinitis alérgica tratada con terfenadina quien, con ocasión de haber ingerido dos vasos de zumo de pomelo, sufrió un colapso y falleció. Analizada la concentración de terfenadina en el plasma su valor se elevaba a 35 ng/ml y el de su metabolito carboxilado a 130 ng/ml, niveles que se encuentran dentro de los valores que se conocían para casos previos de arritmias mortales causadas por este medicamento.

Para evitar estos efectos negativos, como ya se hace con el Adalat, el laboratorio preparador alerta en la literatura que acompaña al medicamento de que no debe ingerirse con el zumo de pomelo.

Siguiendo con el estudio de los medicamentos metabolizados por el CYP3A4, nos referiremos ahora a uno que se encuentra en la primera línea de la terapéutica de la hipercolesterolemia, la lovastatina, que se comporta como un pre-medicamento y que requiere de un proceso hidrolítico para transformarse en el lovastatin ácido, responsable de la acción medicamentosa. Efecto secundario de este medicamento es su toxicidad para el músculo esquelético.

Pues bien, en un trabajo realizado con voluntarios sanos (36) puede comprobarse que al ingerirse con zumo de pomelo el C_{\max} del lovastatin en el suero se incrementaba 12 veces, en relación a la toma del medicamento con agua, y lo mismo el AUC que se incrementaba 15 veces.

Dado pues el peligro de toxicidad para el músculo esquelético, los autores recomiendan no usar zumo de pomelo, o en caso contrario reducir la dosis del medicamento en la cuantía necesaria para que su concentración en suero sea la óptima.

Se dispone también de datos concretos para ciertos medicamentos del grupo de las benzodiazepinas, que también son metabolizados por la CYP3A4. Concretamente en el caso del midazolam la biodisponibilidad oral se aumentó al ser ingerido con el zumo de pomelo, con un incremento del C_{\max} del 56% y del 52% en el caso de AUC. Para el triazolam los incrementos fueron del 30% y del 48% respectivamente. Esta mayor biodisponibilidad tenía su reflejo en los efectos farmacodinámicos, al aumentar significativamente el tiempo de sueño de los individuos (37, 38).

Otro medicamento de la importancia de la ciclosporina también ve afectada su biodisponibilidad por la ingestión del zumo de pomelo, lo que puede ser muy útil cuando en los pacientes sometidos a trasplantes de órganos, se desea conseguir mayores niveles en sangre de este inmunosupresor. Con ese mismo fin está citado su uso en el tratamiento del psoriasis con la ciclosporina (39).

Por su evidente interés y como último ejemplo de medicamentos que ven aumentada su biodisponibilidad por la ingestión de zumo de pomelo, citaremos el caso del saquinavir, un medicamento antiviral, potente inhibidor de la proteasa del VIH, utilizado en el tratamiento del SIDA por su gran efectividad, demostrada por el incremento del número de células CD4+. Sin embargo, su alto coste y la muy baja biodisponibilidad del saquinavir, que se sitúa entre el 1% y el 4% según el estado de ayuno del paciente, hace muy urgente la necesidad de encontrar métodos que permitan incrementar sustancialmente la biodisponibilidad del mismo.

Con este fin se ha realizado un ensayo con individuos sanos (40), comparando la biodisponibilidad del medicamento administrado por vía intravenosa o por vía oral, con ingestión de agua o zumo de pomelo.

De acuerdo con los resultados obtenidos para el C_{\max} y el AUC, se demuestra el papel de los componentes del zumo de pomelo en la biodisponibilidad, que en el caso de la vía intravenosa no se ve modificada mientras que por la vía oral el valor medio del incremento es del 100%, gracias al efecto inhibidor del citocromo CYP3A4. La importancia en terapéutica de estos hallazgos deberá ser comprobada por trabajos posteriores con enfermos de SIDA.

Al papel de inhibidor enzimático que hasta ahora hemos venido reseñando para los componentes del pomelo, se une otro de no menor trascendencia en relación con la actividad farmacológica de ciertos medicamentos. Se trata de la interacción con la glicoproteína P (P-gp), una proteína transmembranaria, de 170 a 180 kDa, que se asocia con la resistencia a los medicamentos de las células tumorales, en los tratamientos quimioterápicos. Las P-gp forman parte del sistema de transporte activo, ATP dependiente, cuya función es la de transferir al espacio extracelular los medicamentos, anulando el efecto terapéutico buscado.

Dado que se ha podido comprobar que ciertos medicamentos que son sustratos para el citocromo CYP3A4 lo son también de la P-gp, se planteó la hipótesis de que si el zumo de pomelo pudiese inhibir el efecto de dicha P-gp, se anularía la resistencia celular al medicamento anticancerígeno, con el consiguiente beneficio terapéutico.

Tratando de demostrar lo anterior, Takanaga y colaboradores (41) investigan el efecto que tienen los componentes del zumo de pomelo, en el transporte de vinblastina a través de la membrana de células Caco-2. Estas células utilizadas como modelo de células epiteliales intestinales, proceden de adenocarcinoma de colon, y se caracterizan por expresar bajos niveles de CYP3A4, en comparación con las células epiteliales intestinales normales, mientras que por el contrario la expresión de la P-gp es muy elevada, resultando por ello muy útiles para el análisis propuesto.

En cultivos de las células Caco-2, se adicionan cantidades crecientes de los extractos de pomelo y [³H]vinblastina, sirviendo como control el mismo sistema sin los extractos. A tiempos diferentes se separan las células y previa lisis de las mismas, se determina por medidas de radiactividad la [³H]vinblastina que ha pasado la membrana celular. Simultáneamente se determina la radiactividad del medio en los que estaban suspendidas las células, con cuyos datos se puede calcular el coeficiente de permeabilidad.

Los resultados obtenidos muestran un coeficiente de permeabilidad, en ausencia de los extractos de pomelo, de $0,019 \pm 0,001$ ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) frente a un valor de $0,070 \pm 0,004$ en presencia del extracto.

Estos datos están poniendo en evidencia que en ausencia del extracto de pomelo, el sistema de la P-gp, transporta de nuevo hacia el medio la vinblastina que pasa a través de la membrana, y por eso la permeabilidad es muy baja, mientras que en presencia del extracto, el sistema de transporte de la P-gp se ve inactivado y el flujo de vinblastina desde el interior de la célula hacia el medio está disminuido.

Utilizando extractos de concentraciones diferentes, se puede observar que el coeficiente de permeabilidad depende de dichas concentraciones. Preparando extractos de las distintas partes del pomelo como son: la piel, el *albedo* (parte blanca interna del fruto) y el zumo, en todos ellos encuentran el componente o los componentes que interaccionan con la P-gp.

Un paso obligado en estos estudios es el de tratar de identificar en el pomelo el componente o los componentes, responsables de las actividades que se han reseñado, fijándose la atención preferentemente en los flavonoides, y concretamente en la naringina. Las experiencias realizadas no sólo con la naringina, sino también con la naringenina, un producto de su hidrólisis por naringinasa a pH ácido, vienen a demostrar que ambos reproducen en las células Caco-2 la incorporación de la vinblastina, aunque no en la misma proporción que lo hacen en el zumo de pomelo a idéntica concentración, lo que apunta a que otros flavonoides también presentes en el zumo participan en el proceso de inhibición de la glicoproteína P-gp.

Edwards (42) ha puesto de manifiesto que una furocumarina presente en el pomelo, la 6',7'-dihidroxi-bergamotina, era un potente inhibidor de la familia de citocromos CYP3A en los microsomas hepáticos de ratas.

En trabajo posterior (43) se profundiza en el tema estudiando la intervención, no sólo de la 6',7'-dihidroxi-bergamotina, sino también de un dímero estrechamente relacionado con ella y otro compuesto que denominan FC726, identificado espectroscópicamente como un psoraleno. Además también se identifican la bergamotina y la 6'-epoxi-bergamotina.

En el trabajo experimental se recurre a la endoscopia duodenal para obtener biopsias en voluntarios sanos, cuatro horas antes de la ingestión

del zumo de pomelo, repitiéndose la toma cuatro horas después. Estudiadas las actividades catalíticas de estas células para su enzima CYP3A4 encuentran que la concentración de la enzima decrece en un 47%, lo que es indicativo de la rapidez del efecto.

Utilizando también cultivos de células Caco-2 se observa que los efectos de los componentes del pomelo sobre la actividad catalítica de la CYP3A4, se reproducen al utilizar la 6',7' dihidroxibergamotina y el componente FC726. Sin embargo, y debido a la pequeña concentración del componente FC726, los efectos inhibitorios del pomelo tanto sobre la CYP3A4 como sobre la glicoproteína P-gp se deberían asignar, en el momento presente, a la 6',7'-dihidroxibergamotina.

No cabe duda que el interés del tema merece un atento seguimiento de las investigaciones en curso, para lo que puede ser muy útil la consulta a la página Web del Dr. Dean Elbe (Internet Homepage «Grapefruit-Juice-Drug Interactions»: <http://powernetdesign.com/grapefruit>).

7. BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Como ya hemos venido comentando, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en nuestra sangre, constituyen el factor fundamental que permite poner de manifiesto los efectos perniciosos de los procesos de oxidación *in vivo*, al dar origen a la acumulación de lipoproteínas aterogénicas.

Se suele denominar como **paradoja francesa**, al hecho de que en ciertas regiones de Francia, la incidencia entre sus habitantes de enfermedades coronarias es inferior a la que se registra en los Estados Unidos, y eso a pesar de que el consumo de grasas saturadas en sus respectivas dietas son muy similares, y ya sabemos que dicho consumo de grasas está considerado como un factor de riesgo en la incidencia de procesos coronarios.

Una de las posibles explicaciones a dicha paradoja, es la de atribuir un factor de prevención al consumo rutinario de vinos, y no precisamente por su contenido alcohólico, sino por los compuestos fenólicos antioxidantes, muy abundantes en los vinos tintos, los cuales contribuyen

a evitar las enfermedades coronarias a través de la prevención de los procesos oxidativos sobre las LDL, y la inhibición de la agregación plaquetaria (44). De ahí el interés por el estudio más profundo y detallado de dichos compuestos fenólicos que aparecen en un trabajo sobre el contenido de antioxidantes naturales en las uvas y en los vinos (45). Encuentran cifras del contenido total en compuestos fenólicos para tres variedades de uvas (Thomson, Flame y Black) de 260-850 y 920 mg/kg respectivamente, frente a 1800 mg/l y 3.200 mg/l para dos tipos de vino, el Cabernet Sauvignon y el Petite Sirah. Comprueban las capacidades antioxidantes en los sistemas ya conocidos, inhibición de la oxidación del β -caroteno y de la peroxidación lipídica del ácido linoleico. Pero quizás el dato de mayor interés podría ser el que al estudiar la inhibición de la oxidación de la LDL por los compuestos fenólicos del vino, lo compara con el efecto del α -tocoferol, encontrándose que el IC_{50} para los primeros era menor de 1 μ M, frente a 2 μ M para el α -tocoferol.

Los autores apuntan la posibilidad de que un valor tan alto en el poder antioxidante de los compuestos fenólicos del vino, podría ser consecuencia de un efecto sinérgico entre ellos.

Evidentemente, tanto a las uvas de las que proceden los vinos, como al mosto no fermentado, le deben ser atribuidos las mismas propiedades antioxidantes comprobadas analíticamente en vinos.

Lo anterior viene confirmado por los resultados de un trabajo (46) con el zumo de unas uvas de la variedad Concord que contiene varias antocianinas junto a la quercetina y miricetina. La concentración de productos fenólicos totales en el zumo era de 3,4 mg por mililitro, expresados en ácido gálico.

El poder antioxidante del zumo se pone de manifiesto con el sistema de LDL y cobre, midiendo la capacidad inhibidora del mismo. En primer lugar se valora la inhibición de la formación de compuestos que reaccionan con el reactivo del ácido tiobarbitúrico, lo que se denominan TBARS. Los resultados demuestran que el zumo diluido 2.000 veces, inhibe la formación de TBARS en un 44%, que se hace muy próxima al 100% de inhibición cuando la dilución es de 1000 veces, y siendo indetectable los TABRS con una dilución de 500 veces.

En segundo lugar, el dato que nos mide la actividad inhibidora de la oxidación del LDL por el cobre, es el tiempo que transcurre entre el inicio de la incubación y la formación de los hidroperóxidos lipídicos. Pues bien, los resultados son bien demostrativos, ya que para el sistema de LDL-cobre, en ausencia de zumos el tiempo es de 130 minutos, que pasa sucesivamente a 185 minutos, con zumo diluido 8.000 veces, a 250 minutos si es diluido 4.000 veces, a 465 minutos si es diluido 2.000 veces y hasta 10 horas si la dilución es de sólo 1.000 veces.

En tercer lugar, utiliza la técnica de electroforesis sobre gel de agarosa, para medir los cambios en velocidad de migración de la LDL durante el proceso de oxidación, comprobándose como en los casos anteriores, la capacidad inhibidora del zumo a distintas diluciones por las distancias de migración de la LDL.

Finalmente y en cuarto lugar, recurren a una técnica inmunoquímica basándose en que la estructura de un antígeno, la apolipoproteína B-100 de la LDL, debe permanecer intacta para que pueda reaccionar con un anticuerpo monoclonal específico de la apolipoproteína B-100 humana. Por tanto, al oxidarse la LDL pierde su inmunoreactividad, comprobándose que en presencia de los zumos diluidos, se previene significativamente la pérdida de la inmunoreactividad, lo que puede ser seguido cuantitativamente.

No cabe duda, a la vista de los resultados anteriores, que el pretendido efecto beneficioso del vino en la prevención de procesos cardíacos coronarios, nos lo puede también proporcionar el mosto, con la ventaja de la ausencia del alcohol.

Insistiendo más en los vinos, es evidente que nos resulta difícil establecer su calidad como agente preventivo, a la vista de la variabilidad en cuanto a sus contenidos en compuestos fenólicos y las respectivas capacidades antioxidativas de los mismos. Vinson y Hertz (47) dan un paso adelante al establecer un nuevo índice, el que denominan fenol-antioxidante-índice (PAOXI), con el cual se pueden establecer comparaciones entre distintas clases de vinos, tanto blancos como tintos.

Para ello determina en cada muestra su contenido en compuestos fenólicos totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, usando

catequina como patrón. Independientemente calculan las respectivas concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀) de estos compuestos fenólicos frente a la oxidación del sistema LDL.

Con estos datos el PAOXI se calcula así:

$$PAOXI = \frac{\text{concentración fenoles totales(micromolar)}}{IC_{50}(\text{micromolar})}$$

Por su evidente interés, podemos reproducir en una tabla algunos de los resultados que figuran en el trabajo y que son los siguientes:

| | <i>Contenido en fenoles (µM)</i> | <i>IC₅₀ (µM)</i> | <i>PAOXI</i> |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------|
| Vinos tintos | | | |
| Petite Sirah | 9.635 | 2.6 | 3.706 |
| Bordeaux | 10.323 | 3.6 | 2.868 |
| Pinot noir | 4.761 | 2.9 | 1.642 |
| Cabernet Sauvignon | 3.581 | 2.0 | 1.791 |
| Vinos blancos | | | |
| Chardonnay | 690 | 1.2 | 575 |
| Sauvignon | 366 | 2.0 | 183 |
| Zinfandel | 612 | 1.7 | 360 |

De los datos anteriores se puede deducir en primer lugar, que el contenido en fenoles de los vinos tintos es muy superior al de los vinos blancos, atribuible al diferente proceso de elaboración de los mismos, que se puede concretar en un mayor tiempo de contacto con la piel de la uva y diferente temperatura para la fermentación, en el caso de los vinos tintos.

Otro dato relevante que se desprende de lo anterior lo tenemos en los valores del IC₅₀, que nos pone de manifiesto que los compuestos fenólicos de los vinos blancos son más efectivos antioxidantes que los de los vinos tintos, pues no olvidemos el significado del IC₅₀ que cuanto

menor sea su valor, será menor la cantidad de producto que está inhibiendo en un 50% la oxidación en el sistema de la LDL.

Pero claro, al reflejar el PAOXI la relación del contenido a la actividad, nos encontraríamos que según este dato, necesitaríamos ingerir tres veces más cantidad del vino blanco Chardonnay con un PAOXI de 575, que de vino tinto Cabernet Sauvignon que tiene un PAOXI de 1791, si quisiéramos obtener el mismo efecto protector antioxidante de la LDL.

Aunque es fácil entender que los valores de PAOXI para una determinada marca de vino variará según las cosechas y su elaboración, sería deseable poder disponer de estos datos relativos a los excelentes vinos que se elaboran en toda España.

De cualquier forma, no debemos dejar de entender el verdadero valor que debemos darle a este índice, ya que su determinación se realiza previo ensayos *in vitro*, que no siempre van a tener su equivalencia *in vivo*. Queremos decir con ello, que al tratarse de antioxidantes en la alimentación, no se trata de buscar aquel compuesto donador de electrones con alta eficacia, sino aquel otro que presente una alta biodisponibilidad al ser ingerido, al objeto de que pueda alcanzar el órgano diana dentro del organismo a la concentración adecuada para prevenir el proceso oxidativo.

Con esta orientación, Lapidot y colaboradores (48) estudian las antocianinas contenidas en los vinos tintos, tratando de conocer los procesos de biotransformación que teóricamente, se verificarán en el tubo digestivo. Los cambios de pH originarán compuestos diferentes: a pH de 1 a 3 las antocianinas se encontrarán en forma de catión de color rojo, que pasará a una forma de carbinol pseudo base incolora, si el pH es de 4 a 5 y a una base quinoidal de color azul-púrpura si el pH se eleva a 7 u 8. Este último compuesto puede pasar a una estructura de chalcona amarilla.

Como todas estas circunstancias de cambios de pH se van a producir teóricamente en el tubo digestivo, lo previsible es que estas estructuras derivadas de las antocianinas serán las absorbidas para pasar al torrente circulatorio. Es por tanto necesario conocer las actividades antioxidantes de las mismas, comparándolas con otras moléculas antioxidantes conocidas, catequina y resveratrol.

Para los ensayos aíslan la malvidina-3-glucósido del vino tinto por HPLC; la pseudo base la generan a pH 4, que ya permanece estable aunque se lleve a pH 7 en las condiciones de medida de la actividad antioxidante; la base quinoidal por su parte se genera a pH 7.

Por las técnicas de inhibición de la oxidación del ácido linoleico, y de la formación de sustancias que reaccionan con el reactivo del ácido tiobarbitúrico, ya conocidas, pueden demostrar que todas las formas transformadas por el pH, se comportan como efectivos antioxidantes con valores de IC_{50} entre 0,5 y 6,2 μ M. Estos resultados nos permiten pensar que, al menos teóricamente, el comportamiento *in vivo* de estos compuestos debe ser una reproducción de los hallados *in vitro*.

No se puede terminar este apartado de los antioxidantes en los vinos, sin tratar de los subproductos de su elaboración. Al igual que ya citamos en el aceite de oliva la pérdida de antioxidantes en las aguas usadas en su preparación, aquí también en la preparación de los vinos quedan grandes cantidades de residuos, formados preferentemente por la piel de la uva, con un alto contenido de antocianinas. Comercialmente se vienen utilizando para preparar unos pigmentos con el nombre de Enocianina, utilizados como colorantes de los alimentos (49).

Es evidente que el aprovechamiento de las actividades antioxidantes de estos compuestos aumentaría el valor añadido de estos residuos. Y eso es lo que propone Saura-Calixto, del Instituto del Frío del CSIC (Departamento de Metabolismo y Nutrición) presentando un nuevo tipo de producto natural: la fibra dietética rica en compuestos fenólicos. Considera que en este producto se unen los efectos fisiológicos beneficiosos de ambos, la fibra dietética y los antioxidantes (50). El producto con la denominación de Vitis Fibra se prepara de acuerdo con la patente de producción (CSIC-El Granero Integral, S.L. 1997) y para dicho trabajo utilizaron una uva de la variedad Cencibel y un vino tinto de la Bodega de Los Llanos, de Valdepeñas.

En la fibra valoran los polifenoles que puede ser extraídos por una técnica secuencial, con metanol-agua (50:50 v/v) y acetona-agua (70:30 v/v) usando el método de Folin-Ciocalteu, con ácido gálico como patrón. El valor resultante lo denominan productos fenólicos extraíbles.

El producto que resta de la extracción anterior, se trata ahora con CIH en butanol (100°C por 3 horas) y en el sobrenadante valoran su contenido en polifenoles, que constituirá la denominada fracción de polifenoles no-extraíbles, formado preferentemente por taninos condensados.

Igualmente, y para simular las condiciones en que se encontrará la fibra en el tubo digestivo, se hace otro ensayo de extracción con jugo gástrico artificial (pepsina pH 1.5) y jugo intestinal (α -amilasa pH 6.9), valorando sus contenidos en polifenoles.

Con cada uno de los respectivos extractos se realizan los ensayos correspondientes para determinar las capacidades antioxidantes, por los métodos de inhibición de la oxidación lipídica del ácido linoleico, y el de la capacidad para secuestrar radicales libres.

Los valores que han encontrado en preparados distintos han sido: para la fibra dietaria un contenido entre el 50 y el 75% de su peso seco; los productos fenólicos extraíbles entre el 1 y el 9%, y los no-extraíbles entre el 15 y el 30%.

Lo importante para nuestro estudio, su capacidad antioxidante, queda reflejada en el hecho de que 1 gramo de Vitis fibra presenta una actividad inhibidora de la oxidación lipídica que es semejante a la que presentan 400 mg de α -tocoferol. Lo mismo ocurre para la capacidad secuestradora de radicales libres, aunque en este caso la relación se sitúa entre 1 gramo de la fibra y 100 mg de α -tocoferol.

A falta de ensayos *in vivo* rigurosos, que puedan demostrar la bio-disponibilidad de los compuestos fenólicos de la fibra, se puede suponer por los datos de solubilidad obtenidos en los jugos gástrico e intestinal, que al menos el 68% de la cifra de productos fenólicos extraíbles, se podrá encontrar en condiciones de ser asimilado por nuestro organismo.

8. INFUSIONES DE TÉ

Existe una abundante bibliografía sobre los flavonoides que se pueden encontrar en las infusiones de té, orientados gran parte de los tra-

bajos en las supuestas actividades anticarcinogénicas de estos antioxidantes.

Nos referiremos en primer lugar al trabajo de Hertog y colaboradores (51) quienes utilizando una técnica de HPLC en fase inversa cuantifican el contenido en quercetina, kaempferol y miricetina en las infusiones de doce diferentes marcas comerciales de té.

Estos contenidos pueden variar según la técnica de preparación y el tamaño del polvo de la hoja. Por lo general toman una bolsa tal como vienen preparadas, sobre la que se añaden 500 ml de agua hirviente y se mantienen durante 5 minutos. Las bolsas contenían 4 ó 5 gramos de té, oscilando los valores de quercetina para las distintas marcas entre 17 y 25 mg/litro; entre 13 y 17 mg/litro para kaempferol y entre 1,7 y 5,2 mg/litro para la miricetina.

Como era previsible el contenido en polifenoles de la infusión se incrementaba ligeramente, si la preparación de la infusión se alarga a 10 minutos. Mayor significación encuentran si la hoja de té se pulveriza y se utiliza solamente el polvo de 0,4 a 0,8 milímetros. En este caso, el contenido en quercetina de la infusión preparada con este polvo, se incrementa en un 40% al pasar de 11 mg por litro a 16 mg/l.

Como resumen se puede concluir a la vista de los resultados, que el contenido en flavonoides de las infusiones con té verde es comparable a la media del contenido encontrado en la de té negro, excepto para la miricetina que era más alto en el té verde (5-17 mg/l) que en el té negro (2-5 mg/l).

La presencia de polifenoles en los extractos de té, como se ha podido ver, ha quedado demostrada y por tanto se hacía necesario conocer si la pretendida acción antimutágena y anticancerígena está relacionada con la actividad antioxidante de los polifenoles. Con esta finalidad se efectuó el trabajo (52) del que comentamos sus resultados.

El extracto de té con el que se efectúan los ensayos lo prepararon con 20 gramos de la variedad de té y 400 ml de agua hirviente por 5 minutos; se filtra la infusión, que posteriormente se liofiliza. El peso del extracto seco osciló ente 3,89 y 5,11 gramos.

Para medir las actividades antioxidantes utilizan sistemas diferentes: a) inhibición de la oxidación del ácido linoleico, b) poder reductor con ferricianuro potásico, c) secuestación de superóxido con el reactivo de nitro azul de tetrazolio, d) capacidad secuestradora para el peróxido de hidrógeno, e) capacidad secuestradora del radical hidroxilo, por resonancia paramagnética electrónica y f) capacidad secuestradora sobre el radical DPPH (α , α -difeníl- β -picrilhidrazilo).

Las pruebas de antimutagenidad se realizaron por el «test» de Ames usando *Salmonella typhimurium* de las cepas TA98 y TA100; y frente a los mutágenos conocidos como: benzo-a-pireno, aflatoxina β_1 , Trp-P-1 (3 amino-1,4-dimetil-5H-piridol[4,3-b]indol), Glu-P-1 (2 amino-6-metilpiridol[1,2-a:3',2'-d]imidazol), y IQ (2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]quinolina).

Los resultados obtenidos han venido a demostrar que los cuatro extractos de té con el que han venido trabajando (verde, «pouchong», «oolong» y negro) tienen un marcado poder inhibitorio de la oxidación del ácido oleico, especialmente el oolong que alcanza hasta el 73,6% de inhibición. Esta misma variedad mostró el mayor poder reductor, en relación con las otras tres, lo que quiere significar la presencia en los extractos de moléculas donadoras de electrones, capaces de reaccionar con radicales libres y convertirlos en moléculas más estables, rompiendo así la cadena de reacción de los mismos.

La variedad de té «oolong» se mostró igualmente superior a las otras tres variedades, en su capacidad secuestradora del peróxido de hidrógeno y en lo que respecta al comportamiento frente al radical hidroxilo, operando con 4 mg del extracto de té, la inhibición es del 100% para las variedades verde, «pouchong» y «oolong», y sólo del 86,4% para el té negro.

Finalmente, en lo que se refiere a la capacidad secuestradora sobre el radical DPPH, el más efectivo es el té de la variedad «pouchong» y ordenados de mayor a menor efectividad le siguen el verde, el «oolong» y el negro.

En la actividad antimutagénica también encuentran una cierta selectividad de comportamiento de las cuatro variedades de té, frente a los

diferentes mutágenos citados anteriormente, aunque de manera general se puede establecer que la actividad antimutagénica es superior en los extractos de las variedades de té que sufrieron un proceso de semifermentación en su elaboración («oolong» y «pouchong»), que en el no-fermentado (verde) o el fermentado (negro).

En definitiva, la conclusión de los autores es la de que las propiedades antioxidativas de los extractos de té pueden explicar la acción antimutagénica de los mismos.

Sin entrar en el estudio en profundidad del proceso, no se puede dejar de reseñar que las actividades antioxidantes de los extractos de té tienen su contrapunto, ya que dependiendo de su concentración estos mismos extractos se convierten en pro-oxidantes. Acción ésta que puede conducir al daño oxidativo del ADN, de sus propias bases y de la deoxirribosa, moléculas claves desde el punto de vista fisiológico.

El trabajo de Yen y colaboradores (53) trata de demostrar cuales deben ser las condiciones para que dicha actividad pro-oxidante se ponga de manifiesto, apuntando que el mecanismo puede estar en la capacidad de los polifenoles para reducir metales, concretamente el Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual puede reaccionar con O_2 o H_2O_2 para dar origen a la formación de radicales hidroxilos responsables del daño oxidativo.

Los datos experimentales demuestran que la oxidación de la deoxirribosa se produce con los extractos de té de las variedades verde, «pouchong» y «oolong», a concentraciones entre 0,025 mg y 0,5 mg, en el que adquiere su valor máximo para decrecer al aumentar la concentración hasta 1,75 mg. A la citada concentración de 0,5 mg el daño oxidativo de la deoxirribosa era 3,1-3,1 y 3,5 veces mayor que el control en ausencia del extracto para las tres variedades citadas.

La variedad de té negro se comportaba más débilmente, con un valor de 2,6 veces, a la concentración de 0,75 mg en la que se alcanza su máximo poder oxidante.

El daño oxidativo sobre el ADN lo demuestran viendo el efecto estimulante que producen los extractos de té en la degradación del ADN por la bleomicina en presencia de O_2 y Fe^{3+} .

En este caso, la presencia del extracto de té a concentración de 0,125 mg, incrementa el proceso de degradación entre 62 y 65 veces respecto al del control; valores que se sitúan entre 2 y 8,4 veces si la concentración del extracto se eleva a 0,75 mg. También aquí para este ensayo, el té negro presenta una acción estimuladora de la oxidación del ADN más débil que la de las otras variedades.

Datos como vemos del mayor interés por el papel que está jugando la concentración del extracto en revertir las actividades antioxidantes-prooxidantes. No olvidemos sin embargo, que se están comentando resultados de ensayos *in vitro*, cuyo reflejo *in vivo* tiene que ser demostrado por los ensayos correspondientes.

* * *

Otro mecanismo que puede originar daño oxidativo en nuestro organismo, es a través del óxido nítrico (NO) una molécula con un electrón no apareado que se caracteriza por una reactividad relativamente baja. Sin embargo, en las células endoteliales vasculares y en los macrófagos, al producirse el NO simultáneamente con el ión radical superóxido O_2^- , se origina el peroxinitrito ($ONOO^-$), que al protonarse se forma el ácido peroxinitroso ($ONOOH$). De estos compuestos, el $ONOO^-$ es un oxidante muy potente de los grupos $-SH$, y el $ONOOH$ por su parte induce la peroxidación lipídica a través de un estado excitado, caracterizado por una reactividad equivalente a la del radical hidroxilo (OH^*).

Por otra parte, el $ONOO^-$ en presencia de metales de transición, como puede ocurrir por el contacto con la enzima superóxido dismutasa, da origen a la formación del ión nitronium (NO_2^+) caracterizado por su actividad nitrante frente a los aminoácidos aromáticos, lo que afecta a los residuos de tirosina.

Interesaba pues conocer si los polifenoles antioxidantes de los extractos de té son capaces de secuestrar al $ONOO^-$, y actuar como preventivo del posible daño oxidativo *in vivo*.

Con este fin hay un trabajo (54) que estudia el efecto inhibitor de los componentes fenólicos del té verde frente al $ONOO^-$. Para ello prepara el extracto con 50 gramos de hojas de té verde y 1 litro de agua

destilada a la temperatura de 70°C, con agitación durante 5 minutos. El extracto sobrenadante lo liofiliza y en el residuo seco extrae los taninos, de los que por HPLC separa los siguientes: epigallocatequina 3-0-galato; galocatequina 3-0 galato, epicatequina 3-0-galato, epigallocatequina, epicatequina y catequina.

La actividad inhibitoria de estos compuestos la comparan con la que presenta la penicilamina, un conocido secuestrador del ONOO⁻ *in vitro*.

Los resultados experimentales vienen a demostrar que los secuestradores más activos fueron: epigallocatequina-3-0- galato y la galocatequina 3-0 galato. Estos compuestos han presentado un IC₅₀ de 20 µM frente a los 60 µM de la penicilamina.

Si este comportamiento puede tener su confirmación por ensayos *in vivo* no cabe duda que nos encontraríamos ante un prometedor antioxidante natural, con un amplio espectro de actividad frente a los sistemas oxidativos. La mayor dificultad para este tipo de ensayos *in vivo* en los humanos es la presencia en su dieta de otros tipos de polifenoles, muy variable dependiendo de los componentes de la misma.

Por eso Zeyman y colaboradores (55) plantean su trabajo utilizando ratas adultas (12 meses) Sprague-Dawley, razonando que los resultados en ellas serían comparables a los que se obtendrían con los humanos de edades entre 50 y 60 años, dado que la vida media de estas ratas está alrededor de los 18 meses.

Durante 75 días incorporan a la dieta polvo de hojas de té verde y negro, y en el agua de bebida extractos de los mismos. A continuación, y después de 15 horas de ayuno, se anestesian los animales para extraerles la sangre y el hígado, al objeto de poder determinar los siguientes parámetros: glucosa y triglicéricos en la sangre, actividad de la superóxido dismutasa en hematíes e hígado, y el contenido en dialdehído malónico en el hígado.

De los resultados analíticos se desprende que la glucosa en sangre desciende en un 23,9% en los animales suplementados con las hojas o el extracto del té verde, y en un 22,8% en los suplementados con té negro.

Los triglicéridos por su parte, se reducen igualmente en unos porcentajes del 33,3% y 25%.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa se incrementa en un 117% con el té negro, y en un 90,8% en el té verde, lo que es indicativo de un aumento de la actividad antioxidante endógena, inducida por los componentes del té.

Por su parte el contenido de dialdehído malónico en el hígado disminuye significativamente en un 34,6% en los grupos suplementados con té negro, y en un 25,4% en los de té verde; todo ello en relación con el grupo control.

Si recordamos que el contenido en dialdehído malónico es un indicativo del daño oxidativo, se puede concluir que la actividad antioxidante del té negro es aparentemente superior a la del té verde.

A la hora de establecer los mecanismos que conducen a los efectos reseñados, se considera que la disminución de la tasa de glucosa puede ser debida a la difenilamina y a los polisacáridos del té. La primera de ellas propiciaría un aumento del metabolismo de la glucosa, mientras que los segundos actuarían a nivel intestinal inhibiendo su absorción.

El mecanismo de reducción de los triglicéridos está menos claro, aunque se apunta a que los polifenoles por su capacidad de enlace a las proteínas podrían estar inhibiendo la actividad de las enzimas digestivas, reduciendo así la digestibilidad y absorción de los lípidos de la dieta.

En definitiva que nos encontramos con nuevos datos experimentales relativos a las actividades antioxidantes del té en las ratas, que están demandando su confirmación en los humanos.

9. TRATAMIENTO CONSERVADORES DE ALIMENTOS

El poder suprimir las reacciones que conducen a la oxidación lipídica en los alimentos, es de una importancia crítica en la industria alimentaria, ya que de lo contrario no sólo nos vamos a encontrar con una pérdida del valor nutricional del alimento, sino que también pueden generarse los típicos olores del enranciamiento y en algunos casos, moléculas con acción tóxica sobre el organismo humano.

En evitación de ello, se ha venido utilizando unas moléculas antioxidantes sintéticas del tipo del hidroxianisol butilado (BHA) o el hidroxitolueno butilado (BHT). Pero debido al hecho de que ambos productos, en experiencias con animales, han resultado responsables de alteraciones hepáticas y sospechosas de promover carcinogénesis, la investigación en este campo está centrada en tratar de identificar antioxidantes naturales que puedan suplir y mejorar si ello es posible, las capacidades antioxidantes de las citadas moléculas sintéticas.

Como ejemplo de este tipo de investigaciones nos referiremos a los estudios realizados con la ovoalbúmina (56) de la que ya se conocía con anterioridad su efecto protector frente a la oxidación lipídica, aunque muy inferior en cuanto a capacidad antioxidante a la que presentan el BHA y el BHT.

Por ello, teniendo en cuenta los trabajos de Lingnert y Eriksson (57) que demuestran la formación de antioxidantes cuando reaccionan azúcares y aminoácidos en la conocida reacción de Maillard, los autores se plantean mejorar las características antioxidantes de la ovoalbúmina al conjugarla con dextrano en condiciones controladas de calor seco, con objeto de que se den las circunstancias favorables para la reacción de Maillard entre los grupos aminos de la proteína y los carbonilos del polisacárido.

El producto así formado demuestra una muy significativa supresión de la oxidación lipídica, en comparación a la mezcla simple en iguales proporciones de ovoalbúmina y dextrano.

Lo mismo ocurre en el ensayo de enranciamiento, al suprimir el olor típico en un modelo de alimento, durante su almacenamiento por 7 días, mientras que el olor aparece a los 4 días al utilizar la mezcla, y a los sólo 2 días en el control.

En el ensayo de inhibición en la generación de superóxidos, los resultados a igualdad de concentración en todos los casos, fueron: ovoalbúmina 15%, mezcla ovoalbúmina-dextrano, 17,7% y el del conjugado ovoalbúmina-dextrano 25,4%.

A efectos comparativos se puede concluir que las actividades antioxidantes del producto obtenido por una reacción de Maillard contro-

lada entre la ovoalbúmina y el dextrano, a la concentración del 0,1%, es equivalente a la de los antioxidantes BHT y BHA al 0,001%.

El producto cumple con todas las exigencias de carencia de toxicidad por ingestión oral en animales y el ser negativo en la prueba de acción mutágena de Ames.

Con posterioridad a estos estudios, los mismos investigadores orientan sus trabajos basándose en la doble propiedad de los antioxidantes que o bien actúan como secuestradores de radicales libres, o como agentes quelantes capaces de inhibir la oxidación lipídica catalizada por metales, como puede ser el hierro.

Fijan su atención en la fosvitina, una glicoproteína con un peso molecular de 35.000 y con una estructura que se caracteriza por presentar numerosos residuos de fosfoserina alineados en secuencias de ocho elementos, sin otros aminoácidos intercalados.

La fosvitina fue identificada en la yema de huevo, como una proteína transportadora de hierro, con tan alta actividad que el 95% del hierro contenido en la yema del huevo se encuentra unido a la fosvitina.

Con estas características de la fosvitina, los autores del trabajo (58) se plantean incrementar su propio poder antioxidante, conjugándola con un galactomanano en las condiciones apropiadas para una reacción de Maillard.

El producto formado presenta unas actividades antioxidantes semejantes a las que se han visto en la ovoalbúmina-dextrano. Así por ejemplo, retarda el olor de enranciamiento por 7 días, e inhibe la generación de superóxido en un 28,3%.

La principal ventaja de este conjugado fosvitina-galactomanano es que no pierde su actividad si se somete en autoclave a 121°C y 2 atmósferas durante 15 minutos, cosa que no ocurre con la mezcla simple de los dos compuestos. Ello quiere decir que por efecto de la conjugación del galactomanano se protege a la fosvitina de su desnaturalización por el calor, manteniendo su capacidad de quelación con el hierro.

Este hecho puede ser de gran utilidad en aquellos casos en los que la elaboración de los alimentos requieran de un determinado proceso térmico.

Otro ejemplo lo podemos encontrar en el trabajo de Richards y colaboradores (59) quienes realizan un estudio sobre el efecto en la calidad final de filetes de pescado refrigerados o congelados, cuando en su preparación se someten a lavados con antioxidantes o sin ellos. Contemplan también los resultados finales si el propio proceso de preparar los filetes se realiza dentro del agua con antioxidantes.

El antioxidante usado en las experiencias es en este caso, el ascorbato sódico a una concentración del 0,2%, junto al tripolifosfato sódico también al 0,2%.

En las conclusiones finales del trabajo consideran el alto coste que este tipo de tratamientos puede tener, por la continua renovación de las aguas con el antioxidante, al quedar contaminadas por la propia sangre de los pescados, además del reto que representa el diseño del equipo industrial para desarrollar estos trabajos.

10. CONSIDERACIONES FINALES

En condiciones normales podemos considerar que en nuestro organismo debe existir un perfecto equilibrio entre la producción de los radicales libres, y los procesos que conllevan a la eliminación de las formas reactivas del oxígeno. Sin embargo, cuando las fuentes de producción de los radicales libres supera a los sistemas de defensa antioxidante de nuestro organismo, se dice que nos encontramos en un proceso de estrés oxidativo.

Dicho proceso juega un papel muy importante en la génesis del daño celular, lo que lleva como consecuencia que se le atribuya su participación en diferentes estados patológicos, tales como la inflamación, infección y procesos isquémicos, a los cuales ya nos hemos referido con anterioridad. No se ha hecho sin embargo mención al ojo, una estructura muy especializada y de una gran sensibilidad para los radicales libres.

En el caso del cristalino hay estudios que sugieren que antioxidantes del tipo de las vitaminas C, E y A pueden retrasar la aparición de las cataratas, y es de suponer que la carencia de las mismas podría tener el efecto contrario.

En la retinopatía diabética se habla también de la producción de radicales libres por la autooxidación del exceso de glucosa y de las proteínas glicosiladas, que no se ven contrarrestadas por las enzimas antioxidantes ya conocidas, catalasa, glutathion peroxidasa y superóxido dismutasa. El resultado para el paciente es que este desequilibrio oxidativo se manifestará por una progresiva degeneración retiniana.

Otra patología ocular, la degeneración macular asociada a la edad, de relativa frecuencia en la población mayor de 65 años, que en casos graves puede ser la causa de una ceguera irreversible, también parece que los procesos de estrés oxidativo juegan un papel importante, ya que hay datos epidemiológicos que asocian un menor riesgo de maculopatías en aquellos individuos con consumo elevado de verduras, hortalizas y frutas.

Queda bien patente las graves consecuencias de índole patológica que acompañan al estrés oxidativo, de ahí el interés de poder disponer en la analítica clínica de algún parámetro que nos permita diagnosticar precozmente la existencia de dicho estrés.

El parámetro con el que se está operando es el de la concentración de hidroperóxidos lipídicos en el plasma, que se verá incrementada en todos aquellos procesos patológicos asociados con la destrucción de las membranas celulares lipídicas (infarto agudo de miocardio, procesos reumáticos, diabetes mellitus, quemaduras y hepatopatías). En el trabajo de Díaz Fernández y colaboradores (60) se pueden encontrar datos referidos a individuos sanos, obtenidos con el equipo de reactivos LPO-586 *Bioxytech*®, *Oxis International* S.A.

Traemos estos datos a colación para dejar patente que ya se puede disponer de métodos analíticos con los que realizar ensayos epidemiológicos en gran escala, que permitan dilucidar *in vivo* el efecto protector de los distintos antioxidantes naturales presentes en nuestra alimentación, que han mostrado su eficacia por ensayos *in vitro*, como hemos tenido la ocasión de comprobar.

Hay que reconocer la dificultad para abordar con el rigor debido semejante tema, debido a su complejidad.

Son muy numerosos los trabajos publicados sobre antioxidantes polifenólicos, por lo general en mezclas muy complejas en las que cabe esperar efectos sinérgicos y antagónicos, y todo ello asociado a que la actividad viene relacionada con su estructura química. Sin embargo, los beneficios que para la salud humana pudieran conseguirse, compensarían con creces el esfuerzo investigador.

Se hace pues necesario en primer lugar, que por una Comisión de expertos se haga un estudio riguroso de cuanto se ha publicado comparando las técnicas analíticas empleadas, seleccionando aquellos resultados que hayan sido obtenidos con el rigor científico obligado. Igualmente es del mayor interés que se identifiquen las especies botánicas con las que se debe trabajar, así como su técnica de cultivo, estado de maduración en el momento de su recolección, las condiciones de almacenamiento y conservación. Todas estas circunstancias pueden condicionar los contenidos cualitativos y cuantitativos, de los polifenoles antioxidantes.

El futuro camina en el sentido de que una vez seleccionada la especie botánica que contenga el producto antioxidante que haya demostrado la mayor selectividad de acción protectora, y con una conveniente biodisponibilidad al ser ingerida, se proceda a mejorar dicha especie botánica para que aumente su rendimiento en el antioxidante deseado.

Las modificaciones genéticas de las plantas ya han comenzado su andadura en este campo, y sirva como último ejemplo el que citemos el trabajo de Shintani y Della Penna (61) para conseguir elevar el contenido en vitamina E.

El tocoferol en las plantas se encuentra bajo cuatro formas diferentes, α -, β -, γ -, y δ -, que se diferencian únicamente en el número y posición de sus grupos metilos en el anillo aromático de la molécula.

Se considera que el más importante de ellos es el α -tocoferol, en virtud de sus características de absorción y distribución en el cuerpo humano tras su ingestión. Por ello se considera, que la dosis diaria recomendada que debe ser ingerida con nuestros alimentos es la de 7 a 9 mg, lo que equivale a 10-13 unidades internacionales (UI) de vitamina E.

Sin embargo, cuando se desea disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular, algún tipo de proceso canceroso, mejorar la respuesta

del sistema inmunitario y hacer más lenta la progresión de enfermedades degenerativas (Alzheimer), la dosis diaria recomendada debe elevarse hasta las 100 o 1000 UI.

Otra observación muy importante es que las semillas oleaginosas contienen altos niveles de γ -tocoferol, que precisamente es el precursor de la síntesis del α -tocoferol, a través de la acción catalítica de la enzima γ -tocoferol metil transferasa. Por tanto será posible una mayor conversión del γ -tocoferol, si por transferencias genéticas se consigue una sobreexpresión del gen que codifica la citada enzima.

Para estos estudios han utilizado la conocida especie botánica *Arabidopsis thaliana* de la que consiguen una planta transgénica cuyas semillas contienen 80 veces el nivel de α -tocoferol, del que normalmente se encuentra en la planta salvaje, comprobándose además que más del 95% del tocoferol presente en la semilla se encuentra en forma de α -tocoferol.

Un simple cálculo pone de manifiesto que 50 gramos de un aceite obtenido con las semillas de la especie salvaje proporcionaría 9 UI de vitamina E, mientras que los mismos 50 gramos del aceite de las semillas transgénicas proporcionarían 84 UI.

Es previsible que a la vista del éxito obtenido en la sobreexpresión del gen de la γ -tocoferol metil transferasa en las semillas de *Arabidopsis*, se puedan reproducir dichos logros en las semillas de aquellas especies botánicas de las que se obtienen los aceites comestibles usados en nuestra alimentación, como puede ser el caso de las semillas de soja, que se convertirían así en la mejor fuente de vitamina E de nuestra dieta.

El interés por los antioxidantes en los alimentos es evidente, y se espera mucho de las investigaciones futuras en este campo tan prometedor.

11. BIBLIOGRAFÍA

- (1) CASCALES, M. (Coordinadora) (1997): Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Real Academia de Farmacia.
- (2) HARBONE, J.B. (1988): The Flavonoids: Advances in Research since 1980. Chapman and Hall. New York.

- (3) ATBCCPS (1994): «Alpha-tocopherol, Beta carotene Cancer Prevention Study Group» *N. Engl. J. Med.* 330, 1029-1035.
- (4) HENNEKENS, CH.; BURING, JE.; MANSON, JE.; STAMPFER, M.; ROSNER B.; COOK, NR.; BELANGER, C.; LA MOTTE, F.; GAZIANO, JM.; RIDKER, PM.; WILLETT, W.; PETO, R. (1996): «Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease» *N. Engl. J. Med.* 334, 1145-1149.
- (5) OMENA, GS.; GOODMAN, GE.; THORNQUIST, MD.; BALMES, J.; CULLEN, MR.; GLASS, A.; KEOGH, J.P.; MEYSKENS, FL.; VALANIS, B.; WILLIAMS, JH.; BARNHART, S.; HAMMA, S. (1996): «Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease» *N. Engl. J. Med.* 334, 1150-1155.
- (6) SMITH, D.M. (1975): *Cancer Res.* 35, 11.
- (7) BLOT, WJ.; LI, JY.; TAYLOR, PHR. (1993): «Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population» *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1483-1492.
- (8) VÁZQUEZ, C.; GALÁN, P.; PREZIOSI, P.; RIBAS, L.; SERRA, LL.; HERCBERG, S. (1998): «Estudio Suvimax (Francia): El Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer y la enfermedad cardiovascular» *Rev. Esp. Salud Pública* 72, 173-183.
- (9) SUZUKI, T.; KOMATSU, M.; ISONO, H. (1997): «Cytotoxicity of chlorinated Hydrocarbons and Lipid Peroxidation in Isolated Rat Hepatocytes» *Biol. Pharm. Bull.* 20 (3), 271-274.
- (10) PUHL, H.; WAEG, G.; ESTERBAUER H. (1994): «Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins» *Methods Enzymol.* 233, 425-444.
- (11) YIN, M.C.; FAUSTMAN, C. (1993): «The influence of temperature, pH and phospho-lipid composition on the stability of myoglobin and phospholipid: A liposome model» *J. Agric. Food Chem.* 41, 853-857.
- (12) MALLET, J.F.; CERRATI, C.; UCCIANI, E.; GAMISANA, J.; GRUBER M. (1994): «Antioxidant activity of plant leaves in relation to their a-tocopherol content» *Food Chem.* 49, 61-65.
- (13) VISIOLI, F.; GALLI, C. (1998): «Olive oil phenols and their potential effects on human health» *J. Agric. Food Chem.* 46, 4292-4296.
- (14) VISIOLI, F.; BELLOMO, G.; MONTEDORO, G.F.; GALLI, C. (1995): «Low-density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents» *Atherosclerosis* 117, 25-32.
- (15) WISEMAN, S.A.; MATHOT, J.N. DE FOUW, N.J.; TIJBURG, L.B. (1996): «Dietary nontocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low-density lipoprotein to oxidation in rabbits» *Atherosclerosis* 120, 15-23.
- (16) DI GIOVACCHINO, L.; SALINAS, M.; MICCOLI, M. (1994): «Effect of extration systems on the quality of virgin olive oil» *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1189-1194.

- (17) GENNARO, L.; PICCIOLI BOCCA, A.; MODISTI, D.; MASELLA, R.; CONI, E. (1998): «Effect of biophenols on olive oil stability evaluated by thermogravimetric analysis» *J. Agric. Food Chem.* 46: 4465-4469.
- (18) HERTOOG, M.G.L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN M.; SIMIC, B.S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. (1995): «Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in seven countries study» *Arch. Inter. Med.* 155, 381-386.
- (19) HERTOOG, M.G.L.; HOLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT D. (1993): «Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands» *Nutr. Cancer* 20, 21-29.
- (20) VINSON, J.A.; HAO, Y.; SU X.; ZUBIK, L. (1998): «Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables» *J. Agric. Food Chem.* 46, 3630-3634.
- (21) VINSON, J.A.; JANG, J.; BABBAGH, Y.A.; SERRY, M.; CAÍ, S. (1995): «Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease» *J. Agric. Food Chem.* 43, 2798-2799.
- (22) CROZIER, A.; LEAN, M.E.J.; McDONALD, M.S.; BLACK, CH. (1997): «Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery» *J. Agric. Food Chem.* 45, 590-595.
- (23) CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. (1996): «Antioxidant capacity of tea and common vegetables» *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426-3431.
- (24) GAZZANI, G.; PAPETTI, A.; MASSOLINI, G.; DAGLIA, M. (1998): «Anti and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment» *J. Agric. Food Chem.* 46, 4118-4122.
- (25) YIN, M.; CHENG, W. (1998): «Antioxidant activity of several Allium members» *J. Agric. Food Chem.* 46, 4097-4101.
- (26) WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. (1996): «Total antioxidant capacity of fruits» *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705.
- (27) WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. (1997): «Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins» *J. Agric. Food Chem.* 45, 304-309.
- (28) NOGATA, Y.; YOZA, K.; KUSUMOTO, K.I.; KOHYAMA, N.; SEKIYA, K.; OHTA, H. (1996): «Screening for inhibitory activity of citrus fruit extracts against platelet cyclooxygenase and lipoxygenase» *J. Agric. Food Chem.* 44, 725-729.
- (29) BAILEY, D.G.; SPENCE, J.D.; MUÑOZ, C. (1991): «Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine» *Lancet* 337, 268-269.
- (30) BAILEY, D.G.; ARNOLD, J.M.O.; MUÑOZ, C.; SPENCE, J.D. (1993): «Grapefruit juice felodipine interaction: mechanism predictability and effect of naringin» *Clin. Pharmacol. Ther.* 53, 637-642.
- (31) JOSEFSSON, M.; ZACKRISSON, A.; AHLNER, J. (1996): «Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of amlodipine in healthy volunteers» *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 51, 189-193.
- (32) BAILEY, D.G.; ARNOLD, J.M.O.; STRONG, H.A.; MUÑOZ, C.; SPENCE, J.D. (1993): «Effect of grapefruit juice and naringin on nisoldipine pharmacokinetics» *Clin. Pharmacol. Ther.* 54, 589-594.

- (33) LUNDAHL, J. (1995): «Relationship between time of intake of grapefruit juice and its effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine in healthy subjects» *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 49, 61-67.
- (34) BAILEY, DG.; ARNOLD, JMO.; BEND, JR.; TRAN, LT.; SPENCE, JD. (1995): «Grapefruit juice felodipine interaction, reproducibility and characterization with the extended release drug formulation» *Br. J. Clin. Pharmacol.* 40, 135-140.
- (35) SPENCE, JD. (1997): «Drug interactions with grapefruit. Whose responsibility is it to warn the public?» *Clin. Pharmacol. Ther.* 61, 395-400.
- (36) KANTOLA, T.; KIVISTÖ, K.T.; NEUVONEN, P.J. (1998): Grapefruit juice greatly increases serum concentrations of lovastatin and lovastatin acid» *Clin. Pharmacol. Ther.* 63, 397-402.
- (37) HUKKINEN, SK.; VARHE, A.; OLKKOLA, K.T. (1995): «Plasma concentrations of triazolam are increased by concomitant ingestion of grapefruit juice» *Clin. Pharmacol. Ther.* 58, 127-131.
- (38) KUPFERSCHMIDT, HUT.; HA, HR.; ZIEGLER, WH. (1995): «Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans» *Clin. Pharmacol. Ther.* 58, 20-28.
- (39) TANIGUCHI, S.; KOBAYASHI, H.; ISII, M. (1996): *Arch. Dermatol.* 132, 1249.
- (40) KUPFERSCHMIDT, HHT, FATTINGER, K.E.; HA, HR.; FOLLATH, F.; KRÄHENBÜHL S. (1998): «Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man» *Br. J. Clin. Pharmacol.* 45, 355-359.
- (41) TAKANAGA, H.; OHNISHI, A.; MATSUO, H.; SAWADA, Y. (1998): «Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in Caco-2 cells» *Biol. Pharm. Bull.* 21 (10), 1062-1066.
- (42) EDWARDS, D.J.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M. (1996): «Identification of 6',7' dihydroxybergamottin a cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice» *Drug Metab. Dispos.* 24, 1287-1290.
- (43) SCHMIEDLIN-REN, P.; EDWARDS, D.J.; FITZSIMMONS, M.E.; HE, K.; LOWN, K.; WOSTER, P.M.; RAHMAN, A.; THUMMEL, K.E.; FISHER, J.M.; HOLLENBERG, P.F.; WATKINS, P.B. (1997): «Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins» *Drug Metab. Dispos.* 25, 1228-1233.
- (44) FRANKEL, E.N.; KANNER, J.; GERMAN, J.B.; PARKS, E.; KINSELLA, J.E. (1993): «Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol» *Lancet* 341, 454.
- (45) KAUNER, J.; FRANKEL, E.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E. (1994): «Natural antioxidants in grapes and wines» *J. Agric. Food Chem.* 42, 64-69.
- (46) LANNINGHAM-FOSTER, L.; CHEN, CH.; CHANCE, D.S.; LOO, G. (1995): «Grape extract inhibits peroxidation of human low density lipoprotein» *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1347-1351.
- (47) VINSON, J.A.; HONTZ, B.A. (1995): «Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines» *J. Agric. Food Chem.* 43, 401-403.

- (48) LAPIDOT, T.; STELA, H.; BEZALEL, A.; GRANIT, R.; KANNER J. (1999): «pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidant» *J. Agric. Food Chem.* 47, 67-70.
- (49) FRANCIS, F.J. (1992): «A new group of food colorants» *Trends Food Sci. Technol.* 3, 27-31.
- (50) SAURA-CALIXTO, F. (1998): «Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potencial food ingredient» *J. Agric. Food Chem.* 46, 4303-4306.
- (51) HERTOOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VAN DE PUTTE, B. (1993): «Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices» *J. Agric. Food Chem.* 41, 1242-1246.
- (52) YEN, G.C.; CHEN, H.Y. (1995): «Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity» *J. Agric. Food Chem.* 43, 27-32.
- (53) YEN, G.C.; CHEN, H-Y.; PENG H-H. (1997): «Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts» *J. Agric. Food Chem.* 45. 30-34.
- (54) CHUNG, H.Y.; YOKOZAWA, T.; SOUNG, D.Y.; KYE, I.S.; NO, J.K.; BAEK, B.S. (1998): «Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin» *J. Agric. Food Chem.* 46, 4484-4486
- (55) ZEYNAN, D.; BIUGYIN, T.; XIAOLIN, L.; JUNMING, H.; YIFENG, C. (1998): «Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the blood tryglicerides and antioxidation *J. Agric. Food Chem.* 46, 3875-3878.
- (56) NAKAMURA, S.; KATO, A.; KOBAYASHI K. (1992): «Enhanced antioxidative effect of ovoalbumin due to covalent binding of polysaccharides in aged rats» *J. Agric. Food Chem.* 40, 2033-2037.
- (57) LINGNERT, H.; ERIKSSON, C.E. (1980): «Antioxidative Maillard reaction products. I. Products rom sugars and free amino acids». *J. Food Process. Preserv.* 4, 161-172.
- (58) NAKAMURA, D.; OGAWA, M.; NAKAI, S.; KATO, A.; KITTS, D.D. (1998): «Antioxidant activity of a Maillard-type phosvitin-galactomannan conjugate with emulsifying properties and heat stability» *J. Agric. Food Chem.* 46, 3958-3963.
- (59) RICHARDS, M.P.; KELLEHER, S.D.; HULTIN, H.O. (1998): «Effect of washing with or whithout antioxidant on quality retention of Mackerel fillets during refrigerated and frozen storage» *J. Agric. Food Chem.* 46, 4363-4371.
- (60) DÍAZ-FERNÁNDEZ, J.; SERRANO, E.; COLOMINA, J.; HERNÁNDEZ, M-D.; ALCAREZ, V.; CARBONELL, L.F. (1999): «Evaluación de un equipo para la cuantificación de lipoperóxidos e intervalos de referencia en individuos adultos» *L'Eurobiologiste* 239, 41-45.
- (61) SHINTANI, D.; DELLAPENNA, D. (1998): «Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering» *Science* 282, 2098-2100.