



Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TESIS DOCTORAL EUROPEA

**Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de
un producto rico en antioxidantes**

***In vitro* and *in vivo* evaluation of the functionality of an
antioxidant-rich product**

Francisco Javier García Alonso

Murcia 2005

Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes

Memoria presentada por el Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
D. Francisco Javier García Alonso para optar al grado de Doctor Europeo, en el Área de
Conocimiento de Nutrición y Bromatología.

Directores:

Dra. María Jesús Periago Castón. Profesora Titular de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Dr. Gaspar Francisco Ros Berruezo. Catedrático del Área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Dra. María Luisa Vidal Guevara. Departamento de Investigación y Desarrollo. Hero España. S.A.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Estructura de la tesis y objetivos</i>	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>El estrés oxidativo en la salud humana</i>	13
2.2 <i>Compuestos fenólicos y diseño de alimentos funcionales</i>	22
2.3 <i>Evaluación de la efectividad de alimentos ricos en antioxidantes</i>	40
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1 <i>Estudio 1. Evaluación de las propiedades antioxidantes de un postre de uvas, cerezas y bayas durante el almacenamiento</i>	53
3.2 <i>Estudio 2. Evaluación de la actividad antiproliferativa y citoprotectora de un zumo rico en compuestos fenólicos en células HepG2</i>	68
3.3 <i>Estudio 3. Un zumo rico en compuestos fenólicos previene el daño al ADN y la citotoxicidad inducida por tert-butilhidroperóxido en células U937</i>	87
3.4 <i>Estudio 4. Estado nutricional y antioxidante de un grupo de ancianos institucionalizados de Murcia (España)</i>	104
3.5 <i>Estudio 5. Estrés oxidativo en un grupo de ancianos institucionalizados tras la ingesta de un postre rico en compuestos fenólicos</i>	120
3.6 <i>Estudio 6. Efecto a corto plazo de la ingesta de un zumo de frutas rico en compuestos fenólicos sobre biomarcadores del estrés oxidativo en individuos sanos</i>	135
4. DISCUSIÓN GENERAL	157
5. CONCLUSIONES	178
6. RESUMEN	183
7. BIBLIOGRAFÍA	188

CONTENTS

1. INTRODUCTION	1
1.1 <i>Planning of the thesis and objectives</i>	3
2. REVIEW	12
2.1 <i>Oxidative stress and human health</i>	13
2.2 <i>Phenolic compounds and design of functional foods</i>	22
2.3 <i>Evaluation of the effectiveness of antioxidant-rich foods</i>	40
3. RESULTS AND DISCUSSION	52
3.1 <i>Study 1. Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry and berries</i>	53
3.2 <i>Study 2. Antiproliferative and cytoprotective activities of a phenolic-rich juice in HepG2 cells</i>	68
3.3 <i>Study 3. Phenolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells via an iron-chelating mechanism</i>	87
3.4 <i>Study 4. Nutritional and antioxidant status of a group of institutionalized elderly from Murcia (Spain)</i>	104
3.5 <i>Study 5. Oxidative stress status in an institutionalized elderly group after the intake of a phenolic-rich dessert</i>	120
3.6 <i>Study 6. Short-term effect of the intake of a phenolic-rich juice on biomarkers of antioxidant protection in healthy subjects</i>	135
4. GENERAL DISCUSSION	157
5. CONCLUSIONS	178
6. SUMMARY	183
7. LITERATURE CITED	188

ABREVIATURAS-ABREVIATURES

%	Porcentaje/percentage
Δ	Incremento/increment
μg	Microgramo/microgram
μL	Microlitro/microlitre
μM	Micromolar/micromolar
μm	Micrómetro/micrometre
μm ³	Micrometro cúbico/cubic micrometre
μmol	Micromol
μmol/L	Micromol por litro/micromol per litre
μU/L	Microunidades por litro/microunits per litre
μU	microunidades/microunits
4-AP	4-amino fenazona/4-amino phenazone
AAS	Semiadehido-2-aminoadípico/2-aminoadipic semialdehyde
AAT	Actividad antioxidante total/total antioxidant activity
ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) radical cation
ABTS ^{•+}	Radical catión del ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin sulfónico
ABTS	Ácido 2, 2'-diazino-di-(3-etilbenzotiazolín) sulfónico
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
ADN, DNA	Ácido desoxirribonucleico/deoxyribonucleic acid
AGEs	Productos finales de glicación avanzada/advanced glycation end-products
AICR	American Institute for Cancer Research
ANCOVA	Análisis de la covarianza
ANOVA	Análisis de la varianza/analysis of variance
AOAC	Asociación Oficial de Analistas Químicos/ Association of Official Analytical Chemists
ARN, RNA	Ácido ribonucleico/ribonucleic acid
ATP	Adenosina trifosfato/Adenosine triphosphate
BERM	Boletín Epidemiológico de la Región de Murcia
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno/butylated hydroxytoluene
BMI	Body mass index
BSA	Albúmina sérica bovina/bovine serum albumin
CARM	Comunidad Autónoma de la Región de Murcia
CAT	Catalasa/catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzoceno/1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CG-MS	Gas chromatography-Mass Spectrometry
% loss a*	% de variación del parámetro a* del color/% of variation of a* colour value
% loss TAn	porcentaje de pérdida de antocianos/percentage of anthocyanin losses

ΔE.....	Variación de la diferencia de color/colour difference
·OH.....	Radical hidroxilo/hydroxyl radical
8-OHdG.....	8-oxo-7,8-dihidroguanina/8-oxo-7,8-dihydroguanine
AAPH.....	2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) dihydrochloride
AAPH.....	Dihidrocloruro de 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano)
Apo-B.....	Apolipoproteína B100/apolipoprotein B100
C.....	Croma métrico/metric chroma
CEBAS.....	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
CIE.....	Commission International de l'Eclairage
cm.....	Centímetro/centimetre
cm ²	Centímetro cuadrado/square centimetre
°C.....	Grado centígrado/Celsius
CRP.....	Proteína C reactiva/C-reactive protein
CsA.....	Ciclosporina A/cyclosporin A
CSIC.....	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DHR.....	Dihidrorodamina/Dihydrorhodamine
dL.....	Decilitro/decilitre
DMSO.....	Dimetilsulfóxido/dimethylsulfoxide
DNPH.....	2,4-defenilhidracina/2,4-diphenylhydrazine
DPPD.....	N,N'-difenil-1,4-fenilendiamina/N,N'-diphenyl-1,4-phenylene-diamine
DPPH.....	2,2'-difenil-1-picril hidrazilo/2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
2,4-DCPS.....	2,4-diclorofenol sulfonado/sulphonated-2,4-dichlorophenol
EB.....	Grupo de ancianos antes del estudio/elderly baseline group
EC ₅₀	Dosis media efectiva/median effective dose
EDTA.....	Ácido etiléndiaminotetraacético/ethylenediaminetetra-acetic acid
ELISA.....	Ensayo inmunoenzimático/enzyme linked immunoassay
ENCA.....	Encuesta Nutricional de Canarias
EPIC.....	Estudio Prospectivo Europeo sobre Dieta, Cáncer y Salud
Eq, eq.....	Equivalente/equivalent
ET.....	Grupo de ancianos tratados/elderly treated group
FAO.....	Food and Agriculture Organization
FD.....	Factor de dilución/dilution factor
Fe ²⁺ o Fe (II).....	Catión ferroso/ferrous iron
Fe ³⁺ o Fe (III).....	Catión férrico/ferric iron
FRAP.....	Capacidad de reducir el hierro férrico/Poder antioxidante
FRAP.....	Ferric reducing ability of plasma
g.....	Gravedad/gravity
g/dL.....	Gramos por decilitro/grams per decilitre
GAE.....	Equivalentes de ácido gálico/gallic acid equivalents
Gamma-GT.....	Gamma glutamil transpeptidasa/gamma glutamyl transpeptidase

GC.....	Cromatografía de gases/gas chromatography
GC-MS.....	Cromatografía de gases-espectroscopía de masas
GGs.....	Semialdehído- <i>gamma</i> -glutámico/ <i>gamma</i> -glutamic semialdehyde
GOT.....	Transaminasa glutámico oxalacética/glutamic oxalacetic transaminase
GPx.....	Glutación peroxidase/glutathione peroxidase
GRed.....	Glutación reductasa/glutathione reductase
GSH.....	Glutación reducido/reduced glutathione
GSSG.....	Glutación oxidado o disulfuro de glutación/oxidized glutathione or glutathione disulfide
GST.....	Glutación-s-transferasa/glutathione-s-transferase
GTP.....	Transaminasa glutámico pirúvica/glutamic pyruvic transaminase
H ⁺	Protón/Proton
H.....	Ángulo <i>hue</i> /Hue angle
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno/hydrogen peroxide
HDL.....	Lipoproteína de alta densidad/high-density lipoprotein
HepG2.....	Línea celular de carcinoma hepático humano/human hepatocyte carcinoma cell line
HOO [•]	Radical hidroperóxido/hydroperoxyl radical
HPLC.....	Cromatografía líquida de alta resolución/high performance liquid chromatography
HPLC-ED.....	Cromatografía líquida de alta resolución-detección electroquímica
HPLC-ED.....	High performance liquid chromatography-electrochemical detection
HPLC-MS.....	Cromatografía líquida de alta resolución-espectroscopía de masas
HPLC-MS.....	High performance liquid chromatography-Mass Spectroscopy
HR.....	Grupo de referencia de individuos sanos/healthy reference group
I+D.....	Investigación y desarrollo/Research and Development
IDR.....	Ingesta diaria recomendada
IMC.....	Índice de masa corporal
ISSORM.....	Instituto de Servicios Sociales de la Región de Murcia
Kcal.....	Kilocaloría/Kilocalorie
Kj.....	Kilojulio/kilojoule
Kg.....	Kilogramo/kilogram
Kg/m ²	Kilogramo por metro cuadrado/kilograms per square metre
L.....	Litro/Litre
LDL.....	Lipoproteína de baja densidad/low-density lipoprotein
M.....	Molar/molar
m ²	Metro cuadrado/square metre
MAPA.....	Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación
MDA.....	Malondialdehído/malondialdehyde
MEM.....	Medio mínimo esencial con sales de Earle/minimum essential medium with Earle's salts
MetMb.....	Metamioglobina/metmyoglobin
mg.....	Miligramo/milligram
mg/L.....	Miligramo por litro/milligram per litre

min.....	Minuto/minute
mL.....	Mililitro/millilitre
mM.....	Milimolar/millimolar
mm.....	Milímetro/millimetre
mm ³	Milímetro cúbico/cubic millimetre
mmol.....	Milimol/millimol
MPA.....	Ácido metafosfórico/metaphosphoric acid
MPT.....	Transición de permeabilidad mitocondrial/mitochondrial permeability transition
MTT.....	3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MTT.....	Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
mU/L.....	Miliunidades por litro/milliuunits per litre
mU.....	Miliunidades/milliuunits
N.....	Normal/normal
NADH.....	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADH.....	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form)
NADPH.....	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NADPH.....	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NCR.....	National Research Council
Nd, ND.....	No detectado/Not detected
nm.....	Nanómetro/nanometre
NO [•]	Radical óxido nítrico/nitric oxide radical
NO ₂ [•]	Radical dióxido de nitrógeno/nitrogen dioxide radical
O ₂ ^{•-}	Superoxido/superoxide
¹ O ₂	Oxígeno singlete/singlet oxygen
-OH.....	Grupo hidroxilo/hydroxyl group
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
o-phe.....	<i>orto</i> -fenantrolina/ <i>ortho</i> -phenanthroline
PASSCLAIM.....	Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods
PASSCLAIM.....	Procesos de evaluación científica de las declaraciones nutricionales de los alimentos
PBS.....	Tampón fosfato salino/Phosphate buffered saline
pg.....	Picogram/picogram
ppm.....	Partes por millón/parts per million
R [•]	Radical alquilo/alkyl radical
Ratio Ca/P.....	Relación calcio fosforo dietético/ratio of dietary calcium and phosphorus
RDA.....	Ingesta diaria recomendadaRecommended dietary allowances
RL.....	Radicales libres/free radicals
RNSF.....	Factor relativo de expansión del núcleo/relative nuclear spreading factor
RO [•]	Radical alcoxilo/alkoxyl radical

ROO*	Radical peroxilo/peroxyl radical
ROO*	Radical peroxilo/peroxyl radical
ROOH	Hidroperóxido/hydroperoxide
ROONO	Alquil peroxinitritos/alkyl peroxinitrites
ROS	Especies reactivas del oxígeno/reactive oxygen species
rpm	Revoluciones por minuto/revolutions per minute
SD	Desviación típica/standard deviation
SEM	Error estándar de la media/Standard error of the mean
SOD	Superóxido dismutasa/superoxide dismutase
STMS	Short-Term Scientific Missions
TAn	Antocianos totales/total anthocyanis
TBA	Ácido tiobarbitúrico/thiobarbituric acid
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico/thiobarbituric acid reacting substances
tB-OOH	tert-butil hidroperóxido/tert-butyl hydroperoxide
TEAC	Actividad antioxidante en equivalentes Trolox/Trolox equivalent antioxidant capacity
TEII	Ácidos elágicos totales/total ellagic acids
TFI	Flavonoles totales/total flavonols
THy	Ácidos hidroxicinámicos totales/total hydroxycinnamic acids
TPTZ	2,4,6-Tripiridiltriazina/2,4,6-tripyridyl triazine
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico
TSt	Estilbenos totales/total stilbenoids
U/L	Unidades por litro/units per litre
U	Unidades/units
U937	Línea celular de leucemia mieloide humana/human myeloid leukaemia cell line
UI/L	Unidades internacionales por litro/international units per litre
UI	Unidades Internacionales/International Units
UV	Ultravioleta/ultraviolet
UV-VIS	Ultravioleta-Visible/Ultraviolet-Visible
VCT	Valor calórico total/total caloric value
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad/very low-density lipoprotein
WCRF	World Cancer Research Foundation
WCRF	World Cancer Research Foundation
WHO	World Health Organization