

1. INTRODUCCIÓ

1.1 FLAVONOIDES. GENERALITATS

1.1.1 Origen

Els flavonoides estan àmpliament distribuïts a la natura. Es sintetitzen a partir de fenilalanina emprant la mateixa via metabòlica i mitjançant reaccions de condensació de policètids (veure apartat 1.1.3). Existeixen un ventall ampli d'estructures possibles que poden intervenir en diferents tipus de reaccions: àcid-base, oxidació-reducció, complexació, oligomerització i precipitació (Harbowy *et al.*, 1997; Soleas *et al.*, 1997; Bravo, 1998). Totes les estructures dels flavonoides es caracteritzen per un esquelet de difenilpropà ($C_6C_3C_6$) i la seva diversitat estructural vindrà donada per la variació en els patrons d'hidroxilació, l'estereoquímica dels tres centres quirals (C-2, C-3 i C-4) i la localització i tipus de la unió interflavànica (C-4) (Figura 1). A part, també són freqüents derivatitzacions com *O*-metilacions, *C*- i *O*-glicosilacions i *O*-gal·loïlacions en l'estructura.

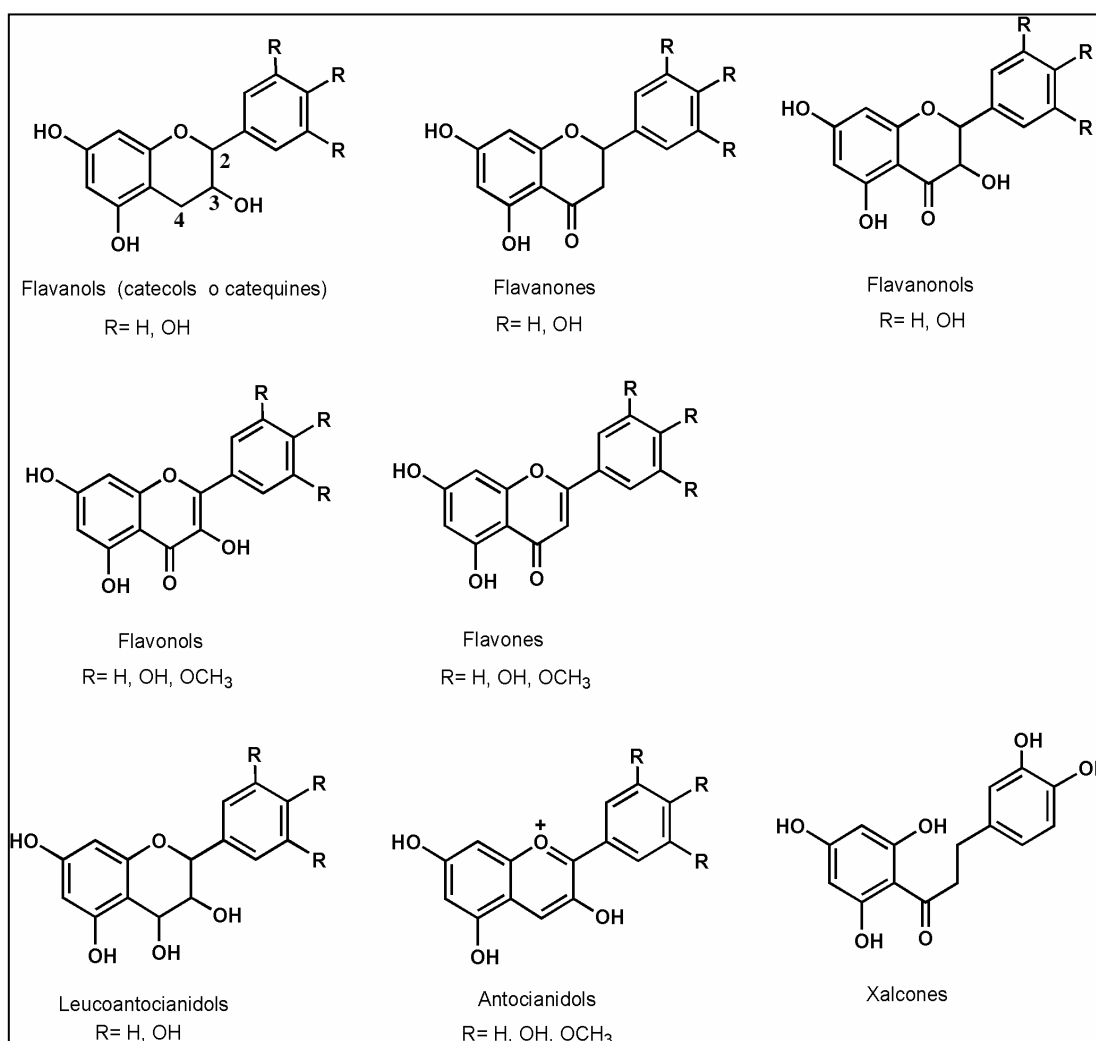


Figura 1. Estructures dels flavonoides més usuals a la natura.

1.1.2 Tanins i proantocianidines

Els flavonoides també es troben en forma polimèrica, especialment en fruites, llavors de llegums, grans de cereals i en begudes com el vi, el te, el coco i els cítrics (Schieber *et al.*, 2001), la gran majoria formant estructures que reben el nom de tanins. El mot “*tannin*” s’emprava antigament per designar substàncies d’origen vegetal capaces de transformar la pell en cuir (fixant i estabilitzant el colàgen). Ara se sap que es tracta d’un grup de compostos fenòlics solubles en aigua que presenten un pes molecular comprès entre 500 i 3000 g/mol que, apart de generar les típiques reaccions fenòliques, tenen la capacitat de precipitar alcaloides, gelatina i d’altres proteïnes (Harborne, 1989). És precisament aquesta capacitat de precipitar proteïnes, en concret les de la saliva, el que li confereix el caràcter astringent típic dels aliments rics en tanins.

Els tanins es classifiquen en tres grups, segons les seves característiques estructurals: Els tanins hidrolitzables, els parcialment hidrolitzables i els condensats (o no hidrolitzables) (Khanbabaee *et al.*, 2001). Aquests últims són oligòmers i polímers formats per unitats de flavanols, les quals no són hidrolitzables en condicions suaus, tot i que en condicions de temperatura elevada i medi àcid els tanins condensats es despolimeritzen formant pigments vermells d’antocianidines, per això els polímers són anomenats proantocianidines.

1.1.2.1 Nomenclatura i classificació de les proantocianidines

Els tanins condensats, o també anomenats proantocianidines, estan formats per oligòmers o polímers d’unitats de flavanol. A aquestes unitats de flavanol se’ls hi aplica una nomenclatura proposada per Hemingway *et al* (Hemingway *et al.*, 1982) i que es pot resumir de la següent manera (Figura 2):

(i) Els noms que reben les diferents unitats dependrà del patró d’hidroxilació de la seva estructura i de la seva configuració. Per exemple la catequina (**2**) presenta la configuració 2*R*, 3*S*. Els monòmers que tinguin la configuració 2*R*, 3*R* porten el prefix “epi”, com per exemple, epicatequina (**1**). Les unitats que presentin una configuració 2*S* es diferenciaran pel prefix enantio (“ent”).

(ii) L’esquelet flavanòlic es dibuixa i els àtoms de carboni es numeren tal com es mostra amb l’exemple de les catequines **1** i **2** (Figura 2).

(iii) La localització del enllaç interflavanic entre dímers i oligòmers es presenta entre parèntesis tal com es fa amb els carbohidrats. La configuració d’aquest enllaç en la posició

C-4 es definirà com α o β segons les normes de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Com a exemple, es mostra el dímer anomenat epicatequin-(4 β →6)-catequina (Figura 2).

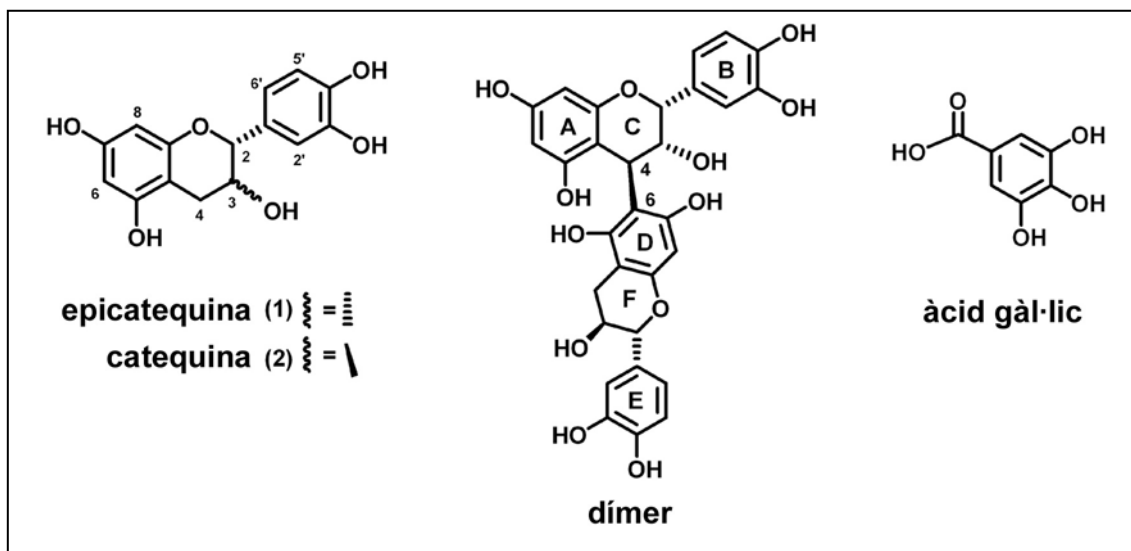


Figura 2. Esquelet flavanòlic amb la numeració dels carbonis de l'epicatequina (1) i la catequina (2), tot dependent de l'estereoquímica del enllaç C-3. dímer d' epicatequin-(4 β →6)-catequina. L'àcid gàl·lic és present en alguns d'aquests compostos en forma d'èster, normalment en la posició C-3.

Així doncs, les proantocianidines són classificades segons el patró d'hidroxilació de les unitats flavàniques que les formen, generant subgrups tals com procianidines (3,5,7,3',4'-OH), prodelfinidines (3,5,7,3',4',5'-OH), procassinidines (7,4'-OH), proapigeninidines (5,7,4'-OH), proluteolinidines (5,7,3',4'-OH), protrictinidines (5,7,3',4',5'-OH), prodistenidines (3,5,7-OH), propelargonidines (3,5,7,4'-OH), proguibourtinidines (3,7,4'-OH), profisetinidines (3,7,3',4'-OH), prorobinetinidines (3,7,3',4',5'-OH), proteracacinidines (3,7,8,4'-OH) i promelacacinidines (3,7,8,3',4'-OH) entre d'altres minoritàries (Hemingway *et al.*, 1982). Les procianidines són el subgrup més comú i s'hi troben tres classes: les procianidines de classe-B (dimèriques) i classe-C (trimèriques) es caracteritzen per una única unió entre les unitats de flavan-3-ols, normalment entre el C-4 de la unitat superior i el C-6 ó C-8 de la unitat inferior (la Figura 2 mostra un dímer de classe-B). Mentre que la classe-A es caracteritza per un enllaç èter addicional entre el C-2 de la unitat superior i el 7- ó 5-OH de la unitat inferior (Ferreira *et al.*, 2000). Una altra peculiaritat de les procianidines és que aquestes es poden trobar esterificades amb àcid gàl·lic (Figura 2), generalment en la posició C-3, convertint-se en productes galats.

1.1.3 Biosíntesi dels flavonoides

El primer pas biosintètic per obtenir qualsevol flavonoide i compostos relacionats involucra la formació de fenilalanina a partir del fenilpiruvat mitjançant una amino transferasa (L-fenilalanina-2-cetoglutarat, PKA). La fenilalanina és transformada per una liasa (fenilalanina amoni liasa, PAL) en àcid *trans*-cinnàmic, el qual és hidrolitzat per una hidrolasa (cinnamat-4-hidroxilasa, C-4-H) a àcid *p*-cumàric. Aquesta primera etapa biosintètica acaba amb la transformació a *p*-cumaril CoA a través d'una CoA ligasa (Figura 3).

El segon pas en la formació dels flavonoides transcorre *via* la generació de policètid mitjançant una metodologia semblant a la biosíntesis d'àcids grassos. Així, a partir del *p*-cumaril CoA obtingut en la primera etapa i tres unitats de Malonil CoA es genera la xalcona mitjançant una flavona sintasa (FS). Un cop arribat a aquest punt, amb l'ajuda de la xalcona isomerasa (CI) es manté un equilibri entre la forma oberta (xalcona) i la ciclada (naringenina). Aquests dos primers passos han estat descrits àmpliament degut a que s'han pogut detectar tots els intermedis i els enzims corresponents (amb especial interès de la xalcona sintasa (Ferrer *et al.*, 1999; Springob *et al.*, 2003)) i les reaccions han estat demostrades en cultius (Kreuzaler *et al.*, 1975; Saito *et al.*, 2002) (Figura 3).

La naringenina és considerada com el precursor dels flavanols, antocianidines, flavan-3-ols i flavan-3,4-diols on els dos últims grups són a la vegada precursors de les procianidines.

Tot i així, en aquesta tercera etapa entre la naringenina i els flavanols existeixen certs dubtes sobre com es genera les diferents esterequímiques (especialment la dels centres quirals C-2, C-3 i C-4) degut a que alguns dels intermedis sintetitzats en laboratori no s'han trobat amb la mateixa esterequímica que en les fonts naturals. A això se li ha d'afegir el fet que substrats i intermedis s'oxiden fàcilment en els extractes biològics. De manera general, l'esquema d'aquesta tercera etapa vindria donat per una hidroxilació de la naringenina (flavanona 3-hidroxilasa, F3H) per obtenir el dihidroflavonol, el qual a través d'una dihidroflavonol reductasa (DFR) s'obtindria la leucoantocianidina o flavan-3,4-diol. Aquests últims són importants en la biosíntesi de les proantocianidines degut a la generació dels flavan-4-carbocations i de la seva estabilització per la deslocalització de la càrrega sobre l'anell A. Així doncs, és a partir dels flavan-3,4-diols que s'obtindrien les antocianidines (a través d'una antocianidina sintasa, ANS) o els flavan-3-ols (a través d'una leucoantocianidina reductasa, LAR) (Shirley, 1996; Winkel-Shirley, 2001; Saito *et al.*, 2002) (Figura 3).

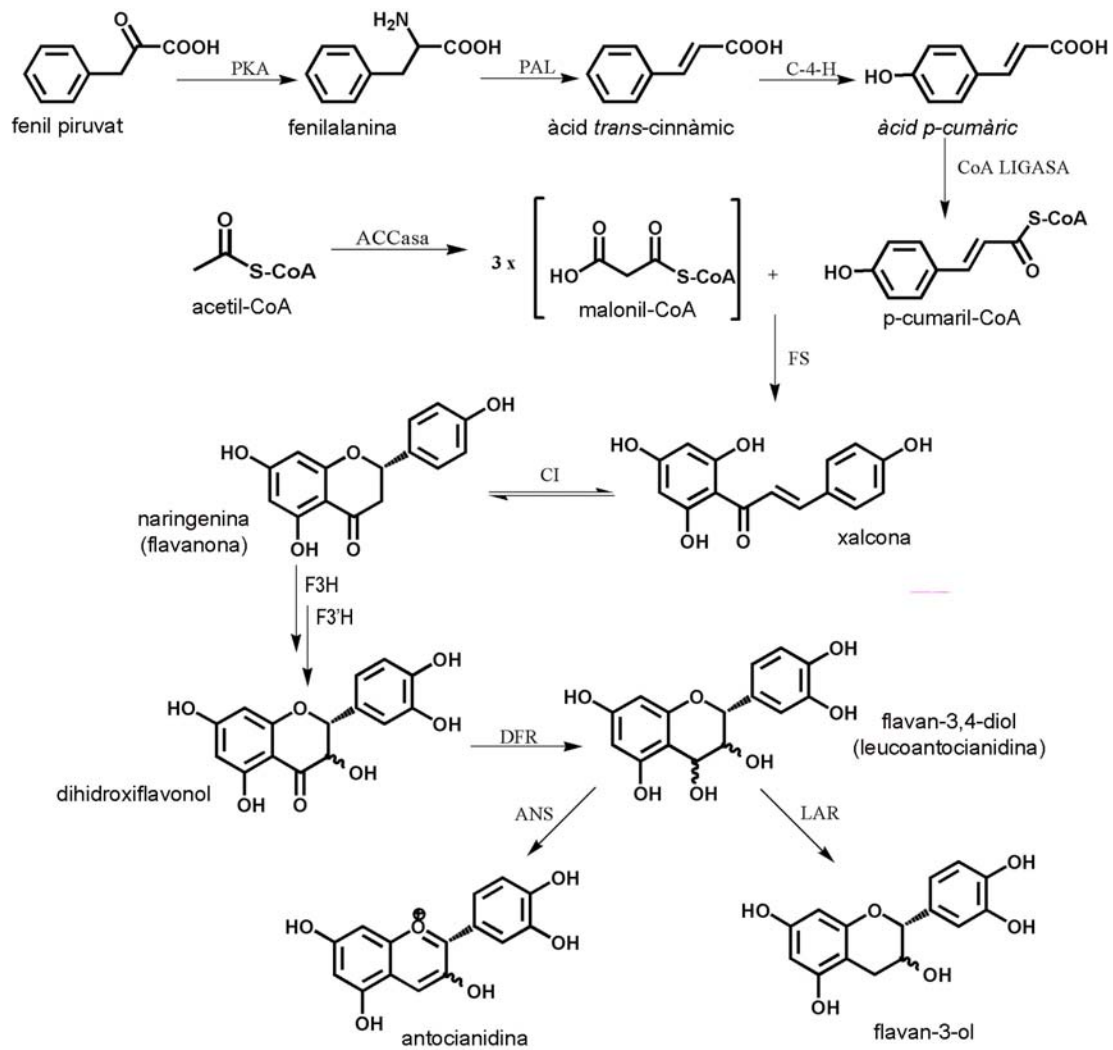


Figura 3. Biosíntesi dels compostos flavonòlics. Els enzims descrits en el procés són els següents: PKA, L-fenilalanina-2-cetoglutarat amino transferasa; PAL, fenilalanina amoni liasa; C-4-H, cinnamat-4-hidroxilasa; ACCasa, acetil CoA carboxilasa; FS, flavona sintasa; CI, xalcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol reductasa; ANS, antocianidin sintasa; LAR, leucoantocianidin reductasa (Soleas *et al.*, 1997; Ferreira, 1999; Springob *et al.*, 2003).

1.1.4 Formació d'oligòmers i polímers de proantocianidines

Fins ara s'ha presentat la formació dels monòmers, el mecanisme del qual es troba ben descrit. Aquests monòmers, a la vegada, es condensen entre ells per formar oligòmers de proantocianidines. En la condensació de les proantocianidines no hi ha tan consens sobre si es realitza *via* mecanisme enzimàtic o no-enzimàtic i el debat encara continua (Saito *et al.*, 2002; Springob *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2005). Per respondre la pregunta primer s'hauria de conèixer el substrat iniciador de la polimerització. Tot i que la catequina es creia el monòmer més comú per realitzar la iniciació, aquest només ho ha realitzat en menys de la meitat dels oligòmers estudiats (Xie *et al.*, 2005). Carbocations o quinones metilades provenint ambdós de les leucoantocianidines, també han estat acceptades com a precursors de les unitats d'extensió de les proantocianidines (Figura 4). Hi mancaria, com en la darrera etapa de la biosíntesi, aïllar els intermedis de les reaccions de polimerització i poder explicar la predominant estereoquímica 2,3-*cis* observada en les unitats d'extensió. Una altra dificultat que presenta el seu estudi és la complexitat de l'estructura de les proantocianidines, que genera uns anàlisis complicats, afegit a la manca d'estàndards comercials purs.

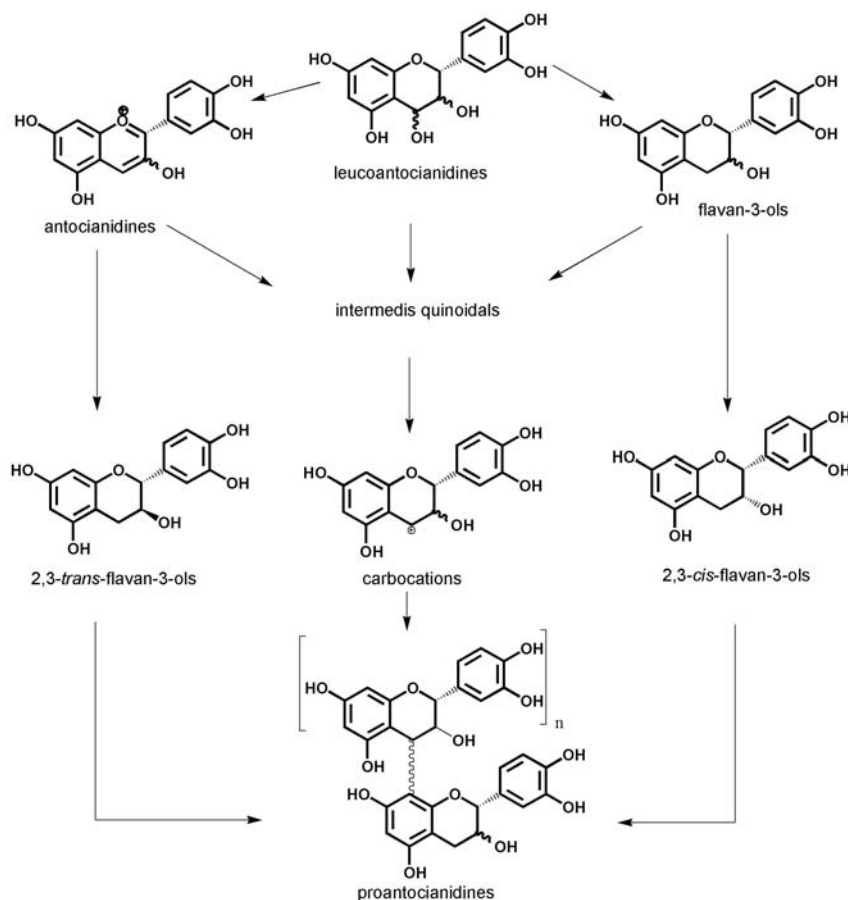


Figura 4. Possible esquema de la polimerització d'unitats flavàniques mitjançant intermedis carbocàtionics (Xie *et al.*, 2005).

1.1.5 Despolimerització

La despolimerització de les proantocianidines té lloc pel trencament del enllaç interflavànic, catalitzat per medi àcid, donant com a resultat un monòmer provenint de la unitat terminal del polímer i d'un carbocatió de la unitat d'extensió.

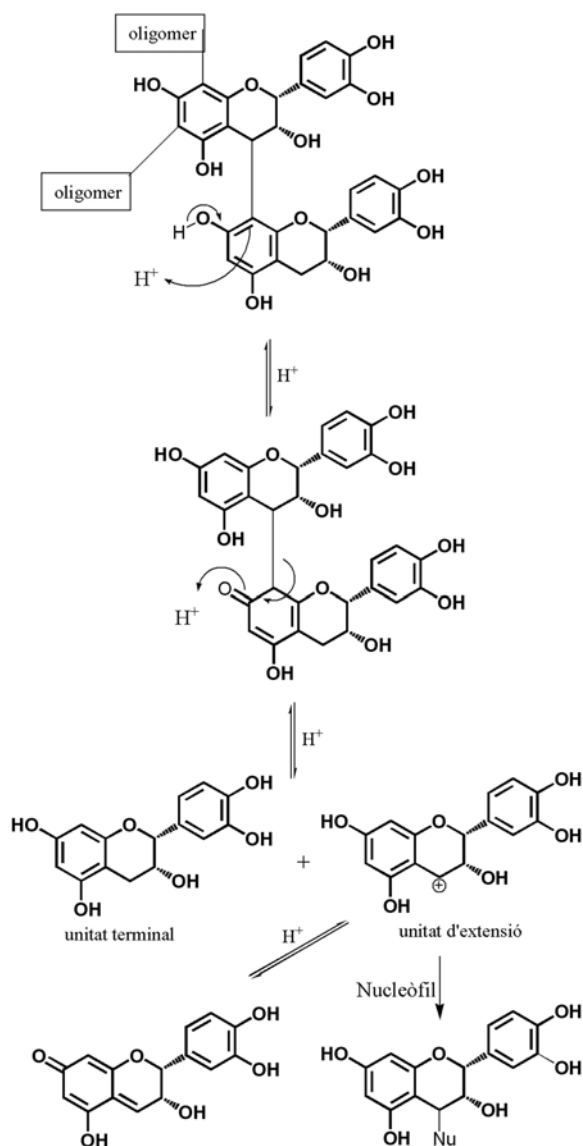


Figura 5. Hipotètic mecanisme de reacció de la despolimerització de proantocianidines en medi àcid (Kennedy *et al.*, 2001).

El mecanisme pel qual transcorre la despolimerització es desconeix per falta d'intermedis mesurables. Una proposta parla de la captació d'un hidrogen del medi pel C-8, generant un carbocatió que immediatament és estabilitzat per la formació de la semiquinona. Finalment, l'enllaç C-C entre la posició 4 i la 8 es trenca heterolíticament per a recuperar l'aromaticitat en l'anell A, mentre genera un nou carbocatió en l'altre monòmer, el qual degenera a una forma quinona més estable (Figura 5) (Ferreira, 1999).

Per evitar aquesta degeneració i determinar quins monòmers han participat en la formació del polímer, s'empra un nucleòfil fort de tipus tiol que atrapi el carbocatió formant un adducte tioèter analitzable (Figura 5 al final). Diferents fonts de tiols han estat emprades en la literatura per la despolimerització de proantocianidines, com ara l'àcid tioglicòlic (Sears *et al.*, 1968), el toluen- α -tiol (Thompson *et al.*, 1972; Rigaud *et al.*, 1991; Prieur *et al.*, 1994; Souquet *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1998) el 2-mercaptoetanol (Tanaka *et al.*, 1998) i el floriglucinol (Matthews *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2001) (Figura 6).

Aquest procediment s'utilitza de manera general per estimar el grau de polimerització i gal·loització de les proantocianidines amb el principal avantatge que la reacció amb un nucleòfil preserva l'estereoquímica de les posicions C-2 i C-3 de les unitats polimèriques i

limita la possibilitat de reaccions secundaries d'oxidació amb el carbocatió (Matthews *et al.*, 1997; Ferreira, 1999). Usos més recents utilitzen la despolimerització per obtenir nous compostos provenint de les unitats d'extensió derivades amb el grup tiol (Tanaka *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2001b).

Aquesta tecnologia és especialment indicada per la recuperació de monòmers a partir de oligòmers i polímers de proantocianidines presents en la natura (fent especial menció als subproductes vegetals obtinguts en processos industrials) convertint-se en una font natural d'una nova classe de compostos, conjugats de flavanols, amb noves propietats físico-químiques.

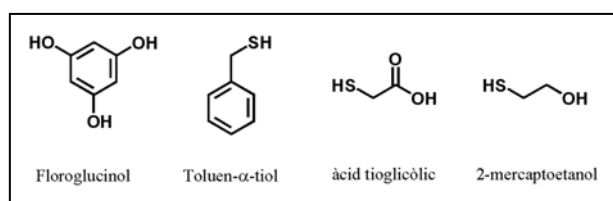


Figura 6. Fonts de tiols més emprades per fer de nucleòfils en les reaccions de despolimerització.

1.1.6 Separació i anàlisi de les proantocianidines

Avui dia existeixen diverses tècniques per a la separació de les proantocianidines, les quals s'empren segons les propietats que presenti la barreja (monòmers, oligòmers i grups funcionals). La més emprada s'anomena cromatografia de fase reversa (reïna hidrofòbica) (Bronner *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 1999; Revilla *et al.*, 2001). En els anys 70, la cromatografia líquida d'alta eficàcia (high performance liquid chromatography, HPLC) en fase reversa fou emprada per primer cop per a la determinació de proantocianidines. Des d'aleshores s'han publicat diversos articles de revisió dels diferents mètodes d'HPLC (Daigle *et al.*, 1988; Robards *et al.*, 1997; Merken *et al.*, 2000), on s'empren majoritàriament columnes de fase reversa i sistemes d'elució binaris amb una solució aquosa acidificada amb àcid acètic, perclòric, fosfòric o fòrmic i un altre solvent orgànic menys polar, com metanol, etanol o acetonitril, també acidificat. En aquests sistemes es mostra que l'àcid trifluoroacètic en ambdós eluents millora la resolució de les catequines i elimina una esquena que mostrava el pic (Dalluge *et al.*, 1998). Menys freqüents són els sistemes terciaris (De Pascual-Teresa *et al.*, 1998).

Altres tècniques són la cromatografia electrocinètica micelar (Larger *et al.*, 1998; Herrero-Martinez *et al.*, 2003), cromatografia de partició (Yoshida *et al.*, 1989; Delaunay *et al.*, 2002),

cromatografia d'exclusió de tamany (Yanagida *et al.*, 2003) i electroforesi capilar (Vaheer *et al.*, 2003). Altres metodologies es troben més enfocades cap a l'extracció no selectiva de material polifenòlic d'origen vegetal com l'extracció en fase sòlida amb resines d'Amberlite XAD (Lalaguna, 1993), extracció de membrana (Nwuha, 2000) i extracció amb fluids supercrítics (Cao *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2000).

Les proantocianidines obtingudes de la separació han estat analitzades extensivament mitjançant tècniques de RMN (Porter *et al.*, 1982; Foo *et al.*, 1996; Hatano *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2000) i cromatogràfiques (Prieur *et al.*, 1994; Souquet *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1998; Ferreira, 1999).

1.1.7 Disponibilitat

Els compostos flavonoides que s'han presentat anteriorment es troben distribuïts àmpliament en el regne vegetal (Rice-Evans *et al.*, 1996; Cheynier, 2005) essent presents en arrels, tiges, troncs, fulles i fruits (Harborne *et al.*, 2000; Manach *et al.*, 2004). Una de les funcions més conegudes és la de substàncies protectores d'influències externes (els vegetals, degut a que són immòbils, necessiten una protecció efectiva respecte les influències externes, com la radiació UV, mossegades d'animal i atacs fúngics o de virus), però també es veuen implicats en funcions tan diverses com l'olor, el color, els mecanismes de polinització (Koes *et al.*, 1994) i la tolerància al fred (Camm *et al.*, 1993) entre d'altres (Cooper-Driver *et al.*, 1998). Els animals, en canvi, no són capaços de sintetitzar compostos aromàtics amb anells benzènics a partir de precursors alifàtics. Per aquesta raó, els animals i els humans depenen fortament d'una dieta exògena per incorporar aquestes substàncies (Taula 1). De la mateixa manera, les vitamines són unes altres substàncies orgàniques vitals en la dieta que l'organisme tampoc pot sintetitzar o les sintetitza només en quantitats insuficients. De la gran família dels polifenols, l'únic que es considera vitamina és la Vitamina E (Hassig *et al.*, 1999).

Taula 1. Algunes fonts de flavonoides presents en la dieta (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Flavanols	Epicatequina Catequina	te verd i negre, vi negre
	Epigallocatequina Epicatequin galat Epigallocatequin galat	
Flavanones	Naringina Taxifolina	pell i la fruita de cítrics
Flavonols	Kaempferol Quercetina Miricetina	raïm, te ceba, enciam, oliva, te, vi negre maduixa, te, vi negre
Flavones	Crisina Apigenina	pell de fruites api, julivert
Antocianidines	Malvidina Cianidina Apigenidina	raïm negre, fruites i pell amb color
Fenil propanoids	Àcid feluric Àcid cafeic Àcid p-cumàric Àcid clorogènic	blat, arròs, tomaquet, espinac vi blanc, oliva, cafè, espinac vi blanc, espàrrec, espinac poma, pera, anís, prèsec

El suplement d'aquests compostos en la dieta ens aporta beneficis coneguts des de fa segles i que la ciència ha anat corroborant i mostrant-ne d'altres en les últimes dècades (Yao *et al.*, 2004b). Així, dietes riques en fruita i verdura juntament amb el consum de te i vi, entre d'altres begudes, protegeixen de malalties cardiovasculars, de certes formes de càncer (Ness *et al.*, 1997; Bravo, 1998; Ross *et al.*, 2002) i possiblement contra d'altres malalties. Aquests efectes protectors han estat majoritàriament atribuïts als antioxidants (com la vitamina C i β -carotè) i també als compostos minoritaris com carotenoids i flavonoides. Tal com s'ha vist anteriorment, els flavonoides contenen grups hidroxils units a anells aromàtics, la qual cosa els confereix l'activitat l'antioxidant (Ferreira, 1999; Rice-Evans, 2001) i d'altres propietats com ara antibiòtica, antial·lèrgica i antiinflamatòria entre d'altres (Bravo, 1998).

Una de les fonts de flavanols més estudiada és la del te, que conté majoritàriament catequines monomèriques tals com (–)-epigallocatequin 3-O-galat (EgcG), (–)-epigallocatequin (Egc), (–)-epicatequina (Ec) i (–)-epicatequin 3-O-galat (EcG) (Harbowy *et al.*, 1997) (Figura 7A).

Les fonts en les que se centra aquest treball són els extractes de raïm, de pi i també d'hamamelis que contenen flavanols monomèrics en menor quantitat i són rics en flavanols oligomèrics (entre dos i set unitats) i polimèrics (més de set unitats) (Figura 7B).

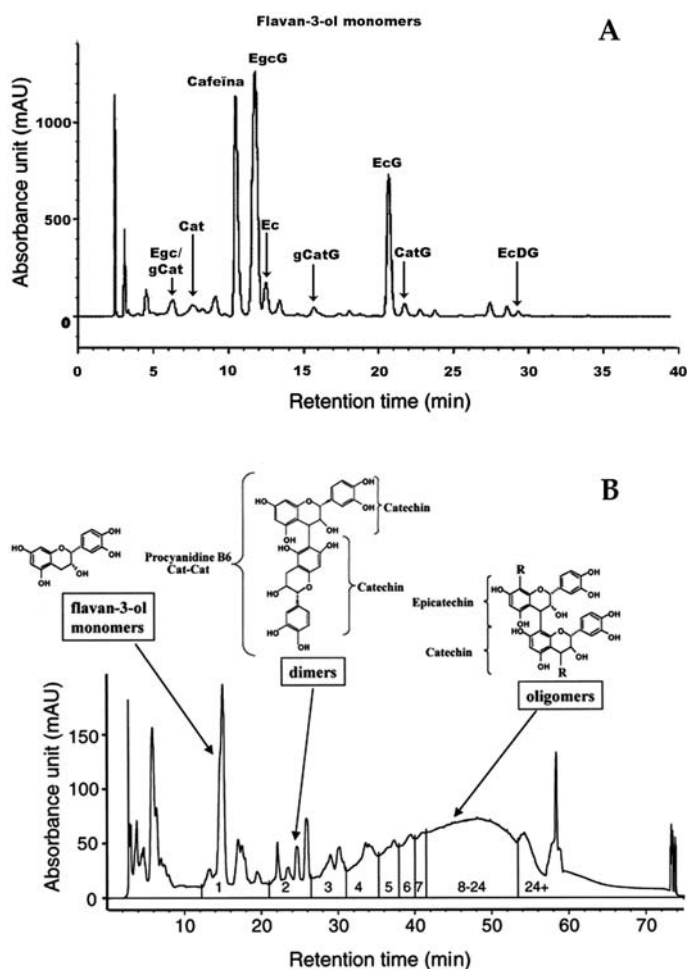


Figura 7. Cromatogrames d'HPLC corresponents a extractes de te (A) i de pi (B). L'extracte de te (A) conté monòmers de flavanols, la majoria d'ells gal·loitzats: Egc, epigal·locatequina; gCat, gal·locatequina; EgcG, epigal·locatequin 3-O-galat; EcG, epicatequin 3-O-galat; EcDG, epicatequin digalat; entre d'altres compostos com teogalina, cafeïna, quercetina i camferol (Yao *et al.*, 2004a). L'extracte de pi (B) conté monòmers de flavanols així com oligòmers de entre 2 i 7 residus i polímers de entre 8 i 24 residus (Harbowy *et al.*, 1997; Bravo, 1998; Packer *et al.*, 1999).

Els extractes de *Vitis vinifera*, *Pinus pinaster* i d'*Hamamelis virginiana*, obtinguts com a subproductes en la primera etapa de premsat del raïm i de l'escorça de pi i d'*Hamamelis* respectivament, seran despolimeritzats en medi àcid i amb la presència d'un grup tiol.

1.2 OXIDANTS I ANTIOXIDANTS

1.2.1 Espècies reactives d'oxigen

Espècies reactives d'oxigen (reactive oxygen species, ROS) és el nom col·lectiu que reben les espècies derivades d'oxigen, radicalàries o no-radicalàries, que siguin agents oxidants i/o que es puguin convertir fàcilment en radicals (Taula 2). Un radical lliure és un compost que conté un o més electrons desaparellats, capaç d'existir de forma independent i que en general és altament reactiu. És per això que tots els organismes aeròbics han de posseir un sistema de defensa antioxidant per protegir-se contra els danys induïts per ROS. Com antioxidant s'enten "qualsevol substància que, quan està present en baixa concentració comparat amb qualsevol altre substrat oxidable, preveu significativament l'oxidació d'aquell substrat" (Halliwell, 1995). Dins del marc de substrats oxidables s'hi inclouen l'ADN, lípids, proteïnes i carbohidrats, entre d'altres.

Taula 2. Espècies d'oxigen reactiu (ROS).

ROS		Símbol
Radicals	Anió superòxid	O_2^-
	Hidroxil	$HO\cdot$
	Alcòxid	$RO\cdot$
	Peròxid	$ROO\cdot$
	Òxid nítric	$NO\cdot$
No-radicals	Peròxid d'hidrogen	H_2O_2
	Àcid hipoclorós	$HClO$
	Ozò	O_3
	Oxigen singulet	$^1\Delta O_2$
	peroxinitrit	$ONOO\cdot$

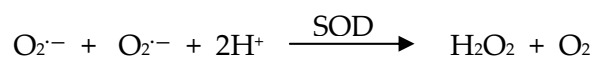
Com a conseqüència de participar en un metabolisme aeròbic, petites quantitats d'espècies amb oxigen reactiu (ROS) són generades constantment en l'organisme, la majoria d'elles a partir de les cadenes de transport d'electrons. S'hi inclouen el radical hidroxil ($\cdot OH$), l'anió superòxid (O_2^-), l'oxigen singulet (1O_2) i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) (Mates *et al.*, 2000). La generació d'aquestes ROS no s'ha de relacionar sempre amb toxicitat. Les diverses funcions cel·lulars, com l'apoptosi i l'homeòstasi de l'organisme, són fortament dependents del correcte balanç redox (Kovacic *et al.*, 2001; Pelicano *et al.*, 2003). Ocasionalment,

l'organisme es troba desbordat per un excés de ROS produït per factors endògens com una malaltia o l'envelliment, o per factors exògens com la pol·lució, el tabac, medicines, pesticides i la radiació ultraviolada entre d'altres. Aquest excés de ROS s'ha relacionat amb el procés d'envelliment (Cadenas *et al.*, 2000) i amb múltiples malalties, inclòs el càncer, i lesions de teixits (Buttke *et al.*, 1994; Slater *et al.*, 1995; Jacob *et al.*, 1996; Kovacic *et al.*, 2001). El teixit del cervell és particularment sensible a les ROS degut al seu alt contingut en substrats oxidables (àcids grassos insaturats) provocant, *a posteriori*, malalties neurodegeneratives com el Parkinson i l'Alzheimer (Liu *et al.*, 2002). És per això que els organismes vius han desenvolupat sistemes de defensa, enzimàtics i no-enzimàtics, per regular els nivells de totes les ROS.

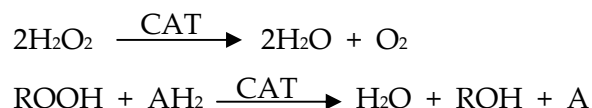
1.2.2 Sistemes de defensa interns del organisme

La primera línia defensiva preveu el dany oxidatiu interaccionant directament amb les ROS. S'inclouen enzims endògens, entre ells la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i la glutatió peroxidasa (GPX) que destaquen com a agents destoxicadors del anió superòxid, el peròxid d'hidrogen i els hidroperòxids orgànics respectivament, els quals es detallen a continuació:

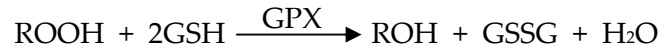
- La superòxid dismutasa transforma el radical superòxid en peròxid d'hidrogen, el qual és posteriorment transformat a aigua per la catalasa.



- La catalasa és un dels enzims més eficients que es coneixen. Aquest reacciona amb el peròxid d'hidrogen per formar aigua i oxigen molecular. Igualment, amb donadors d'hidrogen com metanol, etanol i fenols presenta activitat peroxidasa.



- La glutatió peroxidasa catalitza la reducció d'una variada quantitat d'hidroperòxids (ROOH i H₂O₂) emprant glutatió (GSH) i, d'aquesta manera, protegeix les cèl·lules de danys oxidatius, sobretot d'hidroperòxids lipídics.



La segona línia defensiva no enzimàtica combat els processos generats pels radicals lliures. Els compostos principals són l'àcid ascòrbic (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), el β -carotè, la vitamina A i el NADPH, entre d'altres (Jacob *et al.*, 1996).

Els antioxidants d'origen vegetal integrats a través de la dieta, com els carotenoids i els flavonoides, són considerats una ajuda als mecanismes de defensa interns contra totes aquestes oxidacions no desitjades (Bravo, 1998; Diplock *et al.*, 1998). Els flavonoides presenten diversos mecanismes d'acció antioxidant (tal com es descriurà tot seguit), entre ells la inactivació de radicals mitjançant la formació d'altres radicals fenòlics relativament més estables (Dangles *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 1999a; Kondo *et al.*, 2001).

1.2.3 Mecanisme antioxidant dels flavonoides

Els flavonoides poden exercir la seva capacitat antioxidant *via* diversos mecanismes, com la inactivació radicalària de ROS i la inhibició d'enzims involucrats en la seva producció, la quel·lació de cations de metalls de transició capaços de promoure la formació radicalària (reacció de Fenton) i la regeneració d'antioxidants endògens com l' α -tocoferol (vitamina E) (Cos *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2004). Encara manca informació sobre els mecanismes moleculars pels quals els flavonoides exerceixen la seva capacitat antioxidant degut a la difícil tasca d'aturar les reaccions radicalàries i aïllar els intermedis.

1.2.3.1 Mecanisme antiradicalari

El concepte bàsic per què un antioxidant (AH) tingui activitat antiradicalària és generar un radical més estable i menys danyí després de la reacció amb el radical lliure. La reacció es basa amb una transició redox en que s'involucra la donació d'un electró (o un àtom d'hidrogen, que equival a la donació d'un electró i un protó) per part de l'espècie radicalària (R•) (Cos *et al.*, 2004).



La capacitat antiradicalària d'un compost es determina, generalment, emprant un radical lliure relativament estable. Els assaigs més freqüents que es realitzen són el TEAC i el DPPH. Aquest últim es tracta d'un radical comercial que presenta color i és àmpliament utilitzat per estimar l'habilitat dels antioxidants en donar àtoms d'hidrogen. Cada molècula de DPPH és reduïda per una molècula d'antioxidant. En el cas d'estructures *o*- i *p*-difènòliques, presents en els compostos flavanòlics, aquestes poden ser oxidades per dos molècules de DPPH, obtenint-se la corresponent quinona (Figura 8 Mec. A). Si la quinona no és reactiva en front del DPPH l'estequiometria serà de 2 (2 molècules de DPPH reduïdes per 1 molècula d'antioxidant). En canvi, si aquestes es regeneren poden ser de nou oxidades pel DPPH i la seva estequiometria serà superior a 2 (Dangles *et al.*, 1999). La introducció d'un àcid gàl·lic en la posició C-3 de l'estructura monomèrica, així com la polimerització de fins a tres unitats incrementa significativament la capacitat antiradicalària, mentre que una major polimerització la disminueix (Plumb *et al.*, 1998; Furuno *et al.*, 2002).

Centrant-nos en els flavan-3-ols (catequines), es va veure que eren capaços de reduir entre 2 i 2.5 molècules de DPPH per molècula d'antioxidant (Dangles *et al.*, 2000) (Figura 8 Mec.A). Aquesta observació lligava amb l'estructura *o*-difènòlica que presenta la catequina, la qual és oxidada a *o*-quinona, producte final que s'ha detectat. El que va sorprendre és que la catequina, sota condicions fisiològiques, presentés una capacitat antioxidant més elevada de l'esperada (Kondo *et al.*, 1999a, 1999b). Aquesta observació generà la proposta de diversos mecanismes antioxidants segons els productes finals que es podien elucidar. Una de les primeres propostes, realitzades pel grup de Kondo *et al* als voltants de 1999, fou que a partir d'una primera oxidació de la catequina a semiquinona, la segona oxidació podria evolucionar en dos sentits diferents: cap a quinona (Figura 8 Mec.A) o cap a l'abstracció del 2-H (molt més làbil que els hidrogens fenòlics degut al seu entorn, segons estudis d'entalpies de dissociació d'enllaços) generant un intermedi que evolucionaria fins a cianidina tot recuperant l'hidroxil del anell B. L'anell B tornaria a presentar poder antioxidant podent evolucionar novament fins a la quinona i obtenint un total de fins a 4 molècules de radical reduïdes (Figura 8 Mec.B) (Kondo *et al.*, 1999a; Kondo *et al.*, 2001).

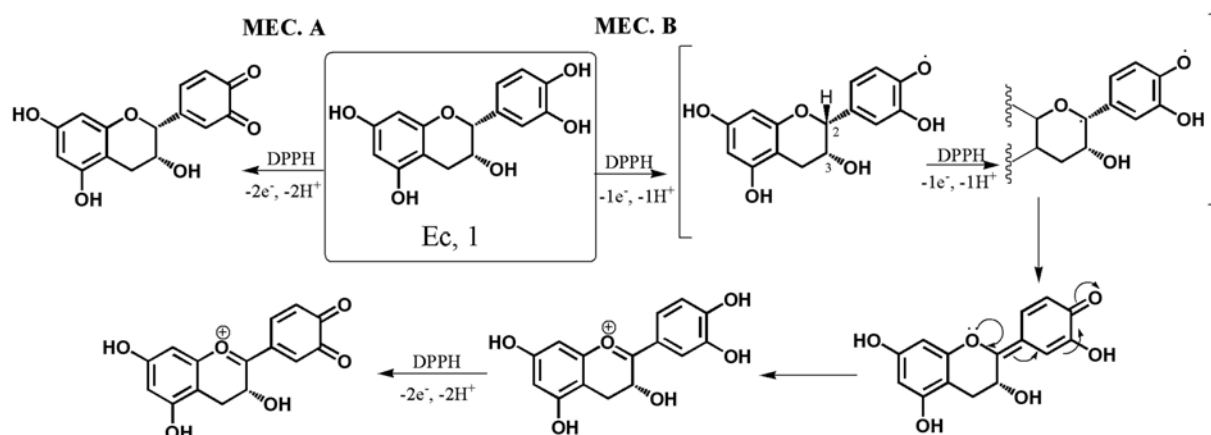


Figura 8. Mecanisme d'oxidació radicalària de la catequina proposat per Kondo. El mecanisme **A** genera la quinona amb dos molècules de DPPH reduïdes. El mecanisme **B** permet la regeneració del radical arilòxid (semiquinona) amb la finalitat d'augmentar la seva capacitat antiradicalària (Kondo *et al.*, 1999a).

En el mateix any, Kondo proposa un mecanisme per les catequines esterificades amb un grup galat, en el qual el número de radicals reduïts és major a la corresponent catequina. Els hidroxils del grup galat presentaren unes entalpies de dissociació prou baixes per poder participar en els primers estadis de la reducció (Figura 9). En les catequines que presentaren grups pirogal·lol (3 hidroxils en l'anell B), tot i reduir un nombre elevat de radicals la seva oxidació va anar acompanyada de la producció de superòxid a partir del oxigen molecular, a causa del baix potencial redox que presentaren els seus intermedis (Kondo *et al.*, 1999b). Aquest efecte pro-oxidant ha estat descrit en més d'una ocasió pels flavanols presents en el te (Yen *et al.*, 1997; Long *et al.*, 2000; Heim *et al.*, 2002; Azam *et al.*, 2004; Elbling *et al.*, 2005).

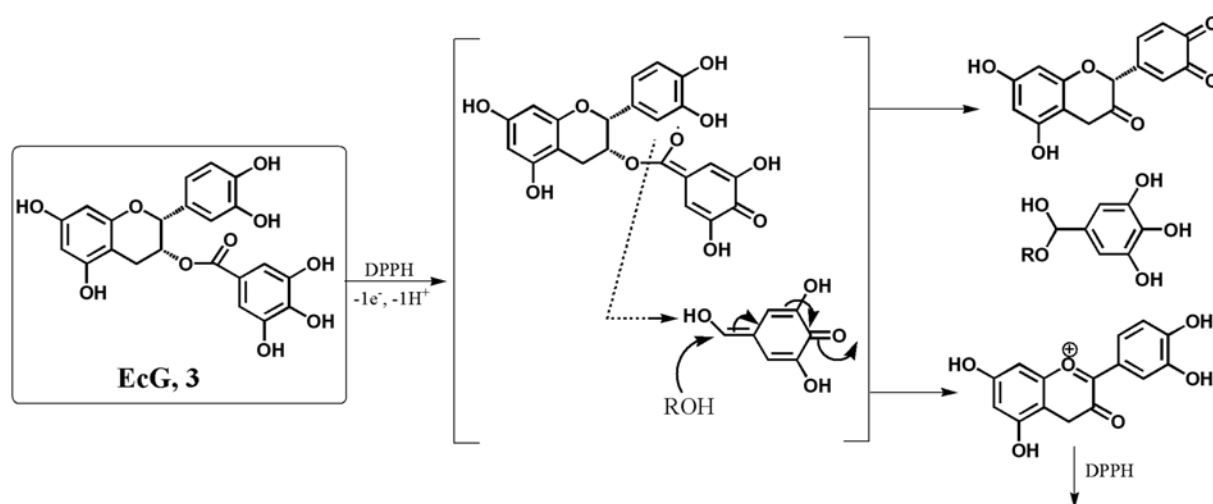


Figura 9. Mecanisme antiradicalari per a una catequina esterificada amb un grup galat. Aquest grup participa en els primers estadis de la reducció, segons proposa Kondo (Kondo *et al.*, 1999b).

En una variant d'aquest mecanisme, Sang *et al* proposa que després de la primera oxidació a semiquinona, aquesta realitza un atac nucleofílic amb una nova catequina per formar un dímer, regenerant l'hidroxil a través d'un equilibri ceto-enòlic, segons els productes de reacció observats(Sang *et al.*, 2002) (Figura 10).

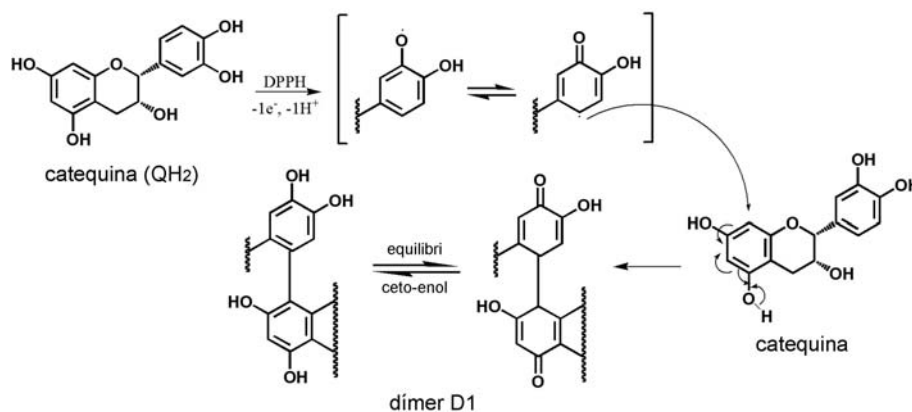


Figura 10. Hipòtesi sobre la regeneració dels hidroxils a partir de la formació de dímers de catequina a partir de la semiquinona.

A mitjans de l'any 2000, Dangles *et al* proposaren una altra possible via de reducció de les catequines. Es basava en la possibilitat que un cop la catequina s'ha oxidat a radical arilòxid (semiquinona), aquesta desproporciona a catecol i a quinona (la desproporció la faria amb una altre semiquinona o amb el radical present). Aquests dos productes poden acoplar-se tot formant un dímer i regenerant així els hidroxils de la quinona. El dímer pot seguir oxidant-se a radical arilòxid amb la subsegüent desproporció (Figura 11) (Dangles *et al.*, 2000).

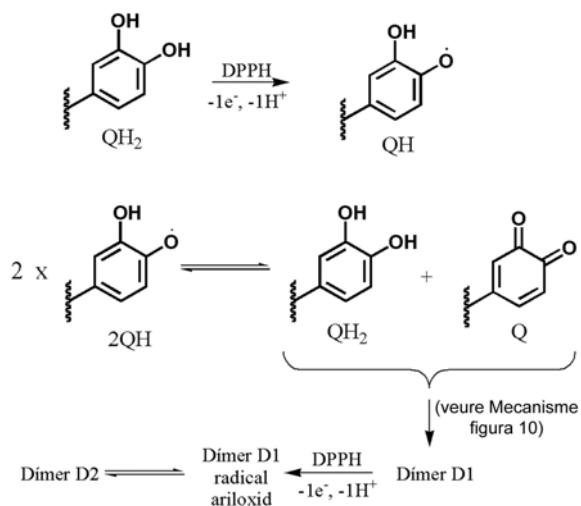


Figura 11. Mecanisme de regeneració dels hidroxils mitjançant una reacció radicalària entre la catequina i la quinona per formar dímers. Els dímers podran ser posteriorment oxidats per radicals.

Aquest últim mecanisme proposat per l'activitat antioxidant de les catequines es modificà lleument dos anys després per explicar l'autoxidació de les catequines.

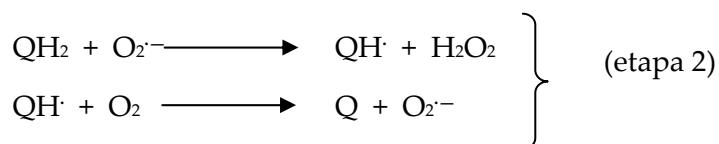
1.2.3.2 Autoxidació de les catequines

Tot i la documentada capacitat de les catequines per actuar com a antioxidants, mostrada anteriorment, també s'ha descrit la facilitat que presenten de ser oxidades per l'oxigen i generar ROS com el radical superòxid i el peròxid d'hidrogen sota certes condicions, especialment en pH bàsic (Aruoma *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1997; Dangles *et al.*, 1999; Roginsky *et al.*, 2005). En condicions fisiològiques (pH 7.4), l'autoxidació de les catequines és molt lenta i a mesura que augmenta el pH, el nivell d'oxidació difereix segons el tipus d'estructura. Així, les gal·locatequines presenten una tendència a l'autoxidació molt més acusada a pH inferiors, i l'autoxidació de la catequina no es fa notoria fins a pHs superiors a 12 (Mochizuki *et al.*, 2002).

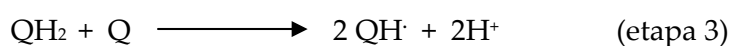
L'autoxidació tindria una etapa d'iniciació en que l'oxigen seria capaç d'oxidar la catequina a semiquinona, tot generant el radical superòxid (etapa 1, sota aquestes línies).



Els dos productes obtinguts actuarien com a catalitzadors d'aquesta primera etapa degut a que el superòxid és més oxidant que l'oxigen per reduir la catequina tot generant peròxid d'hidrogen, i la semiquinona és millor donadora d'electrons que la catequina per reduir l'oxigen tot generant l'espècie quinona (veure l'etapa 2).



La velocitat del procés d'oxidació s'afavoreix de manera quasi exponencial (Mochizuki *et al.*, 2002). L'acumulació de l'espècie quinona (Q) en aquest medi bàsic, juntament amb la catequina de partida (QH₂), desplaça l'equilibri de la desproporció cap a generació de la semiquinona (QH[·]) (etapa 3) (Mochizuki *et al.*, 2002; Roginsky *et al.*, 2005).



1.3 CÈL·LULES I CULTIUS CEL·LULARS

Sembla haver un consens científic sobre l'efecte preventiu dels flavonoides sobre el càncer per mecanismes encara poc clars que podrien estar relacionats o no amb la seva capacitat reductora (antioxidant). S'ha relacionat els flavonoides amb modificacions en la proliferació, el cicle cel·lular i l'apoptosi.

1.3.1 Proliferació

La proliferació és un dels processos cel·lulars que està més controlat. Una cèl·lula normal necessita de factors externs (mitogènics) que regulin el pas de l'estat latent al proliferatiu, tot iniciant el cicle cel·lular (Evan *et al.*, 2001). La seva desregulació és una de les causes principals de càncer.

1.3.2 Cicle cel·lular

Una cèl·lula es troba en estat latent o G0 fins que proteïnes com els factors de creixement o les citoquines (que són agents mitogènics) interaccionen amb receptors de membrana i activen el senyal de proliferació, activant les fases del cicle cel·lular: G1 (període 1), S (síntesis), G2 (període 2) i M (mitosi). La regulació del cicle està molt controlada en diversos estadis, anomenats punts de control. Si el sistema detecta alguna anomalia en aquests punts, el cicle s'atura per tal que s'activin els processos de reparació i se li dóna la oportunitat de ser rectificat. En el cas que la cèl·lula sigui capaç de reparar l'anomalia, es procedeix a la següent fase. En cas contrari, la cèl·lula s'autoelimina activant el programa d'apoptosi.

1.3.2.1 Fases del cicle cel·lular

Així, un cop els factors de creixement "despertem" la cèl·lula del seu estat G0 (quiescent o latent), aquesta entra en el període G1, anomenat primera fase de creixement, on la cèl·lula sintetitza nou material citoplasmàtic, sobretot proteïnes i ARN, tot preparant-se per entrar a la fase de síntesi d'ADN (S).

En la fase S, o de síntesi, té lloc la duplicació de l'ADN. En la finalització d'aquest període, el nucli conté el doble de proteïnes nuclears i d'ADN que al principi ($4n$, on "n" és el número de cromosomes). Aleshores el cicle progressa durant tota la fase G2, o segona fase de creixement, en que es segueix sintetitzant ARN i proteïnes tot preparant la cèl·lula per la

mitosi. El final d'aquest període G2 queda marcat per l'aparició de canvis en l'estructura cel·lular que es fan visibles pel microscopi i ens indiquen el principi de la mitosi.

En la mitosi, o divisió cel·lular, l'ADN replicat es condensa formant els cromosomes i culmina en la separació de les dues cèl·lules filles, procés conegut com citoquinesis.

Si es pren com a començament del cicle la citoquinesis, la cèl·lula filla que se n'obté resulta petita i amb un baix contingut d'ATP, resultat del consum experimentat en el cicle anterior. L'acumulació d'ATP necessari i l'increment de la mida tenen lloc durant l'interval G1, que representa la fase més llarga del cicle cel·lular (Evan *et al.*, 2001; Elliott *et al.*, 2005).

1.3.2.2 Regulació del cicle cel·lular

Com s'ha dit anteriorment, el cicle cel·lular és un procés que està altament controlat per evitar que errors en la seva execució generin repercussions serioses en l'organisme. És per això que presenta tres punts principals de control:

- Al final de la fase G1, quan la cèl·lula ja té la mida òptima i és capaç de realitzar la seva funció en el teixit corresponent, aquesta s'atura en el primer control i entra en la fase quiescent (G0) si no rep senyals mitogèniques o l'ADN el té danyat.
- Al final de la fase G2, on el cicle cel·lular s'atura si l'ADN està danyat o la duplicació és incompleta.
- Al final de la fase M, on s'atura si el procés de separació dels cromosomes no ha sigut òptim.

Sense entrar en detall comentar que aquests tres controls del cicle cel·lular depenen fortament de la síntesis i destrucció d'uns compostos anomenats ciclines. Les ciclines es combinen amb diverses protein-quinases, donant com a resultat un canvi de conformació i una fosforilació que les activa (anomenant-se Cdks). Així, l'inici del cicle s'activa degut a l'activació de les Cdks apropiades i, un cop passa el punt de control de G1 i el cicle entra en S, aquestes ciclines són destruïdes per proteasomes i les ciclines corresponents a la fase S són sintetitzades perquè es puguin unir a d'altres quinases. El mateix ocorre en els punts de control de S i M, tot variant el tipus de ciclines i de quinases igual que el seu mode d'activació i destrucció (Figura 12) (McDonald *et al.*, 2000; Pucci *et al.*, 2000; Evan *et al.*, 2001; Elliott *et al.*, 2005).

Si el cicle cel·lular es degenera i la reparació no s'ha pogut portar a terme, la cèl·lula activa el mecanisme d'apoptosi per evitar el risc de produir cèl·lules genèticament anormals.

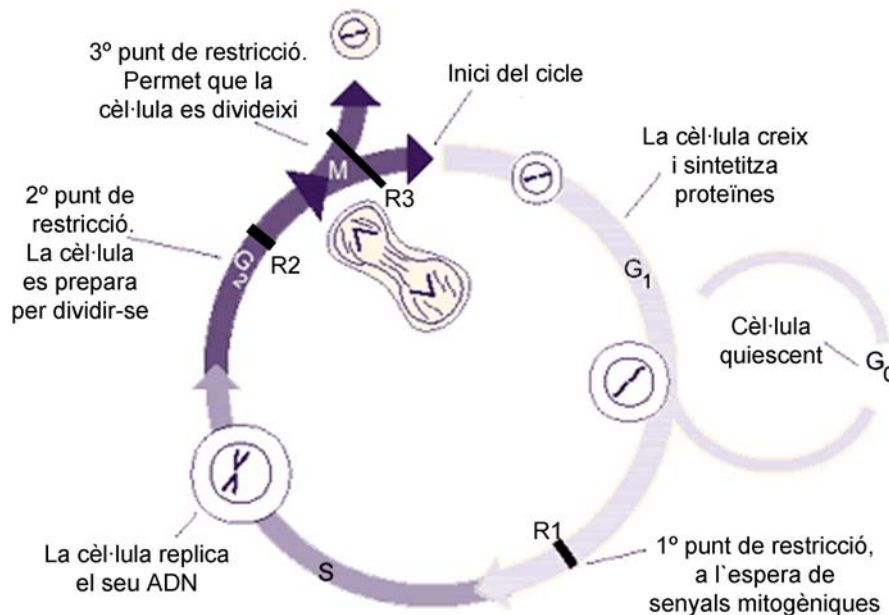


Figura 12. Diagrama simplificat del cicle cel·lular eucariòtic, on es mostren les fases del cicle G₁/G₀, S, G₂ i M i els tres punts de restricció (R1, R2 i R3) on R1 atura el cicle si no rep senyals mitogèniques, R2 si l'ADN es troba danyat o mal duplicat i R3 si hi ha problemes en la separació cromosòmica.

1.3.3 Apoptosi

L'apoptosi o mort cel·lular programada és el nom que rep el mecanisme pel qual una cèl·lula activa tota una cascada de senyals per intentar arreglar desordres cel·lulars i, si no es pot, ser eliminada de manera controlada pel sistema sense causar danys als teixits contigus. Aquesta és la principal diferència amb la necrosi o mort cel·lular patològica, procés que ocorre quan la cèl·lula està exposada a un estrès provenint del medi exterior, com l'hipertèrmia o l'hipòxia, o per agents que danyen la membrana plasmàtica (virus,...). La necrosi es produeix quan l'agressió excedeix la capacitat de la cèl·lula de regenerar-se i s'acompanya d'una sèrie d'alteracions morfològiques i metabòliques:

Els primers estadis de la necrosi ocorren en la mitocòndria amb mínimes modificacions en el nucli. Segueix amb la dissolució de les organel·les i la pèrdua de control de la permeabilitat

de la membrana, amb l'entrada de fluids que causen edema cel·lular, vesiculació i, finalment, expulsió del contingut intracel·lular per la ruptura de la membrana. L'alliberació d'hidrolases causa una accelerada desintegració cel·lular que afecta als teixits contigus generant inflamació (Elliott *et al.*, 2005).

D'altra banda, el mecanisme de l'apoptosi ocorre sota condicions fisiològiques i on la pròpia cèl·lula participa de forma activa. Aquesta mort cel·lular programada consta de diverses fases les quals es van succeint amb un ordre força establert. En un primer estadi, mediadors genètics i bioquímics s'activen per intentar reparar els danys cel·lulars, el que s'anomena com apoptosi reversible. Si aquest mecanisme falla, s'inicia l'apoptosi irreversible o fase d'ejecució, on les cèl·lules sofreixen alteracions estructurals. Una descripció morfològica simplificada dels canvis que ocorren en una cèl·lula apoptòtica inclourien la condensació de la cromatina, canvis en les organel·les i alteracions a nivell de la membrana cel·lular (Gerschenson *et al.*, 1992; Green, 2000).

Alteracions nuclears. La cromatina es condensa i es desplaça cap a la superfície de la membrana nuclear formant protuberàncies. Aquests canvis s'associen a proteïnes nuclears que són degradades, entre elles la topoisomerasa, laminines i proteïnes nuclears reguladores de la mitosi.

Alteracions mitocondrials. Hi ha una pèrdua del potencial de transmembrana mitocondrial, que precedeix canvis en la superfície cel·lular i la degradació de l'ADN. Una de les alteracions que s'ha associat amb l'apoptosi és la fragmentació de l'ADN en trossos de 180-200 parells de bases o múltiples del mateix que apareixen com a resultat de la digestió de l'ADN per endonucleases

Alteracions en la membrana citoplasmàtica. La membrana es deforma apareixent formes abombades i els fosfolípids de la membrana com la fosfatidilserina canvien d'orientació exposant-se cap a l'exterior. En estadis finals s'observen trossos de la membrana que es trenquen per formar els anomenats cossos apoptòtics. Aquests estan constituïts per restes de components citoplasmàtics i nuclears rodejats de membrana cel·lular i són eliminats del entorn extracel·lular per cèl·lules fagocitàries, evitant la lesió i inflamació en els teixits propers (Evan *et al.*, 2001; Elliott *et al.*, 2005).

1.3.3.1 Regulació de l'apoptosi

Aquest mecanisme de mort cel·lular programada està altament controlat per una complexa xarxa de mediadors bioquímics intracel·lulars i extracel·lulars i la maquinaria apoptòtica està dividida entre grups sensorials i grups efectors. Els sensorials són els responsables de captar estímuls que els influencien per activar mecanismes de supervivència o mort. Els efectors s'encarreguen de generar la resposta. En el primer grup entrarien proteïnes que actuen sobretot a nivell de receptors de membrana, com Fas, APO-1 i TNF. La majoria dels senyals que activen apoptosi convergeixen en la mitocòndria, la qual respon a la senyal proapoptòtica alliberant compostos efectors com el citocrom c. Altres proteïnes que s'agrupen segons la seva funció proapoptòtica (Bax, Bak, Bid, Bim, p53) o antiapoptòtica (Bcl-2, Bcl-x) actuen, en part, sobre la mitocòndria activant o inhibint l'alliberament del citocrom c. Els últims efectors de l'apoptosi inclouen una cascada de proteases intracel·lulars anomenades caspases. Les caspases 8 i 9 són activades per receptors de mort cel·lular com FAS o citocrom c, i aquestes activen d'altres caspases efectores que executen el programa d'apoptosi (Figura 13) actuant aquestes últimes sobre proteïnes cel·lulars que generen el típic perfil bioquímic i morfològic d'apoptosi com la fragmentació de l'ADN i l'alteració en la membrana (Rich *et al.*, 1999; Green, 2000; Hengartner, 2000; Johnstone *et al.*, 2002; Danial *et al.*, 2004).

1.3.3.2 Tècniques per detectar l'apoptosi cel·lular

Existeixen nombroses tècniques que s'utilitzen de manera habitual en l'estudi de l'apoptosi, essent les més habituals les que empen la microscòpia òptica i electrònica. Aquestes tècniques permeten observar canvis morfològics, com la condensació de la cromatina i la deformació de la membrana entre d'altres que són propis del mecanisme d'apoptosi. Tot i que resulten idonis per demostrar el procés, són poc útils a l'hora de quantificar-lo. Propera a les tècniques microscòpiques es troba la citometria de flux, que mesura les característiques físiques i químiques de cèl·lules o components cel·lulars i presenta una elevada velocitat d'anàlisi (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Bedner *et al.*, 1999; Vermes *et al.*, 2000).

Juntament amb aquests mètodes, la fragmentació de l'ADN en gels d'agarosa es considera identificatiu d'apoptosi (Montague *et al.*, 1996). Una altra tècnica aprofita els canvis en els fosfolípids de la membrana que apareixen en els primers estadis de l'apoptosi per quantificar l'apoptosi: els fosfolípids de membrana amb càrrega negativa que són exposats a l'exterior

per la cèl·lula apoptòtica són marcats amb molècules conjugades amb fluorocroms, podent quantificar de manera senzilla les cèl·lules fluorescentes (Vermes *et al.*, 1995; Van Engeland *et al.*, 1998; Aubry *et al.*, 1999).

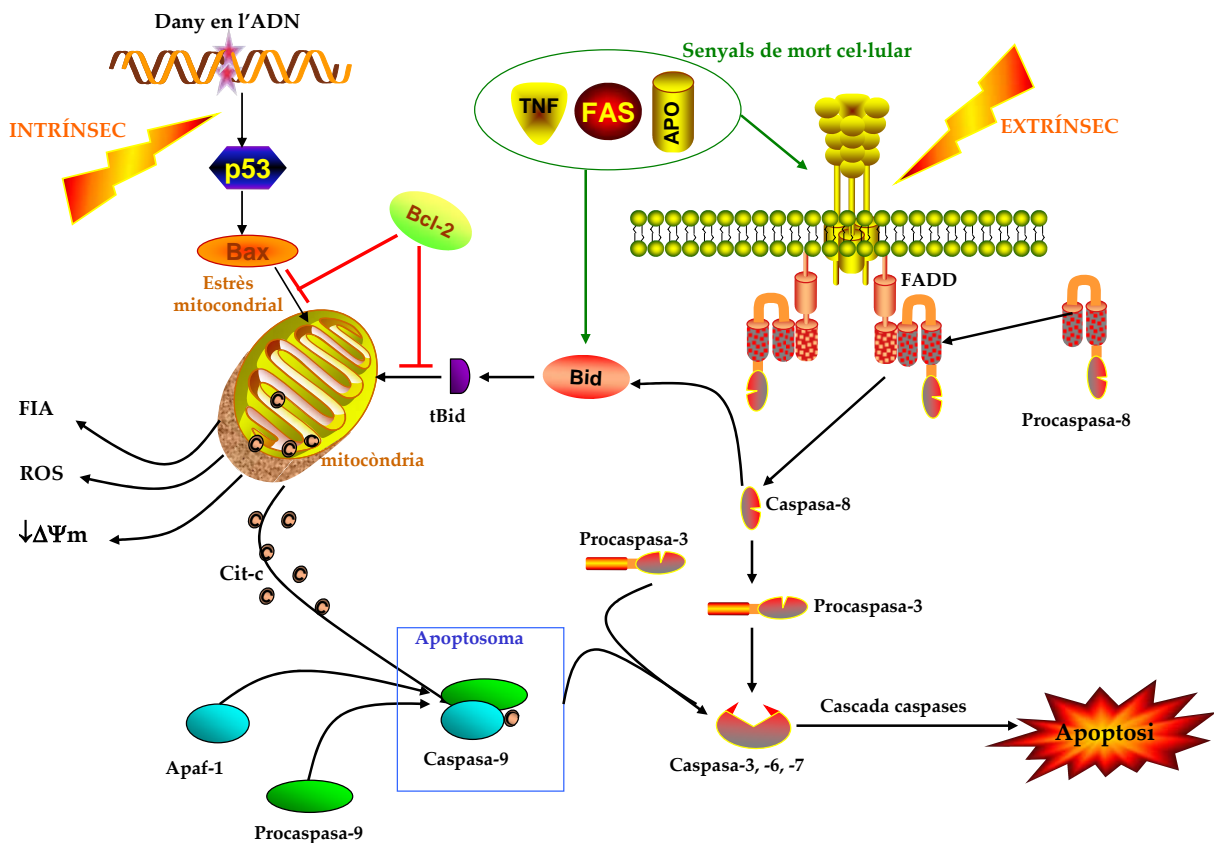


Figura 13. Mecanisme clàssic i simplificat de l'activació de l'apoptosi a través de factors extrínsecs com senyals de mort cel·lular (Fas, APO o TNF) o factors intrínsecs com el dany a l'ADN. Ambdós activen proteïnes proapoptòtiques (Bid, Bax, p53,...) resultant en una cascada de senyals moleculars que actuen majoritàriament sobre la mitocondria. Si la relació entre els senyals proapoptòtics i antiapoptòtics (aquests últims representats aquí amb la proteïna Bcl-2) és favorable als primers, la mitocondria activarà d'altres fluxes fent de l'apoptosi un mecanisme irreversible: alliberament de factors inductors d'apoptosi (FIA), pèrdua del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), producció de ROS i alliberament del citocrom c. El citocrom c forma un complex que activa la caspasa 9 i aquesta, juntament amb la caspasa 8, generen una cascada de caspases efectores que ultimen la mort cel·lular.

1.4 CÀNCER

En l'apartat anterior s'ha parlat dels compostos flavonoides com a protectors de certs càncers. El càncer no és una única malaltia per la qual hi hagi una única cura. Segons la Societat Americana del Càncer (American Cancer Society, ACS), càncer és tot un seguit de malalties caracteritzades per un creixement incontrolat de cèl·lules anormals, les quals s'estenen per la resta de l'organisme. Si aquesta expansió no es controla, pot resultar mortal per l'organisme (Hanahan *et al.*, 2000; Neckers *et al.*, 2003).

Les cèl·lules són les unitats estructurals de qualsevol ésser viu. Cadascú de nosaltres té trilions de cèl·lules, un número similar a les que tindrà un arbre, i són aquestes les que fan possible totes les funcions per viure. Quan una cèl·lula deixa de fer la seva funció o en fa una altra que no li pertoca, aquesta ha de ser reparada o eliminada del organisme. La disfunció cel·lular pot procedir d'agents interns (virus,...), externs (radicació, contaminació, tabac...) o de la mateixa cèl·lula. Moltes d'elles tenen una vida limitada i l'organisme disposa de mitjans per eliminar-les sense afectar a cap altre zona (l'apoptosi). En cas contrari, existeix el risc que es converteixin en tumorals. La característica principal dels tumors és que les cèl·lules proliferen sense control. En els tumors benignes, com les berruges o les pigues, les cèl·lules en expansió s'han encapsulat en teixit conjuntiu i poques vegades resulten una amenaça per a la vida. Els tumors malignes o càncers proliferen de manera invasiva cap a d'altres teixits, procés que s'anomena metàstasi i del que se'n parla tot seguit.

S'han detectat més de 100 tipus de càncer i subtipus de tumors que es troben en òrgans específics (Jemal *et al.*, 2005). Tot i l'ampli catàleg de càncers, es suggereixen unes alteracions de la fisiologia cel·lular comunes a tots ells i que de la seva comunió proliferarien els càncers (Hanahan *et al.*, 2000).

1.4.1 Característiques comunes en cèl·lules canceroses

Autosuficiència en els senyals de proliferació

Les cèl·lules normals requereixen de senyals de creixement per canviar d'estat quiescent a proliferatiu. Aquests senyals són generats *via* extra-cel·lular. En el cas d'una cèl·lula tumoral, aquesta sintetitza els seus propis senyals de creixement independentment del microambient que la rodeja i trencant un dels més crítics mecanismes d'homeòstasi. De la mateixa manera, evadeixen els senyals d'inhibició del creixement que bloquegen la

proliferació (sent aquest un dels sistemes de defensa del sistema per mantenir la quiescència cel·lular).

Evasió de l'apoptosi

Quan una cèl·lula presenta una activitat anormal, com una proliferació desmesurada, s'activen els senyals corresponents a l'activació de l'apoptosi. Es per això que una de les característiques pròpies de molts càncers és la inhibició del mecanisme d'apoptosi en qualsevol dels seus estadis permetent la viabilitat i proliferació de la cèl·lula tumoral. La resistència a l'apoptosi és adquirida en la majoria de les cèl·lules tumorals a través de diverses estratègies. Una de les més comunes involucra la mutació de p53, inactivant-la.

Invasió de teixits i metàstasi

Durant el desenvolupament del tumor, algunes cèl·lules perden la seva localització específica dirigint-se a teixits i òrgans pròxims. Allí adquireixen la capacitat d'envair nous teixits (metàstasi), creixent en localitzacions o ambients diferents al lloc on es van originar. Aquesta és la causa més freqüent de la mort per càncer degut a la impossibilitat de tractar-lo amb èxit (Hanahan *et al.*, 2000; Evan *et al.*, 2001; Johnstone *et al.*, 2002).

1.4.2 Flavonoides com agents anti-cancerígens

Els efectes dels diferents polifenols en el metabolisme de les cèl·lules canceroses és difícil de racionalitzar en un mecanisme bàsic, degut a que l'estructura dels monòmers pot interferir en un gran nombre de vies reguladores, com ara la proliferació, el metabolisme energètic, l'apoptosi, la divisió cel·lular, la transcripció, la reparació de gens, la transmissió neuronal, la inflamació o la resposta al estrès (Agullo *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 1999; Manson *et al.*, 2000; Owa *et al.*, 2001; Chinni *et al.*, 2001; Schroeter *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004). La participació en aquests processos és deguda bàsicament a qüestions electròniques i/o estructurals. L'elevada mobilitat dels electrons en els anells benzènics dels flavanols és un factor clau per la seva capacitat antioxidant i antiradicalària, la qual ha estat comentada anteriorment, mentre que la similitud de la seva estructura amb d'altres substàncies que pertanyen a la bioquímica de les cèl·lules com àcids nucleics, coenzims, hormones i neurotransmissors explicaria la capacitat que presenten alguns monòmers per inhibir enzims i receptors (Wang *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2000b; Chung *et al.*, 2001) i actuar sobre neurotransmissors (Noh *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2003; Levi *et al.*, 2004). Una de les interaccions més estudiades entre enzims i flavonoides és la seva capacitat de inhibir

quinases. Les quinases regulen multitud de processos bioquímics, i aquest ampli rang d'acció permet relacionar aquests compostos amb la inhibició de la proliferació (Liberto *et al.*, 2000; Ermakova *et al.*, 2005) i els efectes sobre el cicle cel·lular (Ahmad *et al.*, 2000a) i l'apoptosi (Saeki *et al.*, 2002) entre d'altres processos regulats per quinases (Polya *et al.*, 1994). En la última dècada, molts agents considerats quimiopreventius (mot utilitzat per designar compostos naturals o sintètics capaços de controlar i/o prevenir el càncer) han mostrat capacitat d'induir apoptosi en cèl·lules tumorals entre ells els flavanols i, especialment, els compostos majoritaris del te (Ahmad *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998; Kazi *et al.*, 2002).

L'elevat potencial que presenten aquests productes polifenòlics com a agents quimiopreventius ha obert una via d'estudi tant per les seves característiques químiques (especialment la seva capacitat antioxidant) com les físiques (estructura capaç interaccionar en processos bioquímics). Un avanç en aquesta recerca permet recuperar aquests productes de material de rebuig, sobretot agroindustrial, induint un valor afegit en el subproducte i afavorint el reciclatge. D'aquest procés se n'obtenen nous conjugats de flavonoides, els quals presenten unes propietats físico-químiques que difereixen de les dels seus homòlegs monomèrics. Els assaigs en línies canceroses de pell (melanoma) i colon i els diferents potencials reductors que presenten sobre espècies radicalàries aporten noves dades sobre la seva implicació en els processos bioquímics.