



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA (FARMÀCIA)

**Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de
fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante
frente a estrés oxidativo en modelos celulares**

Vanessa Ugartondo Casadevall

2009

1. INTRODUCCIÓN

“...esta es una de las principales paradojas en el campo de los radicales libres/antioxidantes que lo convierte en un terreno excitante y estimulante en el que trabajar. Es más, todos los aspectos de la vida aeróbica implican radicales libres y antioxidantes; no puedes escapar de ellos, no deberías desearlo” (Halliwell, 2007).

1.1. Radicales libres y Especies Reactivas

1.1.1. Definición y Clasificación

Los Radicales Libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado (aquél que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), pueden existir de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media (Mitjavila y col., 2001; Boots y col., 2008).

La generación de RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas del Oxígeno (reactive oxygen species, ROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales (la presencia de un "." en una especie reactiva indica que ésta posee un electrón no apareado, es decir, que es un radical). De forma análoga existen Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS), del Cloro (RCIS) y del Bromo (RBrS) (Halliwell, 2006). En la Tabla 1 se presentan las principales especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), que son los dos grandes grupos de especies reactivas implicados en la biología redox (Kohen y Nyska, 2002).

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) fisiológicas.

	ROS	Símbolo	RNS	Símbolo
Radicales	Anión superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Óxido nítrico	NO^{\cdot}
	Hidroxilo	$\cdot OH$	Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}
	Alcóxido	RO^{\cdot}		
	Peróxido	ROO^{\cdot}		
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Peroxinitrito	$ONOO^{\cdot}$
	Ácido hipocloroso	$HClO$	Ácido nitroso	HNO_2
	Ozono	O_3	Catión nitrosilo	NO^+
	Oxígeno singulete	$^1\Delta O_2$	Anión nitroxilo	$NO^{\cdot -}$
			Peroxinitritos alkilo	$ROONO$

Debido al propio funcionamiento del metabolismo aeróbico, pequeñas cantidades de ROS se generan constantemente en el organismo, la mayoría a partir de las

cadena de transporte de electrones. Destacan el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el oxígeno singulete ($^1\Delta\text{O}_2$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

1.1.2. Principales fuentes de Radicales Libres

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de ROS y RNS que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos (Dreosti, 2000). Aunque la exposición a los ROS procedentes de fuentes exógenas sea extremadamente elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a que es un proceso que se da de forma continua en las células de nuestro organismo a lo largo de la vida (Kohen, 1999).

1.1.2.1. Fuentes endógenas de Radicales Libres

Podemos distinguir cuatro fuentes endógenas que originan la mayoría de agentes oxidantes producidos por las células:

- a. En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O (Figura 1). Inevitablemente, a lo largo de este proceso aparecen subproductos como el $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ (Ames y col., 1993).

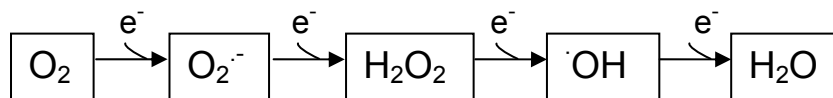


Figura 1. Agentes oxidantes derivados del metabolismo normal celular.

- b. Las células fagocíticas (leucocitos neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo (literalmente una "explosión" oxidativa) en el que se producen grandes cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}\cdot$ y OCl^- (Forman y Torres, 2001). Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica que es el principal factor de riesgo del cáncer (Ames y col., 1993).
- c. Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas, producen H_2O_2 como subproducto, que es degradado de forma natural por la enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, alguno de los peróxidos escapa a la degradación y se libera a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN (Kasai y col., 1989).
- d. Las enzimas del complejo Citocromo P450 son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN (Zangar y col., 2004).

1.1.2.2. Fuentes exógenas de Radicales Libres

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres destacan:

- los óxidos de nitrógeno (NO_x) del humo del tabaco (Elsayed y Bendich, 2001)
- las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos (química de Fenton; Figura 2) (Fenton, 1894; Kohen y Nyska, 2002)



Figura 2. Reacción de Fenton.

- los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición (Ames, 1986; Ames y col., 1990)

En la Tabla 2 se muestra una relación más detallada de los posibles agentes oxidantes exógenos a los que está expuesto nuestro organismo (Lachance y col., 2001).

Tabla 2. Principales factores externos que incrementan la producción de ROS.

Contaminantes	Fibras de asbestos Polvo de minerales Ozono Monóxido de carbono Óxido nítrico y Dióxido de nitrógeno Sílice Solventes Toxinas Hipocloritos Dióxido de sulfuro Bifenilos policlorados Paraquat y Diquat
Drogas	Acetaminoceno Coprofloxacino Antidepresivos tricíclicos Nitrofurantoínas Antidiabéticos Bleomicina Doxorubicina
Iones metálicos	Hierro Cobre Cadmio Níquel Cromo Mercurio

Radiaciones	Ultravioleta Rayos X Gamma
Dieta	Ácidos grasos poliinsaturados Glucosa
Otros	Tabaco Ejercicio intenso

1.1.3. Daños producidos por los Radicales Libres: ¿por qué son tan perjudiciales?

Cuando el organismo se ve desbordado por un exceso de RS, prácticamente cualquier estructura biológica que lo integra (ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos) puede convertirse en diana de la acción de estas especies reactivas y resultar dañada (Diplock y col., 1998). El daño causado por el ataque de ROS y RNS puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función de enzimas, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización en la célula y, en ocasiones, muerte celular por necrosis o apoptosis (Kim y col., 2006). Por este motivo, es común relacionar el daño provocado por las diversas especies reactivas con la fisiopatología de varias enfermedades como el cáncer, la diabetes (Mehta y col., 2006) y enfermedades pulmonares como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la sarcoidosis (MacNee, 2001) (Figura 3).

Es importante destacar que no todas las especies reactivas presentan la misma capacidad de reacción o son igual de reactivas. Ciertos compuestos como el H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ y NO^{\cdot} , reaccionan de forma relativamente selectiva con sólo ciertas moléculas biológicas *in vivo*, mientras que el radical $^{\cdot}OH$ es altamente reactivo, ya que reacciona instantáneamente con cualquier molécula que encuentra (Kohen y Nyska, 2002). Otra característica que diferencia a los ROS es el sitio donde actúan; los radicales libres reaccionan casi al instante en el lugar de su formación debido a su elevada reactividad, mientras que los ROS no radicalarios, como el H_2O_2 , pueden atravesar membranas biológicas y extender así su campo de acción y su posible toxicidad a zonas alejadas de su lugar de formación y durante períodos de tiempo más largos (Sawyer y Valentine, 1981; Kohen y Nyska, 2002).

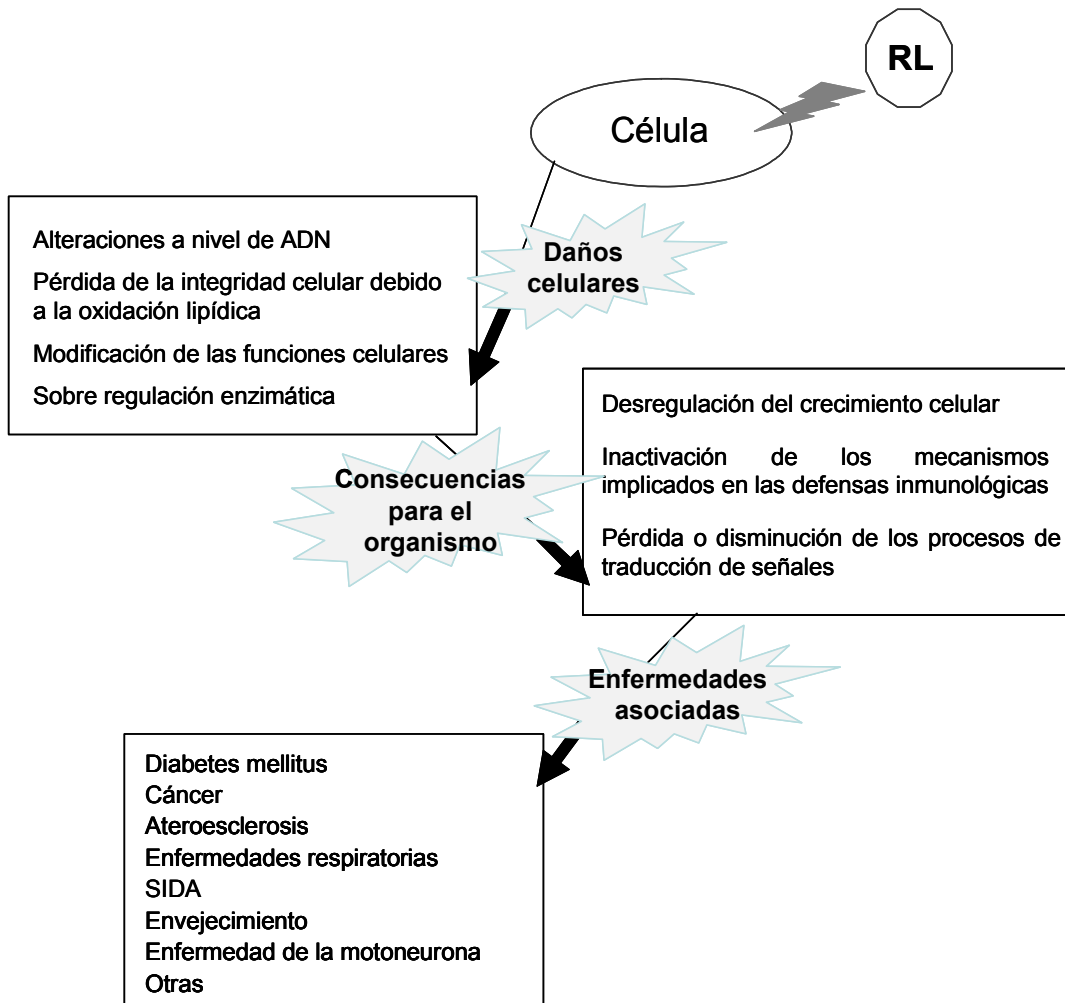


Figura 3. Daños producidos por los Radicales Libres.

Pero, ¿cómo actúan exactamente los Radicales Libres? El mecanismo de “ataque” a las estructuras biológicas se inicia cuando el RL le sustrae un átomo de hidrógeno o, alternativamente un electrón, a la molécula diana, lo que convertirá al electrón no apareado del radical en un par de electrones más estable (Figura 4). Dado que desde un punto de vista electroquímico la molécula que pierde el hidrógeno o el electrón se oxida, los RL y RS se conocen como (pro)oxidantes (Boots y col., 2008).

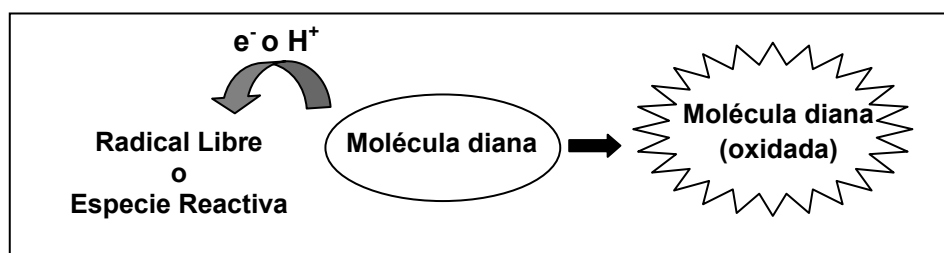


Figura 4. Mecanismo de ataque de los RL.

1.1.3.1. Principales dianas biológicas de los Radicales Libres: lípidos de membrana, proteínas y ADN

Una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducidos por los radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados presentes, mayoritariamente, en las membranas celulares. El daño a los lípidos consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación (Halliwell y Chirico, 1993). La reacción de oxidación se inicia cuando el ácido graso diana pierde un átomo de hidrógeno convirtiéndose así en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical peroxilo (ROO^\bullet). Este radical peroxilo dará lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso y, así sucesivamente en lo que constituye la etapa de propagación. Esta cadena de reacción se conoce como peroxidación lipídica (LPO) y se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra (Figura 5). La reacción en cadena finalizará cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones, (1) se consume una de las moléculas reactivas, es decir, los ácidos grasos o el oxígeno, (2) se forma un radical relativamente poco reactivo o (3) dos radicales al reaccionar forman un par no radical. Entre los productos formados durante la peroxidación lipídica se incluyen, entre otros, el 4-hidroxi-2-alquenal y el malondialdehído (MDA); este último presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases de ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas que pueden estar implicadas en la patogenia de varias enfermedades (Spiteller, 2001).

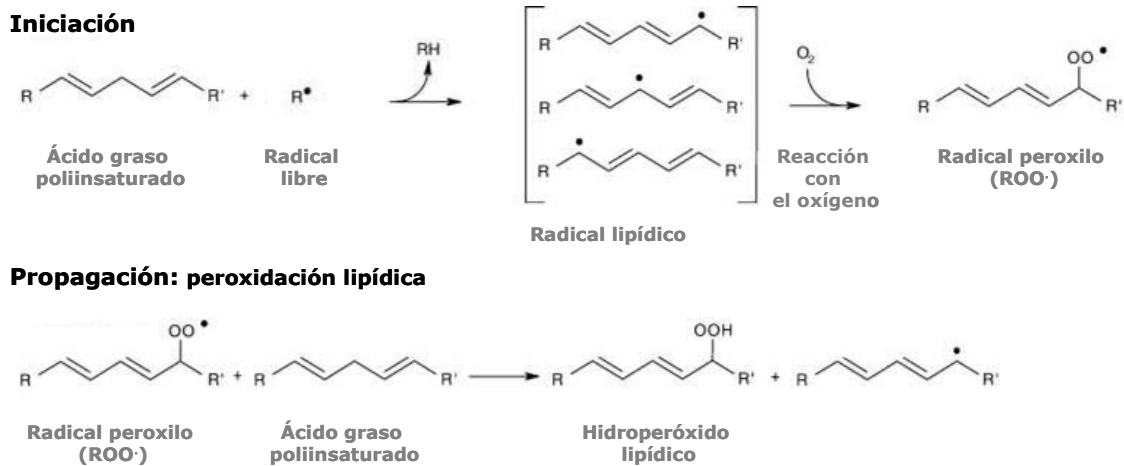


Figura 5. Proceso de peroxidación lipídica iniciada por el radical R^\bullet (adaptada de Boots y col., 2008).

Además de los lípidos de membrana, es importante destacar como dianas biológicas muy vulnerables a la acción de los RL y RS, las proteínas y el ADN. Las proteínas pueden ser dañadas directa o indirectamente por el contacto con los diversos RL, principalmente OH^\bullet , RO^\bullet y RNS . Estos daños incluyen peroxidación, cambios en la estructura terciaria, alteración de determinados residuos aminoacídicos e incluso fragmentación, inactivación y degradación proteica (Davis, 1987). Como consecuencia, pueden aparecer pérdidas de actividad enzimática,

alteraciones de funciones celulares como la producción de energía, interferencias con la creación de potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares (Kohen y Nyska, 2002). El ADN por su parte, aunque se considera una molécula bien protegida, tampoco escapa del ataque de los ROS, especialmente del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Los daños pueden presentarse en forma de modificaciones de las bases o roturas en las cadenas del ADN, pérdida de purinas, daños en la desoxirribosa, cruces entre proteínas y ADN y alteraciones en los sistemas de reparación de esta molécula (Dizdaroglu y col., 2002; Waris y Ahsan, 2006).

1.1.4. Efectos beneficiosos de los Radicales Libres: no podían ser tan malos

A pesar de que los RL son conocidos básicamente por sus efectos dañinos sobre el organismo, se debe puntualizar que la generación de RL no se relaciona siempre con toxicidad y daño, ya que estas moléculas desarrollan funciones fisiológicas cruciales para el correcto funcionamiento del cuerpo humano y, aunque parezca contradictorio, nuestras células necesitan estar rodeadas de un cierto ambiente oxidativo para poder existir y desarrollarse. Los RL participan activamente en diversas funciones celulares como la activación génica, el crecimiento celular, la apoptosis, la modulación de diversas reacciones químicas y el control de la homeostasis (regulando los procesos de fosforilación de enzimas y factores de transcripción); pero las "buenas acciones" de los RL no acaban aquí; gracias a ellos es posible la relajación muscular y la dilatación de los vasos sanguíneos ($\text{NO}\cdot$); actúan en el control de la presión sanguínea (Wolin, 2000), forman parte del mecanismo de defensa llevado a cabo por las células fagocíticas contra agentes infecciosos y participan en el metabolismo de xenobióticos a través de la acción de la Citocromo P450 y en el desarrollo embrionario; por último, se les atribuye un papel relevante como mediadores en la síntesis de otras moléculas, como las prostaglandinas, y como moléculas de señalización tanto en la célula como entre células (Sen, 2000).

1.2. Antioxidantes

"El oxígeno es venenoso y los organismos aeróbicos sobreviven en su presencia sólo porque disponen de defensas antioxidantes" (Halliwell, 2007).

1.2.1. ¿Qué es un antioxidante?

Hemos visto que inherente al metabolismo aeróbico se produce la generación constante de especies reactivas, radicalarias y no radicalarias, que, aunque contribuyen a funciones básicas del organismo como señalización redox o acciones de defensa, pueden producir daños a nivel del ADN y del funcionamiento celular. Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por los radicales libres, ROS y otras especies reactivas, los organismos aerobios han desarrollado un elaborado mecanismo de defensa, el llamado sistema de defensa antioxidante (Diplock y col., 1998; Kohen y Nyska, 2002).

Pero ¿qué es exactamente un antioxidante? Gutteridge y Halliwell definieron "antioxidante" como "cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato" (Halliwell y Gutteridge, 1995). La definición enfatiza la importancia de la diana estudiada (sustrato oxidable) y la fuente de especies reactivas (RS) usada cuando se examina la actividad antioxidante. Dado que la definición no tenía en cuenta ciertos sistemas como las chaperonas, sistemas de reparación (del ADN o de residuos de proteínas) o inhibidores de la generación de RL, se simplificó la definición a "cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana" (Halliwell, 2007).

1.2.1.1. Actividad antiradicalaria

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Halliwell y Gutteridge, 1999). Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antiradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical (R') (Cos y col., 2003). Esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (Figura 6). Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado del antioxidante (A') que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad (Cadenas, 1997).

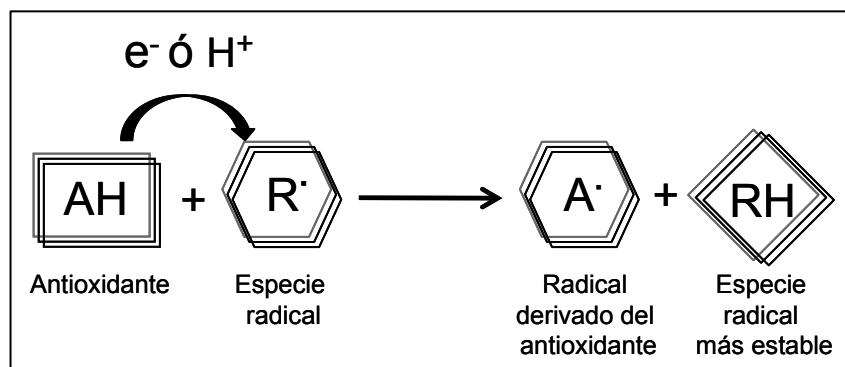


Figura 6. Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes.

1.2.1.2. Caracterización de la actividad antioxidante

La importancia relativa de los antioxidantes que entran en escena cuando se generan ROS *in vivo*, depende del tipo de ROS que se forma y, cómo, dónde y qué clase de daño se evalúa.

Para caracterizar la acción antioxidante de un compuesto, lo primero que se debe concretar es cómo el antioxidante ejerce su actividad, ¿actúa directamente?, es decir, mediante el secuestro de ROS o inhibiendo su generación, o ¿está actuando de forma indirecta?, es decir, por "up-regulation" de las defensas antioxidantes endógenas. Para evaluar la acción directa de los antioxidantes, que es

probablemente la más común *in vivo*, es importante plantearse y responder a ciertas preguntas (Halliwell, 1995):

1. ¿A qué biomolécula está protegiendo el antioxidante? y ¿es suficiente la cantidad de antioxidante que alcanza a esa diana *in vivo*?
2. ¿Cómo ejerce su actividad protectora el antioxidante, por el secuestro de ROS, previniendo su formación, o reparando el daño que han producido?
3. Si el mecanismo de actuación del antioxidante es por secuestro de ROS ¿es posible que los radicales derivados de la actividad del propio antioxidante causen algún tipo de daño por sí mismos?
4. ¿Puede el antioxidante causar daños en otros sistemas biológicos?

Otros dos puntos importantes en la evaluación de la actividad antioxidante son, (i) que el compuesto debe utilizarse a concentraciones "reales", es decir, alcanzables *in vivo* y (ii) que se deben usar ROS biológicamente relevantes como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), radicales peroxilo ($ROO\cdot$), peroxinitritos y el oxígeno singulete ($^1\Delta O_2$).

Experimentos sencillos pueden ayudar a responder algunas de estas preguntas y los resultados obtenidos permiten caracterizar la actividad del antioxidante estudiado y, a menudo, permiten descartarlo como compuesto de interés, ya que un compuesto que resulta ser poco antioxidante *in vitro*, es improbable que sea mucho mejor *in vivo* (Halliwell, 1994).

1.2.2. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

El estudio de nuevos compuestos con potencial efecto antioxidante cada vez adquiere más relevancia en los campos de la biología, la nutrición, la industria alimentaria y la medicina, lo que hace necesaria la existencia de métodos *in vitro* simples, rápidos y, sobre todo, fiables, para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos ya sea en su forma pura (moléculas aisladas) o compleja (alimentos o muestras biológicas) (Magalhaes y col., 2008).

Existen gran variedad de métodos de evaluación de la actividad antioxidante, pero ninguno está oficialmente aprobado ni estandarizado. Por esta razón, los datos aportados por los diferentes investigadores son difíciles de comparar e interpretar, ya que el significado y la relevancia de los estudios realizados depende en gran parte del método de ensayo empleado (Frankel y Meyer, 2000). Cada vez es más evidente que una evaluación correcta y completa de la actividad antioxidante requiere el uso de diferentes métodos de ensayo que incluyan y contemplen los múltiples factores y mecanismos que rodean la inhibición del proceso oxidativo (Schlesier y col., 2002).

Para escoger el protocolo de ensayo adecuado y poder interpretar adecuadamente los resultados obtenidos se deben considerar ciertas pautas de diseño (Frankel y Meyer, 2000):

- Especificar el sustrato oxidable que será protegido por el antioxidante estudiado.
- Determinar el parámetro que medirá la extensión de la oxidación y la inhibición ejercida por el antioxidante y escoger un punto final adecuado de la oxidación.
- Asegurarse de que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo.
- Contemplar cualquier posible efecto prooxidante adverso ejercido por los antioxidantes.
- Plantearse los posibles mecanismos de protección.
- Tener en cuenta el efecto de la interacción con otros componentes del sistema.
- Asegurar la accesibilidad de los sustratos a los antioxidantes y prooxidantes.
- Plantearse si las condiciones son relevantes para una aplicación real.

Los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante pueden clasificarse en función de la especie oxidante (ROS/RNS específicos o radicales estables no biológicos), del mecanismo de actuación del antioxidante (capacidad secuestradora de radicales, capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica, capacidad de reducir metales, etc...) o del sustrato oxidable utilizado (químico o biológico).

A continuación se resumen los métodos *in vitro* más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia:

1.2.2.1. Métodos químicos

a- Ensayos de capacidad secuestradora contra ROS/RNS específicos

a.1. Ensayos de capacidad secuestradora de radicales peroxilo (ROO[•]).

Estos métodos miden la habilidad de un antioxidante para secuestrar radicales peroxilo por transferencia de un átomo de hidrógeno. Los generadores de radicales peroxilo más utilizados son los compuestos azo termolábiles 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH) soluble en agua y el 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN), liposoluble. Entre estos ensayos destacan:

- Ensayo TRAP (total radical-trapping parameter): se desarrolló para medir el estado antioxidante del plasma humano. Los radicales peroxilo oxidan antioxidantes del plasma y la oxidación y su inhibición se miden por absorción de oxígeno. Como antioxidante de referencia se usa el Trolox (derivado sintético de la Vitamina E).
- Método TOSC (total oxyradical scavenging capacity): se basa en la oxidación del ácido α -keto- γ -metilbutírico a etileno por radicales generados por el AAPH. La formación de etileno es inhibida por los antioxidantes y puede determinarse por cromatografía de gases.
- Ensayo ORAC (oxygen radical absorbance capacity): mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente como la fluoresceína sometida a un flujo constante de radicales peroxilo generados por el AAPH. La

protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia (Magalhaes y col., 2008).

- Ensayos basados en la química del luminol: los radicales peroxilo oxidan el luminol generando radicales que emiten luz detectable. Los antioxidantes inhiben esta quimioluminiscencia por un tiempo directamente proporcional al potencial antioxidante de la muestra. Utiliza el Trolox como compuesto de referencia (Hirayama y col., 1997).
- Ensayos de oxidación de LDL (low-density lipoproteins): las LDL aisladas de muestras de sangre se oxidan por los radicales generados por el AAPH o por metales de transición como el Cu(II), generándose dienos conjugados, que se determinan por espectrofotometría a 234 nm.

a.2. Ensayos de capacidad secuestradora de radicales específicos generados en el medio (por radiólisis, fotólisis, reacción de Fenton, etc...).

- Ensayos de capacidad secuestradora del:
 - Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)
 - Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
 - Radical hidroxilo ($\cdot OH$)
 - Ácido hipocloroso (HClO)
 - Oxígeno singulete (1O_2)
 - Radical Óxido nítrico ($NO\cdot$)
 - Peroxinitrito ($ONOO^-$)

b- Ensayos de capacidad secuestradora contra radicales estables, no biológicos y evaluación de la capacidad reductora total

En general estos métodos utilizan radicales libres estables por lo que no es necesario generarlos en el medio:

- Método TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity): mide la capacidad de un compuesto de reducir el radical catiónico ABTS $^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) evaluando la disminución en la absorbancia a 734 nm. Se expresa en relación a la actividad del estándar Trolox.
- Método del radical DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilhidracil): se basa en la reducción del radical por captación de un átomo de hidrógeno al añadir el antioxidante. Se cuantifica midiendo la disminución de absorbancia a 515 nm. Se emplea sobre todo para determinar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos (Magalhaes y col., 2008).
- Método del radical HNTTM (tris(2,4,6-tricloro-3,5-dinitrofenil)metil): dado que este radical es inerte a la captación de átomos de hidrógeno, se mide la capacidad donadora de electrones de los antioxidantes al radical (Jiménez y col., 2004).

- Ensayo FRAP (ferric-reducing antioxidant power): mide la capacidad de una muestra de reducir el complejo incoloro tripiriritriazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) al complejo azulado tripiriditriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) que presenta absorbancia a 593 nm.
- Ensayo FC (Folin-Ciocalteu) de capacidad reductora: el ensayo se basa en la transferencia de electrones del compuesto antioxidante al molibdeno que contiene el reactivo FC, formándose un complejo azulado que presenta absorbancia a 750-765 nm.

1.2.2.2. Métodos biológicos

Los métodos químicos, aunque ampliamente utilizados y aceptados para determinar la actividad antioxidante de gran variedad de compuestos, tienen el inconveniente de que no reflejan las condiciones fisiológicas celulares y que no tienen en cuenta factores como la biodisponibilidad o el metabolismo. Por otro lado, los estudios con modelos animales y los ensayos clínicos con humanos son caros, implican cuestiones éticas y resultan poco adecuados para realizar los estudios iniciales de actividad antioxidante. Un sistema eficaz para el cribado inicial de sustancias antioxidantes es el uso de modelos de cultivos celulares (Liu y Finley, 2005). Los sistemas de cultivo son especialmente útiles para estudiar los efectos del estrés oxidativo en términos de toxicidad y respuestas adaptativas celulares y comprobar los efectos reguladores que pueden ejercer los potenciales antioxidantes en alteraciones como citotoxicidad, genotoxicidad y reacciones oxidativas (Gille y Joenje, 1992). Además, el uso de estos modelos evita los problemas éticos derivados de los estudios realizados con animales y humanos, permite controlar fácilmente las condiciones experimentales y el coste de los ensayos y trabajar con líneas celulares estables gracias a la crioconservación. Los sistemas de cultivos celulares también presentan sus limitaciones, ya que tampoco reproducen exactamente las condiciones del organismo, pues se pierden funciones sistémicas como la nerviosa o la endocrina. Teniendo en cuenta sus límites, el modelo de cultivo celular resulta una herramienta útil y muy valiosa en la ciencia biomédica y farmacéutica (O'Brien y col., 2000). Los modelos celulares incluyen tanto modelos de células aisladas, caso del eritrocito, como cultivos celulares.

1.2.2.2.1. *El eritrocito*

La membrana celular es una barrera de difusión que protege el interior de las células lo que hace que su estructura y función sean muy susceptibles a sufrir alteraciones debido a la interacción con agentes extraños. Además, por su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y proteínas, la membrana celular es el principal blanco fisiológico del ataque de los RL y ROS (Suwalsky y col., 2006). Entre los diversos modelos para detectar y entender los efectos de los ROS y la actividad de compuestos secuestradores de RL, destaca el modelo del eritrocito que resulta excelente para el estudio de la toxicidad sobre biomembranas (Singh y Rajini, 2008). Los eritrocitos son un tipo de muestra fácil de obtener y de preparar y representan un modelo celular muy simple (no contienen ni núcleo ni orgánulos); además, a pesar de que les falta la maquinaria de síntesis proteica y que son menos especializadas que muchas otras células, sus membranas desarrollan suficientes funciones en común con ellas, como el transporte activo y pasivo y la

producción de gradientes iónicos y eléctricos, para ser consideradas representativas de las membranas plasmáticas celulares en general (Suwalsky y col., 2006 y 2007).

Los eritrocitos están particularmente expuestos al estrés oxidativo debido a que son transportadores de oxígeno, tienen un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados y proteínas en sus membranas y poseen una elevada concentración de hemoglobina intracelular que puede actuar como promotora de procesos oxidativos (Tedesco y col., 2000). Por otro lado, los eritrocitos están protegidos de las lesiones oxidativas a través de un sistema antioxidante bien desarrollado compuesto por el glutatión, vitamina E y enzimas como la catalasa, superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa (Figura 7). Por esta razón, tanto los eritrocitos enteros como los eritrocitos "fantasmas" o "ghosts" (eritrocitos que conservan la morfología original con los elementos de la membrana y del citoesqueleto, pero sin el contenido citoplasmático) constituyen un buen modelo experimental para el estudio de los mecanismos de lesión por parte de los radicales y para determinar el potencial antioxidante de diversos compuestos (Simao y col., 2006).

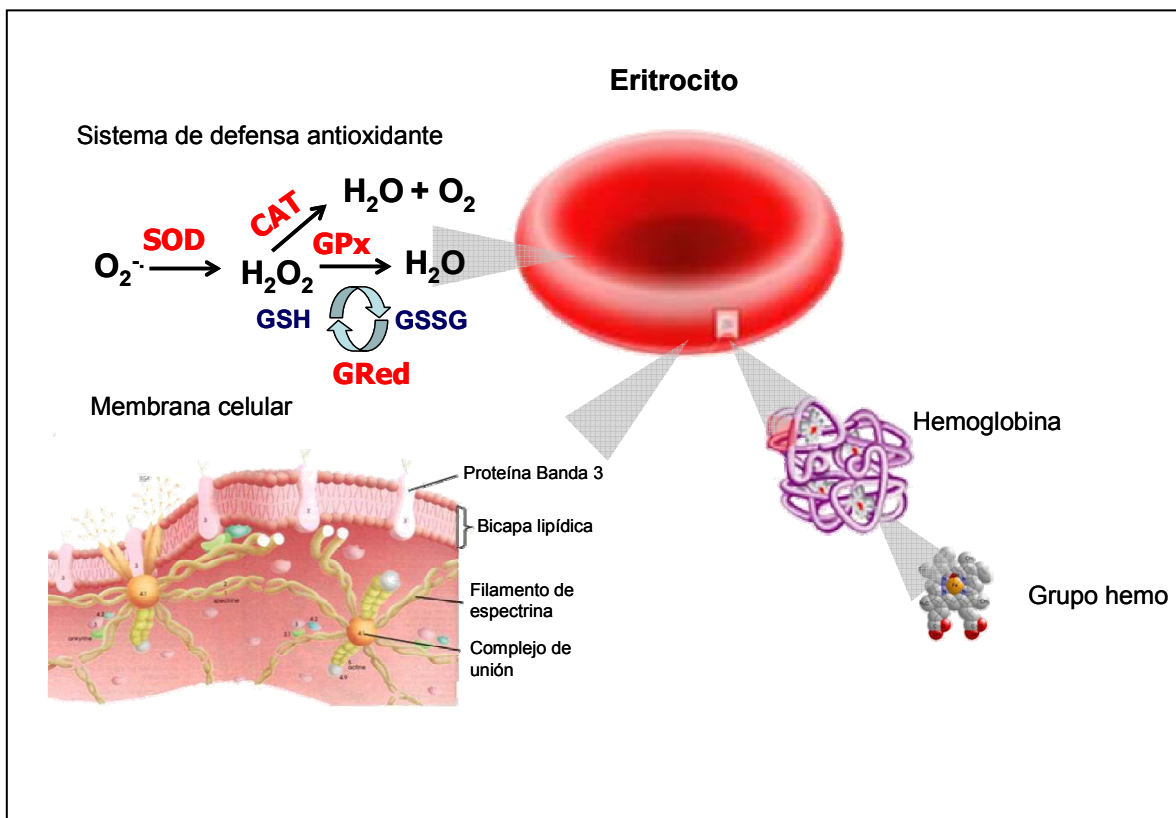


Figura 7. Modelo celular del eritrocito.

La oxidación de la membrana de los eritrocitos por RL suele generarse por medio de la descomposición térmica de un compuesto azo, lipo o hidrosoluble, en medio ambiente con oxígeno. Este método tiene la ventaja que el compuesto azo se descompone termodinámicamente para dar radicales sin participación de enzimas ni biotransformaciones y la tasa y el lugar de generación de radicales es fácilmente medido y controlado (Niki y col., 1988). La exposición de los eritrocitos a los

sistemas generadores de ROS (compuestos azo, peróxido de hidrógeno, etc.) puede provocar toda una serie de alteraciones en la célula (Figura 8) y, sobre todo, en la membrana, como peroxidación lipídica, cambios en la fluidez y deformidad, cambios en la morfología, inactivación de enzimas, entrecruzamiento, fragmentación y degradación de proteínas y hemólisis (Sato y col., 1995; Srouf y col., 2000). Los ensayos con eritrocitos permiten caracterizar los procesos oxidativos inducidos por los generadores de RL y valorar la naturaleza y alcance de la protección ejercida por los potenciales compuestos antioxidantes (Zou y col., 2001).

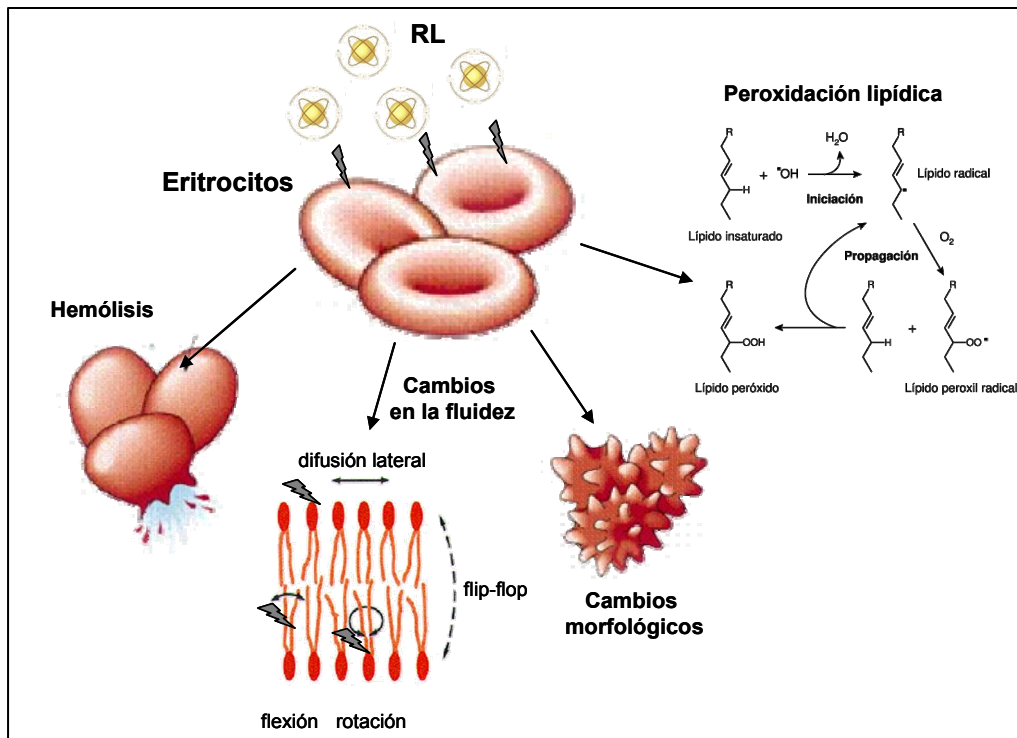


Figura 8. Principales alteraciones producidas en el eritrocito por exposición a RL.

Entre los ensayos más comunes realizados con eritrocitos encontramos:

- Determinación de la hemólisis: los agentes oxidantes provocan la rotura de la membrana del eritrocito hasta desencadenar la lisis celular. El nivel de hemólisis y su inhibición por compuestos antioxidantes se determinan por espectrofotometría a 540 nm (liberación de hemoglobina).
- Determinación de la peroxidación lipídica mediante el ensayo de formación de TBARs (especies reactivas del ácido tiobarbitúrico): en el proceso de la peroxidación lipídica se liberan ciertos productos secundarios como el MDA (malondialdehído) que se utilizan como marcadores del grado de peroxidación. La cuantificación de MDA se realiza mediante métodos colorimétricos basados en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar un producto coloreado conocido como TBARs. El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica reflejará el poder antioxidante de los compuestos estudiados.

- Determinación de la oxidación de la hemoglobina (Hb): se realiza el análisis espectrofotométrico de la Hb intracelular entre 500 y 700 nm para comprobar si el agente oxidante la altera, es decir, la oxida a metahemoglobina. Este ensayo también indica si las moléculas oxidantes y antioxidantes son capaces de penetrar en la célula (Simao y col., 2006).
- Determinación del contenido de glutatión (GSH) intracelular: el ataque por RL provoca una disminución del contenido de GSH intracelular, una molécula antioxidante propia de la célula, que puede ser prevenida por la adición de compuestos antioxidantes.
- Medida del contenido de ATP en los eritrocitos: los eritrocitos utilizan el ATP para mantener la forma y estabilidad osmótica de la membrana. Los agentes oxidantes provocan una disminución del contenido intracelular de ATP lo que origina deformaciones y alteraciones en el citoesqueleto de la membrana. Los compuestos antioxidantes previenen esta reducción del contenido de ATP (Hseu y col., 2002).
- Análisis de las proteínas de membrana por SDS-Page: el ataque por RL y otras ROS induce oxidación de las proteínas de membrana de los eritrocitos. Las alteraciones en el patrón proteico se observan mediante electroforesis en gel desnaturizante (SDS-Page). El patrón de bandas permite determinar si los compuestos antioxidantes evitan la degradación de las proteínas de membrana.
- Observaciones de la morfología del eritrocito: el daño oxidativo conduce a alteraciones en la rigidez y la forma de la membrana celular. Las micrografías de eritrocitos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) permiten observar estos cambios morfológicos inducidos por moléculas extrañas y comprobar si los agentes antioxidantes evitan estas alteraciones (Suwalsky y col., 2007; Ajila y Prasada Rao, 2008).
- Determinación del nivel antioxidante de los eritrocitos: se determina la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, etc..., y el nivel de moléculas como el ácido ascórbico y el α -tocoferol, que forman parte de los mecanismos de defensa de los eritrocitos. Esto permite comprobar el estatus antioxidante de la célula y cómo se ve afectado por agentes externos (Bukowska y Kowalska, 2004; Sangeetha y col., 2005).
- Evaluación de la fluidez de membrana: permite determinar la localización de los compuestos en las membranas y sus efectos en la dinámica de lípidos en diferentes regiones de la bicapa lipídica. Se estudia mediante anisotropía de fluorescencia que, utilizando sondas fluorescentes, permite caracterizar la influencia de diferentes moléculas en las propiedades biofísicas de las membranas (Arora y col., 2000).

Además de todos estos ensayos básicos, el efecto oxidante o antioxidante de los diferentes compuestos sobre los eritrocitos se puede evaluar mediante la determinación de la fragilidad osmótica (Shiva Shankar Reddy y col., 2007), liberación de lactato deshidrogenasa y salida de potasio (Simao y col., 2006), determinación de la carga superficial del eritrocito y determinación del contenido de

glicoproteínas y de grupos carbonilo en las proteínas (Sangeetha y col., 2005). También son comunes los ensayos de fotohemólisis donde los daños oxidativos son provocados por la exposición de los eritrocitos a la luz ultravioleta (UV) (Carini y col., 2000; Misra y col., 2005).

Por último, señalar que es preferible el uso de eritrocitos humanos en lugar de otras especies animales para que los resultados sean más representativos del efecto de estos compuestos sobre el ser humano.

1.2.2.2.2. Cultivos celulares

En el estudio de la capacidad oxidante y/o antioxidante, además de eritrocitos, es habitual utilizar como modelo de ensayo, células en cultivo celular. El tipo de modelo o línea celular y de biomarcador que se escoja dependerá de los efectos, mecanismos de acción, propiedades y actividades que se quieran evaluar.

- *Modelos celulares para la investigación del cáncer.* El daño producido por el ataque de RL puede causar daños a nivel de ADN que se traduzcan en potenciales procesos tumorales y cancerígenos. Los compuestos antioxidantes pueden prevenir o limitar estos procesos por diferentes mecanismos de acción como la actividad antioxidante y secuestro de radicales libres, regulación de la expresión génica en la proliferación y diferenciación celular, inducción de arresto del ciclo celular y apoptosis, modulación de enzimas relacionadas con detoxificación, oxidación y reducción, estimulación del sistema inmune, etc... Por lo tanto, los modelos de cultivo celular para los estudios relacionados con el cáncer deben incluir estos parámetros o líneas de investigación, aunque obviamente, un solo sistema de cultivo celular no podrá englobarlo todo (Liu y Finley, 2005). Además, los ensayos para determinar las propiedades quimiopreventivas o anticancerígenas de los diversos compuestos antioxidantes suelen realizarse con células malignas y no malignas para comparar las respuestas obtenidas, evaluar la selectividad de los nuevos compuestos y determinar la diferente sensibilidad en términos de inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis entre células tumorales y no tumorales (Babich y Visioli, 2003; Weisburg y col., 2004; Popiolkiewicz y col., 2005).

- *Modelos celulares para la investigación de la toxicidad aguda.* Los ensayos de toxicidad aguda se utilizan para determinar el potencial peligro para la salud humana que presenta una sustancia al ser administrada en una dosis única y elevada, normalmente en animales. El ensayo de toxicidad es uno de los primeros estudios que se realizan para caracterizar la seguridad de un producto y su evaluación se basa en la determinación de la dosis letal 50 (LD₅₀) o dosis de producto que mata al 50% de los animales del ensayo. Pero estos ensayos requieren tiempo, son caros y precisan el uso de muchos animales, por lo que es necesario desarrollar métodos *in vitro* que permitan reducir el número de animales y, en consecuencia, el tiempo y dinero invertidos. Los métodos *in vitro* que se están desarrollando y/o validando para predecir toxicidad aguda se clasifican en tres amplias categorías: ensayos de citotoxicidad, ensayos de toxicidad específicos de órgano y métodos de biocinética y metabolismo. Los ensayos de citotoxicidad celular constituyen un componente importante de cualquier batería de ensayos usada para predecir la toxicidad de sustancias en varios tejidos y determinar dosis iniciales de toxicidad; además, la capacidad de un producto de provocar una respuesta corrosiva o tóxica puede predecirse con éxito utilizando los marcadores

adecuados que muestren el grado de daño causado por la sustancia (Sánchez y col., 2004). Estos ensayos se han desarrollado y evaluado en relación a datos *in vivo* para asegurar un modelo predictivo adecuado.

En Estados Unidos, ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) aprobó en el 2007 dos ensayos de citotoxicidad basal *in vitro* para utilizar en los estudios de toxicidad, el ensayo de captación de rojo neutro utilizando fibroblastos 3T3 de ratón (3T3 NRU assay) y queratinocitos normales humanos (NHK NRU assay). Aunque aún está en proceso de validación, el ensayo NRU con fibroblastos 3T3 se utiliza como un modelo general de citotoxicidad para determinar el potencial tóxico de nuevos compuestos; además, ha resultado dar buenas correlaciones con resultados obtenidos *in vivo*, lo que permite utilizarlo como un modelo predictivo de toxicidad aguda y de estimación de dosis iniciales antes de iniciar un ensayo de toxicidad aguda *in vivo*. El uso de estos modelos es útil como método de cribado inicial, para descartar los compuestos más tóxicos y priorizar el estudio de otros compuestos más seguros (ICCVAM, 2008).

Si el compuesto que se evalúa va a ser administrado por vía tópica, interesará determinar su potencial efecto irritante y en este caso la citotoxicidad *in vitro* resulta también un buen método predictivo. Dado que la irritación dérmica no presenta *in vitro* los síntomas "visibles" observados *in vivo* (eritema, edema, etc...), se utilizan otro tipo de biomarcadores para su evaluación, como los cambios en la viabilidad, cambios morfológicos, expresión diferencial de genes y liberación de mediadores inflamatorios o citocinas (Müller-Decker y col., 1994; Eun y Suh, 2000). Como modelos *in vitro* de irritación dérmica encontramos desde cultivos de células aisladas de piel (queratinocitos y fibroblastos) hasta modelos tridimensionales de equivalentes de piel que permiten realizar experimentos a nivel molecular, celular y tisular (Faller y col., 2002)(Figura 9). Los queratinocitos son las células constituyentes de la epidermis y existen muchas evidencias de que la citotoxicidad y apoptosis de los queratinocitos inducida por el estrés oxidativo juega un papel relevante en el inicio, modulación y regulación de la irritación dérmica y en la patogénesis de enfermedades cutáneas, siendo así las células más utilizadas para valorar la irritación dérmica (Zhu y col., 2005). Además hay estudios que sugieren que los cultivos de queratinocitos humanos normales pueden ser predictivos de los fenómenos de irritación en humanos causados por ciertos compuestos como los tensioactivos (Korting y col., 1994a; Benavides y col., 2004). Los modelos más extendidos están formados por monocapas de queratinocitos epidérmicos primarios (NHK, normal human keratinocytes) o de células epidérmicas inmortalizadas como los queratinocitos HaCaT, muy parecidos a los queratinocitos normales en su crecimiento y diferenciación (Boukamp y col., 1988). Otros tipos celulares ampliamente utilizados son líneas de fibroblastos dérmicos, como las líneas 3T3 y 3T6 de origen murino (Lee y col., 2000; Benavides y col., 2004; Sánchez y col., 2004) y otras células que se infiltran en los procesos inflamatorios, ya que desempeñan una función importante en el proceso de irritación (Coquette y col., 2000).

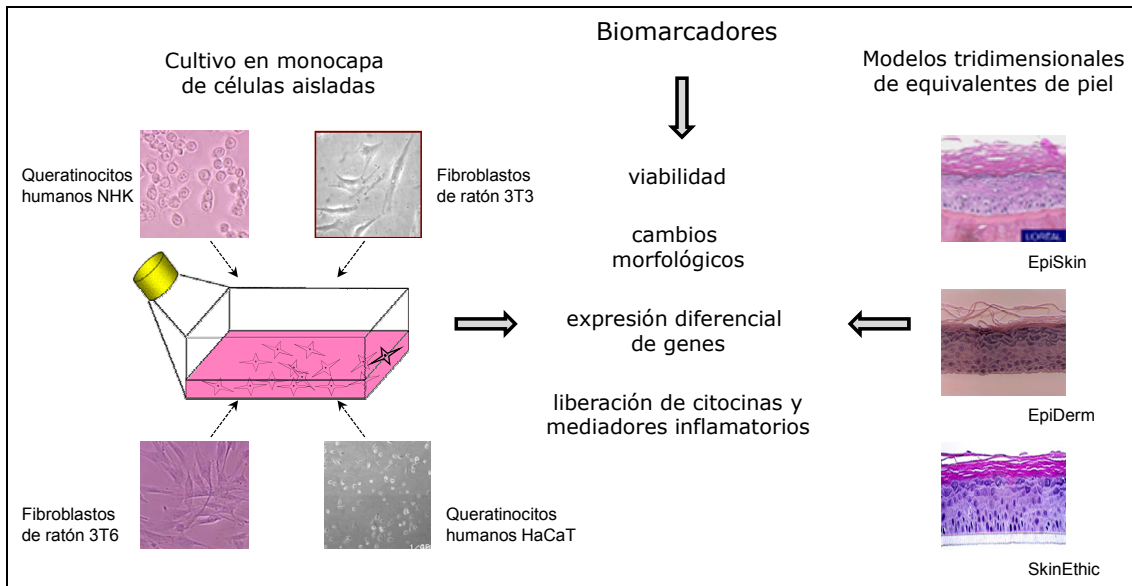


Figura 9. Modelos *in vitro* de irritación dérmica.

- *Modelos celulares para determinar metabolismo y biodisponibilidad.* En muchas ocasiones se trabaja con compuestos antioxidantes sin saber con seguridad si son ellos o sus metabolitos los compuestos bioactivos. Es posible que el compuesto original sea excretado o metabolizado *in vivo* y no alcance su tejido o molécula diana. Los modelos de cultivos celulares de Caco-2 y de hepatocitos representan un buen modelo para estudiar la biodisponibilidad y metabolismo de compuestos antioxidantes (Liu y Finley, 2005).

Los ensayos más comunes realizados con células en cultivo son:

- Ensayos para determinar viabilidad o citotoxicidad. La citotoxicidad ejercida por los diferentes compuestos puede ser basal, relacionada con funciones celulares básicas y estructuras comunes entre tejidos o, específica, dirigida a funciones y estructuras propias de un tejido concreto. Entre los diferentes criterios utilizados para valorar el efecto citotóxico encontramos cambios de morfología, viabilidad, metabolismo, integridad de la membrana celular, proliferación, adhesión y captación e incorporación de precursores radiactivos (Park y col., 2000). Entre los ensayos de citotoxicidad más utilizados encontramos:

1. *El ensayo de captación del colorante rojo neutro (NRU, Neutral Red Uptake Assay):* se basa en la captación y acumulación del colorante vital rojo neutro en los lisosomas de las células viables, es decir, las células cuyas membranas no han sido dañadas por el compuesto a ensayar (Borenfreund y Puerner, 1985; Riddell y col., 1986; Clothier, 1990; Spielmann, 1992).

2. *El ensayo de liberación del colorante rojo neutro (NRR, Neutral Red Release Assay):* evalúa los efectos de la toxicidad inmediata como daño a la membrana plasmática y pérdida de la integridad lisosomal causada por exposiciones breves a altas dosis de compuestos; se determina por la cantidad de colorante liberado por las células que previamente lo han captado (Clothier, 1992; Korting y col., 1994a y 1994b).

3. *Ensayo del MTT*: las células captan por endocitosis el MTT, una sal soluble de color amarillo, y lo reducen a nivel de las mitocondrias y otros compartimentos celulares a formazán, insoluble y de color azul (Liu y col., 1997).
 4. *Actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo*: la LDH es una enzima citoplasmática que se libera al medio de cultivo cuando se producen daños sobre la membrana plasmática de las células siendo un buen marcador de la integridad de la membrana celular (Cook y Mitchell, 1989).
 5. *Análisis por microscopía electrónica*: mediante observación microscópica se evalúan los cambios en la morfología celular a nivel de tamaño y forma, contactos célula-célula, número, tamaño y forma del núcleo, inclusiones intracelulares, etc...
 6. *Ensayos de captación o incorporación de precursores radiactivos*: consisten en añadir al medio de cultivo un precursor radiactivo que se incorporará a la molécula que queremos determinar a medida que ésta vaya siendo sintetizada (aminoácidos, proteínas, ADN, ARN, etc...).
- Ensayos relacionados con el proceso de carcinogénesis.
 1. *Evaluación de la proliferación, diferenciación y ciclo celular*: se mide el incremento del número de células, del número de colonias por área o del contenido total de ADN, ARN y proteínas. Los estudios de ciclo celular se realizan por citometría de flujo mediante sistema FACS (del inglés, fluorescente-activated cell sorting).
 2. *Determinación de apoptosis*: se realiza por microscopía óptica y electrónica para observar cambios morfológicos como la condensación de la cromatina y la deformación de la membrana; también se emplean técnicas de tinción y el análisis por citometría de flujo, que mide las características físicas y químicas de las células o sus componentes celulares (Vermes y col., 2000).
 3. *Estudio de vías de transducción de señales y de modulación de actividades enzimáticas*: mediante técnicas de Western blotting se evalúa la expresión de proteínas relacionadas con procesos inflamatorios y de carcinogénesis como la COX-2 y proteínas-quinasas de la familia MAPKs (Cui y col., 2004).
 5. *Ensayos de daño oxidativo del ADN y genotoxicidad*: la técnica más utilizada para determinar la extensión del daño oxidativo en el ADN celular y el posible efecto protector de los compuestos estudiados es el ensayo del cometa (Comet assay o "single cell gel-electrophoresis"). El nivel de ADN dañado se determina mediante clasificación visual del tamaño de la cola (rotura del ADN) que aparece al migrar las células en la electroforesis (Singh y col., 1988; Tice y col., 2000).

- Ensayos de actividad antioxidante y de secuestro de radicales libres.
 1. *Determinación de peroxidación lipídica:* se realiza mediante el uso de sondas fluorescentes (como la cPnA) o cuantificando la formación de TBARs en el medio de cultivo (Smith y col., 1982).
 2. *Determinación del estado oxidante/antioxidante de la célula:* para determinar el status redox celular se realizan medidas del glutatión (Camera y Picardo, 2002) y del nivel de ROS intracelulares (Yamamoto y col., 2003), así como ensayos de actividades enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc...).
 3. *Determinación de citoquinas inflamatorias:* los principales mecanismos usados por las células epidérmicas para participar en reacciones inmunitarias e inflamatorias de la piel son la producción de citoquinas y respuestas a citoquinas. Los queratinocitos contienen grandes cantidades de IL-1 α , considerada un marcador temprano de irritación y el iniciador principal de inflamación que es liberada cuando estas células se dañan tras una lesión o perturbación de la membrana (Coquette y col., 2000). Una gran variedad de estímulos ambientales como luz UV y agentes químicos pueden estimular a los queratinocitos a liberar citocinas inflamatorias.

1.2.3. Sistemas de defensa antioxidantes del organismo

Los sistemas antioxidantes o mecanismos de defensa que ha desarrollado el organismo para protegerse de los diversos "ataques" oxidativos, pueden clasificarse en función de su origen en sistemas antioxidantes endógenos, enzimáticos y no enzimáticos, y sistemas antioxidantes exógenos, que se adquieren a través de la dieta. Estos mecanismos incluyen modos de actuación tanto directos (interacción directa con los ROS) como indirectos (control de la producción endógena de ROS, reparación de moléculas dañadas, defensa física de las dianas biológicas como las membranas, etc...).

1.2.3.1. Sistemas de defensa antioxidantes endógenos

1.2.3.1.1. Sistemas enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la primera línea de defensa antioxidante y previenen el daño oxidativo interaccionando directamente con los ROS. Reaccionan con las diversas especies reactivas, actúan como catalizadores, sólo se necesita que estén presentes en pequeñas cantidades para que ejerzan su protección y son reciclados eficientemente después de su actuación (Boots y col., 2008). Las enzimas que forman este sistema antioxidante enzimático y las reacciones que catalizan se detallan a continuación (Kohen y Nyska, 2002; Lozano, 2005; Halliwell, 2006):

- *Superóxido dismutasa (SOD):* es una metaloenzima presente en todos los organismos aerobios que cataliza la conversión del radical superóxido en

peróxido de hidrógeno, que posteriormente será convertido en agua por la catalasa (Figura 10).

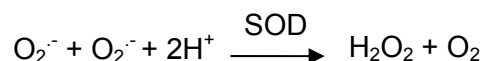


Figura 10. Reacción catalizada por la Superóxido dismutasa (SOD).

- *Catalasa* (CAT): es una enzima ampliamente distribuida en bacterias aerobias, plantas y animales, localizada en los peroxisomas y que reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular; con donadores de hidrógeno como metanos, etanol y fenoles presenta actividad peroxidasa (Figura 11).

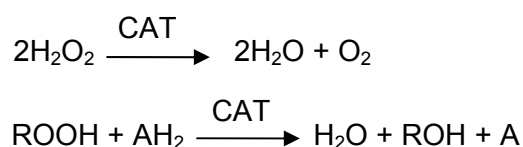


Figura 11. Reacciones catalizadas por la enzima Catalasa (CAT).

- *Glutación peroxidasa* (GPx): es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción de hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2), utilizando el glutatión (GSH) como donador de electrones (Figura 12). El glutatión oxidado que se genera (GSSG) puede ser reducido a GSH por acción de una glutatión-reductasa (GRed) dependiente de NADPH

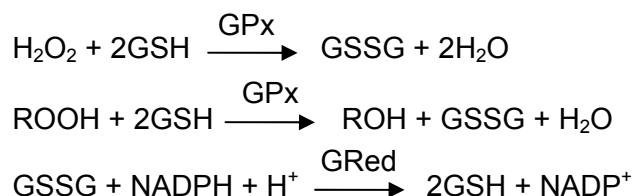


Figura 12. Reacción catalizada por la Glutación peroxidasa (GPx) y la Glutación reductasa (GRed).

1.2.3.1.2. Sistemas no enzimáticos

El sistema antioxidante no enzimático constituye la segunda línea de defensa y está constituido básicamente por antioxidantes de bajo peso molecular (del inglés, low- molecular -weight antioxidants, LMWA) que forman un numeroso conjunto de compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por interacción directa o indirecta con los ROS (Kohen, 1999).

El mecanismo de acción indirecto implica principalmente la quelación de metales de transición para evitar su participación en reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss (Figura 13). Entre los compuestos que actúan por esta vía encontramos proteínas como la ceruloplasmina, la transferrina y la lactoferrina, la haptoglobina y la albúmina (Haber y Weiss, 1934; Kehrer, 2000; Vertuani y col., 2004).

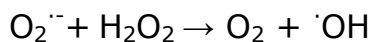


Figura 13. Reacción de Haber-Weiss.

Las moléculas que actúan de forma directa sobre las especies reactivas lo hacen por medio de la transferencia de electrones o por medio del secuestro de radicales evitando así que ataquen las moléculas diana. Además, suelen poseer también capacidad de quelación de metales (actividad indirecta). Por su pequeño tamaño, pueden atravesar las membranas celulares y localizarse cerca de las posibles dianas biológicas; además, la propia célula puede regenerarlas y regular sus concentraciones. Estas moléculas, aunque normalmente actúan como antioxidantes, desarrollan otras funciones biológicas en la célula. Entre estas moléculas destacan:

- El *tripéptido glutatión* (GSH) en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula. Actúa como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 y es capaz de interactuar directamente con ROS como $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, HClO y $\text{O}_2^{\cdot -}$. También actúa como agente quelante, y en diversos procesos metabólicos como la comunicación celular o la degradación de proteínas (Ghezzi, 2005).
- La *bilirrubina* y el *ácido úrico* se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton. El ácido úrico también es eficiente protegiendo contra el O_3 , el $\text{NO}\cdot$ y RNS (Becker, 1993).
- La *histidina* y otros compuestos de la misma familia (carnosina, anserina...) que eliminan ROS por secuestro directo de radicales $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, uniéndose al H_2O_2 , eliminando $\text{O}_2^{\cdot -}$ o uniendo metales de transición (Kohen y col., 1988).
- La hormona *melatonina*, que atrapa una gran variedad de ROS además de estimular la síntesis de importantes enzimas antioxidantes (SOD, GPx y GRed) (Reiter y col., 2001).

1.2.3.1.3. Efecto sinérgico de los antioxidantes

Los antioxidantes no enzimáticos que interactúan directamente con los RL ceden un electrón o un protón al radical, obteniéndose así una molécula relativamente estable derivada del radical. El antioxidante en este proceso queda oxidado y, dado que sólo su forma reducida puede ejercer actividad antiradicalaria, la forma oxidada deberá ser reconvertida a su estado reducido. Además, en su estado oxidado el antioxidante se convierte en una especie radical que puede presentar actividad residual inerte o reactiva; en este segundo caso, podría causar daños en diversas dianas celulares vitales (Cadenas, 1997).

Afortunadamente, el organismo dispone de diversos sistemas antioxidantes que actúan de manera sinérgica, es decir, colaboran entre ellos, reduciéndose químicamente los unos a los otros con el objetivo de disminuir la reactividad del radical antioxidante formado y recuperar el antioxidante reducido para la defensa contra las especies reactivas (Figura 14)(Vertuani y col., 2004). Este proceso de

regeneración puede ser puramente químico o pueden estar implicadas diversas enzimas. Esta interacción entre antioxidantes es importante, ya que cada antioxidante ejerce preferentemente su actividad secuestradora hacia radicales libres o especies reactivas específicos en compartimentos concretos. La interacción entre todos los antioxidantes permite que un antioxidante concreto ejerza una defensa óptima contra una especie reactiva particular y en cualquier parte del cuerpo (Chaudiere y Ferrari-Iliou, 1999). Además, este "reciclaje" de los antioxidantes oxidados incrementa su eficacia biológica al hacer disminuir la necesidad de sintetizarlos de nuevo o de tener que adquirirlos en mayor cantidad de fuentes externas (nutrientes). Pero se debe tener presente que el hecho de poseer un sistema antioxidante tan complejo e interactivo hace que la deficiencia en uno de sus componentes pueda afectar la eficacia de los otros, y que el déficit de un solo antioxidante suponga una pérdida de protección frente a ROS muy superior a la esperada.

Por último, sólo indicar que el estudio de la interacción entre diferentes tipos de antioxidantes es uno de los puntos básicos del desarrollo de las llamadas "terapias antioxidantes", que examinan los posibles efectos beneficiosos sobre la salud de la suplementación con diversos antioxidantes (Kohen y Nyska, 2002; Boots y col., 2008).

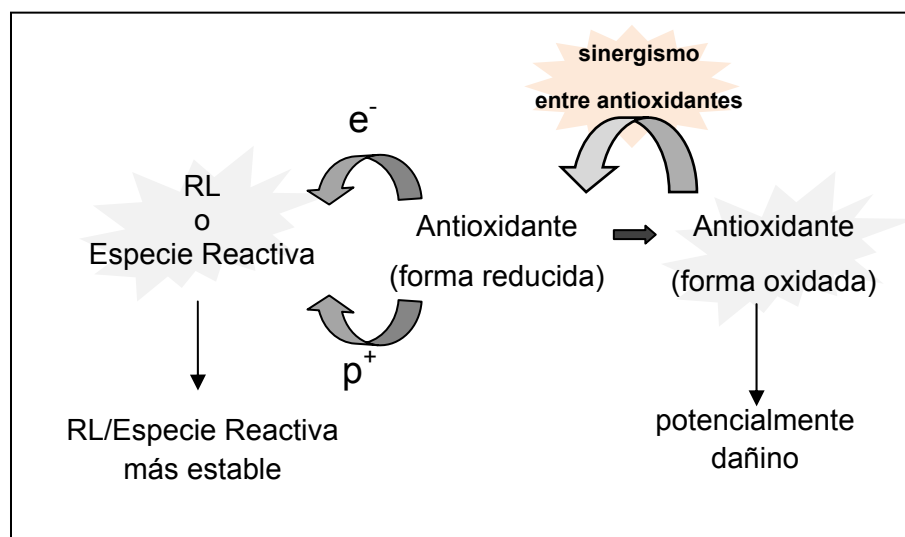


Figura 14. Efecto sinérgico de las moléculas antioxidantes.

1.2.3.2. Sistemas de defensa antioxidantes exógenos

La capacidad de nuestro organismo para "luchar" contra las agresiones producidas por las moléculas oxidantes es limitada, por lo que necesita cierta ayuda externa. Los nutrientes básicos que ingerimos a través de la dieta (proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) ayudan a los mecanismos de defensa internos contra todas las oxidaciones no deseadas, ya sea actuando como antioxidantes por sí solos o haciendo de cofactores de los sistemas antioxidantes endógenos (Diplock, 1998; Lozano, 2005). Por este motivo, llevar una dieta equilibrada y variada es de vital importancia para mantener el equilibrio redox del organismo.

Nutrientes básicos que adquirimos a través de la dieta:

- Proteínas: un déficit de proteínas en la dieta provocaría una disminución en el aporte de aminoácidos como glutamina, cisteína y arginina, constituyentes de las enzimas antioxidantes, lo que causaría una sobreproducción de radicales libres por disminución de estas enzimas.
- Lípidos: la ingesta de ácidos grasos ω -3 disminuye el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, ya que parecen actuar como inhibidores de la producción de radicales libres aumentando la expresión de genes antioxidantes (Vertuani y col., 2004).
- Vitaminas: ciertas vitaminas inhiben la producción de NO y otras actúan como secuestradoras de ROS y reguladoras de la actividad de las enzimas antioxidantes. Destacan la vitamina E (α -tocoferol), que inhibe la formación de ROS inducida por radicales lipídicos y protege a la célula de la peroxidación lipídica y la vitamina C (ácido ascórbico), una eficaz secuestradora de ROS.
- Minerales: actúan como cofactores de muchas enzimas que participan en la eliminación de radicales libres. Como ejemplos, un déficit en cobre o zinc disminuye la actividad de la superóxido dismutasa y aumenta la actividad del citocromo P-450 estimulando la producción de ROS (Powell, 2000); un aumento de hierro intra o extracelular, estimula la producción de ROS, aumenta la peroxidación lipídica y aumenta la síntesis de NO.

Además de todos estos nutrientes básicos, a través de la dieta obtenemos también una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos, las llamadas *sustancias fitoquímicas*, que son compuestos procedentes del reino vegetal de estructura química y propiedades muy variadas, que juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox y en disminuir la incidencia del daño producido por los radicales libres, por lo que actualmente se consideran altamente beneficiosos para la salud. Aunque el interés científico por estos compuestos es relativamente reciente (las últimas cuatro décadas), durante siglos han constituido el único remedio natural existente para el tratamiento de enfermedades (Steinmetz y Potter, 1996). Multitud de alimentos de origen vegetal contienen extractos con compuestos con actividad antioxidante, por ejemplo, el té verde, el vino tinto o el chocolate. En la Tabla 3 se recogen las principales sustancias fitoquímicas y su fuente de origen.

Cada vez es más probable que los fitoquímicos jueguen un verdadero papel nutricional, ya que cada día la investigación está descubriendo más acerca de sus beneficios. Tal vez algún día estos compuestos se clasifiquen como nutrientes esenciales. De momento, mientras la ciencia sigue avanzando en la caracterización de las propiedades de estos compuestos, la recomendación es seguir una dieta variada que incluya sobre todo abundancia de fruta y verdura (Ames y col., 1993; Van Duyn y Pivonka, 2000).

Tabla 3. Sustancias fitoquímicas con actividad antioxidante y algunas fuentes alimentarias naturales de dónde se obtienen.

Sustancias fitoquímicas	Fuentes
Sustancias Terpénicas <ul style="list-style-type: none"> - Carotenoides - Licopenos 	Vegetales de hojas oscuras, zanahorias, patatas, tomates, frutos cítricos, melocotones
Sustancias fenólicas <ul style="list-style-type: none"> - Estilbenos (resveratrol) - Lignanos - Ácidos fenólicos - Flavonoides y Taninos 	Té verde, uva, bayas, semillas oleaginosas, cereales, granos, pimientos, frutos cítricos, tomates, cebollas
Tioles <ul style="list-style-type: none"> - Indoles - Ditioltionas 	Brócoli, repollo, coliflor
Sustancias azufradas <ul style="list-style-type: none"> - Glucosinolatos - Compuestos azufrados de las Aliáceas 	Brócoli, coles, rábanos, ajos, cebollas, puerros
Extractos y aceites esenciales	Té verde, romero, salvia, clavo, orégano, tomillo, avena, arroz integral

1.3. Estrés oxidativo

“No todos los radicales libres son malos, no todos los antioxidantes son buenos. La vida es un balance entre los dos” (Halliwell, 2006).

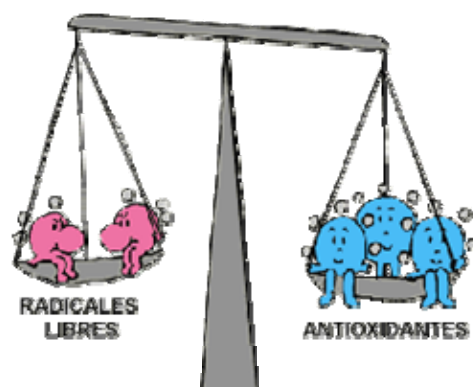


Figura 15. Balanza representativa del equilibrio redox.

En los seres vivos existe un equilibrio interno entre la producción de radicales libres y la acción de los antioxidantes (Figura 15). Pero, ¿qué sucede si esta balanza se desequilibra?, ¿qué pasa si se produce un exceso de oxidación frente a la capacidad antioxidante de la célula?; un desequilibrio de este tipo desencadena un cuadro de cambios fisiológicos y bioquímicos conocido como *estrés oxidativo*. Este estrés oxidativo puede darse tanto por un exceso de producción de RL y ROS como por un problema o alteración en el sistema de defensa antioxidante (Halliwell, 1993). Sies define el estrés oxidativo como “una perturbación en el balance prooxidante-antioxidante a favor del primero provocando un daño potencial” (Sies, 1985). Este daño se conoce como *daño oxidativo* y podría definirse a su vez como “el daño biomolecular causado por el ataque de especies reactivas sobre los constituyentes de los organismos vivos” (Halliwell y Whiteman, 2004). Este daño oxidativo tiene como diana todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN, hecho que conduce a fenómenos de peroxidación lipídica, oxidación y fragmentación de proteínas e hidratos de carbono, mutagénesis, carcinogénesis y lesión de las membranas celulares. Además, el exceso de especies reactivas constituye una señal de estrés capaz de activar vías específicas de señalización celular (Mitjavila y col., 2001). El reconocimiento de la existencia de múltiples y diferentes sistemas de señalización redox y el hecho de que los ROS y RNS tienen un papel fundamental en estos procesos de señalización llevaron a Jones a redefinir el estrés oxidativo como “una interrupción del control y señalización redox que reconoce la existencia de circuitos redox celulares compartimentalizados” (Jones, 2006). La aceptación de esta definición permitiría que los investigadores identificaran perturbaciones clave de los procesos de control y señalización redox y plantearan tratamientos más específicos para trastornos relacionadas con el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo y el daño que produce habitualmente se han relacionado con el proceso de envejecimiento (asociado a la acumulación de componentes celulares oxidados como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos). Actualmente se consideran un factor clave en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas y desórdenes neurodegenerativos relacionados con la edad como el Alzheimer o el Parkinson (Tabla 4). La cuantificación o valoración del estrés oxidativo al que está sometida la población parece ser un posible indicador del peligro que suponen ciertos factores de riesgo del ambiente (Ginter, 1996; Urquiaga y Leighton, 2000).

Tabla 4. Principales enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Enfermedades vasculares	Aterosclerosis Infarto de miocardio Isquemia
Enfermedades neurológicas	Alzheimer Esquizofrenia
Enfermedades autoinmunes	Artritis reumatoide
Enfermedades oculares	Cataratas Retinopatías

Enfermedades pulmonares	Asma bronquial Síndrome de distrés respiratorio en el adulto Neumonía Fibrosis pulmonar Enfisema Bronquitis crónica
Otras	Cáncer

Una de las herramientas de que disponemos para combatir el estrés oxidativo es la suplementación con antioxidantes (*terapia antioxidante*); pero esta suplementación se ha de diseñar y estudiar en profundidad para no cargar al organismo y a las células con un exceso de antioxidantes que podría alterar el equilibrio redox normal, desencadenando procesos deletéreos en la célula o impidiendo que se dieran procesos esenciales para su funcionamiento (Kohen y Nyska, 2002).

Pero la herramienta clave y que, en principio, estaría al alcance de todos, para luchar contra las situaciones de estrés oxidativo y evitar los daños en estructuras y funciones celulares que conlleva, es la dieta; se sabe que incluir en la dieta abundancia de frutas, verduras y algo de vino tinto (éste último con moderación, por supuesto), disminuye el estrés oxidativo y ejerce un efecto protector contra éste, pero en cambio llevar una dieta más rica en grasas lo potencia. (Leighton y col., 1999; Joshipura y col., 1999; Urquiaga y Leighton, 2000). Se cree que el alto contenido de una clase determinada de sustancias fitoquímicas, los polifenoles, en frutas y verduras, es un factor clave en el efecto beneficioso ejercido por la dieta.

1.4. Sustancias polifenólicas

El reino vegetal es fuente de gran variedad de compuestos con potencial actividad antioxidante, las sustancias fitoquímicas, que nosotros adquirimos a través de la dieta y que podrían ayudarnos a evitar el estrés oxidativo y a disminuir el daño producido por el exceso de radicales libres. En base a esta potencial actividad biológica, se han desarrollado numerosos estudios para determinar las propiedades de gran variedad de estas sustancias obtenidas como subproductos de la agricultura, destacando los estudios realizados con el subgrupo de los polifenoles.

1.4.1. ¿Qué son? ¿Cómo son? ¿Qué hacen? o lo que es lo mismo, clasificación, propiedades y funciones de los polifenoles

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con más de 8000 estructuras polifenólicas conocidas (Dreosti, 2000). Son productos del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos donde desarrollan funciones diversas que abarcan desde la protección frente a influencias externas (la radiación UV, mordiscos de animales y

ataques fúngicos y víricos) a los mecanismos de polinización, el olor, el color y la tolerancia al frío (Cooper-Driver y Bhattacharya, 1998; Stevenson y Hurst, 2007). Los animales no somos capaces de sintetizar este tipo de compuestos, así que dependemos fundamentalmente de la ingesta de productos de origen vegetal para incorporar estas sustancias a nuestro organismo.

Respecto al metabolismo de los polifenoles, se sabe que son absorbidos en diferente grado en el intestino en su forma nativa o modificada. Después son metabolizados en productos detectables en plasma que retienen en parte su capacidad antioxidante y, por último, son excretados, por vía biliar o urinaria (Crespy y col., 2003). Durante el proceso de absorción, los polifenoles son conjugados (metilación, sulfatación y glucoronización) primero en el intestino delgado y después en el hígado. En general los metabolitos de los polifenoles son rápidamente eliminados del plasma lo que indica que es necesario un consumo diario de productos vegetales para mantener altas concentraciones de estos metabolitos en la sangre (Manach y col., 2004).

- Estructura y clasificación

Desde el punto de vista químico, los polifenoles se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (grupo fenol)(Figura 16).

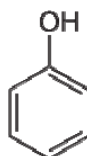


Figura 16. Grupo fenol de los polifenoles.

La estructura de los polifenoles varía de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, a estructuras complejas, como los taninos condensados. Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos (Carratù y Sanzini, 2005): flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Figura 17).

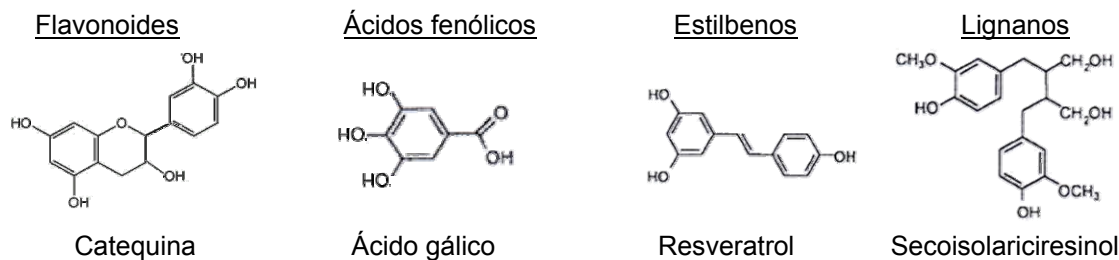


Figura 17. Estructura química de los polifenoles.

- Actividad biológica de los compuestos polifenólicos

La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres (scavengers) y de quelación de metales (Urquiaga y Leighton, 2000). Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones (Sang y col., 2002).

Además de sus propiedades antioxidantes, los polifenoles poseen otras actividades biológicas específicas derivadas o no de su acción antioxidante. Se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antimutagénicas, inhiben *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) relacionadas con enfermedades coronarias, y protegen el ADN del daño oxidativo que tiene graves consecuencias en algunos cánceres relacionados con la edad (Halliwell y Gutteridge, 1999); además inhiben la agregación plaquetaria y presentan efectos antiinflamatorios (Middleton y col., 2000); se ha descrito que poseen actividad anticarcinogénica, actuando como inhibidores de procesos cancerígenos (Yang y col., 2001; Hou y col., 2004), actividad antiVIH y actúan como protectores frente a la peroxidación lipídica en los glóbulos rojos (Urquiaga y Leighton, 2000).

Debido a todas estas actividades biológicas y a que son micronutrientes muy abundantes en nuestra dieta, cada vez cobra más importancia la implicación de los compuestos polifenólicos en la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas como el cáncer o enfermedades cardiovasculares (Ugartondo y col., 2006). Además, por sus características físico-químicas destacan como candidatos para aplicaciones dermofarmacéuticas y alimentarias.

La fruta y bebidas como el té y el vino tinto constituyen las principales fuentes de polifenoles de la dieta; los alimentos contienen complejas mezclas de estos compuestos, pero a menudo estas mezclas están escasamente caracterizadas (Manach y col., 2004). El contenido de polifenoles en las plantas varía y está muy influenciado por factores genéticos y medioambientales, así como por la germinación, madurez, variedad, procesado y almacenaje (Aherne y O'Brien, 2002). Es importante identificar las plantas más ricas en los polifenoles de interés, mejorar los métodos de cultivo y limitar las pérdidas durante el curso de los procesos industriales y domésticos para optimizar así el contenido de polifenoles en los alimentos y poder recuperarlos más eficientemente para su uso en otros campos de interés.

1.4.2. Los flavonoides, los polifenoles más abundantes

La familia de compuestos polifenólicos más común es la del grupo de los flavonoides. Se conocen más de 5000 estructuras diferentes y están presentes en frutas y vegetales, así como en alimentos y bebidas obtenidos a partir de plantas como el aceite de oliva, el té y el vino tinto (Hertog y col., 1993).

La extraordinaria amplitud de actividades bioquímicas, fisiológicas y ecológicas de los flavonoides los convierte en uno de los grupos de compuestos biológicamente activos de origen natural más interesantes y, su frecuencia en la naturaleza y las relaciones químicas y biológicas entre ellos, les hacen objeto de frecuentes estudios y revisiones bibliográficas (Álvarez y Orallo, 2004).

1.4.2.1. Estructura, clasificación y propiedades biológicas

a. Estructura

Los flavonoides son polifenoles de bajo peso molecular formados por la combinación de derivados de fenilalanina y el ácido acético (Lozano, 2005). Comparten una estructura común caracterizada por tener un esqueleto difenilpropano ($C_6C_3C_6$) basado en el núcleo flavonoide (Figura 18) formado por tres anillos conocidos como A, B y C. El anillo aromático A está condensado con un anillo de seis carbonos (C), un heterociclo oxigenado, que en posición dos tiene un anillo bencénico como sustituyente (B) (Aherne y O'Brien, 2002).

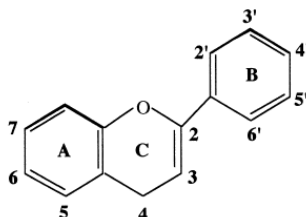


Figura 18. Núcleo flavonoide.

Las diferencias entre los diversos grupos de flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilación (orden y número), el tipo de sustituciones (glicosilación, metilación, sulfatación, etc...) y el grado de polimerización de sus estructuras (Cadenas, 2008). El patrón de conjugación, glicosilación o metilación puede ser muy complejo y modificar la hidrofiliabilidad de la molécula y sus propiedades biológicas y también aumentar significativamente el peso molecular del flavonoide. Las moléculas de flavonoide no unidas a un grupo glúcido se conocen como agliconas, mientras que las formas glicosiladas se llaman glicósidos de flavonoides y son las más frecuentes en las plantas (Manach y col., 2004), ya que la glicosilación incrementa la polaridad de la molécula, la hace más soluble en agua, lo que es necesario para el almacenaje en las vacuolas celulares de las plantas (Urquiaga y Leighton, 2000; Martínez-Flórez y col, 2002).

b. Clasificación

Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en seis subclases (Figura 19): flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas) y antocianidinas (Skibola y Smith, 2000; Manach y col., 2004; Kroon y col., 2004).

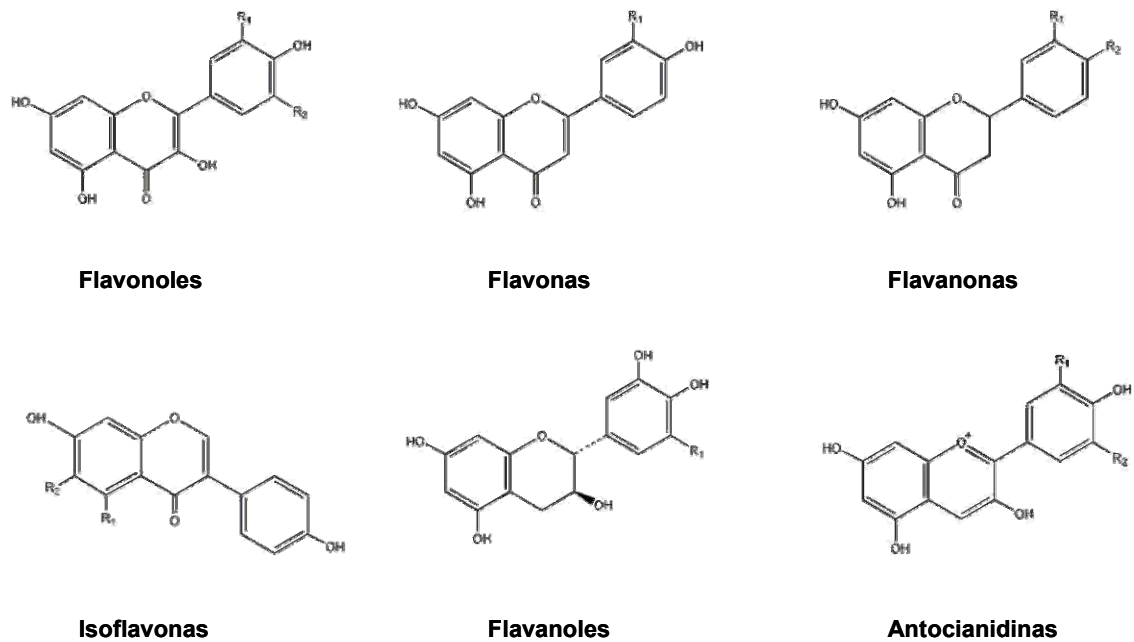


Figura 19. Estructura de los flavonoides más comunes en la naturaleza.

Principales grupos de flavonoides:

- *Flavonoles*. Son los flavonoides más ubicuos en los alimentos siendo muy abundantes en el vino tinto, el té, las cebollas, la escarola y el brócoli. Se presentan en forma glicosilada y se acumulan en los tejidos exteriores aéreos (epidermis y hojas) porque su síntesis está estimulada por la luz. Los principales representantes son la quercitina (Figura 20) y el kanferol.

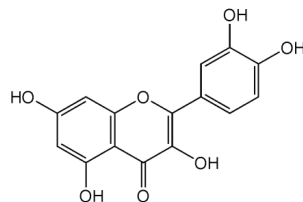


Figura 20. Flavonol quercitina.

- *Flavonas*. No son tan abundantes como los flavonoles y se encuentran principalmente en el perejil y el apio. Las más representativas son la luteolina (Figura 21) y la apigenina.

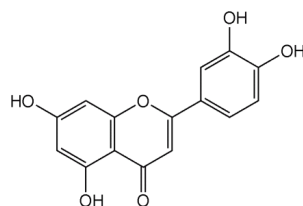


Figura 21. Flavona luteolina.

- *Flavononas*. Se encuentran principalmente en frutas cítricas, tomates y plantas aromáticas como la menta. Se presentan glicosiladas y las agliconas más importantes son la naringenina en el pomelo, la hesperetina (Figura 22) en las naranjas y el eriodictiol en los limones (Erdman y col., 2007).

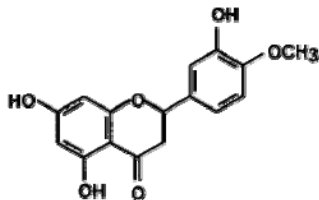


Figura 22. Flavanona hesperetina.

- *Isoflavonas*. Se las clasifica como fitoestrógenos por tener una estructura similar a la de los estrógenos; esto les confiere propiedades pseudohormonales, incluida la habilidad de unirse a receptores del estrógeno. Se encuentran casi exclusivamente en plantas leguminosas y su principal fuente es la soja. Las más importantes son la genisteína y la daidzeína (Figura 23).

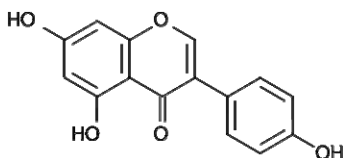


Figura 23. Isoflavona genisteína.

- *Flavanoles*. Pueden presentarse en forma monomérica (catequinas) y en forma polimérica (proantocianidinas). Las catequinas son muy abundantes en la fruta, pero las principales fuentes son el té verde, el chocolate y el vino tinto. La catequina y la epicatequina (Figura 24) son los principales flavanoles en la fruta, mientras que la galocatequina, epigalocatequina (Figura 25) y epigalocatequina galato se encuentran en ciertas semillas leguminosas, en uva y, sobre todo, en el té (Dreosti, 2000; Manach y col., 2004). Este grupo de compuestos no se encuentra glicosilado en los alimentos. Las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados, son dímeros, oligómeros y polímeros de catequinas unidos por uniones C4 y C8 (o C6) y las encontramos en bebidas como el té, vino y cerveza, en el chocolate y en frutas como la uva, el melocotón y la manzana (son las responsables del carácter astringente de estos alimentos).

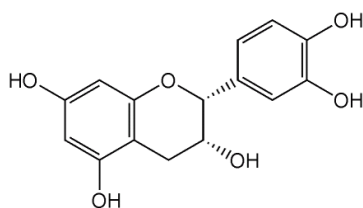


Figura 24. Flavanol epicatequina

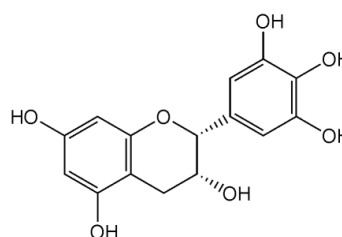


Figura 25. Flavanol epigalocatequina

- *Antocianidinas*. Son los pigmentos responsables de la llamativa coloración de las flores y los frutos de ciertos vegetales. Aunque son inestables en la forma aglicona, mientras están en las plantas son resistentes a la luz, pH y condiciones de oxidación que podrían degradarlas, debido a que se presentan glicosiladas y esterificadas con varios ácidos orgánicos. En la dieta humana se encuentran en el vino tinto, ciertas variedades de cereales y vegetales como la cebolla, guisantes, calabaza, pero sobre todo, en frutas como cerezas, frambuesas, moras, ciruelas, etc... La principal representante es la cianidina (Figura 26).

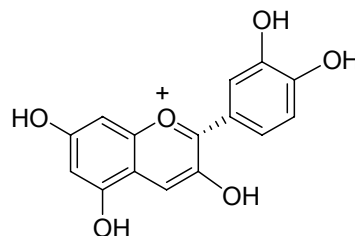


Figura 26. Antocianidina cianidina.

c. Propiedades biológicas

Entre los mecanismos propuestos implicados en los efectos beneficiosos para la salud ejercidos por los flavonoides, se encuentran el efecto antioxidante, la quelación de metales, la inhibición enzimática y la regulación génica (Erlejman y col., 2004). Se sabe que los flavonoides pueden ejercer su actividad antioxidante en numerosos sistemas biológicos, pero se ha de tener en cuenta que su distribución en estos sistemas depende de su relativa hidrofiliicidad/hidrofobicidad y de sus interacciones con determinadas macromoléculas (Saija y col., 1995). Estos factores determinan la concentración local de los flavonoides lo que influye, entre otras características, en su capacidad de regular ciertos fenómenos celulares.

Gran parte del efecto protector ejercido por los flavonoides, por ejemplo de las catequinas presentes en el té, se ha atribuido a su actividad antioxidante por neutralización o secuestro de radicales libres; pero cada vez hay más estudios que evidencian que estos compuestos también actúan regulando ciertas actividades enzimáticas celulares y que parte de esta regulación estaría relacionada con la capacidad de los flavonoides de alterar la estructura de la membrana celular (Caturla y col., 2003). Este efecto sobre la membrana haría que estos compuestos ejercieran su influencia sobre diversos procesos celulares estrechamente relacionados con la membrana celular, como la señalización celular (Spencer y col., 2001), el ciclo celular, el metabolismo del ácido araquidónico (Álvarez y Orallo, 2004) y la proliferación celular, la apoptosis y la funcionalidad de las mitocondrias (Schroeder y col., 2008). Además de su conocida capacidad como antioxidantes, se sabe que los flavonoides juegan un papel más amplio en el funcionamiento del organismo y que poseen gran cantidad de actividades biológicas como son: un efecto vasodilatador, acción anticarcinogénica, antibacteriana y estimulante del sistema inmune (Middleton y col., 2000); actúan además como antialérgicos y antivirales (Song y col., 2005), tienen efectos estrogénicos e inhiben numerosas enzimas como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y fosfolipasa A, pero estimulan otras como la superóxido dismutasa (Santangelo y col., 2007).

1.4.2.2. Actividad antioxidante / prooxidante de los flavonoides

a. Actividad antioxidante de los flavonoides

Los flavonoides forman parte del denominado sistema de defensa antioxidante exógeno del organismo, es decir, aquellas defensas que se adquieren a través de la dieta. Existen tres tipos de mecanismos que pueden explicar la actividad antioxidante de estas defensas:

1- la transferencia de electrones que determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa.

2- la transferencia de electrones que determina la formación de una molécula antioxidante inactiva o estable.

3- pequeñas moléculas que actúan como enzimas antioxidantes (Cadenas, 1997).

El mecanismo por el que ejercerían su actividad antioxidante los flavonoides sería la transferencia de electrones que conlleva la aparición de una molécula radical activa, pero también estaría implicada la capacidad de estos compuestos para quelar metales (Figura 27)

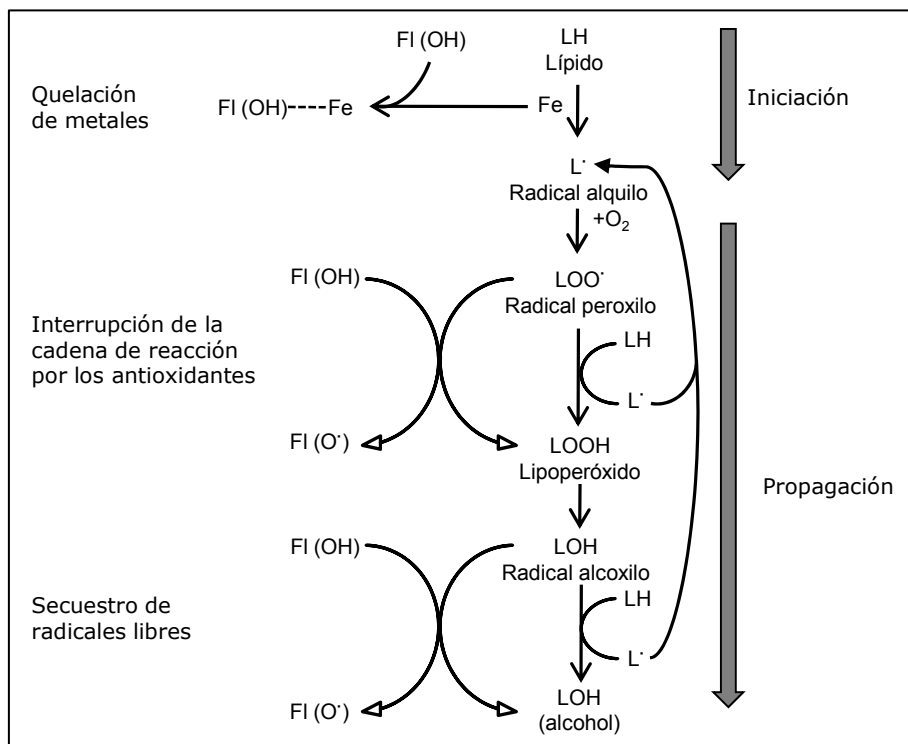


Figura 27. Ejemplo de los diversos mecanismos que son capaces de ejecutar los flavonoides para inhibir los procesos de peroxidación lipídica: quelación de metales o captación de radicales libres (adaptado de Cadenas, 2008).

Pero los flavonoides deben cumplir dos requisitos más para ser considerados moléculas antioxidantes (Halliwell, 1995), (i) incluso a bajas concentraciones deben

proteger a los compuestos contra la oxidación o el daño por radicales libres y, (ii) el radical flavonoide formado (llamado radical aroxilo) debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. También es importante la accesibilidad del flavonoide al radical oxidante. El carácter inestable del radical aroxilo se debe al efecto prooxidante que presentan algunos flavonoides (ver apartado siguiente), pero gracias a la colaboración entre moléculas antioxidantes el radical aroxilo puede ser recuperado por otros antioxidantes, como el ascorbato (ver apartado 1.2.3.1.3).

Los flavonoides son antioxidantes en virtud del número y posición de sus grupos hidroxilos fenólicos unidos a las estructuras de anillo (Rice-Evans, 2001). Existen una serie de características estructurales que permiten valorar *a priori* la posible función antioxidante de los compuestos de naturaleza flavonoide. Estos criterios químicos son:

- presencia de un grupo catecol (3',4'-dihidroxi) en el anillo B
- presencia de un doble enlace insaturado entre C2 y C3 en el anillo C
- presencia de un grupo hidroxilo en C3 en el anillo C (Dreosti, 2000; Rice-Evans, 2001; Cadenas, 2008)

También es importante la presencia de grupos funcionales capaces de unir iones de metales de transición como el hierro o el cobre. Como ejemplo de compuesto flavonoide que reúne todas estas propiedades químicas tenemos el flavonol quercitina (Figura 28) (Williams y col., 2004).

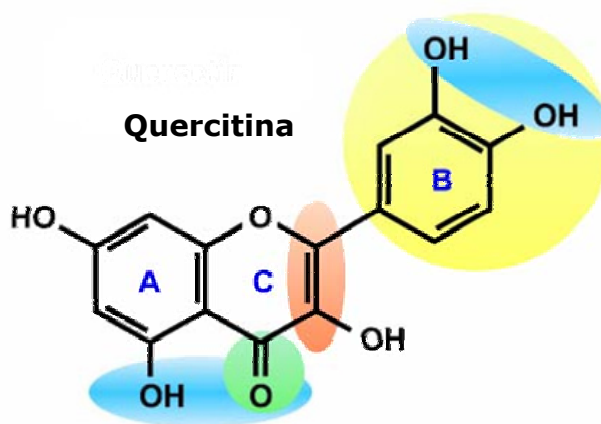


Figura 28. Flavonoide Quercitina mostrando los principales grupos de su estructura implicados en el potencial antioxidante. En amarillo, el grupo catecol del anillo B; en rojo, enlace insaturado del anillo C; en verde, función 4-oxo en el anillo C; en azul, puntos de capacidad de quelación de metales.

Otra estructura química a tener en cuenta cuando se valora el poder antioxidante de los flavonoides es la presencia de grupos galato en las moléculas. Numerosos estudios demuestran que muchas de las actividades biológicas de las catequinas del té se relacionan con la presencia de grupos pirogalol y ácido gálico (Figura 29) en su estructura, que les confiere más efectividad en acciones antibacterianas (Wang y

col., 2000; Yamaguchi y col., 2002), anticarcinogénicas (Matito y col., 2003; Na y Surh, 2006) y sequestradora de radicales libres (Caturla y col., 2003)

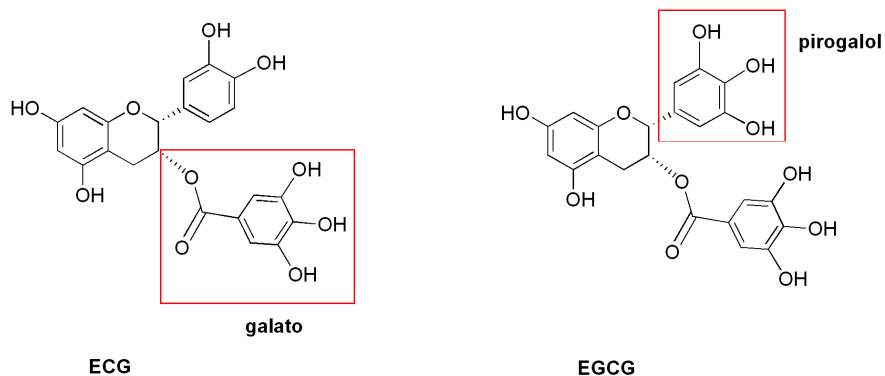


Figura 29. Grupos galato presentes en las moléculas de (-)-epicatequina galato (ECG) y (-)-epigallocatequina galato (EGCG).

Los fenoles con una estructura catecol en el anillo B son más potentes como antioxidantes, pero también son más metabolizados. Para entender el potencial que tienen los flavonoides para funcionar como antioxidantes *in vivo*, es necesario tener en cuenta otros factores como la biodisponibilidad e interacciones en el tracto gastrointestinal, así como la influencia de la conjugación y el metabolismo (Croft, 2004). Además, las concentraciones alcanzadas en los tejidos y la forma en que las modificaciones estructurales influyen las propiedades antioxidantes requieren más estudio (Kroon y col., 2004).

b. Efecto prooxidante de los flavonoides

Al igual que los RL y ROS presentan dos caras opuestas respecto a su actividad, los flavonoides se comportan de una forma similar. Por un lado participan en funciones básicas para el correcto funcionamiento del organismo, pero a la vez pueden actuar como agentes oxidantes dañando diversas estructuras celulares. Las mismas propiedades que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides determinan que tengan efectos prooxidantes, lo que puede implicar un potencial tóxico (Lambert y col., 2007). Los mecanismos en los que se basa este efecto son la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide hierro redox lábil (Cadenas, 2008)(Figura 30). La reacción de autooxidación comporta la formación del radical superóxido que, por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), produce peróxido de hidrógeno que en la célula debe ser eliminado vía catalasa o glutatión peroxidasa. Si no se elimina, puede producir al reaccionar con el Fe^{2+} iones hidroxilo, que son muy reactivos con las biomoléculas. El carácter antioxidante o prooxidante viene determinado por la estabilidad redox del radical formado a partir del flavonoide original. Estos

mecanismos pueden constituir la base de ciertas acciones mutagénicas y citotóxicas de los flavonoides. Muchos estudios evidencian que los flavonoides juegan un papel dual en la mutagénesis y carcinogénesis. Pueden actuar como antioxidantes/prooxidantes y antimutagénicos/promutagénicos, dependiendo de los niveles consumidos y de las condiciones fisiológicas del organismo. Una exposición a niveles demasiado altos de flavonoides puede saturar el organismo provocando la formación de ROS, llegando incluso a dañar el ADN o enzimas asociadas a él (Skibola y Smith, 2000). Los efectos que pueden provocar los flavonoides en condiciones prooxidantes son, entre otros, inducir apoptosis, producir citotoxicidad, disminuir la activación de factores de transcripción (como AP-1) y la expresión de moléculas de adhesión (como ICAM-1), suprimir la proliferación celular y la activación de la proteína quinasa e inhibir el crecimiento celular (Schmidt y col., 2005; Nameikaite-Cenieré y col., 2005).

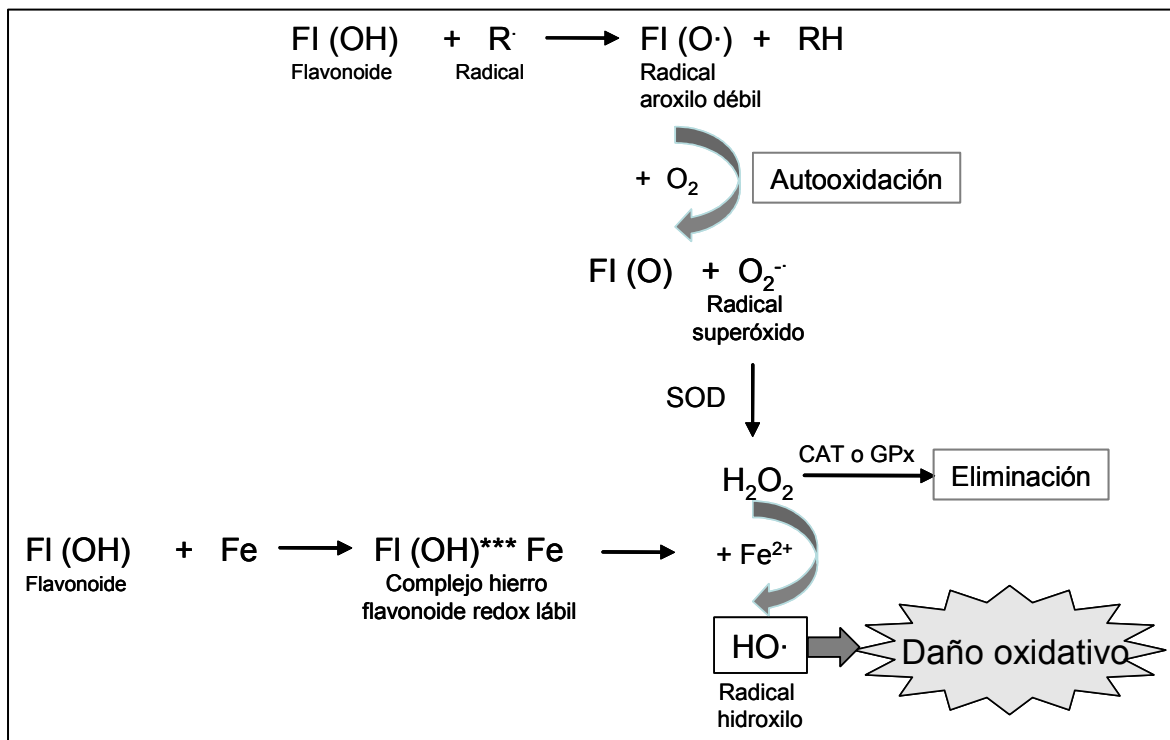


Figura 30. Mecanismos prooxidantes de los flavonoides.

Generalmente se necesitan grandes concentraciones de flavonoides para desarrollar mutagenicidad y citotoxicidad, ya que es a tales concentraciones a las que se genera el radical hidroxilo. Estas concentraciones no pueden ser alcanzadas fisiológicamente a través de la dieta, pero el uso de suplementos, como formulaciones antioxidantes y mezclas de hierbas pueden suponer un nivel de exposición potencialmente tóxico (Skibola y Smith, 2000).

Aunque hay estudios que indican que los polifenoles, entre ellos los flavonoides, pueden tener efectos tóxicos sobre las biomoléculas ensayadas, es mucho más amplia la bibliografía que referencia su capacidad como antioxidantes, su efecto protector frente a enfermedades relacionadas con la edad y, en general, su

participación en el mantenimiento de una buena salud. De cualquier forma, se necesitan más estudios sobre la actividad y mecanismos de acción de los polifenoles para profundizar y entender mejor sus mecanismos de acción, su interacción con las diversas dianas celulares y, en general, sus funciones biológicas, "las buenas y las malas" (Lambert y col., 2007; Cadenas, 2008).

1.5. Sostenibilidad y reciclaje en la industria agroalimentaria

1.5.1. Productos de alto valor añadido

Los recursos naturales son limitados y su demanda es cada vez mayor. La sociedad actual empieza a ser consciente de esta realidad y se muestra cada vez más abierta a toda actividad relacionada con el reciclaje y el aprovechamiento de los recursos. En los últimos años, ciencia e industria han unificado esfuerzos para aprovechar completamente los recursos naturales, con el objetivo de maximizar el rendimiento económico y minimizar el impacto medioambiental. Buena parte de este esfuerzo se ha centrado en la conservación de los bosques, el uso racional de la madera y de los residuos de la agricultura, así como en encontrar nuevas aplicaciones para los productos de desecho (Jahan y col., 2006 y 2007; Ugartondo y col., 2008).

Las industrias agrícola y forestal producen cada año un gran volumen de residuos, tanto sólidos como líquidos, resultado de los procesos de producción, preparación y consumo de sus productos. Estos desechos, además de un potencial riesgo medioambiental (asociado al exceso de biomasa), representan un problema económico debido al poco rendimiento que se extrae de ellos y al coste adicional que implica su eliminación (Laufenberg y col., 2003). Se necesita hacer sostenible la explotación de los recursos, por este motivo dichas industrias están centrando su interés en recuperar, reciclar, aumentar la calidad y, sobre todo, encontrar nuevas aplicaciones a estos residuos con el fin de sacar el mayor rendimiento posible de ellos. Si se dispone de la tecnología adecuada (y de procesos de extracción económicamente viables), estas sustancias residuales pueden ser convertidas en nuevos productos o ser recicladas para usarse como materia prima en procesos secundarios, en otras industrias o incluso como combustible alternativo. Estos desechos y subproductos a los que se les encuentran nuevas utilidades y que pueden ser reaprovechados, es lo que se conoce como productos de alto valor añadido y su obtención supone una nueva fuente de ingresos para la industria.

Los residuos vegetales de la industria agroalimentaria contienen considerables cantidades de compuestos potencialmente interesantes, pero el valor de los productos obtenidos debe compensar el coste de su recuperación. Por este motivo es necesario mejorar, por un lado, los procesos de extracción y, por el otro, corroborar la potencial utilidad y los requisitos de seguridad de los nuevos productos (Ugartondo y col., 2007).

Rosentrater presentó en el 2001 una propuesta de siete pasos para que el esfuerzo en el desarrollo y utilización de los subproductos fuese óptimo (Rosentrater, 2006). La metodología se resume en el siguiente esquema (Figura 31):

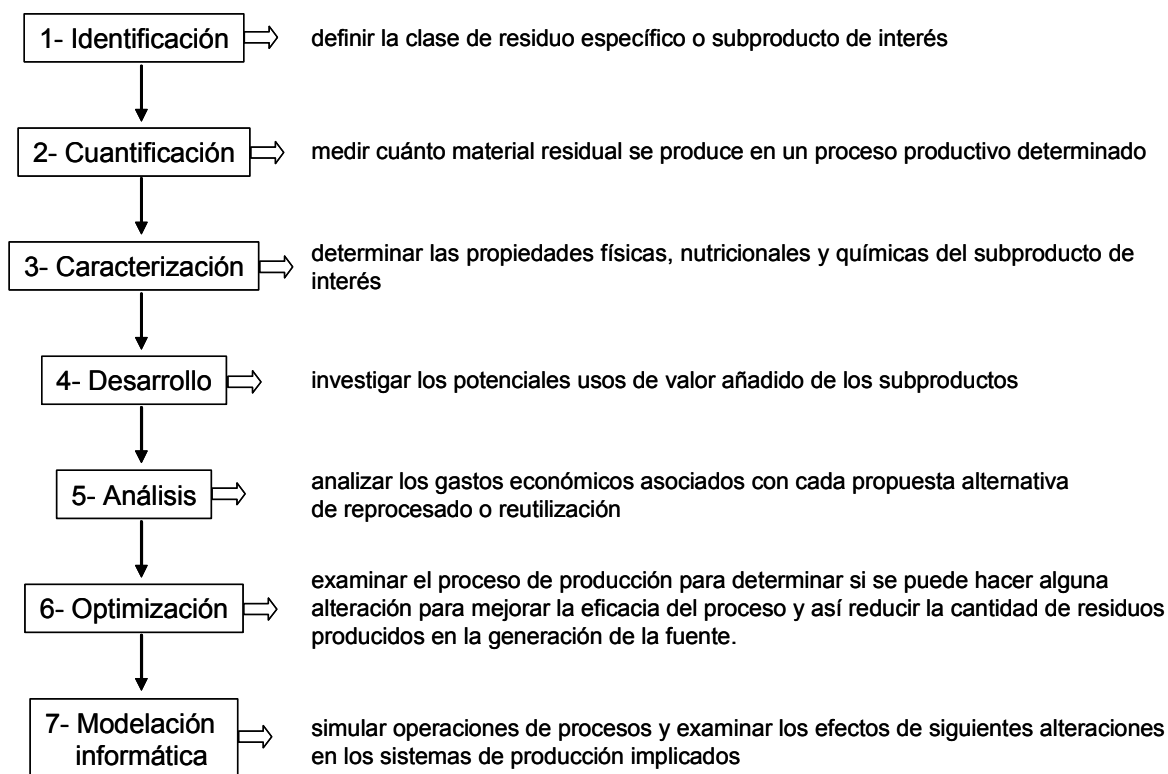


Figura 31. Metodología de procesamiento para la utilización de subproductos industriales.

A lo largo de los años, muchos trabajos de investigación sobre reutilización de residuos y subproductos han utilizado alguno, incluso todos, de los pasos mencionados (Rosentrater y col., 2003; Laufenberg y col., 2003; Scordino y col., 2005).

En muchos procesos agroindustriales y forestales, como la elaboración de zumos y vinos y la producción de madera, se generan subproductos y residuos ricos en polifenoles. Estas sustancias, como ya se ha mencionado, han despertado el interés tanto de científicos como de la industria por el reconocimiento de sus propiedades antioxidantes, su gran abundancia en nuestra dieta y su probable papel en la prevención de varias enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Manach y col., 2004). La recuperación de polifenoles antioxidantes es un ejemplo del esfuerzo realizado para el aprovechamiento integral de los productos agrarios y forestales. Por ejemplo, los subproductos derivados del prensado de la uva (semillas, pieles, raíces, pequeñas ramas) son fuente de fibra dietética antioxidante que combina las ventajas de la fibra dietética con los polifenoles; también se extraen de la uva catequinas oligoméricas que se aplican como complementos alimentarios. Extractos parecidos se extraen de la corteza de pino y de la corteza de cacahuete (Torres, 2002).

1.5.2. Derivados de Epicatequina

La industria del vino produce durante cada campaña una gran cantidad de desechos derivados de la uva, principalmente la piel y las semillas. Diversos estudios de caracterización han concluido que los polifenoles más abundantes en

estos residuos son los flavonoides, destacando por ser los más abundantes la (-)-epicatequina y la (-)-epicatequina galato (Prieur y col., 1994; Torres y col., 2002a; Shi y col., 2003).

El Departamento de Química de Péptidos y Proteínas del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC), con el cual colaboramos en el marco de este trabajo, ha llevado a cabo la obtención de nuevos derivados de flavanoles a partir de proantocianidinas procedentes fundamentalmente del bagazo de uva y también de la corteza de hamamelis. Esto ha sido posible mediante el desarrollo de un método de extracción que consiste en la despolimerización de estas proantocianidinas en presencia del aminoácido cisteína y derivados de este aminoácido como la cisteamina (Torres y Lozano, 2001; Torres y Bobet, 2001). El uso de estos compuestos para realizar la despolimerización se debe a que su combinación con los polifenoles puede facilitar el proceso de aislamiento por diversas técnicas cromatográficas (Matthews y col., 1997; Lozano 2005) y, además, los productos de degradación de los aminoácidos no presentan los efectos tóxicos de otras sustancias usadas en los procesos de extracción, pero sí la posibilidad de obtener nuevos compuestos con actividades antioxidantes mejoradas y propiedades fisicoquímicas modificadas (Torres y col., 2002a; Sagristà y col., 2002).

Diversos estudios han demostrado que estos nuevos derivados presentan diferentes efectos a nivel de actividad antioxidante y de regulación del ciclo celular. Se ha visto que presentan elevada capacidad antiradicalaria y secuestradora de radicales libres, propiedades antiproliferativas y proapoptóticas frente diversas líneas celulares tumorales de piel y colon y actividad neuroprotectora (Torres y Bobet, 2001; Torres y col., 2002a; Lozano y col., 2005; Torres y col., 2005; Lozano y col., 2006; Maher y col., 2008).

1.5.3. Fracciones polifenólicas procedentes de diferentes fuentes vegetales

En el mercado hay una gran variedad de productos beneficiosos para la salud obtenidos a partir de productos secundarios de las plantas y este es un campo de estudio que en las últimas décadas ha adquirido gran relevancia a nivel científico e industrial (Hasler, 2000; Medina y col., 2006; McKay y Blumberg, 2007). Las mezclas de polifenoles han sido propuestas como antioxidantes alimentarios y agentes preventivos contra la irritación dérmica y el cáncer (Packer y col., 1999; Gupta y Mukhtar, 2001), por lo que la obtención de nuevos compuestos bioactivos a partir de diferentes fuentes naturales de origen vegetal ricas en polifenoles es una línea de investigación cada vez más extendida. El grupo del IQAC-CSIC, siguiendo esta tendencia, y mediante diversos procesos químicos de extracción y separación, ha llevado a cabo la obtención de toda una serie de fracciones polifenólicas a partir de tres fuentes vegetales diferentes: bagazo de uva (*Vitis vinifera*), corteza de pino (*Pinus pinaster*) y corteza del arbusto hamamelis (*Hammamelis virginiana*). La composición de estas fracciones es diversa, pero sus diferencias estructurales vienen dadas principalmente por el diferente grado de polimerización y diferente porcentaje de grupos galato que presentan (Torres y Bobet, 2001; Lozano, 2005). Esta diferente composición les confiere a su vez una gran variedad de propiedades biológicas que están siendo caracterizadas con el propósito de buscar futuras

aplicaciones de estos compuestos en campos tan diversos como la conservación de alimentos, la industria cosmética y la lucha contra el cáncer. Hasta el momento, estudios realizados para determinar las propiedades antiradicalarias y antitumorales de estas fracciones han demostrado una efectiva actividad secuestradora de radicales libres y protectora contra el estrés oxidativo, así como una prometedora capacidad antiproliferativa y reguladora del ciclo celular (Torres y col., 2002b; Matito y col., 2003; Touriño y col., 2005; Lizárraga y col., 2007; Touriño y col., 2008a y 2008b).

