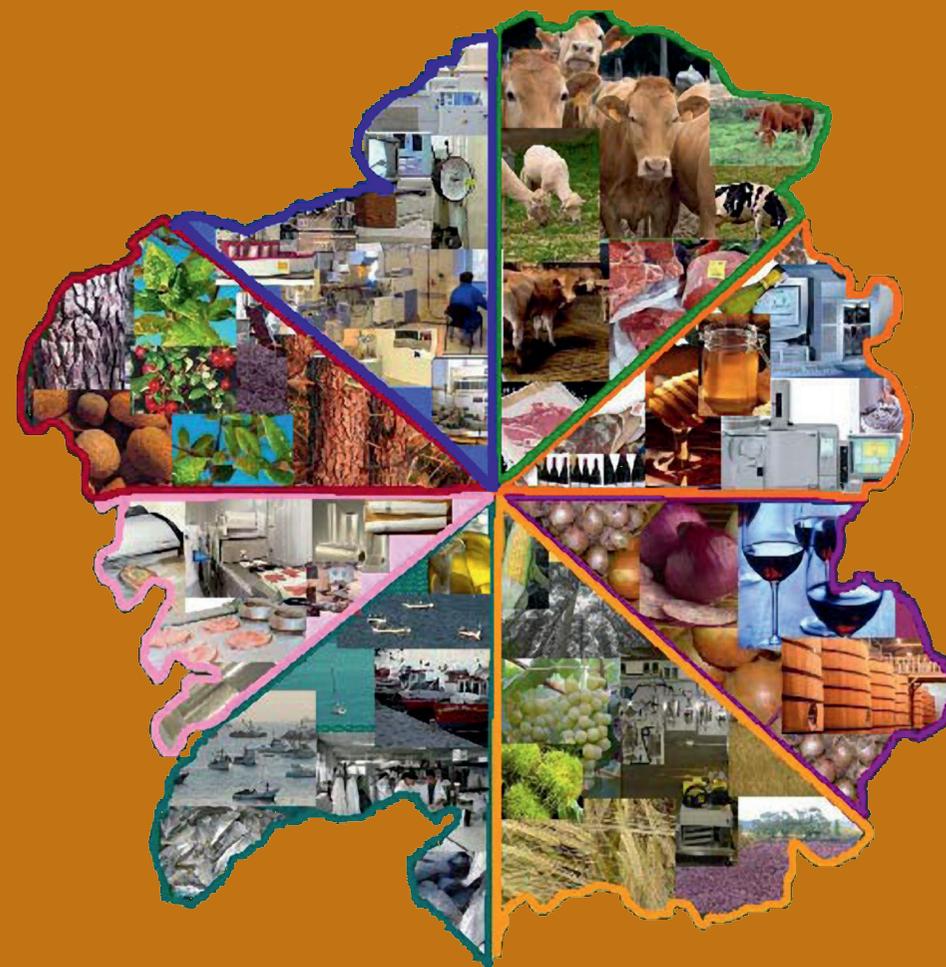


Antioxidantes naturais. Aspectos saudables, toxicolóxicos e aplicacións industriais

EDITORES

Daniel Franco Ruiz
Andrés Moure Varela



ANTIOXIDANTES NATURAIS, ASPECTOS SAUDABLES, TOXICOLÓXICOS E APLICACIÓNS INDUSTRIAIS

XUNTA DE GALICIA

EDITA:
DANIEL FRANCO RUIZ Y ANDRÉS MOURE VARELA

LUGAR:
SANTIAGO DE COMPOSTELA

DISEÑO Y MAQUETACIÓN:
GRÁFICAS GARABAL

Año:
2010

IMPRIME:
GRÁFICAS GARABAL, S.L.

DEPÓSITO LEGAL:
C 3695-2010

ISBN:
978-84-453-4963-2

Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales

EDITORES

**Daniel Franco Ruiz
Andrés Moure Varela**

Xunta de Galicia
Consellería del Medio Rural
Santiago de Compostela
2010

Índice

Presentación del conselleiro	11
Presentación	13
Prólogo	17

BLOQUE I. ASPECTOS SALUDABLES

¿Pueden los antioxidantes naturales alargar la vida?

Josep Lluís Torres Simón	21
--------------------------------	----

Contribución de las bebidas a la ingesta de antioxidantes en la dieta mediterránea.

Fulgencio Saura-Calixto	25
-------------------------------	----

Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos del vino

M.^a Carmen García-Parrilla

Posible efecto protector de los vinos tintos frente al estrés oxidativo

M.^a Luisa González San José

Beneficio cardiovascular de algunos antioxidantes presentes en el té

Ezequiel Álvarez Castro

Efectos vasodilatadores del transresveratrol

Francisco Orallo Cambeiro (*In memoriam*)

Efectos antitumorales de antioxidantes naturales

Marta Cascante Serratos

Cáncer prostático: efecto de fitoesteroles Ps y polifenoles Pf sobre el crecimiento cancerígeno y la metastatización

M.^a Jesús Núñez-Iglesias, Silvia Novío y Manuel Freire-Garabal Núñez

Antioxidantes naturales en la reproducción humana.

Papel del estrés oxidativo en la fragmentación del DNA espermático: utilidad del tratamiento antioxidante

Juan G. Álvarez

Oxidación lipídica y evaluación de antioxidantes.

Edwin Frankel

Antioxidantes naturales en alimentos ricos en ácidos grasos ω -3.

Isabel Medina

BLOQUE II ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Evaluación de la toxicidad de nuevos compuestos antioxidantes 87

Guillermina Font

Acción protectora de antioxidantes frente a la toxicidad de dioxinas y PCBs .. 97

César Ordóñez

Micotoxinas, estrés oxidativo y antioxidantes 109

Teresa Cabaleiro

Toxicología de metales y antioxidantes naturales: cadmio y melatonina 121

Alejandro Romero

Toxicología de insecticidas organoclorados y radicales libres: metoxicloro y óxido nítrico 129

Ana Caride

Radicales libres y muerte celular programada 137

Rafael Balaña Fouce

Neurotoxicidad, estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas y antioxidantes 151

M^a. Anunciación Lafuente

Radicales libres, estrés oxidativo y carcinogénesis 161

Arturo Hardison de la Torre

BLOQUE III. APLICACIONES

Quimiometría y antioxidantes 175

Carlos Herrero

Aspectos legales del uso de antioxidantes en envases de alimentos, nuevas formulaciones de envases activos 179

Víctor Teruel Muñoz

Interés de los antioxidantes en la industria de alimentos 185

Nick Hedges

Envases activos antioxidantes. Desarrollo y perspectivas de uso en el envasado de carne fresca 187

Pedro Roncalés Rabinal

Aplicación de antioxidantes para la mejora de la seguridad y de la calidad sensorial y tecnológica de la carne y productos cárnicos	197
José Antonio García Regueiro	
Aportación a la optimización del perfil nutritivo de la leche mediante la alimentación del ganado: antioxidantes	203
Ismael Martínez Ledo	
Antioxidantes y oxidación lipídica de productos cárnicos	207
Daniel Franco Ruiz	
Extracción de compuestos fenólicos de la uva relacionados con las características tecnológicas y funcionales	219
Celestino Santos-Buelga	
Influencia del nivel de maduración de la uva y de las técnicas de vinificación sobre la composición en compuestos fenólicos del vino	227
Fernando Zamora Marín	
Aplicación de la extracción supercrítica al aprovechamiento de los subproductos de la vinificación	233
Miguel Rodríguez Rodríguez	
Recuperación y concentración de antioxidantes de los residuos de alcoholera	237
Beatriz Díaz Reinoso	

Editores:

Daniel Franco Ruiz.

Dr. Ciencias Químicas. Centro Tecnológico de la Carne

Andrés Moure Varela.

Dr. Ciencias Químicas. Dpto. Ingeniería Química. Universidad de Vigo.

Autores:

Álvarez, E. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

Álvarez, J. Biología Reproductiva. University of Harvard.

Balaña, R. Dpto. Toxicología. Universidad de León.

Cabaleiro, T. Dpto. Toxicología. Universidad de Vigo.

Caride, A. Dpto. Toxicología. Universidad de Vigo.

Cascante, M. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

Díaz-Reinoso, B. Dpto. Ingeniería Química. Universidad de Vigo.

Frankel, E. Dpto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de California.

Font, G. Dpto. de Toxicología. Universidad de Valencia.

Franco, D. Dpto. Producción Animal. Centro Tecnológico de la carne.

Freire-Garabal, M. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

García, J. A. Química Alimentaria del IRTA. Generalitat de Cataluña.

García-Parrilla, M. C. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

González, M. L. Dpto. Tecnología de los Alimentos. Universidad de Burgos.

Hardisson, A. Dpto. de Toxicología. Universidad de La Laguna.

Hedges, N. Unilever. Colworth House, UK.

Herrero, C. Facultad de Ciencias. Universidad de Santiago de Compostela.

Lafuente, M. A. Dpto. Toxicología. Universidad de Vigo.

Martínez, I. Dpto. de I+D de FEIRACO

Medina, I. Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC.

Novío, S. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

Núñez-Iglesias, M.^a J. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

Ordóñez, C. Dpto. de Toxicología. Universidad de León.

Orallo, F. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

Rodríguez, M. Dpto. Ingeniería Química. Universidad de Cádiz.

Romero, A. Instituto de Investigación *Teófilo Hernando*. Universidad Autónoma de Madrid.

Roncalés, P. Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza.

Santos-Buelga, C. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

Saura-Calixto, F. Dpto. Metabolismo y Nutrición. ICTAN-IF, CSIC. Madrid.

Teruel, V. Área de Gestión de Riesgos Químicos. Subdirección General de Gestión de Riesgos Alimentarios.

Torres, J. L. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales. CSIC. Barcelona.

Zamora, F. Facultad de Enología. Universidad Rovira i Virgili.

PRESENTACIÓN DEL CONSELLEIRO

Desde que en el año 2006 ha sido creada la Red de compuestos bioactivos con actividad antioxidante (Antioxgal; <http://www.antioxgal.uvigo.es>), que integra a grupos de universidades y centros públicos de investigación gallegos, se llevaron a cabo diversas actividades para promover la formación de los miembros y divulgar, expandir y consolidar esta área de trabajo en Galicia.

A lo largo del año 2008 se celebraron cinco jornadas y seminarios realizados en distintos puntos de la geografía gallega recogidos en el libro *Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales*. En estas jornadas, más de cuarenta investigadores presentaron aspectos que abarcaron desde los mecanismos fundamentales de la oxidación, la obtención de antioxidantes a partir de diversos productos y subproductos, aspectos de toxicidad, nociones de legislación, las implicaciones clínicas y las aplicaciones alimentarias a productos cárnicos, de pescado y a envases activos.

Con estas actividades se ofreció una oportunidad para reunirse y revisar conocimientos y avances, discutir nuevas ideas, identificar potenciales áreas de interés en su campo y promover las sinergias y colaboraciones. Este volumen que recoge una selección de los temas tratados en estas reuniones puede ser de interés para estudiantes, científicos y profesionales de los ámbitos alimentario, clínico, farmacéutico o cosmético, ofrece al mismo tiempo una visión general de las actividades de investigación de los grupos de la Antioxgal en relación con la de expertos de prestigio internacional.

En el nombre de la Consellería quiero expresar mi agradecimiento a todos los responsables de la edición y financiación de este libro, a los ponentes que prepararon un resumen de las presentaciones y a los organizadores y el público de las jornadas que hicieron de ellas un marco de encuentro, formación y debate.

Samuel Juárez
Conselleiro del Medio Rural

PRESENTACIÓN

Diversos grupos de investigación de Galicia que venían trabajando desde hace décadas en el estudio y en las aplicaciones de compuestos naturales con actividades biológica y antioxidante impulsaron en los últimos cinco años la creación y expansión da Red Antioxgal. En el marco de esta red tuvimos ocasión de establecer vías de colaboración sólidas y duraderas y disponer de una infraestructura que nos permite abordar estudios más complejos y ambiciosos.

Gracias al esfuerzo de los editores, Daniel Franco y Andrés Moure, presentamos ahora una recopilación de algunas ponencias representativas, tanto de investigadores de prestigio reconocido como de investigadores jóvenes que se están formando en los grupos de la Red.

A lo largo de este tiempo tuvimos que decir adiós al profesor Francisco Orallo Cambreiro (1958-2009), uno de los científicos más reseñables del panorama gallego de los últimos años. Ya destacó desde las etapas da su formación, pues recibió varios premios, entre ellos: el premio extraordinario de licenciatura (1979-80) y el de doctorado (1983-84) en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela. Posteriormente fue galardonado con el premio Eloy Díez (1984), con el premio de la Sociedad Española de Química Terapéutica (1987), con una mención honorífica de la Fundación Dr. Esteve (1992), con el premio Dolores Trigo (1993), con el premio de Investigación de la Xunta de Galicia en Ciencias de la Salud (1996) y con el premio nacional de Farmacología (2003). Sus trabajos consiguieron relevancia y reconocimiento internacional. Es bien patente el impacto y la trascendencia de sus estudios sobre los efectos cardioprotectores de diversos compuestos naturales, en particular aquellos sobre el resveratrol.

Además de la amplia trayectoria como profesor e investigador destacable, aportó a la Red Antioxgal su pasión por la investigación, su actividad incansable, la constancia en el esfuerzo y su disponibilidad y participación desinteresada.

Hace ahora un año que él no está con nosotros, pero su contribución científica seguirá estando vigente y la memoria y el aprecio de su valía personal estará presente entre todos los que tuvimos la suerte de conocerlo y colaborar con él.

Herminia Domínguez
Red Antioxgal

In memoriam
Francisco Orallo Cambeiro
Mercedes Sonia García Falcón

PRÓLOGO

En las últimas seis décadas el campo de los antioxidantes ha experimentado un gran auge dentro de una amplia variedad de áreas multidisciplinares que engloban tanto alimentos como salud. Un número creciente de evidencias, de tipo epidemiológico y experimental indican que los antioxidantes presentes en diversos alimentos tienen un papel esencial para la salud. En el libro *Antioxidantes naturales: aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales*, sus editores, los doctores Daniel Franco y Andrés Moure, reúnen los temas tratados en las jornadas y seminarios realizados en el marco de la Red Antioxgal. La buena acogida de las jornadas refleja el interés del público general y especializado por hacer del campo de trabajo de los antioxidantes naturales una herramienta básica para una buena salud y la elaboración de mejores productos en las industrias farmacológicas y alimentarias.

Este conjunto de trabajos expresa la complejidad de la naturaleza de los compuestos con propiedades antioxidantes. Se tocan temas relacionados con aquellos fenómenos que afectan a los aspectos saludables para el organismo, sus implicaciones en procesos de oxidación e inhibición en sistemas biológicos, se presta atención a los aspectos toxicológicos de estos antioxidantes tanto sobre su aplicación directa como su acción protectora frente a xenobióticos y se evalúa el potencial de estos compuestos en aplicaciones industriales.

Este libro por tanto se ha estructurado en los tres bloques anteriormente mencionados: un primer bloque versado en aspectos saludables de los antioxidantes, un segundo bloque donde se desarrollan los principales aspectos toxicológicos y un último bloque donde se muestran potenciales aplicaciones de los antioxidantes en la elaboración de envases, en matrices alimentarias como productos cárnicos y lácteos; y se muestra a la industria del vino como fuente potencial de productos antioxidantes desde sus productos y subproductos.

Creemos que este conjunto de documentos estará al servicio de estudiantes, científicos y profesionales del sector que busquen incrementar su punto de vista delimitado por su ámbito diario y aprovechar el conocimiento entregado en este documento por expertos de prestigio internacional.

Sin el esfuerzo y la colaboración de todos los autores sería imposible tener en nuestras manos este volumen que nos ofrece una visión de conjunto y también pormenorizada del campo de aplicación y de obtención de los antioxidantes naturales.

En esta misma línea de agradecimientos, hacer mención a la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria (Programa de consolidación y estructuración de

unidades de investigación competitivas, Red ANTIOXGAL 2006/06-Fondos FEDER), así como a los participantes del mismo.

Por último agradecer a la Consellería del Medio Rural, a la Universidad de Vigo, CITI (Centro de Investigación Transferencia e Innovación) y al Centro Tecnológico de la Carne (CTC) en representación de la Red REAL (Red de Innovación y Desarrollo Tecnológico Agroalimentario Norte de Portugal-Galicia, cofinanciada a través del Programa Operativo de Cooperación Transfronteriza España-Portugal 2007-2013 (POCTEP-Fondos FEDER) por apoyar esta publicación en beneficio de la industria alimentaria.

Daniel Franco y Andrés Moure

BLOQUE I. ASPECTOS SALUDABLES

¿PUEDEN LOS ANTIOXIDANTES NATURALES ALARGAR LA VIDA?

Josep Lluís Torres Simón

Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales. CSIC. Barcelona

A principios del siglo XX los rayos-X empezaron a ser utilizados en medicina para la detección no invasiva de lesiones y enseguida se detectó su capacidad para dañar los tejidos biológicos. Más tarde, en el año 1946 los Estados Unidos arrojaron dos bombas atómicas sobre Hiroshima y Nagasaki y los efectos de las radiaciones ionizantes se manifestaron dramáticamente. En la primera mitad del siglo XX, los estudios sobre los efectos de las radiaciones X y gamma sugirieron que los radicales libres, sobretudo el radical hidroxilo, eran los responsables del daño celular (Stein y Weiss, 1948). A partir de ese momento los captadores de radicales libres aparecieron como la solución al daño oxidativo relacionado con las radiaciones y con cualquier proceso biológico de deterioro causado por los mismos radicales. En particular, se construyó una teoría que explicaba el envejecimiento por la acción de los radicales libres (Harman y Aging, 1956) y, en consecuencia, la solución había de venir de los antioxidantes captadores de radicales libres. Esta concepción aún perdura. En efecto, la muerte es un proceso irreversible de oxidación, por lo tanto, un antioxidante efectivo como tal debería detener el proceso degenerativo que termina en la muerte.

Vivimos en un ambiente oxidante

La aparición de oxígeno (fotosíntesis) en la biosfera permitió la evolución de organismos cada vez más eficaces en la utilización de la energía química de los carbohidratos pero el oxígeno era, a su vez, tóxico para la mayoría de estos organismos. Desde entonces vivimos en un ambiente oxidante que es a la vez imprescindible y tóxico. Los seres vivos hemos desarrollado una serie de mecanismos de defensa contra la oxidación química y las radiaciones. Son mecanismos de detoxificación enzimática o mediante moléculas más pequeñas (que llamamos antioxidantes) que captan las especies tóxicas (generalmente radicales). Los sistemas de defensa antioxidante mantienen el organismo sano en un estado de equilibrio redox. Sin embargo, los sistemas de defensa pueden verse desbordados por agentes externos (p.e. las radiaciones ionizantes) o procesos patológicos cuya relación con agentes externos es quizás menos directa. En tal caso, agentes antioxidantes exógenos deberían ayudar al organismo a protegerse o a vivir por más tiempo.

Longevidad y radicales libres

Por lo que se refiere a la longevidad hay que distinguir entre duración de la vida (*life-span*) y esperanza de vida (*life-expectancy*). La primera es el número de años que ha

vivido el individuo más longevo de una especie (en el caso del ser humano 122 años) y la segunda es la media de años de vida en la población de un territorio determinado (p.e. 40,9 años en Mozambique, 78,7 años en Europa). En ambos casos el balance redox y los radicales libres parecen tener un papel relevante. Parece ser que el número de replicaciones de cada célula depende del tamaño de los telómeros (secuencia de bases final de los cromosomas) y que los radicales libres podrían influir en los enzimas (telomerasas) de reparación de los telómeros. La influencia de los radicales libres sobre la esperanza de vida parece más evidente. La longevidad, muy por debajo de la duración máxima, depende en gran medida de factores ambientales muy probablemente relacionados con la producción de radicales libres (contaminación, alimentación deficiente, estrés psicológico, enfermedades). Los radicales libres pueden dañar la célula desde fuera, y sobre todo desde dentro, por una sobreproducción en la mitocondria.

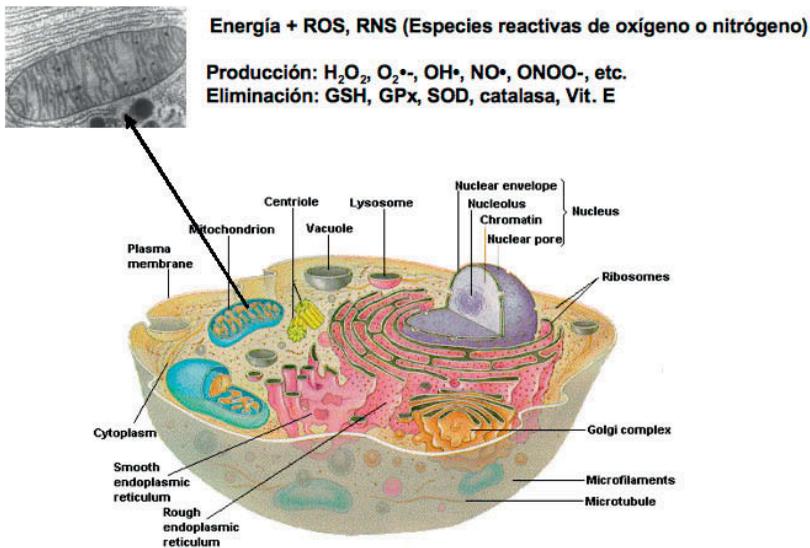


Figura 1. Mecanismo de producción/eliminación de radicales libres en la célula eucariota

En la mitocondria, la cadena respiratoria transfiere cuatro electrones al oxígeno para dar agua. En el proceso se produce el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El radical superóxido es una molécula muy importante puesto que, aunque relativamente inocuo *per se*, puede dar lugar a otras moléculas tóxicas o a mensajeros secundarios cruciales para el funcionamiento celular. Por una parte, el superóxido pasa a peróxido de hidrógeno, que en presencia de metales como el hierro divalente, puede producir el radical hidroxilo, extremadamente dañino frente a ADN y proteínas. Por otra parte

el ión superóxido y el peróxido de hidrógeno forman parte de los mecanismos de señalización molecular involucrados en la regulación de la mitosis (división celular) y la apoptosis (muerte celular programada). El nivel de superóxido está finamente regulado en el organismo y su alteración está relacionada con la aparición de enfermedades (varios tipos de cáncer, alzheimer, parkinson). Desde el punto de vista del estado redox, estrechamente relacionado con la presencia de anión superóxido, la célula eucariota puede estar en un estado altamente reducido, en estado de reposo, o altamente oxidado, en estado de necrosis (muerte traumática). En estados intermedios, la célula pasa por procesos de oxidación controlada relacionados con su crecimiento y división (Halliwell, 2006). En cierta manera, las enfermedades pueden considerarse estados en que los tejidos experimentan un estrés oxidativo excesivo. Este estrés oxidativo puede ser estimulado por agentes externos como la contaminación, química y las radiaciones, a la vez que minimizado por antioxidantes.

¿Son eficientes los antioxidantes naturales contra el estrés oxidativo?

Se entiende normalmente por antioxidantes naturales ciertos productos naturales presentes en vegetales y que con mayor o menor frecuencia ingerimos en la dieta. Se cree que los efectos beneficiosos de una dieta rica en frutas y verduras se deben a estos antioxidantes naturales. Entre ellos se encuentran los polifenoles (captadores de radicales libres, p.e. catequinas del té, proantocianidinas de la uva) y los carotenos (p.e. licopeno del tomate).

Curiosamente, los polifenoles pueden también ser prooxidantes. Algunos de ellos (los que presentan un anillo de pirogalol, tres hidroxilos fenólicos) pueden formar anión superóxido. Asimismo las quinonas, productos de oxidación, pueden dar reacciones redox con la formación de NAD^+ . Es interesante remarcar que esta actividad antioxidante podría ser, paradójicamente, la verdadera actividad antioxidante, porque un cierto estímulo oxidante pone en marcha los mecanismos de defensa antioxidante. Sea como fuere, hay quién piensa que ninguno de estos efectos es significativo en el organismo vivo porque los polifenoles son metabolizados rápidamente ya en el intestino, y porque la homeostasis redox está tan bien regulada que difícilmente puede ser alterada por pequeñas dosis de compuestos moderadamente activos (Halliwell, 2006; Linnane y col., 2007).

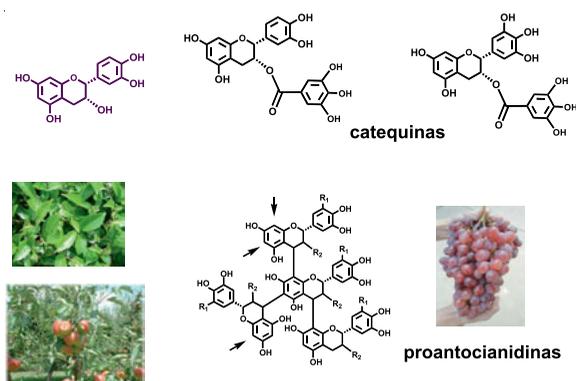


Figura 2. Fuentes y estructuras de compuestos antioxidantes

Si bien aún no hay aún evidencia de que alguna familia de antioxidantes naturales (p.e. polifenoles) pueda hacer aumentar la esperanza de vida en humanos, cada vez parece más claro que un estilo de vida que combine dieta adecuada (con ingestión de frutas y verduras en abundancia), ejercicio moderado y ausencia de estrés psicológico está relacionado con una baja incidencia de enfermedades como el cáncer y los trastornos neurodegenerativos. Por lo que se refiere a la dieta la restricción calórica (disminución de un 20-30% en la ingesta de carbohidratos) parece estar relacionada con menor incidencia de cánceres y con el aumento de la duración de la vida (Willcox y col., 2006). Como quiera, una dieta rica en verduras y fibra que sea también menos abundante en carbohidratos, la restricción calórica podría explicar en parte el efecto beneficioso de una dieta rica en vegetales. Además, el conjunto de los micronutrientes, no solamente los polifenoles o los carotenos, podría conferir a la dieta sus efectos beneficiosos. En este sentido, hay otros componentes que podrían desempeñar un papel importante en prevención, análogo de azúcares (inositales, iminociclitolos) que retrasan la absorción de los carbohidratos.

Los antioxidantes naturales, si son tales antioxidantes y son efectivos en el organismo vivo, han de contribuir a aumentar la esperanza de vida. La cuestión está en saber cuáles son estos antioxidantes naturales y en diseñar una dieta que contenga las dosis efectivas adecuadas.

BIBLIOGRAFIA

- Stein, G., Weiss, J. (1948). *Nature*, 161, 650.
 Harman, D., (1956). *J. Gerontol.*, 11, 298-300.
 Halliwell, B. (2006), 141, (2), 312-322.
 Linnane, A. W., Kios, M., Vitetta, L. (2007). *Biogerontology*, 8, (5), 445-467.
 Willcox, D., Willcox, B., Todoriki, H., y col. (2006). *Biogerontology*, 7, (3), 173-177.

CONTRIBUCIÓN DE LAS BEBIDAS A LA INGESTA DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA MEDITERRÁNEA

Fulgencio Saura-Calixto

Dpto. Metabolismo y Nutrición. ICTAN-IF. CSIC. Madrid

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos realizados en los últimos años asocian de forma significativa el patrón alimentario definido como “dieta mediterránea” con una baja morbilidad y mortalidad por todas las causas y especialmente por enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Dado que la ingesta calórica y total de nutrientes de la misma no explica las diferencias con otros países centro y norte europeos, con alta incidencia en estas enfermedades, los factores preventivos de la dieta hay que buscarlos en componentes específicos tales como los perfiles de ácidos grasos, fibra y fitoesteroles y a la ingesta de antioxidantes. La hipótesis antioxidante indica que las vitaminas y los compuestos bioactivos antioxidantes (fotoquímicos) de los alimentos vegetales pueden tener un papel significativo en la etiología de enfermedades crónicas.

Los alimentos vegetales y las bebidas son la principal fuente de antioxidantes en la dieta. Los alimentos vegetales son ricos en fibra, esta última junto con los antioxidantes son dos temas que tanto en investigación como en desarrollo de productos se abordan separadamente. En este contexto surge la fibra dietética antioxidante (FA) que combina en un solo producto los efectos de la fibra y los antioxidantes naturales (Saura Calixto, 1998). Las fibras antioxidantes contienen al menos un 50% de fibra dietética y una capacidad antioxidante/secuestrante de radicales libres mínima equivalente a 50-100 mg de vitamina E por gramo de fibra. La FA actúa liberando sus antioxidantes gradualmente en el intestino delgado y en el colon produciendo un estatus antioxidante y protector de radicales libres en la mucosa intestinal. Los ensayos biológicos, la experimentación animal y los ensayos clínicos muestran resultados positivos en salud gastrointestinal y en diversos parámetros de riesgo cardiovascular.

Muy pocos vegetales son materias primas aptas para este tipo de fibra. Hasta la fecha, se han obtenido a partir de algunas frutas tropicales, alga *Fucus*, y, especialmente, a partir de subproductos de vinificación. Los estudios sobre propiedades y aplicaciones de estas fibras se ha centrado principalmente en la fibra antioxidante de uva (FAU) cuya composición se muestra en la Figura 1.

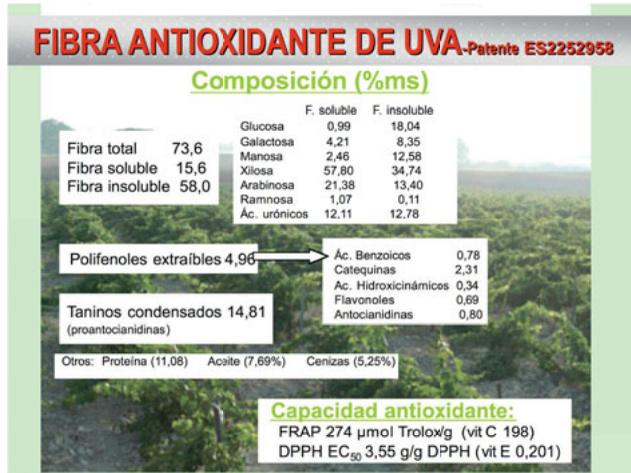


Figura 1. Composición de la fibra antioxidante de uva (FAU)

Por otra parte, los antioxidantes principales y mayoritarios contenidos en los alimentos se pueden agrupar en vitaminas (C y E), carotenoides (incluyendo la propia vitamina A), compuestos polifenólicos y compuestos de Maillard. La capacidad antioxidante (CA) de alimentos y de dietas es debida al efecto combinado y sinérgico de todos ellos. Los polifenoles son los compuestos antioxidantes mayoritarios en nuestra dieta con una ingesta estimada en 2000 a 3000 mg frente a los aproximadamente 150 mg correspondientes a vitaminas C y E y carotenoides

Existe una documentación amplia sobre la CA *in vitro* e *in vivo* de los compuestos alimentarios aislados y de alimentos concretos, pero muy escasa sobre dietas de poblaciones.

Contribución de las bebidas a la ingesta de antioxidantes en la dieta mediterránea

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos empleando el método de ABTS para la medida de la capacidad antioxidante total realizada para la dieta española, representada como la cantidad de unidades antioxidantes (equivalentes trolox) presentes diariamente en el tracto gastrointestinal, y de la contribución de los distintos grupos de alimentos a la misma (Pulido y col., 2003; Saura Calixto y Goñi, 2006; Saura Calixto y col., 2007).

La contribución de cada alimento a la CA de la dieta depende de la cantidad ingerida y de su propia CA. Cabe destacar, que la mayor contribución corresponde a las bebidas (72,6%), en contra de la creencia general de que los alimentos vegetales, y especialmente las frutas y verduras, son la principal fuente de antioxidantes de la

dieta. Frutas y verduras representan un 17,3% del total, frutos secos y legumbres un 8,8%, mientras que la contribución de cereales y aceites es muy baja.

Estos resultados sugieren que para estudiar el papel de los antioxidantes en salud, debería considerarse la CA de la dieta completa. Estudios en alimentos individuales tienen un valor muy limitado, pues aunque presenten unha CA alta, su contribución a la dieta puede ser insignificante. Así, nos encontramos que la contribución del aceite de oliva y del té a la dieta española representa solo el 0,4 y 3% de la CATD. Por el contrario, el vino aporta el 17,4% y, sorprendentemente, el café un 44,6%.

Respecto a la contribución de compuestos específicos, los compuestos polifenólicos son cuantitativamente los principales antioxidantes de la dieta. Las vitaminas C y E representan tan solo alrededor del 10% de la capacidad antioxidante total de la dieta (CATD), y los carotenoides una cantidad mucho menor. No obstante, hay que tener en cuenta que las vitaminas son totalmente biodisponibles mientras que la biodisponibilidad de polifenoles y carotenoides es baja (5 - 15%).

La CA de la dieta en otros países mediterráneos es previsiblemente comparable a la de España. Por el contrario, debe ser menor en países con altos índices de enfermedades cardiovasculares y cáncer, como los del norte y los centroeuropeos, con dietas que se caracterizan por un más alto consumo de cereales y menor de frutas, verduras y vino que en países mediterráneos. De ello concluimos que la CA puede ser un parámetro para considerar en estudios clínicos y epidemiológicos y para definir la dieta mediterránea.

	Capacidad Antioxidante	
	Consumo	ABTS (\pmmol equivalente trolox)
Alimentos vegetales (g sustancia fresca)		
Frutos secos	6,9	176,4
Frutos	265,2	341,5
Verduras y hortalizas	330,7	271,6
Legumbres	22,2	134,7
Cereales	221,6	33,4
Bebidas (mL)	504,8	2575,7
Aceites vegetales (mL)		
Oliva	31,3	12,8
Otros	20,8	2,4
TOTAL		3548,6

Tabla 1. Capacidad antioxidante total ingerida (per cápita/día) en la dieta española (año 2000)

Fibra antioxidante de uva (FAU) como prevención de enfermedades crónicas

La ingesta de FAU en un grupo controlado de 34 voluntarios y 10 controles a los que se les suministró 7,5 g FAU y placebo respectivamente durante 4 meses mostró los siguientes efectos beneficiosos:

1. Aumento significativo del tránsito intestinal
2. Disminución significativa de colesterol total (9%), colesterol LDL (9%), presión sistólica (6%) y diastólica (5%). En sujetos hipercolesterolémicos descensos aún más marcados en colesterol total (14,2%) y colesterol LDL (11,6%), así como en triglicéridos (18,6%).
3. Disminución significativa del porcentaje de grasa corporal en hipergrasos
4. Posibles efectos de regulación de glucemia

También se han obtenido resultados prometedores de la FAU en experimentación animal relacionados con prevención de cáncer de colon, encontrándose pendientes de desarrollo los ensayos clínicos.

En el sector de alimentos funcionales, los estudios se han centrado en el desarrollo de reestructurados de pescado y de productos cárnicos enriquecidos con fibras antioxidantes como ingredientes funcionales. La adición de fibra antioxidante de uva en reestructurados de pescado azul inhibe considerablemente la oxidación durante el período de almacenamiento a -20°C, (Sánchez-Alonso y col., 2007). Por otra parte, este ingrediente aporta las propiedades nutricionales derivadas de la presencia de fibra dietética.

En alimentación animal, la suplementación de la dieta de pollos con fibra antioxidante de uva produce carne con elevada estabilidad oxidativa, igual o superior a la obtenida con suplementos de vitamina E (Goñi y col., 2007). Actualmente, se encuentran en desarrollo estudios para la obtención de productos cárnicos (hamburguesas) enriquecidas con esta fibra. Los resultados preliminares indican una inhibición de la oxidación lipídica en estos alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Pulido, R., Hernández García, M., Saura Calixto, F. (2003). *Eur. J. Clin. Nutr.*, 57, 1275-1282.
- Saura Calixto, F. Goñi, I. (2006). *Food Chem.*, 94, 442-447.
- Saura Calixto, F. Serrano, J. Goñi, I. (2007). *Food Chem.*, 101, 492-501.
- Saura Calixto, F. (1998). *J. Agric. Food. Chem.*, 46, 4303.
- Sánchez-Alonso y col., (2007). *Food Chem.*, 101, 372.
- Goñi, I., y col., (2007). *Poultry Science*, 86, 508.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO

M^a. Carmen García-Parrilla

Dpto. de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universidad Sevilla

En los últimos años se ha suscitado gran interés por los antioxidantes dietéticos. Como ejemplo podemos comprobar el gran aumento en literatura científica de los últimos años referida a este tema. Así en el año 1995 existían 6.486 artículos científicos y en el año 2007 unos 21.517, cifras estas dadas a título orientativo. Este aumento se debe fundamentalmente a su posible relación con la salud y la prevención de la enfermedad. La asociación del binomio del consumo moderado de vino y menor incidencia de enfermedad cardiovascular surgió como es bien conocido con el estudio de Renaud y Lorgeil de la paradoja francesa publicado en 1992. Como etapa inicial de la enfermedad cardiovascular y de otras enfermedades degenerativas está la oxidación. Así pues, la hipótesis de que una mayor ingesta de antioxidante previene la enfermedad dio pie a numerosos trabajos en el campo.

En primer lugar, se debe definir qué es un antioxidante. Un antioxidante es una sustancia que evita o retrasa la oxidación de otra. Halliwell en 1990 definió los antioxidantes como sustancias que estando en bajas concentraciones con respecto a las biomoléculas que protegen, previenen o reducen el daño que sufren las mismas debido a la oxidación. Así pues en una acepción del término, hay que considerar al antioxidante como componente del alimento que va a prevenir la oxidación del mismo. Existen numerosos aditivos alimentarios que son antioxidantes. Pero la gran literatura científica se refiere hoy día al efecto que sobre la salud tienen sustancias que están naturalmente presentes en alimentos y que pueden prevenir los procesos oxidativos que los radicales libres desencadenan en el organismo.

El ácido ascórbico, los tocoferoles o los carotenoides son sustancias antioxidantes. Además existen sustancias que son antioxidantes como los compuestos polifenólicos de los que el vino, especialmente el tinto, es buena fuente. Se pueden identificar y cuantificar gracias a la cromatografía de líquidos con detectores de diodos y masas. Es un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista estructural, pueden presentarse de forma monomérica, dimérica o polimérica y unidos a otras moléculas. Si bien cada día se conocen más, también es cierto que aún quedan por dilucidar muchas estructuras.

Para poner en evidencia las propiedades antioxidantes existen una amplia variedad de métodos *in vitro*. En general el fundamento de estos métodos pasa por la generación de un radical en el medio de reacción y en comprobar cómo desaparece en presencia del antioxidante. En gran número de casos se realiza una medida espectrofotométrica.

Los resultados se refieren a un estándar que suele ser el trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E. Los métodos ABTS y DPPH se usan con gran frecuencia. Además de la molécula que se usa como radical, difieren en el modo de generar el mismo. En el caso del ABTS la generación del radical puede ser con peroxidasa de rábano y agua oxigenada; también con persulfato potásico. En el caso del método DPPH, no es necesario una etapa previa de generación del radical, simplemente la disolución del reactivo comercial. Existen además diversos matices en la realización de los métodos que hay que considerar al comparar los datos de unos autores y otros, de unas muestras y otras. Para comprobar la reproducibilidad de los métodos se pueden observar los datos obtenidos por diversos autores con sustancias patrón. Si los valores de actividad antioxidante de los compuestos fenólicos pueden variar en un 35% aplicando el método del DPPH, en el caso de los valores descritos para el método del ABTS se pueden tener diferencias de un 70%.

Esta diversidad pone de manifiesto que sea necesario una estandarización de las medidas. En este sentido en EEUU están usando el método ORAC para recopilar los datos de actividad antioxidante de los alimentos en tablas. El método ORAC se basa en la pérdida de fluorescencia que sufre una proteína, la ficoeritrina, por el ataque de radicales piróxilo. Después se comenzó a usar fluoresceína como molécula diana ya que es más económica y los resultados son más reproducibles.

Estos métodos se han aplicado a vinos de diversas denominaciones de origen, al estudio de las diferentes fracciones fenólicas o de los compuestos fenólicos aisladamente. También se han aplicado para comprobar el efecto de operaciones enológicas en la actividad antioxidante total del vino.

Los métodos *in vitro* para la determinación de las propiedades antioxidantes son un índice, sirven para poner de manifiesto una propiedad. Son útiles para establecer un orden de reactividad y también se puede evaluar con ellos un posible sinergismo. Se pueden usar para comparar los efectos de un tratamiento tecnológico dado sobre las propiedades antioxidantes. Pero no hay que perder de vista las diferencias que existen con la situación que puede encontrarse en el organismo. Hay que reconocer que en estos métodos se emplean radicales extraños, no son los propios del organismo y su valor es parcialmente representativo.

Para considerar los efectos antioxidantes que pueden tener los compuestos fenólicos *in vivo* tras la ingesta de vino hay que tener en cuenta diversas diferencias con los ensayos en los que se administra un fármaco, por ejemplo. Cuando se consume vino estamos proporcionando una mezcla de sustancias muy heterogénea que se encuentran a dosis relativamente bajas con respecto a las que pueden ensayarse con un medicamento. Por otra parte, el efecto beneficioso esperado debe producirse cuando el alimento forma parte de una dieta variada que, además en el caso del vino, el alcohol

limita aún más su ingesta. Por último hay que considerar que las sustancias presentes en los alimentos no están como tales en fluidos biológicos y además sus concentraciones son muy bajas.

Los compuestos polifenólicos no absorbidos llegan al colon donde son atacados por la flora normal que libera gran variedad de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que conservan actividad antioxidante. El posible papel de la fracción polifenólica polimérica como precursor de otros compuestos antioxidantes que originalmente no están en el alimento es un aspecto interesante para el desarrollo de nuevos productos derivados del sector vitivinícola. Recientemente se ha publicado cómo el consumo de fibra dietética antioxidante de la uva como suplemento dietético mejora el perfil lipídico y la hipertensión.

Además de los estudios en los que se evalúa la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos midiendo la concentración de sus derivados en fluidos biológicos, cabe considerar otra forma de poner en evidencia los efectos antioxidantes y que consiste en evaluar un biomarcador que pudiera ser representativo del efecto antioxidante. Quizá entre estos uno de los más usados en un elevado número de estudios sea la capacidad antioxidante del plasma. La determinación es sencilla se trata de someter plasma extraído de un voluntario humano después de haber consumido vino a un test de actividad antioxidante como los descritos anteriormente (ORAC, FRAP). Si bien sus principales defensores argumentan que es una medida sencilla que puede dar una idea del efecto antioxidante del conjunto de compuestos ingeridos sobre un fluido biológico, es cierto que hay diversas sustancias como el glutatión o el ácido úrico que también reaccionan. En estudios de intervención se ha puesto de manifiesto que tras la ingesta de 300 mL de vino tinto la capacidad antioxidante del plasma aumenta entre un 16 a un 22,8% determinada con el método ORAC. En el caso de estudios de intervención a medio plazo de varias semanas no se han observado diferencias significativas en la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de vinos blancos o vinos tintos.

Sin embargo, existen otros biomarcadores como la actividad de las enzimas antioxidantes o los grupos tiol de las proteínas que se modifican tras la ingesta repetida de vino. En este sentido se puede decir que el consumo repetido de vino modifica la actividad de las enzimas endógenas que constituyen parte de nuestro sistema antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Fernández-Panchón, M, S, Villaño, D, Troncoso, y col. (2008). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48, 649.
- Halliwel, B. (1990). *Free Rad Res. Commun*, 9, 1-32.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). *J Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Jiménez, J, Pérez; Serrano, J, Tabernero, y col. (2008). *Nutrition*, 24, 646-653.
- Manach, C, Williamson, G, Morand, C, y col. (2005). *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 230S-242S.
- Williamson, G., y Manach, C. (2005). *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 243S-255S.

POSIBLE EFECTO PROTECTOR DE LOS VINOS TINTOS FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

M.^a Luisa González San José

Dpto. de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos.

En las últimas dos décadas han proliferado los estudios enfocados a la evaluación de la actividad antioxidante de los constituyentes alimentarios, así como de aquellos que asocian esta actividad antioxidante con los efectos positivos para la salud, derivados de la ingesta de determinados alimentos. La base general de todos ellos es que los antioxidantes son necesarios y beneficiosos para evitar el estrés oxidativo que puede desencadenar diferentes alteraciones fisiológicas o fisiopatológicas como el cáncer, enfermedad cardiovascular, disfunciones cerebrales, declive del sistema inmune, cataratas, envejecimiento, etc. Así, se hace hincapié en desarrollar hábitos alimenticios saludables, entre los que se encuentra el consumo de alimentos que aporten antioxidantes.

La denominada paradoja francesa, observación de la existencia de cierta asociación del consumo de vino, especialmente del tinto, con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, mutagénicas y neurodegenerativas, fue el principio de múltiples estudios que han postulado que el consumo moderado de vino puede tener o tiene un efecto beneficioso para la salud. Uno de los pilares de estas afirmaciones es el alto contenido de compuestos con actividad antioxidante presentes en los vinos tintos, entre los que destacan los compuestos fenólicos y especialmente los flavonoides (antocianos, flavanoles y flavonoles, entre otros) y los estilbenos (el resveratrol y sus derivados).

Hoy en día es bien sabido que la adecuada evaluación de las propiedades antioxidantes de un alimento no puede hacerse por un único método y por tanto se tiende a hacer evaluaciones múltiples que definan el perfil antioxidante del alimento. En general, la capacidad antioxidante se evalúa por métodos que valoran la capacidad para transferir electrones (SET) o ceder hidrógenos (HAT), la capacidad para quelar metales y/o para atrapar radicales libres, la capacidad de reacción de sustancias de naturaleza diversa, etc. Por otra parte, la actividad antioxidante puede ser evaluada por un amplio número de métodos que constituyen una aproximación *in vitro* de la capacidad de un determinado alimento o compuesto de proteger a un sistema biológico de la excesiva oxidación provocada por especies reactivas, nitrogenadas u oxigénicas. Esta actividad se evalúa principalmente por métodos "scavenger" y de biomarcadores.

En la mayoría de los trabajos publicados en los que se han evaluado propiedades antioxidantes de vinos se describe el uso de uno a cuatro métodos, lo que es insuficiente para definir adecuadamente el perfil antioxidante real del vino. Además, rara vez los métodos aplicados son los mismos o se han aplicado en condiciones estandarizadas, por lo que se hace muy difícil comparar datos, que a veces incluso son contradictorios. Recientemente-

te, nuestro grupo de trabajo ha propuesto un perfil que engloba datos de nueve métodos, abarcando cinco químicos, dos “scavenger” y tres biomarcadores, fruto de trabajos de optimización de diversas metodologías ya descritas como adecuadas para determinar la actividad antioxidante de los vinos, y de la búsqueda de otras que permitieran acercarse a los posibles efectos saludables a través de métodos biológicos o de protección a biomoléculas. Los métodos seleccionados, agrupados por tipo de información, fueron los siguientes: relativos a la capacidad antioxidante: ABTS; DPPH; DMPD; ORAC; FRAP y PT; relativos a actividad scavenger: HRSA o actividad scavenger del radical hidroxilo y SRSA o actividad scavenger del radical superóxido; y relativos a biomarcadores de estrés oxidativo: inhibición del daño oxidativo al ADN por electroforesis en gel de agarosa y evaluación del daño a bases nitrogenadas, y inhibición de la peroxidación lipídica en un sistema microsomal.

La mayoría de los trabajos publicados, como ya se ha dicho, asocian principalmente el potencial antioxidante de los vinos a su composición fenólica. Hoy en día la composición fenólica de los vinos ha sido ampliamente estudiada y se sabe que son numerosos los factores que la afectan y modifican. Por ello definir adecuadamente el perfil antioxidante de los vinos implica analizar un número amplio de ellos, y que en las muestras analizadas encierren variabilidad debida al mayor número de actores posibles. Son muy pocos los estudios llevados a cabo con un amplio número de vinos, y en su caso que encierren la heterogeneidad propia de este tipo de productos, lo que hace que aún existan grandes lagunas respecto al verdadero poder antioxidante de los vinos en general, o de algún tipo de ellos en particular.

Nuestro grupo de investigación lleva varios años recopilando datos de vinos tintos y distintas variedades, procedencias geográficas, edades, tipos de elaboraciones y crianzas, y ha estudiado el efecto de algunos de estos parámetros sobre el perfil antioxidante de vinos tintos. Además se ha evaluado la asociación entre la composición fenólica y el potencial antioxidante de los vinos, y se ha planificado el estudio a dos niveles, uno global, derivado de la comparación de la dotación fenólica global de los vinos y de sus propiedades antioxidantes, y otro pormenorizado, enfocado esencialmente en la fracción antociánica, en el que se ha comparado el potencial antioxidante de los vinos y el de su fracción antociánica, aislada por cromatografía en columna.

Resumiendo los resultados obtenidos durante estos años son destacables varios hechos:

- 1º.- Los vinos tintos, en general, tienen un potencial antioxidante elevado conjunto de una serie de mecanismos de protección: HAT, SET, captura de metales y radicales, protección de biomoléculas, etc.
- 2º.- No se detectan grandes diferencias en cuanto al potencial antioxidante de los diversos vinos tintos estudiados ya que presentan balances globales similares (Figu-

ras 1 y 2), en los que descensos en su capacidad protectora por un determinado mecanismo, por ejemplo SET o HAT, se ven compensados por aumentos en otra como el potencial “scavenger” o la protección a biomoléculas.

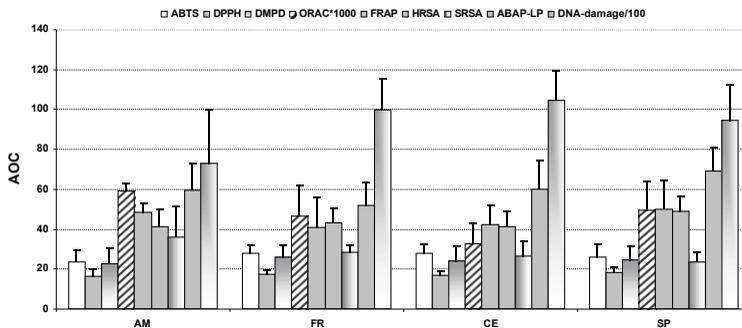


Figura 1. Perfil antioxidante de vinos tintos criados en barricas de distintos rebles

3º.- Aunque la respuesta a la pregunta si resulta saludable un consumo moderado de vino sigue siendo sumamente compleja, los resultados apuntan a que el perfil antioxidante del vino tinto presenta propiedades potencialmente beneficiosas para la salud, especialmente debido a que los fenoles mayoritarios en estos vinos son los antocianos, que además de haber presentado un elevado potencial antioxidante son los fenoles que han mostrado mayor biodisponibilidad en trabajos de otros grupos.

Es claro que el potencial beneficio debe ser comprobado *in vivo* y siempre considerando que cada individuo tiene respuestas diversas, antes de llegar a una conclusión final definitiva.

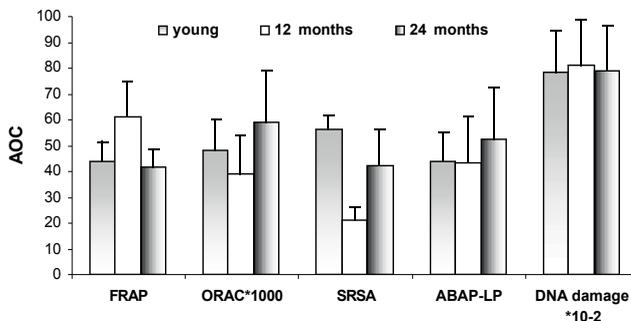


Figura 2. Valores de las propiedades antioxidantes indicadas de vinos tintos de distintas edades

BENEFICIO CARDIOVASCULAR DE ALGUNOS ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL TÉ

Ezequiel Álvarez Castro

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

El té (*Camellia sinensis*) es una de las bebidas más populares y consumidas en todo el mundo. Constituye por ello una importante fuente nutricional de polifenoles, fundamentalmente flavonoides del tipo flavanol o catequina. Según el grado de fermentación del té en sus tres formas de verde, oolong y negro, la composición polifenólica pasa del predominio en catequinas a formas poliméricas de estas moléculas del tipo de teflavinas y terubiginas.

En los últimos años se han llevado a cabo una serie de estudios epidemiológicos sobre el posible beneficio cardiovascular del consumo de té. En este sentido, pese a algunos datos discrepantes el análisis global indica una relación positiva entre el consumo de la bebida y la salud cardiovascular, medida ésta como una disminución del riesgo de infarto de miocardio y de la mortalidad cardiovascular.

Los estudios sobre las causas de este beneficio sugieren que los polifenoles son los principales responsables del efecto y que éste se debe a la suma de una serie de acciones sobre el sistema cardiovascular que incluyen: defensa antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa, antitrombótica, vasorrelajante y antiaterogénica.

El efecto antioxidante quizás sea el más relevante y desde luego, es el más estudiado. Las catequinas del té han demostrado actividad antioxidante frente a diversos radicales libres como los aniones superóxido, el oxígeno singulete o el peroxinitrito. La relevancia de este efecto reside en el hecho de que los radicales mencionados o sus derivados han sido relacionados con el desarrollo de las enfermedades vasculares más importantes y frecuentes. Esto es, hipertensión, aterosclerosis y vasculopatía diabética. Todavía se desconoce el modo preciso en que los antioxidantes pueden interferir en el desarrollo de estas enfermedades y por ello no han podido elaborarse estrategias terapéuticas en este sentido, pero avanzar en este conocimiento es prometedor de importantes beneficios, debido a la alta morbilidad y mortalidad por causas cardiovasculares en nuestra sociedad.

El potencial antioxidante de los polifenoles del té parece estar en relación directa con la presencia del grupo galoil en su estructura. Esto convierte a la epigalocatequina-galato (EGCG) y a la teflavina-digalato en los componentes del té más potentes. Debido a esto y a su abundancia relativa en la planta y su infusión, la EGCG es con diferencia la molécula más estudiada.

Este compuesto presenta una marcada actividad barredora de aniones superóxido generados tanto de forma química, como enzimática o por células como los macrófagos. En contraposición, también se ha sugerido la posibilidad de que este compuesto en solución genere de forma espontánea peróxido de hidrógeno. Esta cuestión parece contradecir el efecto antioxidante de la EGCG, aunque para algunos autores supone otra estrategia para combatir la acción oxidativa ya que la exposición repetida al estrés oxidativo induce resistencia celular a altas concentraciones de radicales libres de oxígeno.

Además de la acción directa sobre los radicales libres, los flavanoles del té presentan otras acciones que contribuyen al efecto antioxidante global. Entre ellas, se cuentan la capacidad para quelar iones metálicos, la inhibición de enzimas generadoras de radicales libres y la inducción de la expresión de enzimas degradadoras de éstos. Esta pléyade de acciones puede configurar un entorno en el que se bloquea la formación de radicales tanto de forma química, por secuestrar los iones metálicos necesarios para las reacciones que los producen, como de forma enzimática, al inhibir específicamente las principales proteínas responsables de la producción radicalaria. Ejemplo de esto es la inhibición por parte de los componentes del té, de la xantina oxidasa, la lipooxigenasa o la ciclooxigenasa. El aumento de los niveles proteicos de aquellos otros enzimas capaces de degradar o metabolizar radicales de oxígeno, sumado a la acción directa de las catequinas sobre los mismos que hemos descrito anteriormente, acaban de conformar un panel defensivo frente a la oxidación que, actuando a diferentes niveles, va a limitar enormemente la acción y los efectos de los radicales que se puedan producir.

El control del equilibrio de reducción-oxidación (redox) en el interior de las células puede constituir otra importante baza de los agentes antioxidantes, ya que existen una serie de factores de transcripción, cuya actividad se ve influenciada por la situación redox. Los factores de transcripción son moléculas intracelulares que regulan la expresión de una serie de genes, consecuentemente, existe una serie de genes que se conoce que son sensibles al equilibrio oxidativo en la célula. En base a esto se explica el efecto inductor (aumento de la expresión) de las catequinas sobre determinados enzimas antioxidantes. Así, los niveles de superóxido dismutasa, catalasa o hemo-oxigenasa-1 pueden ser modificados a través de este mecanismo.

Existen otros genes afectados por este tipo de regulación que son de gran importancia en el sistema cardiovascular, ya que participan en el desarrollo de la aterosclerosis, una de las enfermedades vasculares de mayor morbilidad en nuestra sociedad. Entran dentro de esta categoría genes para determinadas moléculas de adhesión endotelial -molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y E-selectina. Todas ellas participan en la unión de células blancas a la superficie del endotelio vascular y su consiguiente extravasación

al tejido, donde participan en la captación de lipoproteínas modificadas e inician procesos inflamatorios que, de forma crónica, contribuyen a la retroalimentación de este ciclo. Esta situación es lo que se conoce como aterogénesis, o fase inicial de la enfermedad aterosclerótica. Otros genes afectados por el equilibrio redox son determinadas citocinas proinflamatorias o quimiotácticas del tipo de la interleucina-8 o la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), moléculas que participan en el proceso aterogénico, exacerbando la respuesta inflamatoria y contribuyendo al reclutamiento de monocitos hacia el tejido vascular, respectivamente. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento epidermal (EGF), proteínas cuya expresión también es sensible al equilibrio redox, participan en la fase proliferativa de la aterosclerosis, cuando se conforma y crece la placa de ateroma y comienza a obstruir el flujo sanguíneo a través del vaso. Por lo tanto, la influencia en el equilibrio redox de la célula por parte de las catequinas puede modificar los niveles de expresión de determinados genes de importancia en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Finalmente, la inhibición de la oxidación de lipoproteínas es otro mecanismo antioxidante de relevancia ya que también puede frenar el proceso aterogénico. Las lipoproteínas captadas del torrente sanguíneo hacia el vaso son oxidadas y modificadas de forma que se convierten en partículas fagocitables por los macrófagos, que a fuerza de acumularlas en su interior se transforman en las llamadas células espumosas, que darán origen a la placa de ateroma. Las catequinas son efectivos inhibidores de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad *in vitro*: lipoproteínas aisladas del organismo y luego tratadas, aunque esta actividad, por circunstancias diversas, no siempre se confirma en experimentos *ex vivo*, lipoproteínas que reciben el tratamiento dentro del organismo y luego son aisladas para someterlas al experimento oxidativo. Para explicar esta discrepancia se han propuesto varias hipótesis. En primer lugar, la alta concentración de catequinas empleada *in vitro* inicialmente se pensaba que no podía alcanzarse *in vivo*, pero más recientemente se ha demostrado que estos flavanoles pueden acumularse en el organismo a concentraciones comparables a las empleadas *in vitro*. Además, la capacidad antioxidante de estas moléculas se mantiene en el plasma. A lo que parece, deben tenerse en cuenta para la comparación entre resultados *in vitro* y *ex vivo* las variaciones inter-individuales en la biodisponibilidad de los polifenoles del té, cuestión que fundamentalmente se relaciona con diferencias en la microflora intestinal y en polimorfismos genéticos de enzimas implicados en el metabolismo de los polifenoles.

Aparte del efecto antioxidante, los flavonoides del té han demostrado una serie de acciones que también contribuyen al beneficio cardiovascular. En este sentido, los efectos antiinflamatorios, antiproliferativo, antitrombótico, vasorrelajante y antiaterogénico son acciones que suman contra el desarrollo de la enfermedad vascular y ayudan a explicar los efectos epidemiológicos observados.

En resumen, los polifenoles presentes en el té presentan una serie de propiedades demostradas experimentalmente, que podrían explicar los efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular observados en los estudios epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, E, Campos-Toimil, M, y col. (2006). *Br. J. Pharmacol.*, 147 (3), 269-280.

Álvarez, E, Leiro, J, y col. (2002). *Int. Immunopharmacol.*, 2 (6), 849-855.

Khan, N, Mukhtar, H. (2007). *Life Sci.*, 81(7), 519-33.

McKay, D.L, Blumberg, J.B. (2002). *J. Am. Coll. Nutr.*, 21 (1), 1-13.

Riemersma, R.A., Rice-Evans, C.A., y col. (2001). *QJM.*, 94 (5), 277-282.

Stangl, V., Dreger, H., y col. (2007). *Cardiovasc. Res.* 73(2), 348-358.

EFFECTOS VASODILADORES DEL TRANSRESVERATROL

Francisco Orallo Cambeiro (†)

Dpto. de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela

La baja incidencia de cardiopatía isquémica y otras enfermedades cardiovasculares en la población del sur de Francia, a pesar de tener una dieta rica en grasas saturadas y unos factores de riesgo similares a los de otros países industrializados (escaso ejercicio, elevado consumo de tabaco, etc.), ha sido atribuida al mayor consumo continuado y moderado de vino (especialmente de vino tinto) por dicha población, fenómeno que se denomina la paradoja francesa (Leger y col., 1979). Como los efectos beneficiosos y protectores del vino son totalmente independientes de su contenido en alcohol, a lo largo de estos últimos años se han llevado a cabo intensas investigaciones para identificar los principios activos responsables. Aunque dichos principios activos todavía no se conocen, posiblemente debido a la compleja mezcla de sustancias presentes en el vino con efectos opuestos sobre el sistema cardiovascular, existen varias moléculas candidatas, entre las que se encuentran el trans-resveratrol o (*E*)-resveratrol (3,4',5'-trihidroxi-trans-estilbeno; *t*-RESV) (Orallo, 2002; Orallo y col., 2006) y otros compuestos polifenólicos.

Con todos estos antecedentes, hemos estudiado por primera vez la potencial actividad vasodilatadora del *t*-RESV en la aorta de rata mediante estudios funcionales y los mecanismos por los que dicha actividad se produce, con el objeto de intentar dilucidar si el *t*-RESV puede estar implicado en los efectos protectores del consumo moderado y prolongado de vino frente a la incidencia de diversas patologías cardiovasculares y de intentar explicar el fenómeno de la paradoja francesa antes mencionado. El *t*-RESV (1-10 μ M) no tuvo efecto sobre las contracciones inducidas por la (-)-noradrenalina (NA) y por altas concentraciones de KCl extracelular en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Sin embargo, relajó, de una forma dependiente de la concentración, la respuesta contráctil producida por la NA (1 μ M, $CI_{50} = 3,4 \pm 0,32 \mu$ M, $n = 5$) o por elevadas concentraciones de KCl (60 mM, $CI_{50} = 9,6 \pm 0,87 \mu$ M, $n = 5$) en anillos intactos de aorta de rata (Orallo, 2002). Los correspondientes valores de las CI_{50} presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$). Los efectos vasodilatadores del *t*-RESV fueron completamente inhibidos por la N-nitro-L-arginina (L-NOARG, 0,1 mM) y por el azul de metileno (10 μ M) pero no se vieron afectados por la atropina (10 μ M) y la yohimbina (1 μ M). El efecto inhibitorio producido por la L-NOARG fue antagonizado por la L-arginina (0,1 mM) pero no por la D-arginina (Orallo, 2002). El *t*-RESV (1-100 μ M) no modificó la actividad enzimática de la sintetasa constitutiva de óxido nítrico (NO^{*}) en homogeneizados de aorta de rata. Además, el *t*-RESV (1-100 μ M) no mostró propiedades inactivadoras, neutralizadoras o "barredoras" (*scavenger*) de radicales superóxido (O₂^{•-}) ni inhibitoras de la xantina oxidasa porque no alteró la reducción

del azul de nitrotetrazolio (NBT) ni la oxidación de la xantina a ácido úrico utilizando el sistema hipoxantina/xantina oxidasa (HX-XO) (Orallo, 2002).

El *t*-RESV (1-10 μ M) inhibió la actividad enzimática de la nicotinamida adenina dinucleótido/nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADH/NADPH o NAD(P)H] oxidasa vascular en homogeneizados de aorta de rata, es decir, la señal de quimioluminiscencia específica emitida por la reacción entre la lucigenina y los $O_2^{\cdot-}$ generados a partir del oxígeno y del NADH (el sustrato preferido por la NADH/NADPH oxidasa en la aorta de rata). El valor de la CI_{50} fue de $4,81 \pm 0,37 \mu$ M, $n = 5$ (Orallo, 2002).

Todos los resultados anteriores demuestran que:

El efecto vasorrelajante característico dependiente del endotelio del *t*-RESV en la aorta de la rata parece ser debido a un incremento de la actividad de la vía de la L-arginina-NO-guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMP cíclico, GMP_c), posiblemente a través de la inhibición de la actividad de la NADH/NADPH oxidasa vascular, subsiguiente disminución de la biosíntesis celular basal de $O_2^{\cdot-}$ y, por consiguiente, de la inactivación del NO por dichos radicales (Figuras 1a y 1c).

La estimulación de la sintetasa constitutiva de NO presente en las células endoteliales (de forma directa o mediada por la activación de los adrenoreceptores α_2 y de los receptores muscarínicos endoteliales) no parece estar implicada en los efectos vasculares del *t*-RESV (Figura 1a). Por otro lado, dichos efectos tampoco se deben a propiedades neutralizadoras de $O_2^{\cdot-}$ ni a una inhibición de la actividad enzimática de la xantina oxidasa (Figuras 1b y 1c).

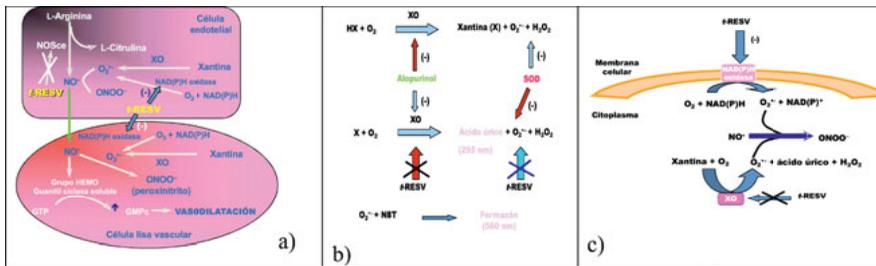


Figura 1. a) Representación esquemática de la ruta de la L-arginina-NO-GMP_c; b) reacciones producidas en el sistema HX-XO; c) Figura de la biosíntesis de $O_2^{\cdot-}$ en células vasculares a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa y de la XO

Ya que la actividad de la ruta L-arginina-NO-GMP_c parece ser defectuosa (baja) y estar alterada (disminución de la síntesis de NO/incremento de la producción de $O_2^{\cdot-}$) en patologías del sistema cardiovascular como la hipertensión y la aterosclerosis (Orallo, 2002; Orallo y col., 2006), básicamente debido a una actividad incrementada

de la NADH/NADPH oxidasa, si el *t*-RESV exhibiese un comportamiento similar en los vasos sanguíneos humanos, nuestros resultados permitirían sugerir que este compuesto polifenólico natural podría desempeñar un papel importante en los efectos cardioprotectores producidos a largo plazo por el consumo diario de moderadas cantidades de vino.

BIBLIOGRAFÍA

Leger A.S., Cochrane A.L., Moore F. (1979). *Lancet*, 1 (8124), 1017-20.

Orallo, F. (2006). Resveratrol in Health and Disease. Boca Raton, USA: CRC Press., 577-600.

Orallo, F., Álvarez E., Camiña M., y col. (2002). *Mol. Pharmacol.*, 61 (2), 294-302.

EFFECTOS ANTITUMORALES DE ANTIOXIDANTES NATURALES

Marta Cascante Serratos

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Instituto de Biomedicina. Universidad de Barcelona (IBUB)

El cáncer es el resultado de la progresiva acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que llevan a una proliferación acelerada, desordenada y descontrolada de células de un tejido que invaden y desplazan, localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo. Para que un tumor adquiera malignidad debe adquirir una serie de características entre las que se destacan, entre otras, la capacidad de crecimiento independiente de los factores de crecimiento, la capacidad invasiva y la capacidad de evadir la apoptosis.

La aparición de un cáncer no se debe a un único factor sino a la combinación de varios factores que se engloban de manera general en dos grupos: la herencia genética y el ambiente. La primera conexión entre el cáncer y la genética se propuso a principios del siglo XX, y esta idea ha servido como una de las bases de su investigación (Klung, 2000).

La incidencia del cáncer está determinada por factores etiológicos, como la inestabilidad genómica, los factores dietéticos, la inestabilidad en secuencias microsátélites o las alteraciones epigenéticas, y por la susceptibilidad individual (Kamangar y col., 2006; Newcomb y col., 2007). Actualmente los tipos de cáncer con mayor mortalidad son el cáncer de pulmón, seguido del cáncer colorrectal y en tercer lugar el cáncer de mama (Terstriepe y Grothey, 2006).

El metabolismo energético de la célula tumoral ha atraído la atención de los bioquímicos desde hace más de 80 años. Ya en la primera mitad del siglo pasado, Otto Warburg describió que las células malignas eran capaces de fermentar la glucosa consumida hasta lactato aún en presencia de oxígeno (Warburg y col., 1924). Dada la ineficiencia energética de este proceso en comparación con la respiración mitocondrial, el consumo de glucosa en las células tumorales se encuentra incrementado con respecto a sus células vecinas, hecho diferencial que ha sido utilizado para la detección de neoplasias mediante la técnica de PET (Gambhir, 2002).

Los mecanismos moleculares que hacen posible esta alta capacidad glucolítica han sido ampliamente estudiados en los últimos años (Gatenby y Gillies, 2004; Matoba y col., 2006). Debido a su crecimiento descontrolado, muchos tumores sólidos deben progresar bajo condiciones de hipoxia. En esas condiciones juega un papel muy importante el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Este factor,

hace aumentar la expresión de varios enzimas glucolíticos (Dang y Semenza, 1999; Rimpi y Nilsson, 2007). Aparte de la activación oncogénica de HIF-1, otros mecanismos que eventualmente provocan la activación de la glucólisis han sido descritos. Ciertamente, el metabolismo mitocondrial guarda una estrecha relación con la progresión del tumor, no sólo a nivel energético, sino debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de ROS como radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), indispensables en muchos procesos.

La producción de ROS por parte de la mitocondria puede ser entendida como una espada de doble filo. Por una parte ha sido descrito un aumento en el estrés oxidativo en las células tumorales (Pelicano y col., 2004), debido seguramente a un mal funcionamiento de la maquinaria mitocondria, que podría provocar un aumento en la tasa de mutagénesis y así inducir malignidad (Pelicano y col., 2004; Wallace, 2005). Por otra parte, dado que la generación de ROS puede desencadenar el proceso apoptótico, este mecanismo ha sido propuesto para el tratamiento del cáncer (Engel y Evens, 2006; Mates y Sánchez-Jiménez, 2000).

El incremento de la formación de compuestos de oxígeno altamente reactivos (ROS: Reactive Oxygen Species) como por ejemplo H_2O_2 o radicales libres derivados del oxígeno como el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), se ha descrito, además de en cáncer, en un gran número de enfermedades que van desde los procesos inflamatorios y alteraciones del sistema inmunológico hasta infartos de miocardio (Mates y Sánchez-Jiménez, 2000).

Los radicales libres se generan *in vivo* como subproductos del metabolismo normal. También se producen cuando un organismo está expuesto a la radiación ionizante, a drogas con propiedades oxidantes o xenobióticos que pueden formar *in situ* metabolitos que son radicales libres. Los radicales libres afectan prácticamente todos los aspectos de la biología celular ya que pueden reaccionar y modificar un gran número de moléculas que constituyen el material estructural, metabólico y genético de la célula.

Algunos de los efectos perjudiciales bien conocidos de una generación excesiva de ROS en los sistemas biológicos son la peroxidación de los lípidos de membrana, la oxidación de los ácidos nucleicos y azúcares y la oxidación de grupos sulfidrilos de las proteínas.

Además a los radicales libres formados a partir del oxígeno se les atribuye la capacidad de iniciar y promover la carcinogénesis.

La propia célula tiene mecanismos de protección para defenderse de los radicales libres pero el incremento de radicales libres que se produce en situaciones de enfermedad, ingestión de xenobióticos y otras situaciones de estrés ambiental como exceso de radiaciones etc. pueden sobrecargar los sistemas de defensa celulares y pueden producirse daños irreparables en la célula que conduzcan a su muerte o a la pérdida del control de proliferación y su conversión en célula tumoral.

Los sistemas de desintoxicación que tiene la propia célula para desintoxicarse de los ROS son de carácter enzimático y no enzimático y constituyen lo que se denomina “los sistemas antioxidantes de defensa”.

Los principales sistemas de defensa son los siguientes sistemas enzimáticos:

- 1) Superóxido dismutasa; 2) Catalasa; 3) Glutatión peroxidasa; y 4) Los sistemas enzimáticos de regeneración del glutatión.

Algunos sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa y la catalasa actúan específicamente contra ROS mientras que otros sistemas enzimáticos reducen grupos tiol.

Los antioxidantes no enzimáticos son menos específicos y pueden actuar sobre otros radicales orgánicos e inorgánicos. Los antioxidantes pueden ser clasificados como solubles en agua o bien liposolubles dependiendo si actúan primariamente en la fase acuosa o en la membrana.

Los antioxidantes hidrofílicos incluyen por ejemplo el ácido ascórbico (vitamina C) y los antioxidantes liposolubles incluyen ubiquinoles, retinoides, carotenoides y tocoferoles (como por ejemplo la vitamina E). Algunas proteínas plasmáticas y el glutatión (GSH) son ejemplos de antioxidantes endógenos mientras que el ácido ascórbico, los carotenoides, los retinoides, los flavonoides y los tocoferoles constituyen ejemplos de antioxidantes provenientes de la dieta. Estos antioxidantes poseen la capacidad de secuestrar y anular varios radicales provenientes de oxígeno, carbono, anillo fenólico etc., así como otros tipos de ROS.

Actualmente, el interés de la comunidad científica hacia la correcta alimentación ha ido en aumento debido a la relación directa de este factor etiológico con la salud de la población. Un gran número de estudios apoyan la idea de que una dieta rica en frutas y verduras tiene un efecto preventivo sobre el cáncer y otras enfermedades debido a su alto contenido en sustancias antioxidantes tales como el ácido ascórbico y los carotenoides. Sin embargo, no hay que olvidar que la fruta y los vegetales también contienen una gran diversidad de flavonoides y compuestos fenólicos que pueden actuar también como antioxidantes. Los flavonoides pueden funcionar como: 1) quelantes de metales y agentes reductores, 2) antioxidantes secuestradores de ROS,

3) inhibidores de la formación de radicales derivados de oxígeno, 4) protectores de la degradación del ácido ascórbico.

Los polifenoles naturales presentes en la uva y en el té se han convertido en sustancias muy apreciadas por su acción antioxidante y se encuentran presentes en muchos suplementos nutricionales recomendados para prevenir el envejecimiento y el cáncer. Asimismo, la fibra dietética también es apreciada como fuente de prevención del cáncer colorrectal, debido a sus propiedades reguladoras del intestino (Kim, 2000).

Los efectos beneficiosos de los antioxidantes naturales, presentes en frutas y verduras, como preventivos del estrés oxidativo que deriva en el daño celular y en la carcinogénesis han sido extensamente estudiados. Así, se ha demostrado que distintos antioxidantes que mimetizan la acción de los sistemas enzimáticos de defensa celulares son capaces de inhibir la tumorigenesis inducida por distintos agentes carcinogénicos.

Uno de los grupos de antioxidantes naturales sobre el que más estudios se han realizado en los últimos años es el de los flavonoides. Así como el efecto preventivo de la aparición de tumores de los antioxidantes naturales presentes en la dieta está ampliamente reconocido, el efecto de los antioxidantes sobre el tumor ya formado ha sido objeto de controversia.

Es bien sabido que existen principalmente dos caminos a través de los cuales se produce la muerte celular: La necrosis y la apoptosis. En la necrosis típicamente conlleva que la célula se hinche, se produzca la consecuente lisis celular y respuesta inflamatoria. La muerte por necrosis se traduce en la liberación de material intracelular que desencadena la respuesta inflamatoria. En cambio la apoptosis se considera una muerte celular programada ya que la célula pierde volumen, los núcleos se condensan y en general, aunque no siempre, se produce la fragmentación del DNA. La apoptosis conlleva la liberación de muy poco material intracelular con lo que no se produce respuesta inflamatoria. Los cuerpos apoptóticos producidos son eliminados por los macrófagos. En la célula existen mecanismos de vigilancia y control de manera que cuando se detecta alteración irreversible en el material genético deberían activarse los mecanismos que conducen a la apoptosis.

La apoptosis y el cáncer se consideran fenómenos opuestos ya que en la célula tumoral a pesar de tener anomalías a nivel genético, la apoptosis no se produce espontáneamente como debería de ocurrir. Los antioxidantes naturales como los flavonoides pueden actuar como un arma de doble filo ya que muchos de ellos a altas concentraciones puede actuar como prooxidantes (Decker, 1997). Así, a concentraciones moderadas, pueden actuar como secuestradores de ROS, disminuyendo la

elevada concentración que presenta la célula tumoral e interfiriendo así en su proliferación. Sin embargo, a altas concentraciones pueden actuar como productores de ROS induciendo la apoptosis celular.

Los radicales libres, y en particular las ROS, se han propuesto como un mediador común para la apoptosis. Por otro lado, a pesar de la extensa evidencia a favor de que las ROS jueguen un papel crucial en la apoptosis, existen también datos indicativos de que las ROS no son esenciales.

Por lo que se refiere a la gran familia de antioxidantes constituida por los flavonoides, se han descrito diversos compuestos capaces de inducir apoptosis en distintas líneas celulares (para una revisión ver Middleton y col., 2000).

Los mecanismos a través de los cuales los antioxidantes actúan inhibiendo la proliferación tumoral y favoreciendo la regresión del tumor van siendo poco a poco elucidados. Además se ha descrito que el efecto de los antioxidantes naturales presentes en la dieta es selectivo para las células tumorales, lo cual representa uno de sus mayores atractivos a nivel farmacológico.

Entre la gran cantidad de antioxidantes naturales que existen, en nuestro laboratorio nos hemos centrado en el estudio de polifenoles bioactivos derivados de subproductos vinícolas. Dichos productos se han obtenido a partir de un fraccionamiento de extractos primarios de bagazos de uva mediante la técnica de HPLC. Las diversas fracciones extraídas están formadas por monómeros y polímeros de catequinas y flavanoles.

Los estudios que se han llevado a cabo han demostrado que fracciones de los extractos de uva con alto grado de galoización poseen propiedades antitumorales y podrían ser utilizados en la prevención y el tratamiento del cáncer (Lizarraga y col., 2007). Además actualmente también estamos realizando estudios que indican que la fibra dietética combinada con antioxidantes presentes en la uva podría ser efectiva en la prevención y el tratamiento del cáncer de colon.

Agradecimientos

Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2004-07579-C04-02 y AGL2004-07579-C04-03), Instituto Carlos III y Fondos Feder de la Comunidad Europea (ISCIII-RTICC (RD06/0020/0046) y Generalitat de Catalunya (2005SGR00204).

BIBLIOGRAFÍA

-
- Dang, C.V. y Semenza, G.L. (1999). *Trends Biochem Sci.*, 24, 68-72.
Decker, E. A. (1997). *Nutr. Rev.*, 55 (11 Pt 1), 396-398.
Engel, R.H. y Evens, A.M. (2006). *Front. Biosci.*, 11, 300-312.

- Gatenby, R.A. y Gillies, R.J. (2004). *Nat. Rev. Cancer*, 4, 891-899.
- Gambhir, S.S. (2002). *Nat. Rev. Cancer*, 2, 683-693.
- Kamangar, F., Dores, G.M. y Anderson, W.F. (2006). *J. Clin. Oncol.*, 24, 2137-50.
- Kim, Y.I. (2000). *Gastroenterology*, 118, 1235-1257.
- Lizarraga D., Lozano C., Briedé J., y col. (2007). *FEBS Journal*, 274(18):4802-4811.
- Mates, J.M. y Sánchez-Jiménez, F.M. (2000). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 32, 157-170.
- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., y col. (2006). *Science*, 312, 1650-1653.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. y Theoharides, T.C. (2000). *Pharmacol. Rev.*, 52, 673-751.
- Newcomb, P.A., Baron, J., Cotterchio, M. y col. (2007). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 16, 2331-2343.
- Rimpi, S. y Nilsson, J.A. (2007). *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 305-310.
- Pelicano, H., Carney, D. y Huang, P. (2004). *Drug Resist. Updat.*, 7, 97-110.
- Terstrief, S. y Grothey, A. (2006). *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 6, 921-30.
- Wallace, D.C. (2005). *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.*, 70, 363-374.
- Warburg, O., Posener, K. y Negelein, E. (1924). *Biochem. Z.*, 152, 309-344.

CÁNCER PROSTÁTICO: EFECTO DE FITOESTEROLES (PS) Y POLIFENOLES (PF) SOBRE EL CRECIMIENTO CANCERÍGENO Y LA METASTATIZACIÓN

María Jesús Núñez-Iglesias, Silvia Novío y Manuel Freire-Garabal Núñez
Dpto. de Farmacología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

Una de las líneas de trabajo de nuestro grupo de investigación versa sobre el efecto de diferentes compuestos y factores biológicos sobre el crecimiento tumoral y metastatización, empleando para ello diversos modelos de cáncer. Actualmente, nuestro trabajo se ha centrado en el estudio del cáncer de próstata (CaP). Esta enfermedad es la neoplasia maligna invasiva más común (Jermal y col., 2005) en los países occidentales. A pesar de una mayor vigilancia y detección precoz, el CaP sigue ocupando el segundo lugar como causa de muerte relacionada con el cáncer. Por tanto, son necesarias nuevas actitudes terapéuticas con las que abordarlo.

El tratamiento del CaP metastásico es un importante desafío para médicos debido a su comportamiento refractario y a su resistencia a quimioterapias convencionales. Estudios previos han demostrado que sustancias antioxidantes naturales tales como el resveratrol o la genisteína pueden inhibir la iniciación, promoción y progresión de la tumorigénesis. A la hora de determinar efectos beneficiosos de componentes naturales sobre el CaP, dos aspectos claves relacionados con dicho proceso deben ser tenidos en cuenta: angiogénesis y metástasis.

Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso esencial implicado en el desarrollo y progresión del cáncer prostático (Guo y col., 2007). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un regulador esencial del proceso angiogénico durante la carcinogénesis prostática. En nuestros estudios hemos investigado posibles mecanismos antiangiogénicos de diversas moléculas, principalmente fitosteroles (PS) y polifenoles (PF) de origen natural, sobre la expresión de VEGF en cultivos celulares *in vivo*.

Células cancerígenas prostáticas humanas andrógeno insensibles PC-3 y PC3-M son cultivadas bajo condiciones *in vitro* durante diferentes períodos de experimentación, bajo la influencia de PS y PF incorporados al medio de cultivo en diferentes concentraciones. Se extrae el sobrenadante y se miden las concentraciones de VEGF mediante la técnica de ELISA. Por otra parte, y tras despegar las células de los pocillos con tripsina, la expresión génica de VEGF se determina por RT-PCR.

El efecto de estas sustancias también es estudiado en un modelo angiogénico *in vitro* con células endoteliales aórticas bovinas (BAECs), siguiendo los procedimientos previamente descritos (Mantell y col., 2000). La angiogénesis se cuantifica mediante un sistema de análisis de imagen computarizado. Las células con crecimiento elongado son representadas digitalmente, y el área ocupada por éstas es determinada expresándose como un porcentaje del área total.

Por otra parte, también se realizan ensayos de apoptosis con kits comerciales. Los núcleos celulares se examinan mediante microscopía de fluorescencia tras efectuar una tinción con naranja de acridina. La integridad del ADN extraído de las células cultivadas sobre discos cubiertos con gelatina se determina en presencia de los mismos compuestos utilizados en la técnica de ELISA.

Para los estudios *in vivo* (Mantell y col., 2000) se realizan dos implantes subcutáneos en la región dorsal de ratones desnudos BALB/c nu/nu hembra, de 6 semanas, bajo anestesia con halotano. Transcurridos 6 días, en cada ratón se realiza, bajo anestesia con flutano, un implante subcutáneo de células PC3 en cada flanco. El crecimiento tumoral se monitoriza semanalmente. Después de 8 semanas, los ratones son sacrificados y los tumores extraídos. Finalmente, se realiza tinción histoquímica de secciones tumorales obtenidas por criocongelación y se determina la densidad microvascular.

Estudios de metastatización

La proteína quinasa activada por mitógeno (MAP) p38 regula la activación de la metaloproteínasa de la matriz tipo 2 (MMP-2) y la invasión celular. Algunas sustancias que bloquean el crecimiento prostático también impiden la activación de la MAP quinasa p38 mediada por el factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta) (Xu y Bergan, 2006). Recientemente, se han identificado a la proteína quinasa 2 activada por MAP quinasas (MAPKAPK2) y a la proteína de choque térmico 27-kDa (HSP27) como reguladores derivados de la acción de la p38MAPK.

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado ensayos *in vitro* empleando células PC3 y PC3-M para determinar los efectos de nuevas sustancias sobre la cascada metastásica derivada de la activación de MMP-2 por el TGF-beta, analizando la expresión de la quinasa de adhesión focal (FAK), la p38MAPK y la HSP27 mediante western blot y zimografía.

Además, hemos estudiado el efecto de diferentes PS y PF en ensayos de invasión celular, según protocolos previamente descritos (Huang y col., 2005; Liu y col., 2002; Xu y Bergan, 2006). Brevemente, 24 horas después de la siembra, las células PC3 y PC3-M son transfectadas con un vector de expresión junto al vector β -galactosidasa (pCMV- β -gal) para permitir la detección de las células transfectadas. Al día siguiente,

las células son disociadas, colocándose la suspensión celular en el compartimiento superior de una cámara de Boyden de 48 pocillos, y permitiéndose que las células migren durante un periodo de 10 horas a través de membranas Nuclepore (diámetro de poro 8 μm). Previo procesamiento de las membranas y tinción Diff-Quick (Dade Behring AG, Dudinggen, Switzerland) se realiza el conteo de células invasoras y no invasoras empleándose coordenadas de campo predeterminadas.

En resumen, mediante los procedimientos anteriormente señalados, nosotros tenemos información preliminar pero fehaciente sobre propiedades terapéuticas de moléculas PS y PF aportadas por otros miembros de la red Antioxgal sobre el cáncer prostático. Nuestros resultados sientan una base férrea para la realización de futuros ensayos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

Guo, Y., Wang, S., Hoot, D.R., y col. (2007). *J. Nutr. Biochem.* 18, 408-417.

Huang, X., Chen, S., Xu, y col. (2005). *Cancer Res.*, 65, 3470-3478.

Jemal, A., Murray, T., Ward, E., y col. (2005). *Cancer J. Clin.*, 55, 10-30.

Liu, Y., Jovanovic, B., Pins, M., y col. (2002). *Oncogene*, 21, 8272-8281.

Mantell, D.J., Owens, P.E., Bundred, N.J. y col. (2000). *Circ. Res.*, 87, 214-220.

Xu, L., Bergan, R.C. (2006). *Mol. Pharmacol.*, 70, 869-877.

ANTIOXIDANTES NATURALES EN REPRODUCCIÓN HUMANA. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA ESPERMÁTICO: UTILIDAD DEL TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE

Juan G. Álvarez

Biología Reproductiva. Harvard Medical School. Boston. MA (EEUU)

Introducción

La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término tanto *in vivo* como *in vitro*. En general, espermatozoides con el DNA dañado pueden fecundar ovocitos en metafase II con la misma eficacia que espermatozoides con DNA intacto (Aitken y col., 1998). Sin embargo, la presencia en el embrión de ciertas modificaciones a nivel de nucleótidos y/o fragmentación en las cadenas del DNA procedentes del complemento genómico paterno (que no hayan sido reparadas por el ovocito después de la fecundación) es incompatible con un desarrollo embrionario y fetal normal.

Se estima que un 25% de las causas de infertilidad masculina son de origen idiopático. La etiología de algunas de estas causas podría estar relacionada con daño de DNA en los espermatozoides. Sin embargo, este daño podría ser reparado por el ovocito después de la fecundación. Esto va a depender sobre todo (i) de la calidad citoplasmática y genómica del ovocito; y (ii) del grado de daño en las cadenas de DNA del espermatozoide que haya fecundado al ovocito. Dado que la capacidad del ovocito de reparar este tipo de daño disminuye con la edad y que, al mismo tiempo, el nivel de fragmentación de DNA en los espermatozoides aumenta, ello podría explicar, al menos en parte, la disminución significativa en la tasa de embarazo que se observa en parejas de edad avanzada. Este tipo de daño en las cadenas de DNA podría encontrarse en embriones con un complemento cromosómico normal. Es decir, la presencia de daño de DNA no reparado por encima de un umbral crítico en embriones generados tanto *in vivo* como *in vitro* podría explicar el paro en el desarrollo embrionario que se produce tras la implantación de embriones con un cariotipo normal. Estudios recientes sugieren que este tipo de daño se expresa a partir del día 3 de desarrollo embrionario y ha sido caracterizado como *late paternal effects* (Tesarik y col., 2004).

Cabría puntualizar que el daño de DNA que pudiera encontrarse en el embrión no tiene porque estar exclusivamente relacionado con el daño de DNA en el espermatozoide que haya fecundado al ovocito. Este daño podría provenir también del ovocito o de ambos. Sin embargo, dado que (i) el análisis de fragmentación de DNA en gametos es destructivo; (ii) este daño podría variar de un ovocito a otro; y (iii) el número de ovocitos es

limitado, esto no nos ha permitido estudiar hasta ahora la presencia de esta patología en ovocitos. En cambio, el uso de tests que permitan el estudio del grado de fragmentación de DNA (especialmente cuando se trata de daño de DNA de cadena doble) en blastómeras de embriones obtenidas para DGP, podría aplicarse al estudio de la integridad de la cromatina embrionaria. El uso combinado de PCR, de sondas cromosómicas y de tests de fragmentación de DNA nos permitiría estudiar de forma simultánea la presencia de enfermedades monogénicas, aneuploidías y el grado de fragmentación de DNA en el embrión, permitiéndonos así seleccionar los embriones de mejor calidad genómica.

Mecanismos de fragmentación del DNA espermático

¿Cómo se produce la fragmentación de DNA en los espermatozoides? El daño de DNA en los espermatozoides puede afectar tanto el DNA mitocondrial como el nuclear y puede ser inducido por cinco mecanismos principales: (i) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; (ii) roturas de DNA o “nicks” producidos durante el remodelado de la cromatina que tiene lugar durante el proceso de espermiogénesis; (iii) fragmentación de DNA a nivel post-testicular inducida por ROS y caspasas/endonucleasas durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo; (iv) fragmentación de DNA inducida por caspasas y endonucleasas espermáticas; y (v) fragmentación de DNA inducida por radio y quimioterapia. De estos cinco mecanismos, quizás en el que juega un papel más importante sea la fragmentación de DNA a nivel post-testicular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Esto viene avalado por estudios previos que demuestran que la fragmentación de DNA es más alta en espermatozoides del epidídimo (Steele y col., 1999) y eyaculados (Greco y col., 2005; Ollero y col., 2001) que en espermatozoides testiculares (Greco y col., 2005).

1. Inducción de apoptosis durante el proceso de espermatogénesis. Durante el proceso de espermatogénesis tiene lugar un *screening* celular importante que resulta en la inducción de apoptosis en un 50-60% de las células germinales que entran en la meiosis I. Estas células *earmarked* con marcadores apoptóticos tipo *Fas* deberían ser fagocitadas y eliminadas por la célula de Sertoli, a la cual se encuentran asociadas (Billig y col., 1996; Pentikainen y col., 1999; Sakkas y col., 1999). Sin embargo, esto no siempre va a ocurrir y un porcentaje variable de estas células germinales entran en el proceso de remodelado celular de la espermiogénesis (que es el que determina la morfología espermática) apareciendo posteriormente en el eyaculado. En relación a este proceso de *screening* fallido, los resultados de un estudio reciente sugieren que existe una disociación entre la calidad genómica de la célula germinal y el remodelado espermático que tiene lugar durante la espermiogénesis (Burrello y col., 2004). Es decir, una célula germinal puede tener el núcleo “pulverizado” por apoptosis o ser aneuploide y sin embargo el espermatozoide resultante tener una morfología normal. De ahí que cuando se microinyecte un espermatozoide de morfología normal, esto no nos garantiza que el genoma sea normal. Lo que si se ha constatado es que cuando existe oligospermia, la probabilidad de que un

espermatozoide con morfología normal sea aneuploide es mucho mayor que si existe normozoospermia (Burrello y col., 2004). Esto probablemente esté relacionado con un bloqueo madurativo parcial asociado a alteraciones meióticas. Por último, el hecho de que un porcentaje variable de espermatozoides en el eyaculado expresan marcadores apoptóticos del tipo de *Fas*, *fosfatidilserina*, *Bcl-X_L*, *p53* (Sakkas y col., 2002) podría utilizarse para seleccionar espermatozoides no apoptóticos en muestras de semen. Un método desarrollado recientemente en esta dirección es el utilizado para separar espermatozoides apoptóticos de espermatozoides no-apoptóticos mediante el uso de las columnas de ANnexin-conjugated MicroBeads (ANMB Microbead Kit, Miltenyi Biotec, Germany). El principio en el que están basadas estas columnas es que los espermatozoides apoptóticos expresan fosfatidilserina en la hemicapa externa de la membrana y se unen a la anexina V. Al aplicar un campo magnético a las columnas, los espermatozoides unidos a la anexina V conjugada con las micropartículas magnéticas serían retenidos en la columna, mientras que los no-apoptóticos pasarían a través de la misma (Grunewald y col., 2001). Otro método, quizás más específico, sería la selección de espermatozoides apoptóticos por técnicas de inmunoadsorción fase sólida mediante el uso de anticuerpos anti-*Fas* adheridos a placas de Petri.

2. Roturas de DNA durante el proceso de espermiogénesis. Alteraciones en el proceso de remodelado de la cromatina espermática durante la espermiogénesis podrían resultar en fragmentación de DNA. McPherson y Longo han postulado que la presencia de roturas en el DNA podría ser indicativa de maduración incompleta durante la espermiogénesis. Para que se produzca el empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide es necesaria la actividad de nucleasas endógenas que corten y ligen el DNA durante su protaminación. Estos cortes proporcionarían una liberación de estrés torsional ayudando así al empaquetamiento de la cromatina durante el desplazamiento de las histonas por las protaminas (McPherson y Longo, 1992, 1993a, b). Alteraciones en el control de este proceso podrían resultar en roturas de DNA no reparadas. Estas alteraciones se producirían antes de la espermiación.

3. Fragmentación de DNA a nivel post-testicular. Estudios recientes demuestran que espermatozoides inmaduros que producen niveles elevados de ROS pueden inducir daño de DNA en espermatozoides maduros. Este daño se produciría después de la espermiación durante la comigración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimo (Ollero y col., 2001). Dado que los espermatozoides se encuentran en íntimo contacto en el epidídimo, y que la vida media de los ROS es del orden de nano a microsegundos, esto facilitaría el que los ROS induzcan fragmentación de DNA a nivel del epidídimo, ya sea actuando directamente sobre el DNA o bien indirectamente mediante la activación de endonucleasas y caspasas espermáticas. Esto es consistente con el hecho de que la co-centrifugación de espermatozoides inmaduros (que producen niveles elevados de ROS) con espermatozoides maduros resulta en la inducción de fragmentación de DNA en estos últimos, ya que en estas condiciones estos

espermatozoides también se encontrarían en íntimo contacto (Twigg y col., 1998). Esto también es consistente con el hecho de que la exposición *in vitro* de espermatozoides maduros a ROS resulta en daño significativo de DNA (Aitken y col., 1998; Lopes y col., 1998). Por otra parte, el mismo epidídimo podría también jugar un papel activo a la hora de inducir fragmentación de DNA en los espermatozoides a su paso por el mismo, ya sea producido por radicales libres como el anión superóxido (Britan y col., 2006), el radical hidroxilo o el óxido nítrico, o bien mediante la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por agentes tóxicos o por factores epididimarios. En el primer caso, este tipo de daño podría prevenirse mediante el uso de agentes antioxidantes, mientras que en el segundo caso este tratamiento carecería de eficacia. Esto viene avalado por los resultados recientemente publicados por Greco y col. (2005) donde el uso de antioxidantes produjo una reducción significativa en los niveles de fragmentación de DNA.

Probablemente, los espermatozoides que expresen un mayor daño de DNA sean aquellos que adquieran un menor grado de *crosslinking* de puentes disulfuro en la cromatina espermática durante su maduración en el epidídimo. En este sentido, estudios recientes han demostrado que, en general, el grado de fragmentación de DNA en espermatozoides eyaculados es más alto que en espermatozoides testiculares (Greco y col., 2005; Steele y col., 1999), y que en espermatozoides del cuerpo y cabeza del epidídimo (que es donde se completa el proceso de *crosslinking*) y que la inducción de fragmentación de DNA en los espermatozoides a su paso por el epidídimo podría estar relacionada con la calidad genómica del espermatozoide. Es decir, además del mecanismo de *screening* de la célula de Sertoli, al que hacíamos referencia antes, existiría otro mecanismo de *screening* a nivel del epidídimo dirigido a eliminar espermatozoides genómicamente defectuosos (Suganuma y col., 2005).

El daño potencial de DNA que los espermatozoides pueden experimentar a su paso por el epidídimo tiene una gran trascendencia clínica, ya que en casos de niveles elevados de fragmentación de DNA en semen y fallo en dos o más ciclos de FIV/ICSI, podría recurrirse a la microinyección de espermatozoides testiculares obtenidos mediante la técnica de TESA o TESE (preferiblemente TESA, dado que es menos invasiva y gozaría de una mayor aceptación por parte del paciente y del ginecólogo). Esto viene avalado por los resultados obtenidos en un estudio publicado por Greco y col. (2005) donde la microinyección de espermatozoides testiculares en pacientes con un nivel de fragmentación de DNA en semen > 15%, medido por el test TUNEL, resultó en una tasa de embarazo del 44,4%, mientras que con espermatozoides eyaculados la tasa de embarazo evolutivo fue del 0%.

Cabe destacar que la fragmentación de DNA inducida por el radical hidroxilo resulta en la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina en un primer estadio seguido de fragmentación de DNA de cadena sencilla o de cadena doble (Cui y col., 2000). Mientras que el daño de DNA del primer tipo pudiera ser reparado por el ovocito, la fecundación de

un ovocito por un espermatozoide con fragmentación de DNA de cadena doble extensiva es prácticamente irreversible e incompatible con el desarrollo de un embarazo a término. Dado que valores de fragmentación de DNA en espermatozoides eyaculados > 20%, medidos por TUNEL (Sergerie y col., 2005), o > 30%, medidos por el test SCSA (Evenson y col., 1999), están asociados a tasas de embarazo < 5%; la hipótesis que se ha venido postulando hasta ahora es que si bien un 20% y 30% de los espermatozoides tienen roturas en las cadenas de DNA, el resto de los espermatozoides podrían tener modificaciones en las bases de DNA del tipo de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina. Por lo tanto, la probabilidad de que un espermatozoide con DNA normal fecunde al ovocito sería mucho más baja que la esperada con un valor de fragmentación de DNA del 20% o 30%, respectivamente. Es decir, además de la fragmentación de DNA medible del 20% y 30%, el 80% y 70% restante de los espermatozoides, tendrían otro tipo de daño que no miden los test habituales de fragmentación de DNA y que, de no ser reparado, no sería compatible con el desarrollo de un embarazo a término. Este concepto ha sido designado como el "efecto iceberg" (Evenson y col., 1999). Sin embargo, en la actualidad se baraja otra hipótesis alternativa: dado que en algunos estudios se encuentra una correlación entre un valor patológico de fragmentación de DNA y bajas tasas de embarazo en técnicas de reproducción asistida y en otros no se encuentra esta correlación, incluso en parejas con un perfil de factor femenino muy similar y sin factor masculino genético (FISH en semen y meiosis normal), lo más probable es que esta aparente discrepancia esté relacionada con el tipo de daño de DNA: es decir, si el daño del DNA espermático es reparable o no por el ovocito. Dos pacientes pudieran tener un mismo valor de fragmentación de DNA, e.g., 40%, y sin embargo en un caso el daño ser reparable y en el otro no. Por lo tanto, estaríamos hablando de subpoblaciones de varones con diferentes tipos de daño de DNA, más que de valores absolutos de fragmentación de DNA (Álvarez y col., 2004).

4. Activación de caspasas y endonucleasas espermáticas. La activación de caspasas y endonucleasas en espermatozoides diferenciados por factores fisicoquímicos puede inducir también fragmentación del DNA espermático. Estudios previos indican que la exposición de espermatozoides de ratón *in vitro* a 40°C resulta en un aumento significativo en el grado de fragmentación del DNA (Sailer y col., 1997). Más recientemente, Banks y col. han demostrado la inducción de fragmentación de DNA en espermatozoides de ratón *in vivo* tras haber sido expuestos los testículos a una temperatura de 42°C (Banks y col., 2005). Dado que la fragmentación de DNA se encontró en espermatozoides aislados del epidídimo una hora después del estímulo. Los autores concluyeron que el daño observado tendría que haberse producido en los espermatozoides a su paso por epidídimo y que podría ser causado por radicales libres o por activación de caspasas y endonucleasas espermáticas.

Tratamiento de la fragmentación del DNA espermático

Basado en lo expuesto anteriormente se deriva que el tratamiento del estrés oxidativo epididimario con antioxidantes podría ser de gran utilidad a la hora de reducir, al menos en parte, el daño del DNA espermático y mejorar las tasas de embarazo en parejas de infertilidad. De hecho, estudios previos (Greco y col., 2005) indican que el tratamiento con vitaminas E y C reduce de forma significativa la fragmentación del DNA espermático. Sin embargo, estudios recientes indican que el uso a largo plazo de este tipo de antioxidantes puede dañar la cromatina espermática (Menezo y col., 2007), quizás debido a que se altera el equilibrio de óxido-reducción en las células del epitelio epididimario donde la producción de radicales libres es utilizada para la oxidación de los puentes disulfuro de las protaminas de la cromatina espermática (Britan y col., 2006). Por otra parte, agentes antioxidantes tipo diclofenaco no parecen interferir con este equilibrio de óxido-reducción y producen resultados satisfactorios a largo plazo. El mecanismo por el cual el diclofenaco previene la fragmentación del DNA espermático es independiente de su efecto anti-inflamatorio. Sin embargo, en casos de procesos inflamatorios/infecciosos en el epidídimo, el efecto anti-inflamatorio del diclofenaco podría contribuir a reducir el estrés oxidativo, ya que se ha demostrado que factores pro-inflamatorios pueden magnificar de forma considerable la producción de radicales libres por parte de espermatozoides inmaduros (Saleh y col., 2002). Estudios previos indican que el diclofenaco actúa como antioxidante a través de un doble mecanismo: (i) quelante de metales pesados que catalizan la reacción de Haber-Weiss entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno; y (ii) actuando directamente como *scavenger* del radical hidroxilo (Aruoma y Halliwell, 1988). La dosis inicial de diclofenaco habitualmente utilizada es de 50 mg cada 12 horas durante al menos 4 semanas. También se suele combinar con un antibiótico tipo doxiciclina (100 mg cada 12 horas durante dos semanas) para tratar una posible infección subclínica a nivel del epidídimo causada sobre todo por *Ureaplasma* y *Chlamydia trachomatis* (Gallegos y col., 2007). Una vez que se haya llevado a cabo este tratamiento inicial, se recomienda continuar el tratamiento de diclofenaco cada dos semanas para prevenir la fragmentación del DNA espermático que se pueda producir a nivel post-testicular. La razón por la cual se establece un período de tratamiento de dos semanas está relacionada con el tiempo de tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, que es aproximadamente de una semana.

	0 semanas	1 semana	4 semanas	8 semanas
Control	17,3 ± 2,01 ¹	17,8 ± 1,8	18,5 ± 2,2	19,2 ± 1,9
Diclofenaco	18,0 ± 2,20	12,0 ± 0,9	12,4 ± 0,6	11,5 ± 0,6
	p=0,81	p<0,01	p<0,01	p<0,01

Tabla 1. Efecto del diclofenaco en los niveles de fragmentación del DNA espermático

¹valores representan la media ± la desviación estándar

Conclusiones

El estrés oxidativo en el epidídimo juega un papel muy importante en la fisiopatología de la infertilidad masculina. Los radicales libres, y en particular el radical hidroxilo, inducen daño de DNA tipo 8-OHdG y fragmentación de DNA de cadena sencilla y cadena doble, además de la peroxidación de fosfolípidos de membrana (Álvarez y Storey, 1995). Este daño post-testicular puede o bien prevenirse, al menos en parte, mediante tratamiento farmacológico con antioxidantes o bien mediante el uso de espermatozoides testiculares en combinación con técnicas de reproducción asistida (TESA-ICSI). Además, la selección de espermatozoides mediante columnas de Annexin V o el uso de Confocal Light Absorption Scattering Spectroscopy (CLASS) nos va a permitir en un futuro próximo poder seleccionar espermatozoides con bajos niveles de fragmentación de DNA o incluso con la cromatina intacta, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., y col. (1998). *Biol. Reprod.*, 59, 1037-1046.
- Álvarez, J.G. y Storey, B.T. (1995). *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 334-346.
- Álvarez J.G., Ollero M., Larson-Cook K.L., y col. (2004). *Fertil. Steril.*, 81, 712-713.
- Aruoma O.I., Halliwell, B. (1988). *Xenobiotica*, 18, 459-470.
- Banks, S., King, S.A., Irvine, D.S., y col. (2005). *Reproduction*, 129, 505-514.
- Billig, H., Chun, S.Y., Eisenhauer, K., y col. (1996). *Hum. Reprod. Update*, 2, 103-117.
- Britan, A., Maffre, V., Tone, S., y col. (2006). *Cell Tissue Res.*, 2, 1-10.
- Burrello, N., Arcidiacono, G., Vicari, E., y col. (2004). *Hum. Reprod.*, 19, 2298-2302.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., y col. (1999). *Hum. Reprod.*, 14, 1039-1049.
- Gallegos, G., Ramos, B., Santiso, R., y col. *Fertil Steril*.
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., y col. (2005). *Hum. Reprod.*, 20, 226-230.
- Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., y col. (2005). *J. Androl.*, 26, 349-353.
- Grunewald, S.D., Paasch, U., Glander, H.J. (2001). *Cell Tissue. Bank*, 2, 127-133.
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G., y col. (1998) *Hum. Reprod.*, 13, 896-900.
- Lopes, S., Sun, J.G., Jurisicova, A., y col. (1998). *Fertil. Steril.*, 69, 528-532.
- McPherson. S.M.G., Longo. F.J. (1992). *Mol Reprod. Dev* 31, 268-279.
- McPherson. S.M.G., Longo. F.J. (1993a). *Devel Biol* 158, 122-130.
- McPherson. S.M.G., Longo. F.J. (1993b). *Eur J Histochem* 37, 109-128.
- Menezo, Y.J., Hazout, A., Panteix G., y col. (2007). *Reprod. Biomed. Online.*, 14, 418-421.
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., y col. (2001). *Hum. Reprod.*, 16, 1912-1921.
- Pentikainen, V., Erkkila, K., Dunkel, L. (1999). *Am. J. Physiol.*, 276, E310-E316.
- Sailer, B.L., Sarkar. L.J., Bjordahl, J.A., (1997). *J. Androl.*, 18, 294-301.
- Sakkas D., Mariethoz, E., Manicardi, G., y col. (1999). *Revi. Reprod.*, 4, 31-37.
- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., y col. (2005). *Hum. Reprod.*, 20, 3446-3451.
- Steele, E.K., McClure, N., Maxwell, R.J., y col. (1999). *Mol. Hum. Reprod.*, 9, 831-835.
- Suganuma R., Yanagimachi R., Meistrich M. (2005). *Hum. Reprod.*, 20, 3101-3108.

Tesarik, J., Greco, E., Mendoza, C. (2004). *Hum. Reprod.*, 19, 611-615.

Twigg, J.P., Irvine, D.S., Aitken, R.J. (1998). *Hum. Reprod.*, 13, 1864-1871.

OXIDACIÓN LIPÍDICA Y EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES

Edwin Frankel

Universidad de California. Davis. EEUU

Oxidación producida por los radicales libres

La oxidación de aceites comestibles es un problema importante para la industria alimentaria debido al considerable aumento en el uso de grasa y aceites polinsaturados que proceden de vegetales y pescados, hecho este unido al abandono del uso de antioxidantes sintéticos y al enriquecimiento de algunos alimentos con hierro. La oxidación de los lípidos provoca la aparición de aromas y olores rancios en alimentos y esto conlleva una disminución en la calidad nutricional y por consiguiente problemas de seguridad alimentaria debido a la formación de productos secundarios después del procesado y también cocinado.

La oxidación de los lípidos ocurre mediante un mecanismo en cadena iniciado por radicales libres y en el que se pueden encontrar los siguientes procesos: iniciación, propagación y terminación. Estas etapas constan a menudo de complejas cadenas de reacciones (Figura 1).

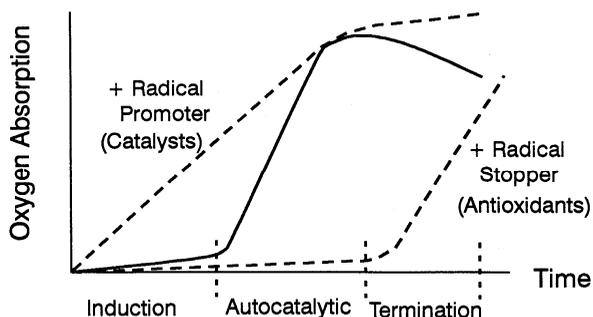
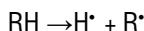


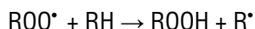
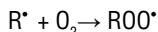
Figura 1. Cinéticas de oxidación

1. Iniciación. En presencia de iniciadores, los lípidos insaturados (RH) pierden un átomo de hidrógeno, dando lugar a un radical libre.



2. Propagación. El radical alquilo de los lípidos insaturados reacciona muy rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo. Esta etapa siempre es mucho más rápida ($k=10^{7-9}$) que la siguiente reacción de transferencia de hidró-

geno con los lípidos insaturados para dar lugar a la formación de hidroperóxidos (ROOH) que son productos primarios de las reacciones de oxidación. Debido a que esta etapa es lenta y por lo tanto limitante el secuestro de H de los lípidos insaturados se realiza de forma selectiva desde los enlaces hidrógeno más débiles.



3. Terminación. En presencia de altas concentraciones de radicales alquilo y peroxilo interactúan con otros para dar lugar a productos no radicalarios en lo que se conocen como reacciones de terminación.



Oxidación vía radicales libres del oleato. El mecanismo clásico que describe la oxidación del metal oleato conlleva la captura de un átomo de H de los carbonos alílicos 8 y 11, lo que da lugar a tres radicales carbón alílicos deslocalizados (Figura 2). De acuerdo a este mecanismo el oxígeno ataca los carbonos terminales de esos productos intermedios dando lugar a una mezcla de cuatro hidroperóxidos alílicos que contienen grupos OOH en los carbonos 8, 9, 10, y 11:

9-hydroperoxy-*trans*-10-octadecenoate (*trans*-9-OOH)

11-hydroperoxy-*cis*-9-octadecenoate (*cis*-11-OOH)

10-hydroperoxy-*trans*-8-octadecenoate (*trans*-10-OOH)

8-hydroperoxy-*cis*-9-octadecenoate (*cis*-8-OOH)

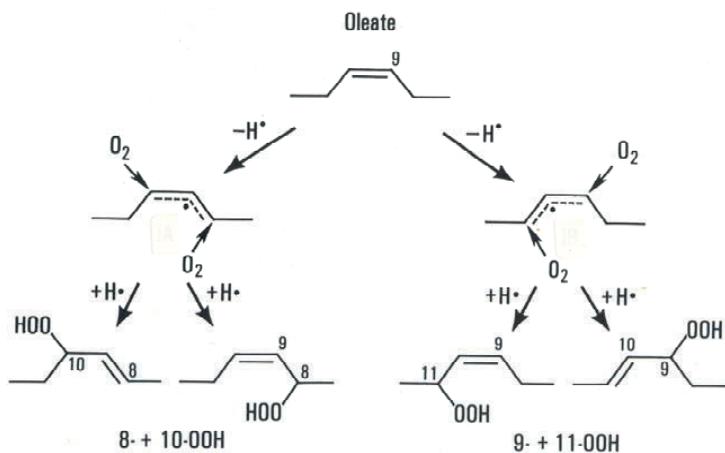


Figura 2. Oxidación radicalaria del oleato

Oxidación vía radicales libres del linoleato. El linoleato es aproximadamente 50 veces más reactivo que el oleato, debido a que posee un grupo activo metileno dialílico en el carbono 11 entre dos dobles enlaces que pueden perder un átomo de H muy fácilmente. El secuestro del átomo de H en la posición 11 del carbono del linoleato da lugar a un radical pentadienilo híbrido que reacciona con el oxígeno en las posiciones finales del carbono 9 y 13 dando lugar a una mezcla de dos dienos conjugados (9 y 13 hidroperóxidos) (Figura 3). La gran reactividad del linoleato es debida a la formación del radical intermedio pentadienilo que es mas efectivamente estabilizado por resonancia y los dienos hidroperóxidos producidos son asimismo estabilizados por conjugación. Los isómeros conjugados se forman en concentraciones equimolares para diferentes niveles de oxidación. Estudios estereoquímicos, mostraron que la formación de la mezcla de 4 dienos conjugados hidroperóxidos *cis*, *trans* y *trans*, *trans*.

- 9-hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12-octadecadienoate (*ci*, *trans*-9-OOH)
- 9-hydroperoxy-*trans*-10, *trans*-12-octadecadienoate (*trans*, *trans*-9-OOH)
- 13-hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoate (*cis*, *trans*-13-OOH)
- 13-hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadecadienoate (*trans*, *trans*-13-OOH)

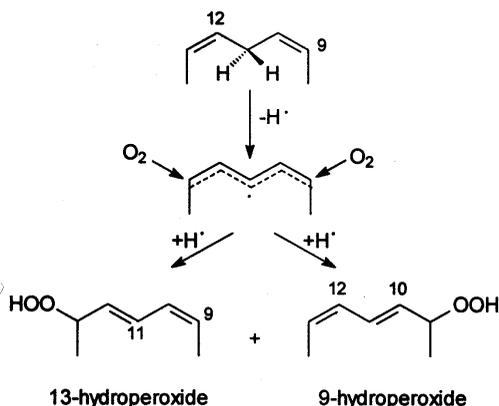


Figura 3. Oxidación radicalaria del linoleato

Inicialmente y a bajas temperaturas los isómeros *cis*, *trans*-OOH son los mayoritarios. La proporción de *trans*, *trans*-OOH aumenta con el incremento de la temperatura.

Oxidación vía radicales libres del linolenato. El metilo linolenato tiene dos grupos metilo dialílicos y reacciona con el oxígeno dos veces más rápido que el linoleato. Linolenato es aproximadamente dos veces más reactivo que el linoleato. De manera análoga al mecanismo presentado para el linoleato, en el caso del linolenato se forman dos radicales pentadienilo por secuestro de átomos de H de los carbonos 11 y 14 situados entre los dienos 1,4 entre el carbono 9 y 13 en un lado y en el carbono 12 y 16 del otro lado de la molécula (Figura 4). La reacción del oxígeno con los carbonos terminales de cada uno de los radicales pentadienilo da lugar a una mezcla de cuatro radicales peroxilo que da lugar a los correspondientes dienos conjugado 9-, 12-, 13- e 16-hidroperóxidos conteniendo un tercer doble enlace *cis* aislado.

9-hydroperoxi-*trans*-10, *cis*-12, *cis*-15-octadecatrienoate (*trans*, *cis*, *cis*-9-OOH)

13-hydroperoxi-*cis*-9, *trans*-11, *cis*-15-octadecatrienoate (*cis*, *trans*, *cis*-13-OOH)

12-hydroperoxi-*cis*-9, *trans*-13, *cis*-15-octadecatrienoate (*cis*, *trans*, *cis*-12-OOH)

16-hydroperoxi-*cis*-9, *cis*-12, *trans*-14-octadecatrienoate (*cis*, *cis*, *trans*-16-OOH)

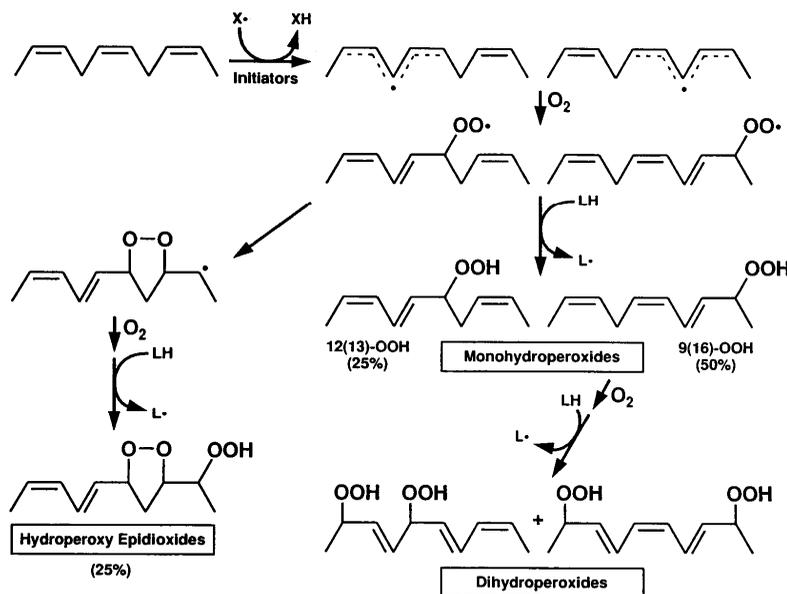


Figura 4. Oxidación radicalaria del linolenato

Un análisis del linolenato autooxidado mostró que las cantidades de 9- y 16-hidroperóxidos fueron aproximadamente dos veces mayores que las de 12- y 13-hidroperóxidos. Esta distribución no equimolar de los hidropéroxidos del linolenato ha sido atribuida a la tendencia del 12- y 13-radicales peroxilo a una rápida ciclación de los radicales peroxil para dar lugar a ciclación en los carbonos 1 y 3 y posterior oxidación que produce los hidroperóxidos-5-epidioxido, como productos mayoritarios.

Oxidación radicalaria de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA).

Los ácidos grasos de cadena larga omega 3 más importantes encontrados en aceites de pescado, algas y productos marinos son el *cis*-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanoico (EPA) y el *cis*-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico (DHA). De acuerdo al mismo mecanismo establecido para el linolenato, el EPA da lugar a la formación de 8 hidropéroxidos, 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 14-, 15- y 18, mientras el DHA da lugar a diez 4-, 7-, 8-, 10-, 11-, 13-, 14-, 16-, 17- y 20. La oxidabilidad de cada PUFA se duplica por cada grupo metilo dialílico. Por lo tanto la oxidabilidad del EPA es aproximadamente cuatro veces mayor que el DHA y 5 veces mayor que el del linoleico (Figura 5). Utilizando esta regla se puede calcular la oxidabilidad de aceites vegetales desde el 9-10 % para aceite de oliva y palma, hasta valores del 46-73% para aceites de colza, algodón, soja y girasol (Figura 6).

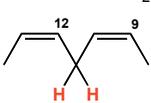
Fatty acids	Relative rates	PUFA	
18:1 n9	1	Oxidizability = $2 \times \text{active CH}_2$	
18:2 n6	50		
18:3 n3	100		
18:4 n3,20:4 n6	3		
20:5 n3 (EPA)	4		
22:6 n3 (DHA)	5		

Figura 5. Potencial de oxidación calculado para ácidos grasos insaturados

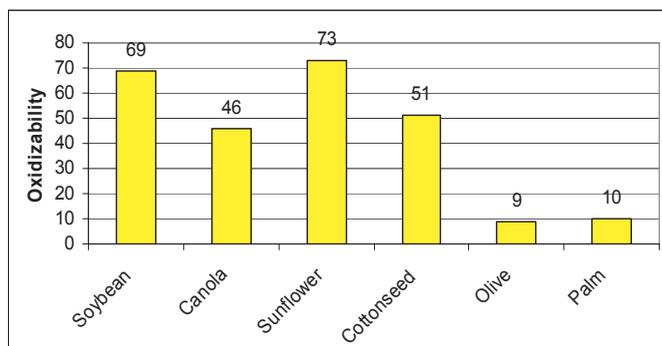


Figura 6. Potencial de oxidación de aceites vegetales: (% 18:2 x 1) + (% 18:3 x 2)

El correspondiente potencial de oxidación de los aceites de pescado varía entre 110 hasta 262 % para diferentes aceites de pescado y algas (Figura 7).

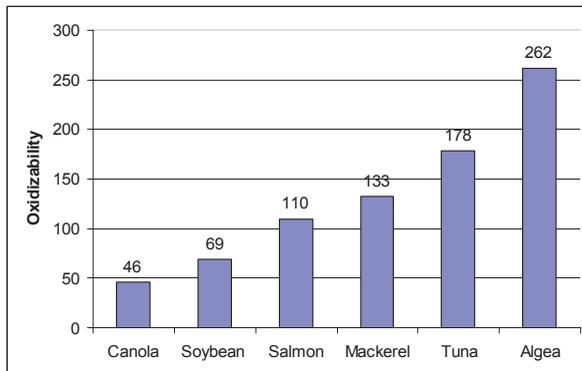


Figura 7. Potencial de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados n-3: $(18:2 \times 1) + (18:3 \times 2) + (20:4 \times 3) + (20:5 \times 4) + (22:6 \times 5)$

Descomposición de los productos de oxidación

Un gran número de compuestos han sido identificados como productos de la oxidación de hidroperóxidos del linoleato, incluyendo dímeros, polímeros, productos secundarios (epoxi-hidroperóxidos) y volátiles (aldehídos, hidrocarburos, cetonas, ésteres, etc.) como productores de olores y sabores (Figura 8.).

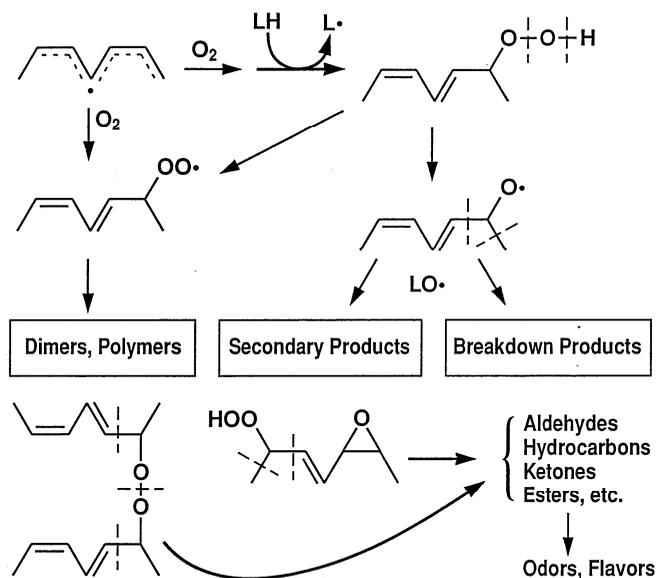


Figura 8. Productos de descomposición de hidroperóxidos del linoleato

La descomposición por ruptura en la posición beta da lugar al 2,4-decadienal a partir del hidroperóxido de 9-linoleato, y pentano frente al hexanal proveniente del hidroperóxido 13-linoleato (Figura 9).

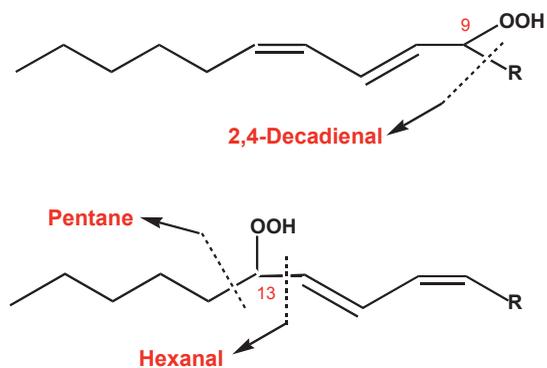


Figura 9. Principales volátiles provenientes de la descomposición de hidroperóxidos del linoleato

La descomposición da lugar a 2, 4, 7-decatrienal a partir del 9-linolenato hidropéroxido, 2,4-heptadienal a partir del 12-linolenato hidropéroxido, 2- o 3-hexenal a partir de 13-linolenato hidropéroxido, y propanal a partir de 16-linolenato hidropéroxido (Figura 10).

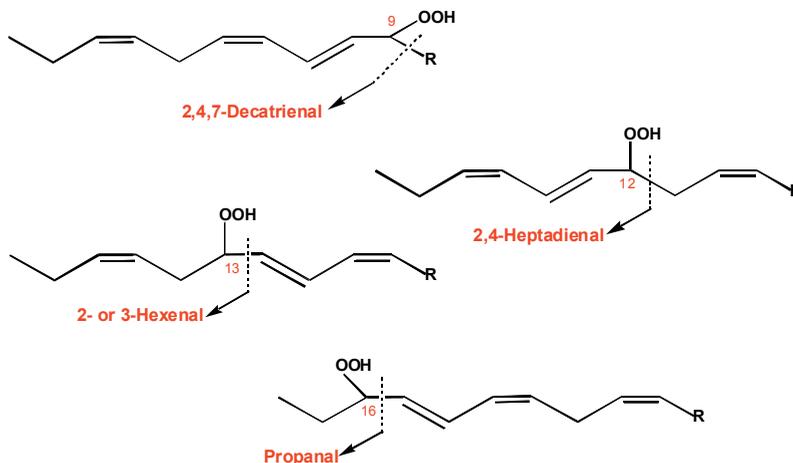


Figura 10. Principales volátiles provenientes de la descomposición de hidropéroxidos del linolenato

Antioxidantes

1. Mecanismos. Los antioxidantes inhiben las reacciones de iniciación y propagación que se producen durante los fenómenos de oxidación. Para ser efectivos en esta interrupción del proceso oxidativo los antioxidantes dan lugar a un radical estable A que reacciona lentamente con los lípidos LH (3) y rápidamente con los radicales peroxilo LOO· (4). La reacción (5) es despreciable a presión atmosférica, pero puede llegar a ser importante en condiciones de baja presión de oxígeno y elevada temperatura. El radical antioxidante A podría reaccionar de nuevo con radicales peroxilo para dar lugar a peróxidos estables LOOA mediante la reacción (6) o dimerizarse con otro radical antioxidante para obtener A-A de acuerdo a la reacción (7).





2. Métodos antioxidantes. Las publicaciones relacionadas con los antioxidantes desde los últimos años hasta la actualidad son caóticas y confusas. Un muestreo de los trabajos publicados sobre antioxidantes en la revista *J. Agric. Food Chem.* en el año 2003 reveló la siguiente multiplicidad de métodos y terminología usada por los diferentes autores.

- En el título: “Antioxidante”
- Total: 101 publicaciones: métodos por publicación
 - 1 método: 35
 - 2 métodos: 25
 - 3 métodos: 9
 - 4 o más: 11
- Sin medida de antioxidantes (contenido en fenoles totales): 14
- Terminología usada: Propiedades antioxidantes, potencial antioxidante, capacidad antioxidante, actividad captación de radicales libres, actividad bloqueadora de cadenas, actividad antiradicalaria, capacidad quelante, equivalentes trolox, capacidad equivalente vitamina C, capacidad captadora o secuestrantes de radicales del oxígeno.

El número de publicaciones que usan los siguientes métodos se presentan a continuación:

- 35: DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, absorbancia a 517 nm
- 20: TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes trolox (ABTS.+ :2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-SO₃Na), Absorbancia a 734 nm
- 15: Oxidación del ácido linoleico u oxidación del metil linoleato: Absorbancia a 234 nm para dienos conjugados
- 7: ORAC: (oxygen radical absorbance capacity), AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propane) diHCl induced oxidation, b-phycoerythrin fluorescence loss
- 10: Otros métodos diferentes

Algunas limitaciones en la evaluación de métodos antiradicalarios son:

- No existencia de un sustrato biológico o alimentario “diana” para proteger
- Uso inapropiado de sustratos (ácido linoleico, metil linoleato, B-phycoerythrin)
- No específico y unidimensional: no adecuados para antioxidantes multifuncionales

- Uso de radicales artificiales y iniciadores azo que actúan de diferente forma a los metales
- No datos de composición
- Interferencias de otros radicales y pigmentos de plantas
- No existe información sobre los mecanismos (Tabla 1).

Phenolics (5 μ M GAE)	% Inhibition LDL oxidation	TEAC mM Trolox	ORAC μ M Trolox
Cyanidin	79.4	4.4	2.2
Catechin	74.9	2.4	2.5
Delphinidin	71.8	4.4	1.8
Epicatechin	67.6	2.5	2.4
Rutin	67.6	2.4	0.6
Gallic acid	63.3	3.0	1.7
Quercetin	61.4	4.7	3.3
Malvidin	59.3	2.1	2.0
Pelargonin	39.0	1.3	1.1

Inhibition of LDL oxidation (Our work 1996-1997)

TEAC = Trolox equivalent antioxidant activity (Miller y col. 1993)

ORAC = Oxygen radical absorbance capacity (Cao y col. 1993)

Tabla 1. Variaciones significativas en la actividad antioxidante indicadas por diferentes autores utilizando diferentes métodos.

3. Actividad interfacial en el seno del fluido y emulsiones

Estudios con antioxidantes fenólicos de origen sintético mostraron que eran más efectivos cuando todas las posiciones orto estaban sustituidas o cuando uno o dos son sustituidos por butilos terciarios (Figura 11). En estudios de fenómenos de interfases, hemos comparado la actividad de antioxidantes lipofílicos (alfa-tocoferol y ascorbilo de palmitato) con sus hidrofílicos análogos (trolox y ác. ascórbico) (Figura 12).

su carácter lipofílico o hidrofílico. Por tanto alfa- T es un antioxidante lipofílico que se comporta de manera diferente en varios sustratos lipídicos debido a su ácido carboxílico análogo al trolox, el cual es hidrofílico. En el seno de una disolución formada por ácido linoleico, metil linoleato y triglicéridos de aceite de maíz, el trolox es mejor antioxidante que alfa-tocoferol, pero la tendencia opuesta se observa en una emulsión aceite-agua del linoleato de metilo y aceite de maíz, donde el trolox fue menos efectivo que el alfa-tocoferol. Sin embargo en emulsiones de ácido linoleico tuvo mejor comportamiento que el alfa-tocoferol. El ácido linoleico constituye un sustrato único debido a su tendencia a formar micelas (Figura 13).

Hydroperóxido		
In Bulk systems:	formation	decomposition
Linoleic acid	Trolox > α-Toc	Trolox > α-Toc
Methyl linoleate	Trolox > α-Toc	α-Toc > Trolox
Corn oil	Trolox > α-Toc	Trolox > α-Toc
In Emulsion systems:		
Linoleic acid	Trolox > α-Toc	Trolox > α-Toc
Methyl linoleate	α-Toc > Trolox	α-Toc > Trolox
Corn oil	α-Toc > Trolox	Trolox > α-Toc

Tabla 2. Actividad antioxidante de alfa-tocoferol y trolox en diferentes sustratos lipídicos.

α -Tocoferol y trolox muestran complejas propiedades interfaciales entre las interfases aceite-aire y aceite-agua que afectan significativamente a sus actividades relativas en diferentes sistemas lipídicos (Tabla 2). En el seno del aceite el trolox (hidrofílico) protege mejor si está situado entre la interfase aire-aceite (Figura 13). En la emulsión el tocoferol (lipofílico) protege mejor si está situado en la interfase agua aceite. Dada su tendencia a formar micellas, el ácido linoleico no es un lípido apropiado para testar antioxidantes debido a que el comportamiento en este sustrato es significativamente diferente del de alimentos que están compuestos principalmente por triglicéridos.

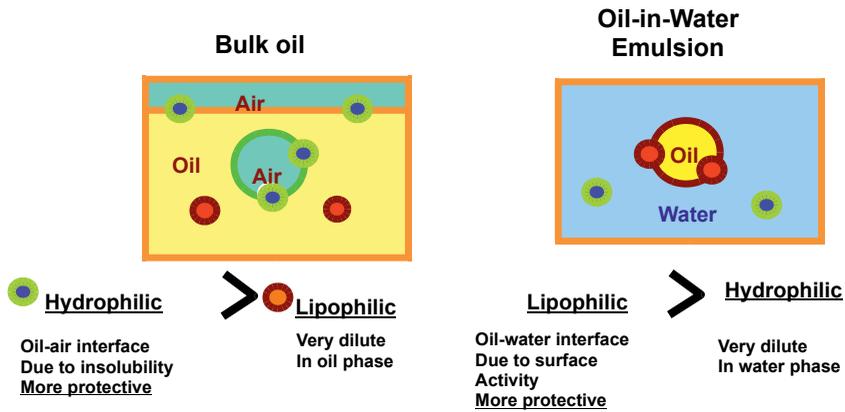


Figura 13. Esquema de la paradoja polar

c. Flavonoides. Los flavonoides son unos de los compuestos con mayor actividad antioxidante presentes en las plantas. Su estructura básica consiste de núcleo flavón con 2 anillos bencénicos (A y B) junto con un oxígeno contenido en un anillo pirano (C) (Figura 14). Las diferentes sustituciones en el anillo C definen las diferentes clases de flavonoides, entre lo que se incluyen los flavan-3-ol, flavonoles, antocianidinas y procianidinas que incluyen oligómeros del flavan-3-ol. Otros flavonoides presentes en frutas contienen un gran y diverso número de glucósidos, provenientes de la glucosilación en la posición 3 y 7. En los flavonoides se conocen multitud de mecanismos antioxidantes:

- Secuestradores de radicales ROO^{\bullet} , RO^{\bullet} , HO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, 1O_2
- Inactivadores de iones metálicos
- Complejadores de proteínas: Enzimas, ApoB del LDL, Metal binding sites of proteins
- Sinergismo: Reduce antioxidantes oxidados (ácido ascórbico)
- Efectos de particionamiento: Localization at oxidation sites

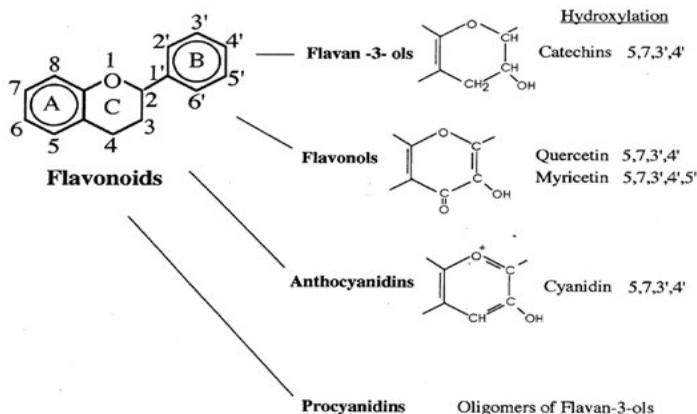


Figura 14. Estructura química de los flavonoides

d. Antioxidantes del romero. La actividad antioxidante de los extractos comerciales de romero está directamente relacionada con su contenido en dos diterpenos fenólicos: ácido carnósico y carnosol, los cuales también se encuentran en la salvia. El ácido carnósico tiene una estructura que consta de tres a seis anillos incluyendo un anillo fenólico dihidrico y un ácido carboxílico libre (Figura 15).

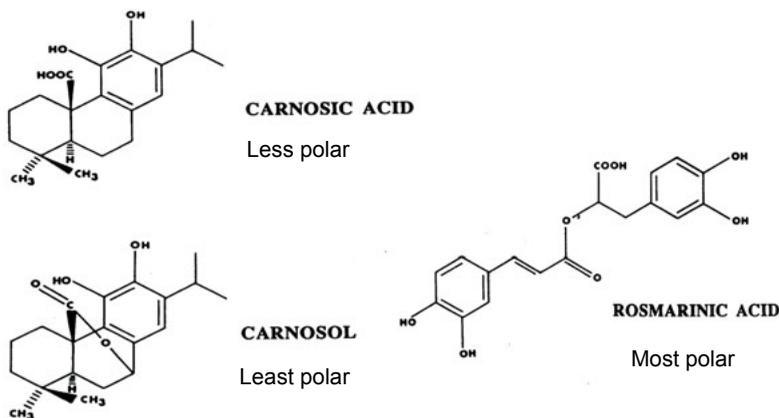


Figura 15. Estructuras de los compuestos antioxidantes del romero

El carnosol es un derivado del ácido carnósico que contiene un anillo de lactona. En una disolución de aceite (bulk) de aceite de maíz, el extracto de romero, el ácido carnósico, el ácido rosmarinico y el α -tocoferol fueron significativamente más acti-

vos que el carnosol. Por el contrario en emulsiones aceite-agua de aceite de maíz, el carnosol fue significativamente más activo que en el aceite, mientras el extracto de romero y el ácido carnósico fueron menos activos y el ácido rosmarínico mostró una actividad prooxidante (Figura 16). Los compuestos polares hidrofílicos del romero fueron menos activos en emulsiones, debido a su tendencia a dividirse en la fase acuosa por lo que protegen menos que en el seno del aceite.

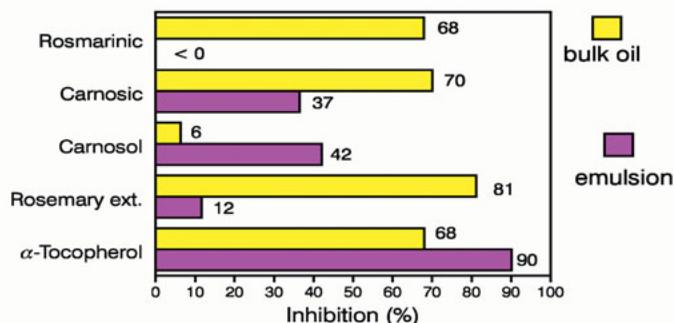


Figura 16. Inhibición de la formación de hidroperóxidos

e. Catequinas del té verde. Los extractos de té verde se componen de una compleja mezcla de galatos de catequina, que incluyen (+)-catequina (+)-galocatequina (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato, (-)-epigalo-catequina, y epigalocatequina galato (Figura 17). Las catequinas del té muestran diferentes comportamientos en cuanto a actividad antioxidante en diferentes sistemas lipídicos. En aceite de maíz oxidado a 50 °C, la epigalocatequina, epigalocatequina galato y epicatequina galato fueron mejores antioxidantes que epicatequina y catequina. Sin embargo en la correspondiente emulsión agua-aceite de maíz, las catequinas del té fueron prooxidantes así como propil galato y ácido gálico. Por el contrario en liposomas de lecitina epigalocatequina galato fue el mejor antioxidante, seguido por la epicatequina, epigalo-catequina epicatequino galato y catequina.

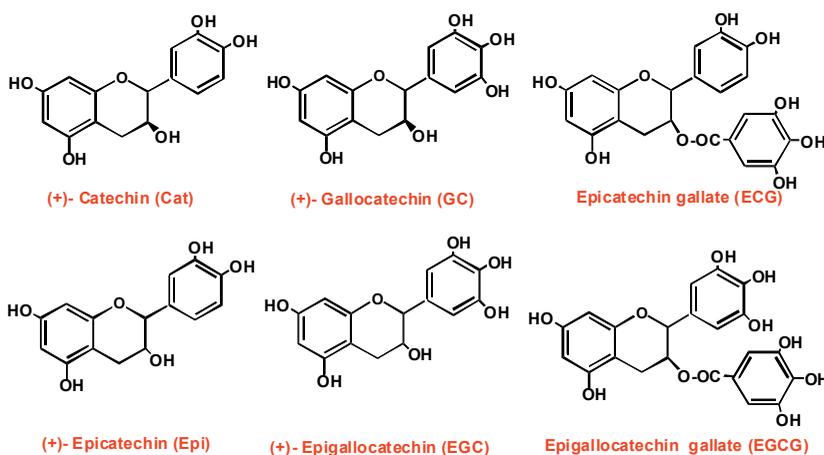


Figura 17. Estructura de las catequinas del té verde

- Triglicéridos de aceite de maíz (50°C): EGC = EGCG = ECG > EC > Cat
- Emulsión aceite de maíz-agua (50°C): EC, Cat y catequinas del te: prooxidantes
- Liposoma de lecitina de soja (50°C): EGCG = ECG > Cat = EC; EGC: prooxidante
- Liposoma de lecitina de soja (37°C + acetato de cobre): EC = Cat > ECG; EGCG, EGC: prooxidante

El té verde mostró actividad antioxidante en liposomas de lecitina de soja oxidada a 37 °C en presencia de catalizador de cobre. Se observó una mayor inhibición del hexanal que la formación de hidroperóxidos, lo que sugiere que las catequinas del té verde podrían actuar de forma efectiva inhibiendo la formación de radicales alquilo, que se forman como precursores de aldehídos.

4. Evaluación de antioxidantes naturales. Aunque los antioxidantes naturales presentes en extractos de plantas son generalmente multifuncionales, un amplio abanico de métodos unidimensionales se han desarrollado para evaluar su actividad, entre los que se incluyen DPPH, TRAP, TEAC, ORAC, FRAP (Tabla 9.19, Lipid Oxidation, 2nd edition, p. 250). Varios protocolos se han desarrollados para medir la actividad antioxidante medida por la capacidad de captación de radicales libres. Estos métodos usan una amplia variedad de sistemas generadores de radicales libres y métodos de inducción de la oxidación, así como medida del punto final de la oxidación. La validez de estos métodos puede ser cuestionable, debido a que no tienen en cuenta la complejidad de las acciones antioxidantes. Debemos de realizarnos varias preguntas para dar validez a esos métodos, como:

- ¿Cuál es el verdadero impacto de la oxidación en los alimentos?
 - Problema: la metodología es cuestionable
 - Uso de metodología no específica
- ¿Cuáles son los efectos reales de los antioxidantes?
 - Se necesita información química específica:
 - ¿Qué sustratos son inhibidos?
 - Varios ensayos específicos son necesarios
 - Oxidación de lípidos, proteínas y sus interacciones con otros productos
 - Accesibilidad de sustratos para oxidantes y antioxidantes
 - Oxidación y antioxidación interfacial

No existe una sencilla aproximación para determinar actividad antioxidante en alimentos complejos.

5. Ensayos recomendados. La efectividad de los antioxidantes depende en gran medida del tipo de test en el que se prueben, del estado físico de los sustratos lipídicos, de las condiciones de oxidación, del sustrato oxidable, localización de los antioxidantes, método empleado para evaluar la oxidación y del estado de la oxidación. La metodología para evaluar los antioxidantes naturales debe ser cuidadosamente interpretada de acuerdo al sistema, a la metodología analítica usada para determinar la extensión y el punto final de la oxidación. Para evaluar la capacidad antioxidante de cada compuesto se debería realizar bajo diferentes condiciones de oxidación, usando varios métodos que midan diferentes productos de oxidación que están relacionados con la calidad del alimento o con reacciones biológicas críticas. Los ensayos deberían considerar los siguientes parámetros:

1. Sustratos: usar sustratos relevantes de alimentos y sistemas biológicos, entre los que se incluyen triglicéridos y fosfolípidos en disolución, en emulsiones o en sistemas liposómicos. Los ácidos grasos libres deberían evitarse porque forman micelas en las cuales los antioxidantes tienen un comportamiento diferente a los triglicéridos
2. Condiciones: ensayos bajo diferentes condiciones de oxidación, incluyendo diferentes temperaturas (por debajo de 60 °C), catalizadores o superficies de exposición.
3. Análisis: la medida de niveles de oxidación relativamente bajos (por debajo del 1 %) y la inclusión tanto de productos iniciales (hidroperóxidos, peróxidos, dienos conjugados) como secundarios (carbonilos, compuestos volátiles).

4. Concentraciones: comparar antioxidantes con la misma concentración molar de compuestos activos, relacionándolo con la estructura. Con extractos crudos de plantas sin purificar el contenido total de fenólicos y datos de composición son necesarios para comparar muestras.
5. Cálculos: cuantificación en base al periodo de inducción, porcentaje de inhibición o de velocidades de formación o descomposición de hidroperóxidos, I_{50} (concentración de antioxidante necesaria para llegar a un 50% de inhibición), T_{50} (tiempo para alcanzar el 50% de inhibición).

BIBLIOGRAFÍA

- Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000). *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1925-1941.
- Frankel, E.N. (2005). "Lipid Oxidation". Second edition. The Oily Press, Bridgwater, England. (470 páginas).
- Frankel, E.N. y German, J.B. (2006). *J. Sci. Food Agric.*, 86, 1999-2001.
- Frankel, E.N. (2007). "Antioxidants in Food and Biology. Facts and Fiction". The Oily Press, P.J. Barnes & Assoc., Bridgwater, Inglaterra. (266 páginas).
- Frankel, E.N. y Finley, J.W. (2008). *J. Agr. Food Chem*, 56, 49 - 4908.

ANTIOXIDANTES NATURALES EN ALIMENTOS RICOS EN ÁCIDOS GRASOS ω -3

Isabel Medina

Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC

El músculo de pescado y los alimentos enriquecidos en aceites de pescado son una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y su consumo se ha relacionado con la prevención de riesgo cardiovascular y otras enfermedades. La elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados confiere a estos alimentos un notable valor nutricional pero simultáneamente los hace extremadamente susceptibles a sufrir el ataque del oxígeno molecular y a oxidarse dando lugar a la formación de volátiles de bajo peso molecular, responsables de la detección organoléptica de la rancidez. La oxidación lipídica es una compleja reacción que transcurre mediante la generación de radicales libres lipídicos y que provoca una serie de efectos indeseables en el alimento como la formación de aromas anómalos, modificaciones en la textura o pérdidas de vitaminas y oxidación de pigmentos. Existe un interés claro por parte de la industria dedicada a la conservación y transformación de los productos pesqueros en prolongar su vida útil mediante el uso de métodos y condiciones idóneas de almacenamiento. Tales métodos deben fomentar la aceptabilidad del producto sin suponer un elevado coste al industrial.

Uno de los procedimientos más eficaces en la prevención de la oxidación de los alimentos grasos es la utilización de antioxidantes. Se trata de sustancias que son capaces de inhibir o retardar el desarrollo de la oxidación bien porque actúan impidiendo que ésta se inicie o bien impidiendo que ésta se propague. Contribuyen a aumentar la vida útil del alimento sin ocasionar un deterioro nutritivo o sensorial, y su empleo en combinación con otros métodos de preservación reduce los costes de conservación. Aunque el empleo de antioxidantes alimentarios sintéticos está permitido, las normativas internacionales tienden a restringir su empleo y, en concreto, la UE prohíbe su utilización en alimentos infantiles y aceites envasados. Actualmente los intereses de la industria alimentaria y de los consumidores exigen la utilización de ingredientes o aditivos naturales en sustitución de los denominados sintéticos y existe una necesidad clara de búsqueda, reconocimiento y aplicación de antioxidantes extraídos de fuentes naturales. Esto se ha manifestado en los últimos años, en el creciente interés en la obtención y purificación de antioxidantes de origen natural que está dando lugar a numerosos trabajos de investigación, patentes y proyectos de investigación. Entre los principales antioxidantes naturales pueden citarse los extractos polifenólicos procedentes de vegetales y frutas, los extractos de plantas como el té, especialmente ricos en catequinas, de especies como el romero caracterizados por la presencia de los derivados del ácido carnosólico, y de semillas de

diversos frutos. Este trabajo presenta la aplicación de dos familias de compuestos de origen natural, los ácidos hidroxicinámicos y los polifenoles procedentes de las uvas, en la inhibición de la rancidez de alimentos enriquecidos en aceites de pescado y de alimentos que tienen como base el músculo de pescado. La investigación presenta los mecanismos que explican la efectividad de estos compuestos en función de sus parámetros estructurales y propiedades fisicoquímicas y de la interacción de estos compuestos con el propio músculo, tejido o aceite.

Los resultados obtenidos mostraron una significativa eficacia antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos. De manera particular, el ácido cafeico presentó la mayor efectividad antioxidante, inhibiendo la oxidación de aceites y músculo de pescado. Su elevada eficacia se relacionó con su capacidad de donar electrones y con la habilidad para reducir el radical α -tocoferilo regenerando α -tocoferol en el músculo a través de un ciclo redox en el que participa el ácido ascórbico. Entre las procianidinas extraídas del bagazo de uva, el grado de polimerización (número de residuos fenólicos) y el grado de galoización (grupos galato) mostraron una relación directa con la capacidad reductora, es decir la capacidad de ceder electrones. Sin embargo, los estudios sobre la eficacia antioxidante en músculo de pescado mostraron la existencia de un óptimo de polimerización a partir del cual no se conseguía una mayor inhibición de la rancidez oxidativa. Un elevado número de residuos fenólicos puede inducir elevadas interacciones repulsivas que reducen la eficacia de la quelatación. Por el contrario, un aumento en el grado de galoización mejoró la eficacia de las procianidinas en músculo y emulsiones de aceites de pescado. Los estudios realizados en aceites de pescado pusieron de manifiesto la importancia de la polaridad en la actividad inhibidora de la oxidación.

Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron que la incorporación del antioxidante en los puntos activos donde ocurre la oxidación es un factor crucial en la eficacia del mismo. La distribución eficaz del antioxidante así como su interacción con el α -tocoferol presente en las membranas son factores clave en la inhibición de la oxidación de los alimentos con un elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados ω -3. La posibilidad de incorporar compuestos de origen natural para estabilizar productos enriquecidos en aceites de pescado o productos elaborados a base de pescado permite el diseño de alimentos funcionales que contengan lípidos ω -3, así como compuestos antioxidantes.

BLOQUE II. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Guillermina Font
Área de Toxicología. Universidad de Valencia

La evaluación de la toxicidad de nuevos antioxidantes, posibles nutrientes o no, se puede enfocar desde dos aspectos distintos como son, la posible utilización como aditivos alimentarios, o bien su utilización como complementos alimentarios en alimentos enriquecidos y los denominados “alimentos funcionales”.

Antes de que el uso de un aditivo sea aceptado para la alimentación, debe haber sido sometido a una adecuada evaluación toxicológica. Una vez que la necesidad tecnológica y la valoración para el consumo de los aditivos se han establecido, se necesita conocer las implicaciones sanitarias de la utilización de los mismos.

Como aditivos la evaluación de la toxicidad se plantea de forma clásica, es decir tratando de descubrir los efectos adversos de pequeñas concentraciones, mientras que en el caso de nutrientes o suplementos dietéticos la evaluación de riesgos está asociada a los niveles máximos de ingesta.

La metodología de evaluación del riesgo surge en EEUU en las décadas de los 70 y 80 del siglo pasado, y consta de varias etapas como son: la identificación del peligro por evaluación de la toxicidad y la relación de la dosis y la respuesta, que junto a la evaluación de la exposición permitirá la caracterización del riesgo y a partir de esta información se podrá llevar a cabo la toma de decisiones, estableciendo niveles tolerables o aceptables de una sustancia. En la UE esta metodología se incorpora con la Directiva 93/67/CEE sobre evaluación de riesgo de nuevas sustancias, en su doble vertiente de evaluación toxicológica (salud humana) y de evaluación ecológica (especies salvajes y ecosistema).

A continuación se presentan las definiciones de algunos términos comúnmente usados en la evaluación de riesgos:

-Peligro: es la posibilidad de que una sustancia, mezcla de sustancias o procesos que involucran sustancias, bajo ciertas condiciones de producción, uso o disposición causen efectos adversos en los organismos o en el ambiente, por sus propiedades inherentes y de acuerdo con el grado de exposición.

-Exposición: la concentración, cantidad o intensidad de un determinado agente, que incide en una población, organismo, órgano, tejido o célula diana, usualmente expresada en términos cuantitativos de concentración de la sustancia, duración y frecuencia (para agentes químicos y microbiológicos) o de intensidad (para agentes físicos como la

radiación). El término también se puede aplicar a una situación en la cual una sustancia puede incidir, por cualquier vía de absorción, en una población, organismo, órgano, tejido o célula diana.

-Riesgo: es la probabilidad de que ocurra un daño por un determinado tóxico; depende de las características del tóxico y de la exposición.

-Relaciones entre dosis-respuesta y dosis-efecto: en toxicología se establece una distinción entre las curvas de dosis (o concentración)-respuesta y de dosis (o concentración)-efecto.

La curva de dosis-respuesta puede ser definida como la expresión gráfica de la relación entre la dosis y la proporción de individuos que experimentan un efecto del todo o nada y es esencialmente la representación de la probabilidad o la proporción de una población que presenta un efecto frente a una dosis. Los ejemplos típicos de tales efectos totales o nulos son la mortalidad o la incidencia de cáncer.

En cambio, la curva de dosis-efecto es la expresión gráfica de la relación entre la dosis y la magnitud del cambio biológico producido, medido en unidades apropiadas. Se aplica a cambios que se pueden medir y que dan una respuesta gradual al aumentar la dosis de un xenobiótico.

-Caracterización del riesgo: es la cuantificación del riesgo después de considerar la exposición y la relación dosis-respuesta (efecto). Se define como la evaluación, con o sin modelo matemático, de la probabilidad y naturaleza de los efectos de la exposición a una sustancia, a partir de la cuantificación de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta para la población y los componentes ambientales que pueden estar expuestos y de la medición de los niveles de exposición potenciales de la población, los organismos y el medioambiente en riesgo.

Evaluación de riesgos

Este proceso es un intento científico de identificar y estimar los riesgos reales, y resulta de la consideración de los componentes mencionados anteriormente: el peligro, la relación dosis-respuesta (efecto) y la caracterización del riesgo. Se puede definir de la siguiente manera: es la identificación y cuantificación del riesgo resultante del uso o presencia de un agente químico o físico; toma en cuenta tanto los posibles efectos dañinos en las personas o las poblaciones que usan dicho agente en la cantidad y de la manera recomendada, como las vías posibles de exposición. La cuantificación requiere, idealmente, el establecimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta en los individuos y poblaciones objetivo.

Si después de una evaluación de riesgos se llega a la conclusión de que todavía existe un riesgo inherente importante que no se puede reducir más, se pasa al manejo del riesgo, donde la decisión de proceder o no depende de una combinación de factores económicos, sociales y políticos.

El proceso completo de evaluación toxicológica de riesgos consta de tres fases: evaluación de riesgos, gestión de riesgos y comunicación de riesgos.

Metodologías para la evaluación de la toxicidad

La evaluación de la toxicidad se hace de acuerdo con metodologías estandarizadas, propuestas por comités de expertos internacionales [OMS, 1958; OMS, 1987; OCDE, 2003 (www.oecd.org/document), European Chemicals Bureau, 2004 (<http://ecb.jrc.it/testing-methods>)]. Las tres categorías principales de información empleadas por las agencias internacionales para la evaluación y regulación son los estudios epidemiológicos, las exposiciones clínicas controladas y los estudios con animales. Los estudios de las relaciones estructura-actividad se usan como soporte a las tres categorías citadas y solo ocasionalmente se utilizan como fuente primaria de información.

Los ensayos de toxicidad en animales se apoyan en dos principios fundamentales:

- Los efectos que el tóxico produce en animales de experimentación son extrapolables a humanos. Sobre la base del “peso corporal”, los humanos son generalmente más vulnerables que los animales de experimentación (por un factor corrector de 10). Teniendo en cuenta estas diferencias cuantitativas se pueden calcular dosis relativamente seguras en humanos utilizando factores apropiados.

- La exposición de animales de experimentación a dosis altas de agentes tóxicos es un método válido para descubrir posibles riesgos en humanos. Este principio se basa en las curvas dosis-respuesta. El diseño de modelos experimentales requiere un pequeño número de animales en comparación con el tamaño de la población expuesta al riesgo. Para obtener resultados estadísticamente válidos en grupos pequeños de animales es necesario administrar dosis relativamente altas, de manera que el efecto aparezca con una frecuencia tal que sea suficiente para ser detectado.

El diseño experimental es un aspecto clave en los estudios de evaluación de la toxicidad. A continuación se comentan algunos de los aspectos a considerar:

1. *Propiedades fisicoquímicas de la sustancia a estudiar.* Esta información es imprescindible antes de iniciar cualquier estudio toxicológico. Permite definir las condiciones de manipulación y almacenamiento de dicha sustancia, los modelos experimentales (vía o modo de administración), explicar la aparición de algunos

fenómenos tóxicos y comprobar que la sustancia estudiada tenga siempre las mismas características.

2. *Elección de las especies.* A pesar de las similitudes de algunas especies con el hombre, la extrapolación es siempre difícil. En general, ratón, rata, cobaya, conejo, perro y mono son las especies más utilizadas. La elección de una determinada especie depende de varios factores: tipo de efecto toxicológico a estudiar, disponibilidad en un determinado momento, facilidad de manipulación del animal, condiciones de manutención, farmacocinética y biodisponibilidad del producto ensayado.

Así, por ejemplo, para los estudios de administración por vía oral, cutánea o por inhalación se prefieren los roedores y especialmente la rata. Para los estudios de toxicidad cutánea se utilizan el conejo o el cerdo. Para los estudios de toxicidad crónica en especies no roedoras se usan perros o primates. Para los estudios de carcinogénesis se utilizan usualmente el ratón y la rata, etc.

3. *Elección de los grupos.* En general se utilizan tres grupos tratados y uno control. Estos grupos se forman al azar a partir de lotes de animales del mismo origen, de edad y peso comparable y generalmente de ambos sexos. En los estudios de larga duración y de carcinogénesis se acostumbra a utilizar dos grupos control: un control negativo al que no se le administra nada, o sólo el vehículo de administración del tóxico, y un control positivo que recibe una sustancia de referencia.
4. *Elección de la vía de administración.* En el campo de la seguridad de los alimentos normalmente se utiliza la vía oral. El producto puede administrarse mediante una sonda esofágica o estomacal (estudios cortos) o mezclando el tóxico con la comida o bebida (estudios de larga duración).
5. *Elección de las dosis.* Siempre es muy difícil. Varía en función del estudio a realizar. En estudios de toxicidad aguda se usan dosis elevadas que produzcan intoxicaciones claras en los animales. En estudios de toxicidad crónica suele emplearse una gama de dosis que van desde dosis bajas, que corresponden a la utilización normal en el hombre, hasta dosis elevadas que producen efectos tóxicos en la especie escogida.
6. *Duración del tratamiento.* Es muy variable, dependiendo del tipo de estudio a realizar. Generalmente los estudios se realizan de forma secuencial: empiezan por experimentos cortos (días-semanas), luego de 3-6 meses y, en casos especiales, podemos tener estudios de 12 meses a 2 años, e incluso más en los roedores.
7. *Análisis estadístico de los datos.* En cada ensayo los resultados obtenidos se someten a un análisis estadístico para determinar si la distribución de las respuestas

en los grupos tratados difiere de las obtenidas en el grupo control. Existen numerosos métodos estadísticos para el análisis de resultados.

Tipos de estudios de toxicidad

En la evaluación toxicológica se utilizan ensayos *in vivo* e *in vitro*. Para aprobar la utilización de los aditivos en los alimentos existen dos organismos encargados de realizar la evaluación toxicológica y elaboración de normas de identidad y pureza, así como la determinación de su inocuidad basándose en los estudios realizados en animales de experimentación, con diversas dosis y periodos prologados, estos Organismos son el Comité de Expertos de aditivos de los alimentos, de la FAO/OMS (JECFA) y el Comité Científico de los Alimentos (SCF) de la UE.

Todos los aditivos que aparecen en la “lista positiva” han sido previamente evaluados por la JECFA y por el CCAH. Cuando los comités consideran insuficiente la información disponible pueden establecer o no una ingesta diaria admisible (IDA) provisional, y eventualmente recomendar los nuevos experimentos necesarios.

Desde una perspectiva sanitaria los aditivos alimentarios plantean un problema derivado de su potencial acción tóxica y será por lo tanto necesario realizar una serie de ensayos toxicológicos para demostrar su inocuidad, como son ensayos de toxicidad aguda, de dosis repetidas a corto y largo plazo, así como una serie de ensayos especiales como estudios de la función reproductora, carcinogénesis, mutagénesis, etc.

Ensayos de toxicidad aguda

Estos estudios identifican los compuestos extremadamente tóxicos y proporcionan información sobre la DL_{50} o CL_{50} , naturaleza de los efectos tóxicos y relación dosis-respuesta, riesgos por exposición a dosis elevadas del tóxico (accidente, intento de suicidio, etc.) y las diferencias entre especie y sexo. Cuando se ensayan varias especies o ambos sexos se obtiene información que puede ser útil para predecir si la toxicidad es mediada por la actividad hormonal o para establecer si una especie debe ser investigada más exhaustivamente. Además, permiten ofrecer recomendaciones sobre cómo llevar a cabo los estudios toxicológicos de más larga duración.

Se usan grupos homogéneos de animales (ratón, rata, conejo) que reciben dosis crecientes del tóxico. La vía de administración es, fundamentalmente, oral. Los animales se observan durante 14 días. A los animales que mueren durante el estudio o son sacrificados al final se les hace la necropsia. Durante el ensayo se anotan los síntomas de intoxicación, mortalidad, lesiones de los órganos y toda la información se clasifica por dosis y sexo. Por una fórmula matemática se calcula la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales.

Aunque estos ensayos aportan información valiosa, tienen varias limitaciones. Así, por ejemplo, no indican los posibles efectos que aparecerían después de una administración reiterada del tóxico. Por otra parte, la DL_{50} es una variable aleatoria que puede calcularse por métodos estadísticos, sin necesidad de utilizar un número excesivo de animales.

De los ensayos de toxicidad aguda se obtienen los índices de toxicidad aguda, el más empleado es la DE_{50} (dosis efectiva 50) que expresa la cantidad de sustancia, en mg/Kg, que en determinadas condiciones experimentales (muy precisas) produce efectos en el 50% de una especie animal determinada. Cuando el efecto buscado es la muerte se habla de DL_{50} (dosis letal media). Otros índices de toxicidad aguda son la CE_{50} , CL_{50} , o CI_{50} (concentración inhibitoria).

La DE_{50} y DL_{50} se calculan mediante métodos gráficos o matemáticos (estadísticos), a partir de las curvas dosis-respuesta. De forma similar pueden obtenerse los valores de DE_{1} , DE_{99} , DE_{90} , etc. Hay que destacar el hecho de que los valores de toxicidad se refieren exclusivamente a la vía de entrada (oral, dérmica o respiratoria) y a la especie para la que se han determinado.

Aunque en los últimos tiempos se ha puesto en entredicho la validez y utilidad de la DL_{50} , este parámetro ha sido clásicamente utilizado como criterio de toxicidad a efectos comparativos entre distintos tóxicos. De hecho, la DL_{50} es un criterio utilizado por la UE para la clasificación y etiquetado de productos químicos como muy tóxicos, tóxicos o peligrosos.

Ensayos de toxicidad de dosis repetidas de corta duración o subcrónicos

Proporcionan información sobre: efectos tóxicos principales y relaciones dosis-respuesta, órganos diana implicados, reversibilidad o irreversibilidad de los efectos precisando si son acumulativos o retardados, las dosis para los estudios de más largo plazo, que es uno de los principales objetivos de estos ensayos.

En general consisten en la administración regular o frecuente de varias dosis o concentraciones de la sustancia estudiada. Usualmente se incluyen tres niveles de dosis: una dosis alta que produzca toxicidad, una dosis baja que no produzca toxicidad y una dosis intermedia que permita calcular la relación dosis-respuesta. Las especies animales utilizadas son ratas, ratones (roedores) y perro, mono (no roedores). La duración del estudio es de 14 días a 3 meses. Durante el estudio los animales se someten a observación clínica (estado general, comportamiento, etc.) y se hace una evaluación del crecimiento ponderal, consumo de agua y alimentos. Se toman muestras periódicamente para realizar exámenes hematológicos y bioquímicos en sangre, orina y heces. A los animales que mueren o son sacrificados al final se les realiza la necropsia.

Por análisis de los resultados obtenidos se deberían establecer los valores de nivel más bajo estudiado con efecto observable y los niveles sin efectos observable.

Ensayos de toxicidad de dosis repetidas de larga duración o de toxicidad crónica

Estos estudios tratan de detectar los efectos tóxicos que requieren un largo tiempo de latencia o que son acumulativos. Por ello son los únicos experimentos que permiten evidenciar determinadas afecciones cardíacas o renales en los animales estudiados, de aparición a menudo ligada a la edad. Proporcionan información sobre el tipo y naturaleza de los efectos tóxicos (funciones dañadas, órganos diana), dosis sin efecto tóxico (dosis umbral), dosis con efectos tóxicos, tiempo de aparición de los efectos tóxicos (en función de la dosis o de la concentración), reversibilidad eventual de los efectos observados.

En estos ensayos se administra el tóxico de manera reiterada a grupos de mamíferos (roedores o no roedores) en dosis variables. En general se utilizan 3 grupos tratados y 1 control (20-35/grupo/sexo, en roedores y 4-10/grupo/sexo, en no roedores). Las dosis se eligen en función de los resultados obtenidos en los experimentos de corta duración y generalmente se utiliza la vía oral.

El conjunto de los resultados se somete a un exhaustivo estudio estadístico y se debería determinar el parámetro denominado NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) o “dosis sin efecto” que podríamos definir como la dosis máxima diaria (expresada en mg/Kg/día) que no produce efectos observables en el animal considerado LOEL y LOAEL (Lowest Observed Effect Level y Lowest Observed Adverse Effect Level) que se expresa también en mg/kg/día y es la dosis más baja capaz de producir efectos adversos.

El parámetro que se debe utilizar para fijar la dosis diaria admisible (DDA) o ingesta diaria admisible (IDA), de los límites de tolerancia de las sustancias en los alimentos y en el agua de bebida, o los valores límite de exposición es el NOAEL.

De igual manera que en los índices de toxicidad aguda los valores obtenidos dependen de la especie y las condiciones experimentales utilizadas en el estudio así como de la vía de entrada del tóxico. Evidentemente para cada “efecto” considerado tendremos unos valores de NOAEL, LOAEL, etc. Normalmente se considera una exposición crónica de 3 meses a 2 años.

El NOAEL es sin duda alguna el parámetro toxicológico más importante ya que sobre él se apoya el cálculo de los límites tolerables de exposición y las concentraciones máximas permisibles. Es por ello que conviene hacer algunas consideraciones sobre el concepto y el cálculo del mismo.

Es importante hacer una observación sobre el cálculo del NOAEL. El NOAEL debe ser, por definición, una de las dosis experimentales probadas. Es decir, que a diferencia de la DL_{50} , aquí no se debe hacer una extrapolación a partir de una serie de datos. El NOAEL/LOAEL debe ser una de las dosis usadas en el estudio. En la práctica se determina utilizando una serie de concentraciones decrecientes y se elige aquella que “no produce efectos adversos observables”. A veces por mucho que se disminuya la dosis siempre obtenemos un efecto adverso siendo imposible establecer un NOAEL. En esos casos la dosis más baja que produce un efecto adverso se toma como LOAEL. Por lo tanto, el valor del NOAEL o LOAEL es un valor observado que depende del protocolo y del diseño de la investigación. Entre los factores “estudio-dependientes” que pueden influir en la magnitud del valor observado podemos citar la especie, el sexo, la edad, el tamaño del grupo, la sensibilidad de los métodos utilizados para medir la respuesta y la selección de los niveles de dosis, ya que con frecuencia están muy espaciadas, de manera que el valor observado del NOAEL puede ser, en algunos casos, considerablemente menor que el verdadero “nivel de efecto no adverso”.

Límites tolerables de exposición

El límite tolerable de exposición, representa la dosis (expresada en mg/Kg/día) de un producto que puede ingresar en el organismo diariamente, durante toda la vida, sin que resulte perjudicial para la salud. Después de considerar todos los estudios toxicológicos disponibles sobre una sustancia, se elige el NOAEL característico más bajo. Se da la primera prioridad a los estudios realizados en seres humanos; los efectuados con animales generalmente sirven para complementarlos. Sin embargo, la mayoría de los análisis se basa en estudios de mamíferos no humanos. También se da por sentado que cualquier efecto tóxico por lo general es independiente de la ruta de exposición.

Cuando es posible, se consideran estudios toxicocinéticos relativos a la sustancia, lo que podría ser significativo en la selección de los conjuntos de datos claves usados para estimar el NOAEL. Por ejemplo, la selección de un NOAEL apropiado para animales se puede basar en las semejanzas entre la toxicocinética humana y animal. Cuando no es posible decidir cuál de las especies tiene características más pertinentes para el ser humano, se eligen los resultados de las más sensibles a la sustancia.

Luego, se usa el NOAEL para determinar la dosis de referencia (RfD) mediante el uso de factores de incertidumbre (FI) que reflejan la confianza general en los diversos conjuntos de datos. En algunos casos, se usan factores de modificación (FM), basados en el criterio científico. En toxicología alimentaria el criterio básico de límite tolerable de exposición se denomina es la dosis diaria admisible (DDA) o ADI (Acceptable Daily Intake): La DDA es utilizada por la OMS para los pesticidas y aditivos. Se define como “la dosis de un producto que puede ser ingerido diariamente por un individuo durante toda su vida sin riesgo apreciable para su salud”. Se expresa en mg/Kg/día.

La DDA se fija a partir de ensayos experimentales con animales sobre la toxicidad aguda y crónica (investigando eventuales efectos mutágenos, teratógenos y cancerígenos). Se considera el efecto más sensible en la especie animal más sensible. Se determina la cantidad máxima que dicha especie animal puede ingerir diariamente, durante el tiempo de la experiencia, sin efecto nocivo, NOAEL crónico) Para extrapolar al hombre (que se considera la especie más sensible y vulnerable) se divide la dosis establecida para el animal por 10 y, para incluir las variaciones individuales y los casos especiales (embarazadas, niños, ancianos, etc.) se divide de nuevo por 10. En definitiva y, de forma general, la DDA es la centésima parte del NOAEL (expresada en mg/Kg de peso y día). Se usa por lo tanto un factor de seguridad o incertidumbre para englobar diferencias inter e intraespecíficas.

En caso de no existir datos concluyentes sobre los estudios de toxicidad se pueden usar factores más altos. Así, por ejemplo, el LOAEL se usa cuando no existe un valor de NOAEL aunque en tal caso se usa un factor de seguridad adicional al hacer los cálculos ($\div 10$). Hay que tener en cuenta que la DDA asume un consumo durante toda la vida, por lo que para el cálculo hay que usar el NOAEL "crónico". Si, por ejemplo, el NOAEL se ha obtenido en un estudio subcrónico (90 días) hay que aplicar otro factor adicional de 10 ($\div 10$).

La EPA ha introducido un quinto factor de incertidumbre UFD cuando se trata con bases de datos incompletas, como no disponer de datos de dos estudios de dosis repetidas en mamíferos, uno multigeneracional, y dos de toxicidad del desarrollo. Si los cinco estudios están hechos hay bastante confianza de que al menos en uno se haya obtenido el NOAEL más bajo posible.

La aplicación matemáticamente queda: $DDA = LOAEL \text{ o } NOAEL / UF_s$

El uso de todos podría llegar a 100.000 y esto es poco realista y se tienen en cuenta factores de modificación, por ejemplo si un estudio se ha realizado con muchos animales, esto disminuye la incertidumbre.

Concentraciones máximas permisibles

La concentración máxima permisible (CMP) es la concentración máxima de un tóxico (expresada en mg/Kg o mg/L) que se permite en un medio determinado (alimento, agua). A partir de los valores de la DDA (o cualquiera de los otros parámetros equivalentes) se pueden establecer las Concentraciones Máximas Permisibles (CMP) en un alimento o bebida, que se expresan como mg/Kg de producto fresco o por litro de producto líquido. Estos valores se calculan a partir de la DDA teniendo en cuenta el peso medio de una persona, la cantidad media ingerida por día y la contribución de ese producto al total de la dieta.

Para el cálculo de las concentraciones máximas permisibles es necesario conocer el consumo diario del alimento en cuestión o de la bebida considerada. Estos datos se pueden obtener de las encuestas de consumo que se realizan en los diferentes países. Los límites tolerables de exposición y las concentraciones máximas permisibles son los valores de referencia que constituyen la herramienta básica para la evaluación del riesgo.

Conclusiones

Los valores de ingestas diarias admisibles (IDAs) se han usado durante más de 40 años, establecidas por comités científicos y han demostrado ser útiles para prevenir de efectos tóxicos, con las únicas excepciones de los niños menores de doce años o personas alérgicas.

Las evaluaciones de la ingesta proporcionan una sobreestimación de la ingesta real lo que combinado con las IDAs, establecidas con los márgenes de seguridad, aseguran una buena protección de los consumidores.

El establecimiento de las IDAs con el refinamiento de las tecnologías continuará proporcionando parámetros a utilizar en el siglo XXI.

BIBLIOGRAFÍA

- Beck, B.D., Calabrese, E.J., Slayton, T.M., Rudel, R. (2008). En: Principles and Methods of Toxicology, Fifth Ed (Ed) Hayes AW. CRC Press, New York.
- Benford, D. (2000). International Life Sciences Institute (ILSI series), Bruselas.
- FAO/WHO. (2006). Report issued (Internet) on 13 January
- Fernández-Pachón, M. S., García, M.D., Morales, M.L., Troncoso, A.M. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Repetto, M., Madrid, 453-452.
- Lipscomb, J.C., Ohanian, E.V. (2007). Informa Healthcare, New York.
- Pla, A., Hernández, A., Gil, F. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Repetto, M., Díaz de Santos, Madrid, 77-94.
- PNUMA/IPCS. (1999). Evaluación de riesgos humanos.
- Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Repetto, M., Díaz de Santos, Madrid, 95-121.
- Ruiz, M.J., Font, G. (2007). En: Micotoxinas en Alimentos. (Ed) Soriano del Castillo, J. M., Díaz de Santos, 15-27.
- Vilanova E. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Repetto, M., Díaz de Santos, Madrid, 123-140.

ACCIÓN PROTECTORA DE ANTIOXIDANTES FRENTE A LA TOXICIDAD DE DIOXINAS Y PCBs

César Ordóñez Pascia

Dpto. Ciencias Biomédicas. Facultad de Veterinaria. Universidad de León

Con el nombre DLCs se agrupan compuestos de tipo dioxinas, furanos y PCBs caracterizados todos ellos por ser de tipo organoclorado y organobromado y teniendo un alto número de congéneres cada unos de estos grupos.

La historia de los efectos contaminantes de estos compuestos se remonta a finales de los años 40, cuando trabajadores de las fábricas de herbicidas clorados de Monsanto empezaron a desarrollar eczemas en la piel, dolores en las piernas y articulaciones, debilidad, irritabilidad, nerviosismo y pérdida de la libido.

Con posterioridad el ejército de Estados Unidos utilizó cantidades masivas de herbicidas defoliantes (agente naranja) sobre las selvas de Vietnam. Los estudios epidemiológicos posteriores establecieron la causalidad entre los niveles de dioxinas que contaminaban las formulaciones y determinadas patologías (Dwyer y Flesch-Janys, 1995).

La emisión de dioxinas más conocida se produjo en Meda al norte de Seveso (Italia) en 1976. La planta industrial de ICMESA de la empresa Hoffman-La Roche liberó accidentalmente una nube tóxica que contenía 500 g de DLCs. El viento del sudeste produjo numerosas víctimas entre los animales domésticos y obligó a la evacuación de más de 700 personas. Los gases emitidos produjeron víctimas mortales, así como la aparición de casos de embriotoxicidad que se tradujeron en malformaciones congénitas (Pesatori y col., 2003).

Recientemente se han producido alertas alimentarias por contaminación de dioxinas en distintos países. En febrero de 1999 aparece en Bélgica un episodio relacionado de nuevo con la contaminación de alimentos destinados al consumo humano. En esta ocasión el origen se encontraba en la contaminación de piensos destinados al cebado de pollos que contenían residuos de PCBs y PCDD/Fs que excedían en más de 250 veces los niveles de tolerancia.

Las denuncias recientes de alimentos de procedencia animal (pollos, cerdos, salmones) contaminados con dioxinas, como consecuencia de la utilización de piensos que contienen grasas de origen industrial contaminadas con estas sustancias, han reavivado la polémica sobre la toxicidad y el riesgo de exposición a estos compuestos, así como el de la seguridad química de nuestros alimentos.

Estructura química y propiedades fisico-químicas

El núcleo central de las dioxinas es la dibenzo-*para*-dioxina. Los derivados clorados de este núcleo (congéneres) se denominan genéricamente dibenzodioxinas policloradas (PCDDs), y entre ellas la 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) es la molécula de referencia del grupo. Junto a las dioxinas propiamente dichas, existen otros grupos de sustancias químicamente relacionadas que están asociadas a las primeras desde un aspecto toxicológico. Los dibenzofuranos policlorados (PCDFs) y los bifenilos polihalogenados, tanto en sus versiones cloradas (PCBs) o bromadas (PBBs) presentan características estructurales y toxicológicas muy parecidas, por lo que serán considerados de forma semejante a lo largo de este capítulo.

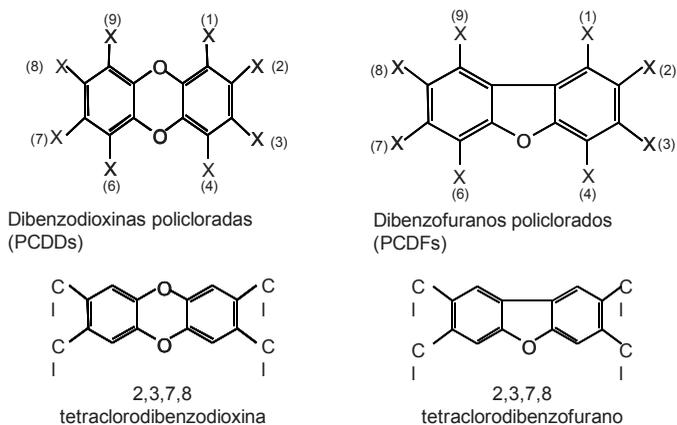


Figura 1. Estructura química general de los compuestos dioxínicos (DLCs), dioxinas policloradas (PCDDs) y furanos policlorados (PCDFs). Como ejemplo la figura presenta las estructuras de los derivados tetraclorados más representativos de cada serie

Entre sus características fisicoquímicas más relevantes destacan su elevada liposolubilidad y su gran estabilidad química y térmica.

Los PCBs con comportamiento tipo dioxina (Figura 2) contienen entre cuatro y seis átomos de cloro sustituidos en posiciones *para*- y *meta*- (PCBs no-*orto* o PCBs coplanares). Aunque estructural y toxicológicamente difieren de éstos, los congéneres mono-*orto* sustituidos suelen incluirse dentro de este grupo.

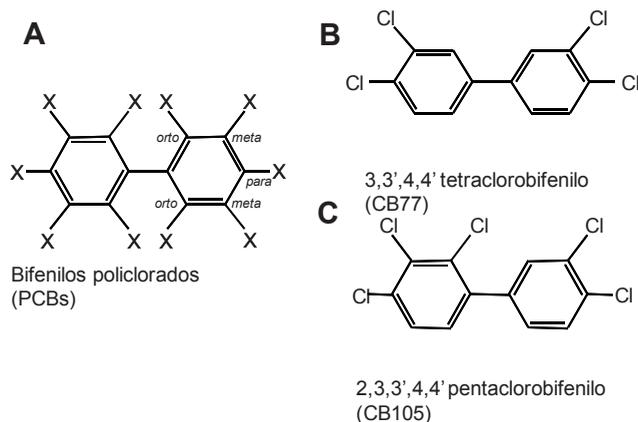


Figura 2. Estructura química general de los bifenilos policlorados (A), así como dos ejemplos de PCBs coplanares con estructura *no-orto* (B) y *mono-orto* sustituidas (C). X suele ser un átomo de cloro, aunque puede ser Br en el caso de los bifenilos polibromados (PBBs)

Los conceptos de I-TEF e I-TEQ

La cuantificación de PCDD/Fs precisa de un tratamiento especial con el fin de tener en cuenta el grado y orden de cloración entre los diferentes congéneres. La finalidad es obtener el potencial toxicológico de estos compuestos cuando se encuentran en una mezcla. En muestras reales los DLCs no se encuentran por separado, sino como una mezcla de congéneres con diferente toxicidad. Con este fin se introdujo en 1988 el factor de equivalencia tóxica (I-TEF) que está basado en dos supuestos: (1) todos los compuestos clorados en posición 2, 3, 7, 8 tienen el mismo mecanismo de acción (en términos cualitativos) aunque su potencial tóxico puede variar de uno a otro, y (2) la respuesta tóxica de una mezcla de estas sustancias es el resultado de la suma del comportamiento de cada una de ellas por separado. Basados en estos dos principios se puede asignar un valor de I-TEF a cada compuesto independientemente. Ya que el compuesto más tóxico es el 2, 3, 7, 8-TCDD, se le asignó el valor arbitrario de 1, siendo el resto fracciones del mismo (Tabla 1).

Junto con el concepto de I-TEF se introdujo el término de cantidad de equivalencia tóxica (I-TEQ) que resulta de multiplicar la concentración de cada uno de los congéneres por su correspondiente I-TEF y sumarlos todos en una mezcla. De esta manera, la toxicidad real de una mezcla de PCDD/Fs se expresa como la suma de los I-TEQs de sus 17 congéneres, obteniendo un valor indicativo. Recientemente la OMS ha propuesto un nuevo concepto de I-TEQ que incluye los factores de equivalencia para PCBs coplanares (Van den Berg y col., 1998).

PCDFs	I-TEF	PCDDs	I-TEF
2,3,7,8-TCDF	0,1	2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	1,2,3,7,8-PeCDD	0,5
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5		
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		0,01
1,2,3,4,,6,7,8-HpCDF	0,01	1,2,3,4,,6,7,8-HpCDD	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,01	OCDD	0,001
Los prefijos T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta y O = octa indican el grado de cloración de los congéneres.			

Tabla 1.- Factores de equivalencia tóxica (I-TEF) de los 17 congéneres PCDDs y PCDFs

Fuentes de formación y exposición a DLCs

Salvo los PCBs, los PCDD/Fs son subproductos no intencionados de la combustión incompleta de la materia orgánica, ya sea de fuentes naturales (incendios forestales) o antropogénicas (incineración de basuras) (Tuppurainen y col., 2003).

Los procesos industriales (fabricación de papel o de productos químicos) y biológicos también contribuyen en menor cuantía a su liberación al medioambiente. Sin embargo, debido a la resistencia de los PCBs a elevadas temperaturas se les utilizó masivamente desde los años 30 en la fabricación de transformadores, capacitadores y fluidos hidráulicos, hasta su prohibición en 1977. A pesar de su prohibición, la exposición a PCBs todavía existe, debido a su elevada persistencia en el aire, suelos y sedimentos acuosos. Además todavía forman parte de viejos dispositivos eléctricos, luces fluorescentes, y electrodomésticos antiguos que aún siguen en uso.

La fuente más importante de liberación de DLCs al medioambiente es la incineración de residuos sólidos (basura municipal sólida, medicamentos y desperdicios médicos, residuos peligrosos, etc.), la quema de combustibles fósiles (carbón, y derivados del petróleo), así como los incendios accidentales incontrolados (incendios forestales, erupciones volcánicas, etc.).

La elevada persistencia ambiental de las dioxinas puede incrementarse al permanecer ligadas a sustratos orgánicos o inorgánicos que sirven como reservorios. Los DLCs son compuestos estables y muy resistentes a la mayoría de los procesos de degradación ambiental. Los procesos de transformación de los DLCs comprenden la fotoxidación atmosférica mediada por radicales libres, la fotólisis en el aire, suelo y agua y la biodegradación por los microorganismos del suelo.

Toxicocinética

La absorción se produce a lo largo del tracto gastrointestinal. La velocidad de absorción depende del grado de cloración de los mismos. De esta manera los derivados hepta- y octo-sustituidos son absorbidos más lentamente que los que tienen un menor grado de cloración. Debido a su alta liposolubilidad se produce una rápida redistribución orgánica, unidos a proteínas plasmáticas, concentrándose finalmente en tejidos grasos: tejido adiposo > SNC > hígado > grasa subcutánea. Una vez acumulados en los depósitos grasos su biodisponibilidad orgánica suele ser muy baja.

Todos estos compuestos son muy estables y sufren una metabolización continua pero muy lenta. El aclaramiento de estos compuestos depende del congénere, de modo que el grado de cloración favorece su acumulación en el organismo. La eliminación puede ser urinaria o biliar, de manera que puede aumentar su biodisponibilidad orgánica al sufrir sucesivos ciclos enterohepáticos.

Mecanismo de acción

La semejanza de los efectos tóxicos causados por los PCDD/Fs y PCBs coplanares sustentan la hipótesis de que estas sustancias tienen un mecanismo de acción común. La unión y activación del receptor citosólico AhR (receptor hidrocarburo de arilo o receptor de dioxina) por estos compuestos, y la inducción de genes nucleares específicos de respuesta a dioxinas, es la hipótesis actual de trabajo (Figura 3). El receptor AhR es un factor de transcripción que actúa una vez que se ha unido un ligando a su centro activo funcionando como un sensor biológico de señales externas e internas (Bock, 1994).

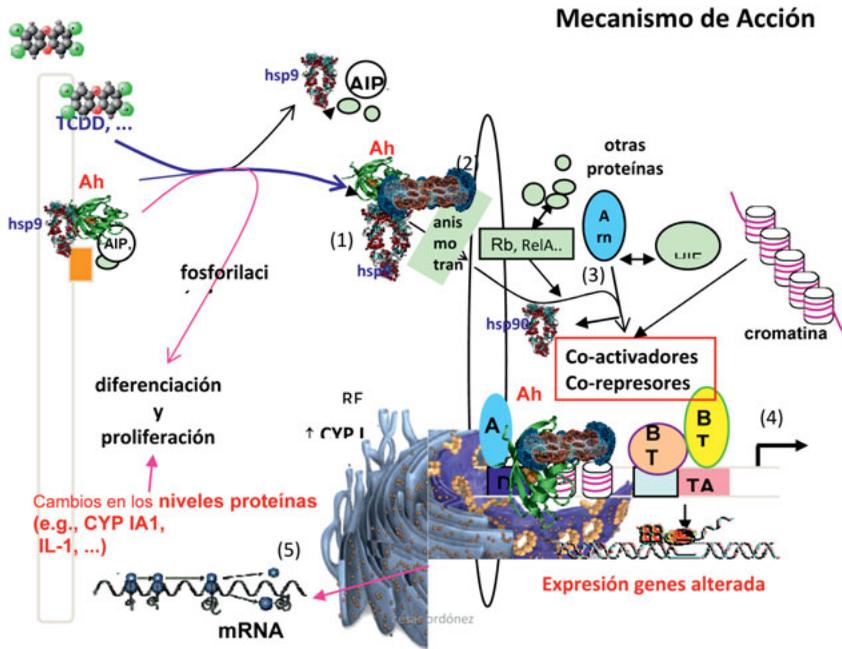


Figura 3. La mayoría de los efectos del TCDD son mediados por su unión al receptor citosólico AhR (1). La formación del complejo de estabilización con las proteínas HSP90 y XAP2 (2) permite su traslocación nuclear (3) donde formará un heterodímero con la proteína ARNT (4) cuya unión a los elementos de respuesta a dioxinas (ERDs) genómicos (5) aumenta la transcripción de los genes presentes corriente abajo

Los DLCs y otras sustancias semejantes se unen reversiblemente al receptor AhR que tiene que ser previamente estabilizado en el citoplasma por una proteína de 90 kDa (HSP 90) y por la chaperona XAP2. Este complejo estabilizado se desplaza hacia el núcleo celular con la ayuda de una importina donde el AhR queda libre uniéndose a un translocador nuclear (ARNT). El heterodímero AhR/ARNT identifica ciertas regiones del ADN cromosómico denominadas Elementos de Respuesta a Dioxinas (ERDs), e induce la transcripción de los genes situados corriente abajo, entre ellos diferentes isoenzimas CYP1A1 con actividades hidrocarburo aromático hidroxilasa (AHH) y etoxiresorufina O-desetilasa (EROD) (Figura 4).

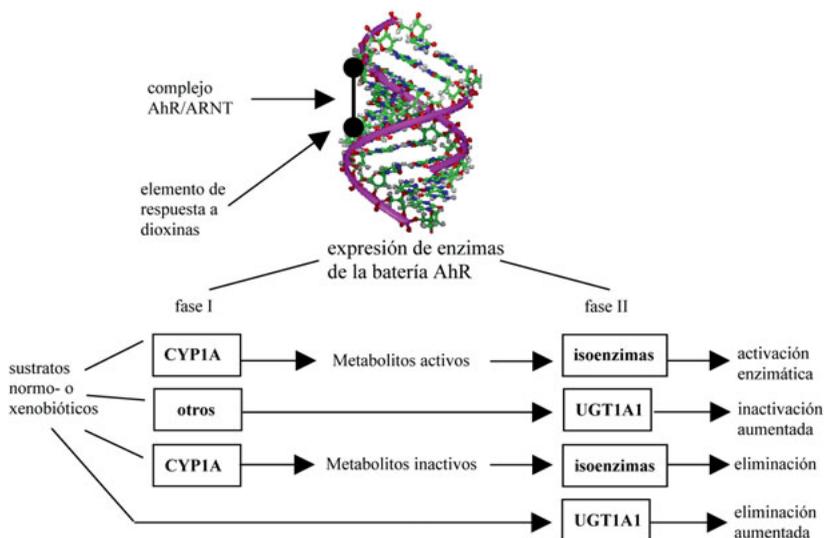


Figura 4. Posibles consecuencias de la expresión de los genes ligados a los elementos de respuesta a dioxinas (ERDs), relacionados con el metabolismo de xenobióticos

El receptor AhR está presente en los tejidos de multitud de especies animales con un elevado grado de conservación filogenética (Hahn, 2002) y es estructuralmente semejante a los receptores citosólicos para esteroides. Sin embargo, ninguna hormona tiene capacidad de unirse a este receptor, ni recíprocamente, los derivados clorados tienen afinidad por los receptores esteroideos. La unión de los PCDDs al receptor AhR no garantiza una respuesta biológica. De este modo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, flavonas sustituidas y cumarinas pueden unirse al receptor AhR, pero no producen sus efectos tóxicos y son rápidamente metabolizados.

Toxicidad

Mientras que los PCDD/Fs se encuentran entre los compuestos de origen antropogénico más tóxicos a dosis única, no ocurre así con los PCBs .

1. EFECTOS DÉRMICOS Cloracné Hiperqueratosis Hiperpigmentación Elastosis	4. EFECTOS SISTÉMICOS Fibrosis hepática suave Incremento de las transaminasas séricas Hipercolestereolemia Hipertrigliceridemia Apetito reducido y pérdida de peso Problemas digestivos Dolor en músculos y articulaciones Glándulas linfáticas hinchadas Problemas cardíacos Problemas del tracto urinario Dificultades respiratorias Problemas pancreáticos
2. EFECTOS NEUROLÓGICOS Alteraciones sexuales Dolores de cabeza Neuropatías Alteraciones visuales Disminución de los sentidos del oído y del olfato	
3. EFECTOS PSICOLÓGICOS Alteraciones del sueño Depresión Energías reducidas Arranques de mal humor	

Tabla 2. Signos y síntomas de la exposición a elevadas concentraciones de TCDDs en humanos

En animales de experimentación, la muerte se produce después de una progresiva pérdida de peso acompañada por una reducción drástica del consumo de alimento. Los efectos somáticos son muy semejantes en todas las especies estudiadas, independientemente de su susceptibilidad e incluyen neuropatía periférica, fatiga, depresión, cambios de la personalidad, adelgazamiento, hepatitis, hepatolia, porfiria cutánea tarda y erupciones cutáneas acneiformes (Mukerjee, 1998). Los efectos agudos de la intoxicación son una consecuencia de la interacción de las dioxinas con el receptor AhR. Ratones transgénicos en los que se ha anulado el gen codificante del receptor AhR (ratones AhR⁻) son 10 veces menos susceptibles a la administración de TCDD ($DL_{50} = 2000 \pm g/kg$ de peso corporal), no presentando ninguno de los síntomas de intoxicación descritos con anterioridad (González y Fernández-Salguero, 1998).

Sin embargo, son los efectos a largo plazo, los que resultan más peligrosos y difíciles de controlar (Hays y Aylward, 2003). Entre los efectos más relevantes se incluyen: cloracné, inmunotoxicidad, hepatotoxicidad carcinogenicidad y efectos embriotóxicos y de la reproducción e inducción de estrés oxidativo.

Dioxinas, PCBs y furanos estrés oxidativo y antioxidantes

El estrés oxidativo puede definirse como una alteración en el sistema antioxidante, el cual no es capaz de contrarrestar adecuadamente los radicales libres y especies

reactivas de oxígeno (ROS) y detener las reacciones en cadena de peroxidación lipídica

Entre los principales mecanismos de toxicidad de las dioxinas y sus bioisómeros está el estrés oxidativo que puede ser la causa del daño tisular producido por la exposición a estos compuestos. Distintos estudios han demostrado que tras la administración de dosis agudas de TCDD a animales de experimentación se inducen ROS, probablemente a través de la interacción con el receptor AhR (Bagchi and Stohs, 1993; Alsharif y col., 1994b), peroxidación lipídica (Stohs y col., 1983, 1990; Mohammadpour y col., 1988) y daño en el ADN (Wahba y col., 1988; Stohs y col., 1990) y decrece la fluidez de la membrana y el glutatión hepático además de en otros tejidos (Stohs y col., 1990). Estudios posteriores han demostrado incrementos significativos en la producción de anión superóxido en hígado aumentando también la peroxidación lipídica, además de supresiones significativas en los niveles de glutatión y de alfa-tocoferol (Slezak y col. 1999) tras la exposición a estos compuestos.

Efecto protector de los antioxidantes frente dioxinas

Para evitar la acción de los radicales libres, las células de los mamíferos poseen sistemas de defensa antioxidante tanto de naturaleza enzimática como no enzimática.

Si consideramos el daño oxidativo como una posible consecuencia de la exposición a las DLCs, la incorporación en la dieta de agentes antioxidantes deberían ejercer un efecto protector, existen estudios que demuestran el efecto beneficioso de los antioxidantes frente a la toxicidad de las dioxinas.

En ensayos realizados con animales de experimentación se pudo observar como aquellos animales pretratados con Butil Hidroxi Anisol (BHA), conocido antioxidante de origen sintético, resistían dosis letales de TCDD, debiéndose este efecto protector no sólo a su efecto antioxidante (Stohs y col., 1984; Hassan y col., 1987).

Otros antioxidantes como la vitamina A y E sin embargo ejercen una protección limitada contra la toxicidad de estos xenobióticos (Alsharif y Hassoun. 2004).

Conclusiones, evolución y riesgos futuros

Disminuir la exposición a residuos de DLCs en la dieta como resultado de la restricción de las fuentes de liberación medioambiental es el objetivo prioritario de las administraciones europeas. La drástica reducción en los últimos 30 años es una consecuencia del descenso sustancial en la exposición a dichos compuestos (se estima que entre un 90 – 95% desde finales de los años 60 y comienzos de los 70). Ya que las cargas corporales han disminuido de significativamente en este periodo, las previsiones para los próximos años no tendrán el impacto de las décadas ante-

rios. Estimaciones hechas hasta el año 2030 sugieren que incluso una reducción de 10 veces en los valores actuales de exposición (una disminución poco posible basándose con el conocimiento actual de las fuentes de contaminación por DLCs en alimentos) afectaría sólo marginalmente a los niveles séricos de estos compuestos.

Un estudio comparativo de la evolución de la carga ambiental y corporal de DLCs en los últimos 70 años ha demostrado que ambos parámetros han disminuido drásticamente en los últimos 30 años y que tal caída continuará en un futuro próximo sin ninguna necesidad adicional de medidas reguladoras (Aylward y Hays, 2002). Desde los años 70, las emisiones de dioxinas desde fuentes cuantificables –vertederos, incineradores y combustión de gasolinas con plomo- han disminuido drásticamente y así seguirá en el futuro próximo. Los datos toxicocinéticos para el TCDD indican que la ingestión de esta dioxina ha disminuido en más de un 95% desde los niveles anteriores a 1972 y que la ingesta para todos los demás congéneres ha disminuido al menos en 10 veces en este mismo periodo. Reflejo de la disminución en la exposición e ingesta de TCDD las cargas corporales de TCDD disminuyeron en un 90% entre 1970 y 2000, y si los niveles de exposición continúan disminuyendo a la misma velocidad que en el 2000, las cargas corporales caerán en un 50 % de las actuales en 2010. Para el resto de los congéneres la carga corporal disminuirá algo más lentamente debido a que las vidas medias de algunos de ellos son superiores a las del TCDD.

Sólo mediante el cumplimiento estricto de las medidas reguladoras establecidas por las administraciones, y el control periódico de las fuentes potenciales de liberación al medioambiente y de las rutas de entrada en la dieta humana, se podrá garantizar la seguridad de los alimentos, amenazada por estos contaminantes insidiosos por su persistencia y su toxicidad.

BIBLIOGRAFIA

- Alsharif, N.Z., Schlueter, W.J., Stohs S.J. (1994). *Arch. Environ. Contam Toxicol*, 26, 392-397.
- Alsharif, N.Z., Hassoun, E.A. (2004). *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol*, 95, 131-138
- Bock, K.W. (1994). *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 125, 1-42.
- Dwyer, J.H. Flesch-Janys, D. (1995). *Am J Public. Health*, 85, 476-478
- González, F.J., Fernández-Salguero, P. (1998). *Drug. Metab. Dis*, 26, 1194-1198.
- Hahn, M.E. (2002). *Chem. Biol. Interact*, 141, 131-160.
- Hays, S.M., Aylward, L.L. (2003). *Regul. Toxicol. Pharmacol*, 37, 202-217.
- Hassan, M.Q. Mohammadpour, H. Hermansky, S.J. y col. (1987). *Gen. Pharmacol*, 18, 547-550
- Mohammadpour, H., Murray, W.S., Stohs, S.J. (1988). *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 17, 645-650.
- Mukerjee, D. (1998). *J. Air Waste Manag. Assoc*, 48, 157-165.
- Pesatori, A.C., Consonni, D., Bachetti, S. y col. (2003) *Ind. Health*, 41, 127-138.
- Taylor, P.H., Lenoir, D. (2001). *Sci. Total. Environ*, 269, 1-24.

Stohs, S.J., Hassan, M.Q., Murray, W.J. (1984). *Xenobiotica*, 14, 533-537.

Stohs, J.S. (1990). *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 79-90

Tuppurainen, K., Asikainen, A., Ruokojarvi P., y col. (2003). *Acc. Chem. Res.* 36, 652-658.

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld AT, y col (1998). *Environ Health Perspect*, 106, 775-792.

Wahba, Z.Z., Lawson, T.A., Stohs, S.J. (1988). *Cancer Lett*, 39, 381-386.

MICOTOXINAS, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

Teresa Cabaleiro

Laboratorio de Toxicología. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo

Micotoxinas: aspectos generales

Las micotoxinas [del griego *mykes* (hongos) y *toksicon* (veneno)] son metabolitos secundarios sintetizados por hongos al final de la fase de crecimiento sobre diversos alimentos, fundamentalmente cereales y frutas, bajo determinadas condiciones. Los principales géneros productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria* (Bennett y Keller, 1997). Entre las micotoxinas más comunes, distribuidas por todo el mundo, se encuentran las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona y fumonisinas. Constituyen un riesgo importante en seguridad alimentaria, ya que su presencia en niveles superiores a los tolerables representa una amenaza para la inocuidad de los alimentos y además reducen el valor nutritivo de los mismos.

Las necesidades generales para el crecimiento fúngico incluyen: un sustrato fácilmente utilizable, carbohidratos (proporcionados por el almidón o la celulosa); humedad elevada en el alimento (10-18%) y en el ambiente (por lo menos del 70%); generalmente condiciones aerobias; adecuada temperatura (varía con el hongo, aunque suelen estar en un rango entre 12°C a 25°C); pH alcalino; etc.

La contaminación de alimentos por micotoxinas y el transporte de las mismas a través de la cadena alimenticia tienen que ser controlados con precaución, ya que a bajas concentraciones pueden inducir alergias, erupciones cutáneas, neurotoxicidad y otros trastornos. La ingesta de micotoxinas puede conllevar efectos agudos, crónicos a largo plazo, efectos teratogénicos, carcinogénicos (principalmente en hígado y riñón), estrogénicos o inmunosupresores en animales y en humanos, siendo normalmente los animales los que sufren más sus efectos tóxicos debido a la ingesta de alimentos de menor calidad. El consumo de piensos preparados con ingredientes como las semillas oleaginosas de cacahuete, algodón, coco o granos de maíz contaminados con micotoxinas no sólo provoca micotoxicosis en los animales, sino que crean también problemas de residuos de micotoxinas en productos animales destinados al consumo humano, tales como la leche, la carne y los huevos.

El estrés oxidativo acontece en las células como consecuencia de los procesos fisiológicos normales e interacciones con el medioambiente, y los sistemas de defensa antioxidante juegan un papel en la protección contra el daño oxidativo. El mecanismo de acción de las micotoxinas está mediado por la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS). Las micotoxinas desarrollan sus efectos biológicos a través de su unión a los fosfolípidos que conforman la membrana celular. Esta

unión activa las enzimas fosfolipasas que degradan los lípidos de membrana dando lugar a ácidos grasos poliinsaturados, que son un sustrato para la peroxidación lipídica y generación de ROS, lo que finalmente conduce a la aparición de efectos citotóxicos. Los antioxidantes inhiben las reacciones de radicales libres mediante la captación o *scavenging* de radicales y la formación de un radical antioxidante más estable.

Las micotoxinas alteran la membrana celular mediante peroxidación lipídica, y las sustancias antioxidantes poseen propiedades protectoras de frente a la toxicidad de estos xenobióticos. Es importante destacar el papel de la dieta, ya que aporta antioxidantes implicados en los procesos de detoxificación y reducen la toxicidad y el daño ocasionado por radicales libres producidos por micotoxinas. Además, las reacciones implicadas en la detoxificación están conducidas por enzimas que requieren cofactores, coenzimas y otras moléculas, proporcionadas a través de la dieta.

El estrés oxidativo como mecanismo de acción tóxica en la toxicodinamia de las micotoxinas

Ocratoxinas

Las ocratoxinas –toxina más estudiada y representativa en la ocratoxina (OTA)- son sintetizadas por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Kuiper-Goodman y Scott, 1989). La exposición en el hombre proviene de la ingesta de productos vegetales contaminados, tales como cereales, pan, cerveza, café, especias, frutas, zumo de uva, vino y derivados del cerdo. Dicha exposición está confirmada por la detección de OTA en plasma y orina en concentraciones nanomolares (Scott, 2005).

El órgano diana de las ocratoxinas es el riñón. La ocratoxina A es nefrotóxica, siendo un factor determinante en el desarrollo de la nefropatía endémica de los Balcanes. Asimismo, esta micotoxina es citotóxica, ya que inhibe la síntesis de proteínas por competición con el aminoácido fenilalanina e induce apoptosis. Está clasificada como carcinógeno del grupo 2B (“posible carcinógeno humano”) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1993), siendo el daño oxidativo al DNA su mecanismo de carcinogenicidad. El estrés oxidativo puede ser debido a un descenso del sistema de defensa antioxidante o bien por un aumento en la producción de ROS, y se ha evidenciado que la OTA aumenta los niveles de ROS, malondialdehído (MDA) y la expresión de la enzima hemooxigenasa 1 (HO-1) (Baudrimont y col., 1997; Rahimtula y col., 1988), y por otro lado desciende los niveles de glutatión reducido (GSH) y tocoferol (Schaaf y col., 2002; Gautier y col., 2001). La generación de ROS está mediada por la formación de un complejo OTA-Fe³⁺ (Omar y Rahimtula, 1993). La OTA facilita la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ por la NADPH-citocromo p450 reductasa (Omar y col., 1991), y el Fe²⁺ en presencia de O₂ proporciona las especies activas que inician la peroxidación

lipídica. Además, la inhibición del mecanismo de defensa antioxidante celular contribuye a la carcinogenicidad de la OTA en riñón (Figura 1). La OTA disminuye la expresión de genes regulados por el factor de transcripción Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), que está implicado en la defensa antioxidante y la detoxificación, lo cual reduce la capacidad de respuesta al estrés oxidativo, y en consecuencia las células de riñón son más vulnerables a la toxicidad inducida por OTA, favoreciendo el desarrollo de tumor (Marin-Kuan y col., 2006).

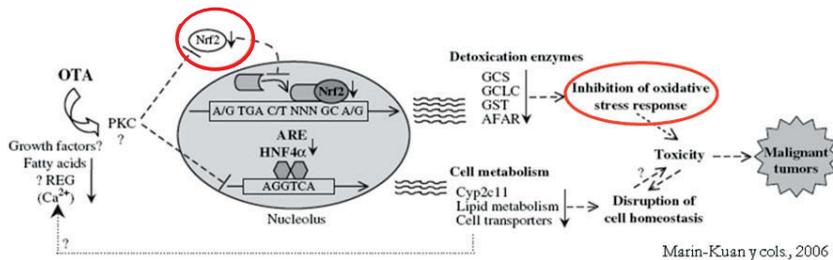


Figura 1. Figura del mecanismo de carcinogenicidad de la ocratoxina A (adaptado de Marin y col., 2006)

b. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son micotoxinas sintetizadas por las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. El representante más tóxico es la aflatoxina B1 (AFB1). Las aflatoxinas pueden contaminar alimentos como cereales, semillas oleaginosas, especias, frutos secos, leche, etc. El órgano diana es el hígado, siendo hepatocarcinogénica (Shen y col., 1996). La correlación positiva entre el consumo de alimentos contaminados con AFB1 y el incremento de la incidencia del cáncer de hígado en algunas poblaciones de Asia y África ha llevado a la clasificación de la AFB1 como carcinógeno del grupo 1 (“carcinógeno para el ser humano”) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002).

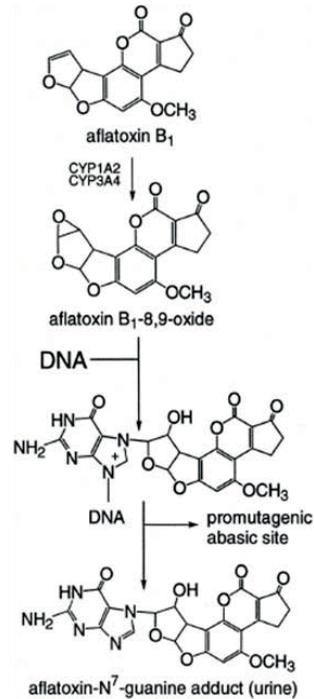
Su principal mecanismo de acción implica la formación de aductos entre el ADN y el metabolito carcinógeno de la AFB1, el AFB1-8,9-epóxido (McGlynn y col., 2003) (Fig. 2). La AFB1 se metaboliza por oxigenasas del sistema citocromo p-450 hepático al intermediario AFB1-8,9-epóxido, el cual ataca residuos de guanina en el ADN de doble cadena, causando roturas en la hebra de ADN y mutaciones puntuales del tipo transversión G: C a T: A, lo que conlleva la sustitución de serina en el residuo 249 de p53 (proteína implicada en el control del ciclo celular) en el carcinoma hepatocelular.

Fig. 2. Formación de aductos entre el AFB1-8,9-epóxido y el ADN (McGlynn y col., 2003)

Además, se ha evidenciado que la AFB1 induce la formación de 8-hidroxidiguanina (8-OHdG) (Shen y col., 1995), que está considerado marcador de daño oxidativo al ADN, indicando el papel importante de ROS en la citotoxicidad de este hepatocarcinógeno.

c. Zearalenona

La zearalenona es sintetizada por hongos del género *Fusarium* sp. Contamina principalmente maíz, otros cereales y derivados (cerveza). Su citotoxicidad se manifiesta por la inhibición de la proliferación celular y la síntesis de proteínas. Además, es genotóxica y carcinogénica en animales de experimentación, hepatotóxica e inmunotóxica. Asimismo, es estrogénica, activa el receptor de estrógenos, lo que está asociado con desórdenes reproductivos en animales. Además, altera el metabolismo de los fosfolípidos de membrana, y libera altas cantidades de ácidos grasos insaturados, lo que conduce a la formación de peróxidos lipídicos. Se ha evidenciado que esta micotoxina induce estrés oxidativo en riñón e hígado, ya que aumenta los niveles de MDA y disminuye los de glutatión reducido (GSH) (Hassen y col., 2007). Además, diferentes toxinas de *Fusarium* sp. son capaces de dañar el ADN (fragmentación y metilación del ADN) e inducir citotoxicidad (inhibición de la proliferación celular y la síntesis de proteínas) (Kouadio y col., 2007). Todo ello apunta al daño oxidativo como posible vía implicada en la toxicidad de la zearalenona. Por otro lado, la zearalenona induce la expresión de Hsp 70 (Galvano y col., 2002), lo que constituye un mecanismo de defensa celular importante, ya que el Hsp 70 posee efectos citoprotectores.



d. Fumonisinias

La fumonisin B1 (FB1) es el representante más tóxico dentro del grupo de las fumonisinas, siendo sintetizada por el hongo *F. verticillioides*, que contamina maíz y otros cereales. Además de una exposición dietética, también hay que tener en cuenta la exposición aérea en humanos a cepas productoras de FB1, debido a que *F. verticillioides* puede crecer en edificios con humedad. La FB1 induce estrés oxidativo y la pérdida de mecanismos protectores. Entre los efectos tóxicos más sobresalientes de estas micotoxinas se encuentran la neurotoxicidad, inmunotoxicidad y hepatotoxicidad. Concretamente, en la neurotoxicidad inducida por FB1 está implicado el estrés oxidativo y la

apoptosis (Stockmann-Juvala y col., 2004). Así, la FB1 aumenta peroxidación lipídica y la producción de ROS, disminuye los niveles de GSH y la actividad superóxido dismutasa (SOD), reduce la viabilidad celular e induce apoptosis. La fumonisina FB1 es inmunotóxica, ya que incrementa la permeabilidad de membrana en linfocitos, lo que las hace más susceptibles a la oxidación (Yin y col., 1998). Por otro lado existe una relación entre las fumonisinas y el aumento de la incidencia de cáncer de hígado en humanos (Sun y col., 2007).

e. Tricotecenos

Los tricotecenos son micotoxinas producidas por *Fusarium* sp., que se caracterizan por la presencia de un núcleo 12,13-epoxitricoteceno en su molécula. Se han detectado cuatro tricotecenos como contaminantes naturales en alimentos, principalmente trigo y derivados (harina, pan y cereales para el desayuno), maíz, avena, cebada, centeno y arroz: toxina T-2, nivalenol, desoxinivalenol y diacetoxiscirpenol, siendo los más importantes la toxina T-2 y el desoxinivalenol.

e.1. Desoxinivalenol.- El desoxinivalenol (DON) es el tricoteceno que se detecta con mayor frecuencia. Es producido por *F. graminearum* y *F. culmorum*, patógenos vegetales que causan el brote de golpe blanco del trigo. El DON es hepatotóxico y causa desórdenes gastrointestinales. Recibe su nombre común, vomitoxina, por los vómitos que normalmente acompañan la intoxicación por tricotecenos. Además, es un factor determinante de la Aleukia Tóxica Alimentaria (ATA), debida al consumo de trigo almacenado al aire libre infectado con *Fusarium*. Dicha enfermedad cursa con la aparición de puntos en la piel, angina necrótica, leucopenia y múltiples hemorragias. En relación a la generación de estrés oxidativo, el DON aumenta peroxidación lipídica (Kouadio y col., 2005) y disminuye los niveles de GSH y la actividad SOD y catalasa (Rizzo y col., 1994).

e.2. Toxina T-2.- La toxina T-2 es el tricoteceno más tóxico. Está sintetizado por *Fusarium* sp., y es un contaminante natural en cereales, semillas y vegetales. La toxina T-2 es hepatotóxica, y su mecanismo de hepatotoxicidad está basado en la inducción de peroxidación lipídica por generación de radicales libres, alterando la estructura de las membranas celulares (Rizzo y col., 1994). Además, la toxina T-2 puede unirse al grupo -SH del glutatión, reduciendo sus niveles, y altera actividad enzimas antioxidantes (Suneja y col., 1989).

Antioxidantes y toxicidad de micotoxinas

Las propiedades protectoras de los antioxidantes son probablemente debidas a su capacidad de captar radicales libres actuando como *scavengers*, de reducir la generación de ROS y disminuir la peroxidación lipídica, protegiendo así las membranas celulares del daño inducido por micotoxinas. Se ha demostrado la capacidad que presentan

algunas sustancias naturales con propiedades antioxidantes en la prevención de los efectos oxidativos inducidos por las micotoxinas (Zourgui y col., 2008; Costa y col., 2007a; Guerra y col., 2005).

a. Carotenoides

Los carotenoides (carotenos y xantofilas) son un grupo de antioxidantes lipídicos basados en un esqueleto carbonado isoprenoide, con propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas. Están presentes naturalmente en algunos alimentos, como zanahorias, tomates rojos, mantequilla, queso, aceite de palma, salmón rojo, pimentón y granos de maíz. Son *scavengers* de radicales libres, previenen la peroxidación lipídica, y son precursores de la vitamina A (retinol), que también tiene propiedades antioxidantes. Los carotenoides disminuyen el daño en el DNA de hepatocitos inducido por AFB1 en ratas, debido a que transforman la AFB1 en un metabolito menos tóxico, la AFM1, reduciendo el desarrollo de cáncer de hígado inducido por AFB1 (Gradelet y col., 1998). Además, el carotenoide licopeno, un pigmento rojo presente principalmente en el tomate, reduce el estrés oxidativo inducido por la toxina T-2 (Leal y col., 1999), observándose un descenso de los niveles de MDA y un incremento del contenido de GSH.

b. Vitaminas A, C y E

Se han atribuido acciones protectoras a las vitaminas A (retinol), C (ascorbato) y E (alfa-tocoferol) frente a la exposición a micotoxinas. Estas vitaminas pueden actuar como *scavenger* del radical superóxido, peróxido de hidrógeno, radical peroxilo, ácido hipocloroso y oxígeno de singlete.

b.1. Protección frente a la toxicidad de ocratoxinas. Las vitaminas A, C y E reducen los aductos entre OTA y ADN en riñón e hígado de ratón (Grosse y col., 1997) previenen la reducción de la viabilidad celular y disminuyen la producción de ROS (Baldi y col., 2004). Además, en ratones expuestos a esta micotoxina se ha evidenciado que la vitamina C reduce las alteraciones tanto en cromosomas mitóticos y meióticos como en la morfología de la cabeza de espermatozoides (Bose y Sinha, 1994). Por otro lado, suplementos de vitamina E administrada a pollos contrarrestan parcialmente la formación de peróxidos lipídicos debido a la exposición a OTA (Hoehler y Marquardt, 1996).

b.2. Protección frente a la toxicidad de aflatoxinas. Las vitaminas C y A son efectivas en reducir la unión AFB1-DNA y el daño al ADN inducido por dicha micotoxina (Yu y col., 1994). El diferente estatus de vitamina A está fuertemente relacionado con la hepatocarcinogenicidad de la AFB1 en ratas (Webster y col., 1996). De hecho, se observó un incremento del daño del DNA inducido por AFB1 durante una deficiencia de vitamina A, mientras que el daño fue revertido con suplementos de vitamina A. Además, la

administración de vitamina E inhibe la peroxidación lipídica en hígado inducida por AFB1 (Cassand y col., 1993).

b.3. Protección frente a la toxicidad de la zearalenona. Las vitaminas A, C y E reducen los aductos con el ADN y el daño oxidativo al ADN en riñón e hígado de ratón expuestos a zearalenona (Grosse y col., 1997). La vitamina E es capaz de prevenir la genotoxicidad inducida por la zearalenona, actuando como análogo estructural de esta micotoxina o como antioxidante (Ouanes y col., 2003). El pretratamiento con vitamina E reduce el daño oxidativo inducido por zearalenona en hepatocitos (Hassen y col., 2007). La especificidad de la protección se atribuye a la similitud estructural de la vitamina E y zearalenona (Ghédira-Chékir y col., 1998).

b.4. Protección frente a la toxicidad de tricotecenos. Las vitaminas E y C presentan actividad antioxidante y protegen el bazo y el cerebro contra el daño inducido por la toxina T-2 y DON en las membranas celulares, hecho observado en rata (Rizzo y col., 1994). Por otro lado, se ha evidenciado en pollos que la administración de suplementos de vitamina E contrarresta parcialmente la formación de peróxidos lipídicos debido a la exposición a la toxina T-2 (Hoehler y Marquardt, 1996).

c. Catequinas

Las catequinas son compuestos fenólicos presentes en hojas de té verde, chocolate y algunas plantas. Poseen propiedades anticancerígenas y antioxidantes, ya que tienen capacidad para quelar Fe^{+3} y Cu^{+2} (Kuo y col., 1998). Las catequinas pueden mostrar un carácter lipofílico parcial y penetrar en el interior de las membranas, donde el principal iniciador acuoso de la oxidación lipídica, el radical hidroxilo, es atrapado fácilmente y es accesible para radicales peroxilo iniciadores de la cadena. Las catequinas previenen la citotoxicidad inducida por OTA, ya que reducen la producción de ROS inducida por dicha micotoxina (Costa y col., 2007a). Además, estos compuestos fenólicos inducen la actividad de la glutatión S-transferasa citosólica, que estimula la formación del conjugado AFB1/glutatión, evitando que dicha aflatoxina se una al ADN (Aboobaker y col., 1994).

d. Cianidin-3-glucopiranosido (C-3G)

El cianidín-3-glucopiranosido (C-3-G) es un polifenol, concretamente un antociano, presente en naranjas, zarzamora, fresas, arándanos y otras frutas y vegetales, siendo responsable de su pigmentación. Posee un gran poder antioxidante debido a la presencia en su estructura química de varios grupos hidroxilos fenólicos. Se ha demostrado que el tratamiento con C-3-G tiene efectos citoprotectores frente al daño celular inducido por AFB1 y OTA, ya que inhibe la citotoxicidad, reduce la producción de ROS y contrarresta la inhibición de la síntesis de ADN y proteínas y la apoptosis causadas por ambas micotoxinas (Guerra y col., 2005).

e. Melatonina

La melatonina es una indolamina con actividad antiproliferativa y potencialmente anticarcinogénica (García-Navarro y col., 2007), considerada un *scavenger* de radicales libres y antioxidante. Protege frente al daño oxidativo causado por micotoxinas, hecho demostrado por la inhibición de la producción microsomal de H_2O_2 inducida por AFB1 en hígado (Awney y col., 2002), la reducción de la peroxidación lipídica inducida por OTA (Fig. 3) y la restauración de los niveles de las actividades glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa en hígado y suero de rata alterados tras la exposición a OTA (Soyóz y col., 2004). Además, también reduce la apoptosis causada por AFB1 en hígado (El-Gibaly y col., 2003).

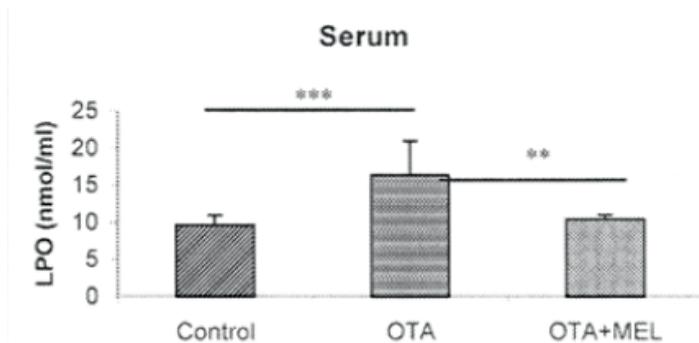


Figura 3. La melatonina (MEL) reduce la peroxidación lipídica (LPO) inducida por ocratoxina A (OTA). (Adaptado de El-Gibaly y col., 2003)

f. N-acetil-serotonina

La N-acetil-serotonina es un precursor de la melatonina que protege frente al daño oxidativo. De hecho, reduce la peroxidación lipídica inducida por ascorbato- Fe^{2+} en microsomas y mitocondrias de testículo (Gavazza y Catalá, 2004) y de hígado de rata (Leaden y Catalá, 2007). Gesing y Karbownik-Lewinska (2008) observaron que la administración de N-acetil-serotonina disminuye peroxidación lipídica (MDA) inducida por AFB1 en cerebro, hígado y pulmón.

g. Romero

El ácido carnósico es un compuesto polifenólico presente en el romero (*Rosmarinus officinalis*), con capacidad como *scavenger* de radicales libres y de reducción de los niveles de ROS. El pretratamiento con ácido carnósico tiene un efecto citoprotector, ya que reduce la muerte celular inducida por la exposición a AFB1 (Costa y col., 2007b) e inhibe la formación de aductos de ADN con AFB1 (Offord y col., 1997).

h. Ácido rosmarínico

El ácido rosmarínico es un compuesto fenólico natural presente en la salvia, albahaca y menta. Renzulli y col. (2004) demostraron su efecto citoprotector frente a la OTA y AFB1, además de atenuar la producción de ROS, la inhibición de la síntesis de ADN y proteínas y la apoptosis, en una línea celular de hepatoma humano.

i. Café

El café posee compuestos con capacidad antioxidante, como los diterpenos cafestol y kahweol, y el ácido cafeico. Estos compuestos son protegen frente a la unión de AFB1 y ADN (Cavin y col., 2001). Sin embargo, la cafeína potencia la genotoxicidad de AFB1.

j. Cactus

El extracto de cactus es efectivo en la protección frente al daño oxidativo causado por la zearalenona. De hecho, se ha observado que la administración de extracto de cactus revierte el incremento de peroxidación lipídica inducida por zearalenona en hígado y riñón (Zourgui y col., 2008).

k. Vino tinto

El vino tinto contiene una serie de compuestos que le confieren un efecto protector frente a la nefrotoxicidad por OTA, mediante la limitación del daño oxidativo. Dichos compuestos son el resveratrol, el ácido cafeico, las catequinas y la quercetina. La ocratoxina A aumenta los niveles de peróxidos lipídicos en riñón y descende la actividad SOD y la ratio GSH/GSSG. Si se administra con vino tinto, la OTA es menos nefrotóxica, se reduce el daño oxidativo, restaurando los niveles de GSH y preservando la ratio GSH/GSSG (Bertelli y col., 2005).

l. Pimienta

La pimienta negra contiene un alcaloide, la piperina, que es un agente protector frente a los efectos carcinogénicos de la AFB1, ya que reduce la actividad de las monooxigenasas del citocromo p-450 y contrarresta la toxicidad de AFB1 (Reen y col., 1997).

m. Aspartamo

Compuestos prometedores en la prevención de los efectos tóxicos de la OTA son los análogos estructurales y/o compuestos con una alta afinidad de unión por proteínas plasmáticas, entre ellos el aspartamo, un edulcorante. Los efectos protectores del aspartamo sobre la nefrotoxicidad inducida por OTA podrían estar basados en la

unión competitiva a proteínas plasmáticas, transporte o distribución a tejidos o la eliminación de la toxina en la orina (Creppy y col., 1998). Además, el aspartamo reduce el incremento de los niveles de MDA (peroxidación lipídica) y contrarresta la inhibición de la síntesis proteica inducidos por la exposición a OTA (Baudrimont y col., 1997), previniendo sus efectos tóxicos, incluyendo la genotoxicidad.

n. Glucomananos

Los glucomananos son polisacáridos presentes en la pared celular de levaduras. Cuando se administran en una dieta contaminada, como estos productos no son digeridos, la micotoxina adsorbida es excretada a través de las heces. La exposición combinada de glucomananos y alimentos con toxina T-2, restaura la concentración de GSH y reduce la peroxidación lipídica inducidas por la micotoxina (Dvorska y col., 2007).

o. Hierbas medicinales y extractos de plantas

Hay algunas plantas que contienen compuestos con efectos beneficiosos para la protección frente a la toxicidad inducida por micotoxinas. Actúan como antioxidantes, *scavengers* de radicales libres e inhibiendo la peroxidación lipídica. Entre ellas podemos destacar:

- *Cassia senna*: La administración de un extracto de etanol de un concentrado de *C. senna* inhibe el efecto mutagénico de la AFB1 (al-Dakan y col., 1995).
- Nuez de anacardo: El extracto de nuez de anacardo es efectivo en reducir el hepatocarcinoma inducido por AFB1 (Premalatha y Sachdanandam, 1999).
- Hojas de pimienta: La administración de extracto de metanol de hojas de pimienta disminuye el efecto genotóxico de AFB1 (Hashim y col., 1994).
- La administración de un extracto del fruto de *Schisandra chinensis* proporciona una acción hepatoprotectora contra AFB1 por la estimulación del sistema hepático antioxidante y de detoxificación (Ip y col., 1996).

Finalmente, es importante tener en cuenta que en algunos casos los posibles agentes protectores también son una vía potencial de intoxicación. Este es el caso del café, té, uvas y hierbas medicinales. De hecho, se debe tener precaución en la promoción de la acción antimicotóxica de las sustancias discutidas anteriormente, ya que algunas de ellas pueden ser carcinogénicas y/o tener propiedades tóxicas a dosis concretas y en determinadas circunstancias.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboobaker, V.S., Balgi, A.D., Bhattacharya, R.K., (1994). *In Vivo*, 8, 1095-1098.
- al-Dakan, A.A., al-Tuffail, M., Hannan, M.A., (1995). *Pharmacol Toxicol*, 77, 288-292.
- Awney, H.A., Attih, A.M., Habib, S.L., y col. (2002). *Toxicology*, 172, 143-148.

- Baldi, A., Losio, M.N., Cheli, F., y col. (2004). *Br. J. Nutr.*, 91, 507-512.
- Baudrimont, I., Ahouandjivo, R., Creppy, E.E. (1997). *Chem. Biol. Interact.*, 104, 29-40.
- Bennett, J.W., Keller, N.P. (1997). En: *Fungal Biotechnology* (Ed. T. Anke). *Chapman & Hall, Weinheim*, 265-273.
- Bertelli, A.A., Migliori, M., Filippi, C. (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6924-6929.
- Bose, S., Sinha, S.P. (1994). *Food Chem. Toxicol.*, 32, 533-537.
- Cassand, P., Decoudu, S., Leveque F. (1993). *Mutat. Res.*, 319, 309-316.
- Cavin, C., Mace, K., Offord, E.A. (2001). *Food Chem. Toxicol.*, 39, 549-556.
- Costa, S., Utan, A., Cervellati, R., y col. (2007a). *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1910-1917.
- Costa, S., Utan, A., Speroni, E., y col. (2007b). *J. Appl. Toxicol.*, 27, 152-159.
- Creppy, E.E., Baudrimont, I., Anne-Marie (1998). *Toxicol. Sci. 23Suppl*, 2, 165-172.
- Dvorska, J.E., Pappas, A.C., Karadas, F., y col. (2007). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 582-587.
- El-Gibaly, I., Meki, A.M., Abdel-Ghaffar, S.K. (2003). *Int. J. Pharm.*, 260, 5-22.
- Galvano, F., Russo, A., Cardile, V., y col. (2002). *Food Chem. Toxicol.*, 40, 25-31.
- García-Navarro, A., Gonzalez-Puga, C., Escames, G., y col. (2007). *J. Pineal Res.*, 43, 195-205.
- Gautier, J.C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., y col. (2001). *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 1089-1098.
- Gavazza, M.B., Catala, A. (2004). *J. Pineal Res.*, 37, 153-160.
- Gesing, A., Karbownik-Lewinska, M. (2008). *Cell Biochem. Funct.*, 26, 314-319.
- Ghedira-Chekir, L., Maaroufi, K., Zakhama, A., y col. (1998). *Chem. Biol. Interact.*, 113, 15-25.
- Gradelet, S., Le Bon, A.M., Berges, R., y col. (1998). *Carcinogenesis*, 19, 403-411.
- Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., y col. (1997). *Cancer Lett.*, 114, 225-229.
- Guerra, M.C., Galvano, F., Bonsi, L., y col. (2005). *Br. J. Nutr.*, 94, 211-220.
- Hashim, S., Aboobaker, V.S., Madhubala, R. y col. (1994). *Nutr. Cancer*, 21, 169-175.
- Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Osoz, A.A., y col. (2007). *Toxicology*, 232, 294-302.
- Hoehler, D., Marquardt, R.R. (1996). *Poult Sci*, 75, 1508-1515.
- IARC, (1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 489.
- IARC, (2002). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 82. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 171.
- Ip, S.P., Mak, D.H., Li, P.C., y col. (1996). *Toxicol.*, 78, 413-416.
- Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., y col. (2005) *Toxicology*, 213, 56-65.
- Kouadio, J.H., Dano, S.D., Moukha, S. y col. (2007). *Toxicol.*, 49, 306-317.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. (1989). *Environ. Sci.*, 2, 179-248.
- Kuo, S.M., Leavitt, P.S., Lin, C.P. (1998). *Biol. Trace Elem. Res.*, 62, 135-153.
- Leaden, P.J., Catala, A. (2007). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77, 29-35.
- Leal, M., Shimada, A., Ruiz, F., y col. (1999). *Toxicol. Lett.*, 109, 1-10.
- Marin-Kuan, M., Nestler, S., Verguet, C., y col. (2006). *Toxicol. Sci.*, 89, 120-34.
- McGlynn, K.A., Hunter, K., LeVoyer, T., y col. (2003). *Cancer Res.*, 63, 4594-4601.

- Offord, E.A., Mace, K., Avanti, O., y col. (1997). *Cancer Lett.*, 114, 275-281.
- Omar, R.F., Rahimtula, A.D., Bartsch, H. (1991). *J. Biochem. Toxicol*, 6, 203-209.
- Omar, R.F., Rahimtula, A.D. (1993). *Biochem. Pharmacol.* 46, 2073-2081.
- Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., y col. (2003). *Mutat. Res.*, 538, 63-70.
- Premalatha, B., Sachdanandam, P. (1999). *J. Ethnopharmacol*, 66, 131-139.
- Rahimtula, A.D., Bereziat, J.C., Bussacchini-Griot, V., y col. (1998). *Biochem. Pharmacol*, 37, 4469-4477.
- Reen, R.K., Wiebel, F.J., Singh, J. (1997). *J. Ethnopharmacol*, 58, 165-173.
- Renzulli, C., Galvano, F., Pierdomenico, L., y col. (2004). *J. Appl. Toxicol*, 24, 289-296.
- Rizzo, A.F., Atroschi, F., Ahotupa, M., y col. (1994). *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 41, 81-90.
- Schaaf, G.J., Nijmeijer, S.M., Maas, R.F., y col. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, 1588, 149-158.
- Scott, P.M. (2005). *Food Addit. Contam. 22 Suppl*, 1, 99-107.
- Shen, H.M., Ong, C.N., Lee, B.L. y col. (1995). *Carcinogenesis*, 16, 419-422.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Shen, Y., y col. (1996). *Free Radic. Biol. Med.*, 21, 139-146.
- Soyoz, M., Ozcelik, N., Kilinc, I., y col. (2004). *Cell Biol. Toxicol*, 20, 213-219.
- Stockmann-Juvala, H., Mikkola, J., Naarala, J., y col. (2004). *Free Radic. Res.*, 38, 933-942.
- Sun, G., Wang, S., Hu, X., y col. (2007). *Food Addit. Contam.*, 24, 181-185.
- Suneja, S.K., Wagle, D.S., Ram, G.C. (1989). *Toxicol.*, 27, 995-1001.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K. (1996). *In Vivo*, 10, 113-118.
- Yin, J.J., Smith, M.J., Eppley, R.M., y col. (1998). *Biochim. Biophys Acta*, 1371, 134-142.
- Yu, M.W., Zhang, Y.J., Blaner, W.S., y col. (1994). *Cancer*, 73, 596-604.
- Zourgui, L., Golli, E.E., Bouaziz, C., y col. (2004). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1817-

TOXICOLOGÍA DE METALES Y ANTIOXIDANTES NATURALES: CADMIO Y MELATONINA

Alejandro Romero Martínez

Dpto. de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Instituto de Investigación Teófilo Hernando. Universidad Autónoma de Madrid

Introducción

El cadmio (Cd) fue descubierto en 1817 por el químico alemán Friedrich Stromeyer en las incrustaciones de los hornos de zinc. Aunque también puede estar asociado a otros metales como plomo o cobre (Zubera-Cosano, 1993), o formando compuestos inorgánicos solubles en agua como cloruros, sulfuros y acetatos (Reilly, 1991). Se trata de un elemento no esencial para los seres vivos y está considerado como uno de los 126 contaminantes principales por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Waisberg y col., 2003). Presenta una larga semivida en el hombre; entre 10 y 30 años (Satarug y col., 2004) aunque otros autores lo estiman entre 15 y 20 años (Jin y col., 1998).

Presencia del cadmio en el medio ambiente

El cadmio es uno de los mayores agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental e industrial, pues reúne cuatro de las características más temidas de un tóxico: a) efectos adversos para el hombre y el medio ambiente, b) bioacumulación, c) persistencia en el medio ambiente y d) dispersión (Ramírez, 2002).

El cadmio se obtiene como subproducto del tratamiento metalúrgico del zinc y del plomo, a partir de sulfuro de cadmio; en el proceso hay formación de óxido de cadmio, compuesto muy tóxico. Además de contaminar el ambiente desde su fundición y refinación, contamina también por sus múltiples aplicaciones industriales. Los principales usos y aplicaciones del cadmio o sus compuestos son: como pigmento en pinturas, esmaltes, plásticos, textiles, vidrios, tintas de impresión, caucho, lacas, en la producción de pilas de cadmio-níquel, como estabilizador de termoplásticos (PVC), como “endurecedor” de ruedas y llantas de automóvil (Zubera-Cosano, 1993).

Exposición al cadmio a través de la dieta

Las principales fuentes de exposición al cadmio para el hombre son atmósferas profesionales concretas, la dieta, el agua de bebida y el tabaco (Repetto y López-Artíguez, 1995; Llobet y col., 1998; Chan y col., 2000). Además, presenta una larga semivida en el hombre, principalmente debido a su baja ratio de excreción y a su acumulación en el organismo.

La absorción oral del cadmio a través de la ingesta alimentaria ha sido estimada en un 5% en humanos (I.P.C.S., 1992), con una variabilidad interindividual de un 20-30% (Satarug y col., 2004), determinada por distintos factores como es la ingesta de fibra, la cual inhibe la absorción intestinal del metal (Berglund y col., 1994).

Según el Internacional Programme on Chemical Safety, de la Organización Mundial de la Salud, la ingesta media de cadmio es inferior a la ingesta semanal provisional tolerable (PTWI) (Galal-Gorchev, 1993), siendo la PTWI $1\mu\text{g Cd/Kg}$ peso/día (C.A.C., 2003). Sin embargo, según Nasreddine y Parent-Massin (2002), los europeos estamos expuestos a concentraciones de cadmio superiores a la PTWI.

El agua de bebida también puede constituir una fuente de exposición al cadmio. Aunque la concentración media es inferior a $1\mu\text{g Cd/L}$, en hogares con tuberías de cobre puede llegar a $2\mu\text{g Cd/L}$ en el caso de tuberías galvanizadas (Sharret y col., 1982).

Aspectos moleculares de la toxicología del cadmio

El cadmio induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Filipič y col., 2006). Además, induce la producción de radicales hidroxilo (O'Brien y Salacinski, 1998), aniones superóxido, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (Stohs y col., 2001) e induce peroxidación lipídica (El-Maraghy y col., 2001). Las ROS son continuamente generados durante el metabolismo del oxígeno. Posteriormente son transformados en radicales hidroxilo, altamente reactivos, que atacan el ADN, produciendo la rotura de las hebras y alterando las bases, lo que conlleva la aparición de mutaciones y el desarrollo de tumores (Waalkes, 2002).

El mecanismo por el cual el cadmio inicia la formación de ROS puede deberse fundamentalmente a que este metal provoca un descenso intracelular del contenido de glutatión y reduce la actividad de los enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa, permitiendo la acumulación de ROS y un incremento del estrés oxidativo intracelular en células expuestas al cadmio (Waisberg y col., 2003).

También se ha observado que el cadmio induce peroxidación lipídica en diversas regiones cerebrales (Méndez-Armenta y col., 2003). De hecho, se ha relacionado la toxicidad neuroendocrina de este metal con el estrés oxidativo (Poliandri y col., 2006; López y col., 2006), situación en la que existe una alteración en el balance de agentes oxidantes y antioxidantes en las células (López y col., 2006). Por otro lado, el aumento de especies reactivas de oxígeno puede conllevar diversas perturbaciones fisiológicas: mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, alteraciones en la transmisión sináptica, etc. (Evans, 1995). Además, a nivel cerebral, el estrés oxidativo es el responsable de numerosas enfermedades degenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (Hirano, 1991) y alzheimer (Sinet y Ceballos-Picot, 1992).

Neurotoxicología del cadmio

El cadmio, al igual que otros metales pesados, como plomo y mercurio, presenta una elevada neurotoxicidad (Pohl y col., 2006). Atraviesa la barrera hematoencefálica (Murphy, 1997) y puede acumularse en las distintas regiones cerebrales (Lafuente y col., 2003; Ong y col., 2006). También puede depositarse en el plexo coroideo que constituye la barrera hematoencefálica (Manton y col., 1984). Este hecho conlleva alteraciones morfológicas en su estructura, lo que permite que los metales y otros xenobióticos neurotóxicos difundan hacia el cerebro (Zheng, 2001). Concretamente, el cadmio unido a la metalotioneína (formando un complejo cadmio-metalotioneína) se fija en el plexo coroideo (Zheng, 2001) y destruye la ultraestructura del plexo (Zheng, 2001). Según diversos autores (Wong y Klaassen, 1982; Choudhuri y col., 1996) algunas patologías neurológicas podrían ser debidas a un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al cadmio.

La neurotoxicidad asociada a la exposición al cadmio podría ser debida al efecto global de una serie de pequeñas perturbaciones en el metabolismo cerebral y del estrés oxidativo en particular, ya que este metal parece intensificar la peroxidación lipídica a través de la inhibición de la superóxido dismutasa y otros enzimas relacionados (Gutiérrez-Reyes y col., 1998).

Los efectos tóxicos del cadmio en el SNC incluyen alteraciones en la síntesis y/o metabolismo de las aminas biógenas y de los aminoácidos neurotransmisores. Así se ha observado en diversas regiones cerebrales, bajo heterogéneas condiciones experimentales (*in vivo* e *in vitro*, diversas dosis del metal, diferentes vías de administración del tóxico), en diversas especies animales y de distintas edades (Williams y col., 1978; Arito y col., 1981; Nation y col., 1989; Das y col., 1993; Lafuente y Esquifino 1999; Lafuente y col., 2001; 2002; 2003; 2004; 2005a y b).

Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) fue caracterizada por primera vez después de procesar cromatográficamente miles de glándulas pineales de origen bovino (Lerner y col., 1958). Se denominó con el término melatonina debido a sus efectos sobre la pigmentación de la piel de ranas y por su relación química con la serotonina (5-hidroxitriptamina) (Lerner y col., 1960). Actualmente se sabe que esta indolamina es el principal producto secretado por la glándula pineal en mamíferos, incluyendo el hombre.

Benot y col. (1998 y 1999) evidenciaron en rata y en el hombre que tanto los niveles en sangre de melatonina como la capacidad antioxidante total de ese fluido corren paralelos. De esta manera, el incremento fisiológico nocturno de los niveles de melatonina se acompaña de un concurrente ascenso en la capacidad del fluido para

neutralizar los radicales libres. El fuerte paralelismo entre la concentración sanguínea de melatonina y su capacidad antioxidante fue también confirmado por Albarran y col. (2001) en aves.

Cardinali y col. (2001) consideraron la importancia de las concentraciones subcelulares de melatonina. Cabe destacar que como sustancia lipofílica atraviesa fácilmente las membranas celulares, y que bajo condiciones fisiológicas y farmacológicas puede ser mucho más elevada la concentración intracelular de la hormona que sus niveles circulantes.

Hace dos décadas, se cuantificó por radioinmunoensayo la concentración hipotalámica de melatonina en rata, obteniendo valores de 1-4 pg/mg de tejido (Catala y col., 1987). Posteriormente, al utilizar técnicas cromatográficas, se observó que la concentración nocturna de melatonina en esta misma región cerebral era superior: 10 pg/mg de tejido (Cardinali y col., 2001). De estos datos se desprende que los niveles de melatonina en los tejidos puedan estar dentro de un elevado rango nanomolar, asumiendo una distribución homogénea de melatonina en varios compartimentos subcelulares. Estos valores podrían ser sustancialmente más elevados si la melatonina se distribuye de forma distinta dentro de los compartimentos subcelulares. De hecho, los niveles más elevados se han encontrado en el núcleo celular y en la mitocondria, en un rango micromolar (Cardinali y col., 2001).

Funciones de la melatonina y su posible papel protector frente a la toxicidad de los xenobióticos

La melatonina presenta la capacidad de paliar, al menos en parte, el daño molecular y celular originado por el estrés oxidativo (Reiter, 1998). Entre los diversos mecanismos de actuación en este sentido, destacan los siguientes (Figura 1):

Es un potente “scavenger” (agente neutralizante) de radicales libres (Tan y col., 2002), como son las ROS y del nitrógeno (RNS) y los radicales peroxilo (LOO^{\bullet}).

1. Actúa como un antioxidante indirecto:
 - a. Induciendo enzimas antioxidantes (Reiter y col., 2000; Rodríguez y col., 2004)
 - b. Estimulando la síntesis de glutatión (Urata y col., 1999)
 - c. Incrementando la actividad de otros antioxidantes (Gitto y col., 2001)
 - d. Protegiendo a enzimas antioxidantes del daño oxidativo (Mayo y col., 2003), aumentando la eficiencia de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, reduciendo así la fuga de electrones y la generación de radicales libres (Acuña-Castroviejo y col., 2002).

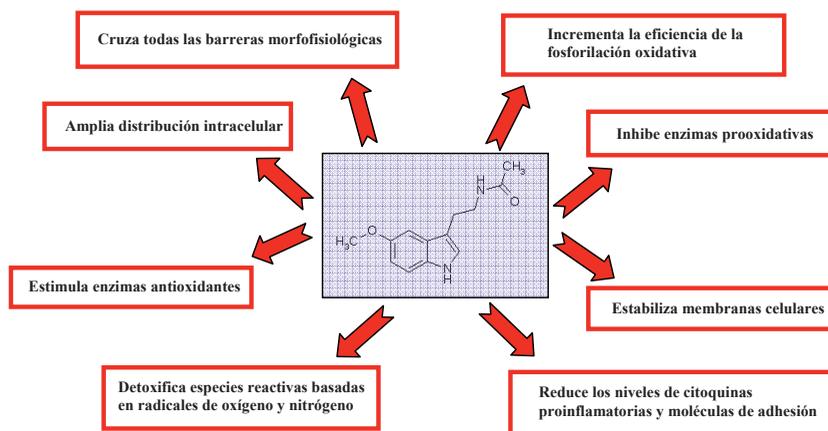


Figura 1. En esta figura se resumen los diversos mecanismos a través de los cuales la melatonina protege a las células del daño oxidativo (Reiter, 2003)

Algunas de estas acciones son mediadas vía receptor, mientras que otras no lo son. En primer lugar habría que citar su actividad endocrina, tanto autocrina como paracrina y su función de “scavenger” (agente neutralizante) directo de radicales libres (Tan y col., 2003). Más concretamente, esta hormona es capaz de reducir la peroxidación lipídica inducida por cadmio en diversos órganos, al administrarse intraperitonealmente a dosis farmacológicas (Karbownik y col., 2001). Además de sus propiedades antioxidantes, la melatonina también puede formar complejos *in vitro* con cadmio y otros metales (Limson y col., 1998). En esta misma línea, la melatonina revierte las alteraciones que induce el cadmio en la expresión génica de enzimas implicados en la peroxidación lipídica y en el estrés oxidativo (óxido nítrico sintasa 1 y 2 y hemo oxigenasa-1) en el eje hipotalámico-hipofisario (Poliandri y col., 2006).

El efecto protector de la melatonina frente a la neurotoxicidad del cadmio que se observa a nivel de neurotransmisores podría ser debido, al menos en parte, a que la neurohormona disminuye la retención del metal en el organismo (Chwelatiuk y col., 2006) y reduce el estrés oxidativo inducido por cadmio (Poliandri y col., 2006). Además, los efectos protectores de la melatonina frente al daño oxidativo inducido por metales han sido evidenciados principalmente en estudios *in vitro* (Karbownik y col., 2001; Parmar y col., 2002; Ortega-Gutiérrez y col., 2002, Daniel y cols., 2004; Eybl y col., 2006), por lo que los efectos tóxicos del cadmio que escapan a la protección de la melatonina, podrían ser debidos a otros factores que existen *in vivo* y que no se dan en los experimentos *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Carozo, A., y col. (2002). *Curr. Topics Med. Chem.*, 2, 133-152.
- Albarran, M.T., Lopez-Burillo, S., Pablos, M.I., y col. (2001). *J. Pineal Res.*, 30, 227-233.
- Arito, H., Sudo, A., Suzuki, Y. (1981). *Toxicol. Lett.*, 7, 457-461.
- Benot, S., Molinero, P., Soutto, M., y col. (1998). *J. Pineal Res.*, 25, 1-4.
- Benot, S., Goberna, R., Reiter, R.J., y col. (1999). *J. Pineal Res.*, 27, 59-64.
- Berglund, M., Akesson, A., Nermell, B., y col. (1994). *Environ. Health Perspect.*, 102, 1058-1066.
- C.A.C. (Codex Alimentarius Commission) (2003). Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Document ALINORM 03/12, Appendix XIV. Rome, CAC.
- Cardinali, D.P., Cutrera, R.A., Brusco, L.I., y col. (2001). En: *The Pineal Gland and Cancer*, Bartsch, C., Bartsch, H., Blask, D.E., Cardinali, D.P., y col. Eds., Springer, Berlin, 50-65.
- Catala, M.D., Quay, W.B., Timiras, D.S. (1987). *Int. J. Dev. Neurosci.*, 5, 313-318.
- Chan, D.Y., Black, W., Hale, B. (2000). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64, 526-533.
- Choudhuri, S., Liu, W.L., Berman, N.E., y col. (1996). *Toxicol. Lett.*, 84, 127-133.
- Chwelatiuk, E., Wlostowski, T., Krasowska, A., y col. (2006). *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 19, 259-265.
- Daniel, S., Limson, J.L., Dairam, A., y col. (2004). *J. Inorg. Biochem.*, 98, 266-275.
- Das, K.P., Das, P.C., Dasgupta, S., y col. (1993). *rat. Biol. Trace Elem. Res.*, 36, 119-127.
- El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T., y col. (2001). *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 15, 207-214.
- Evans, P.H. (1995). *Br. Med. Bull.*, 49, 577-587.
- Eybl, V., Kotyzova, D., Koutensky, J. (2006). *Toxicology*, 225, 150-156.
- Filipič, M., Fatur, T., Vudrag, M. (2006). *Hum. Exp. Toxicol.*, 25, 67-77.
- Galal-Gorchev, H. (1993). *Food Addit. Contam.*, 10, 115-128.
- Gitto, E., Tan, D.X., Reiter, R.J., y col. (2001). *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 1393-1401.
- Gutierrez-Reyes, E.Y., Albores, A., Rios, C. (1998). *Toxicology*, 131, 145-154.
- Hirano, A. (1991). *Adv. Neurol.*, 56, 91-101.
- I.P.C.S. (International Programme on Chemical Safety) (1992). Cadmium. Environmental Health Criteria 134. Geneva, World Health Organization.
- Jin, T., Lu, J., Nordberg, M. (1998). *Neurotoxicology*, 19, 529-535.
- Karbownik, M., Gitto, E., Lewinski, A., y col. (2001). *Cell Biol. Toxicol.*, 17, 33-40.
- Lafuente, A., Fernández-Rey, E., Seara, R., y col. (2001). *Neurochem. Int.*, 39, 187-192.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Marquez, N., y col. (2002). *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 16, 249-254.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Romero, A., y col. (2003). *Exp. Brain Res.*, 149, 200-206.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Romero, A., y col. (2004). *Toxicol. Lett.*, 146, 175-182.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Romero, A., y col. (2005a). *Toxicol. Lett.*, 155, 87-96.
- Lafuente, A., Gonzalez-Carracedo, A., Cabaleiro, T., y col. (2005b). *J. Physiol. Biochem.*, 61, 439-446.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, E. (1958). *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2587-2589.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, E. (1960). *J. Biol. Chem.*, 235, 1992-1997.
- Limson, J., Nyokong, T., Daya, S. (1998). *J. Pineal Res.*, 24, 15-21.
- Llobet, J.M., Granero, S., Schuhmacher, M., y col. (1998). *Trace Elem. Electroly.*, 15, 136-141.
- Lopez, E., Arce, C., Oset-Gasque, M.J., y col. (2006). *Free Radic. Biol. Med.*, 40, 940-951.

- Manton, W.I., Kirkpatrick, J.B., Cook, J.D. (1984). *Lancet*, 2, 351.
- Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., y col. (2003). *Free Radic. Res.*, 37, 543-553.
- Murphy, V.A. (1997). En: Yasui, M., Strong, M.J., Ota, K, y col., eds. Mineral and metal, neurotoxicology. Boca Raton, CRC, 229-240.
- Nasreddine, L., Parent-Massin, D. (2002). *Toxicol. Lett.*, 127, 29-41.
- Nation, J.K., Frye, G.D., Von Stulz, J., y col. (1989). *Behav. Neurosci.*, 103, 1108-1114.
- O'Brien, P., Salacinski, H.J. (1998). *Arch. Toxicol.*, 72, 690-700.
- Ong, W.Y., He, X., Chua, L.H., y col. (2006). *Exp. Brain Res.*, 173, 468-474.
- Ortega-Gutierrez, S., García, J.J., Martínez-Ballarín, E. (2002). *Neurosci. Lett.*, 323, 55-59.
- Parmar, P., Limson, J., Nyokong, T., Daya, S. (2002). *J. Pineal Res.*, 32, 237-242.
- Pohl, H. R., Abadin, H., Risher, J. F. (2006). En: Neurodegenerative diseases and metal ions. Vol 1. Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds) John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England, 474.
- Poliandri, A.H., Esquifino, A.I., Cano, P., y col. (2006b). *J. Pineal Res.*, 41, 238-246.
- Ramirez, A. (2002). Anales de la Facultad de Medicina, 63, 51-64.
- Reilly, C. (1991). *Elsevier Applied Science.*, 3-151.
- Reiter, R.J. (1998). *Prog. Neurobiol.*, 56, 359-384.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., y col. (2000). *J. Biomed. Res.*, 7, 444-458.
- Reiter, R.J. (2003a). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17, 273-285.
- Repetto, M., Lopez-Artiguez, M. (1995). En: Toxicología avanzada. Repeto, M. (Ed.), Díaz de Santos, Madrid, 393-418.
- Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., y col. (2004) *J. Pineal Res.*, 36, 1-9.
- Satarug, S., Ujjin, P., Vanavanitkun, Y., y col. (2004). *Toxicol. Lett.*, 148, 177-185.
- Sharret, A. G., Carter, A. P., Orhein, R. M., y col. (1982). *Environ. Res.*, 28, 456-475.
- Sinet, P.M., Ceballos-Picot, I. (1992). Springer Verlag, Berlin 91-98.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., y col. (2001). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 20, 77-88.
- Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., y col. (2002). *Curr. Topics Med. Chem.*, 2, 181-198.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Hardeland, R., y col. (2003). *J. Pineal Res.*, 34, 75-78.
- Urata, Y, Honma, S., Goto, S., y col. (1999). *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 838-847.
- Waalkes, M.P. (2002). En: Sarkar, B. Ed. Handbook of heavy metals in the environment. Marcel Dekker, 121-146.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., y col. (2003). *Toxicology*, 192, 95-117.
- Williams, B.J., Laubach, D.J., Nechay, B.R., y col. (1978). *Life Science*, 23, 1929-1924.
- Wong, K.L., Klaassen, C.D. (1982). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 330-337.
- Zheng, W. (2001). *Microscopy research and technique*, 52, 89-103.
- Zubera-Cosano, G. (1993). Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Macrae, R., Robinson, R. K., Sadler, M. J. (Eds.), Academic Press Ltd, London, 557-561.

TOXICOLOGÍA DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS Y RADICALES LIBRES: METOXICLORO Y ÓXIDO NÍTRICO

Ana Caride

Laboratorio de Toxicología. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo

Oxido nítrico

El óxido nítrico es un mensajero biológico con una vida media de unos pocos segundos debido a su carácter gaseoso. Fue descubierto en 1987 en las células endoteliales y se denominó inicialmente factor relajante derivado del endotelio, ya que inducía la relajación de la musculatura lisa precontraída farmacológicamente, implicando su importancia en el sistema cardiovascular y en la mayoría de los demás sistemas biológicos. Por este motivo fue elegida como molécula del año en 1992 por la revista *Science* y mereció que se les otorgara el premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1998 a los investigadores pioneros de este descubrimiento (Ferid Murad, Robert Furchgott y Louis Ignarro).

El óxido nítrico, a temperatura ambiente y presión atmosférica, es un gas que posee un electrón desapareado, por lo que se comporta como un radical libre y en consecuencia es muy reactivo. Debido a esto tiene una vida media de segundos. Una vez liberado, ejerce sus efectos y se descompone para producir dos metabolitos estables, los radicales nitrito y nitrato. Es sintetizado a partir de L-arginina mediante una reacción enzimática catalizada por el óxido nítrico sintasa (NOS), enzima que contiene cuatro cofactores: FAD, FMN, tetrahidrobiopterina y hemo. Hasta el momento han sido identificadas tres isoformas de NOS, que hacen referencia al tejido en el que se purificaron inicialmente: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). La isoforma endotelial de óxido nítrico sintasa se encuentra en las células endoteliales vasculares, en donde, activada por estimulación colinérgica, promueve la relajación de la musculatura lisa. La nNOS se encuentra principalmente en el cerebro y, al igual que la eNOS, es calcio-dependiente. Estas dos isoformas median la producción de óxido nítrico a concentración fisiológica, para actuar como señalizador molecular. La expresión de la isoforma inducible de NOS es sintetizada en diferentes tipos de células, tales como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso y endotelio, y es calcio-independiente. Esta isoforma cataliza la síntesis de gran cantidad de óxido nítrico, que puede ser tóxico en determinadas circunstancias.

El óxido nítrico participa en una gran variedad de importantes funciones biológicas. Hasta el momento existen más de 30.000 publicaciones que versan sobre el papel biológico del este compuesto. Es importante destacar que es un neurotransmisor, que posee propiedades diferentes a las de los neurotransmisores clásicos debido a su naturaleza gaseosa: no se acumula en vesículas sinápticas; no requiere de re-

ceptores de membrana para ejercer su acción, ya que penetra en la célula diana por difusión lipídica; y no es metabolizado por enzimas específicos, sino que es degradado espontáneamente por oxidación o bien por compuestos tales como el anión superóxido o la oxihemoglobina. A nivel de sistema nervioso central desempeña funciones tan importantes como la regulación de la liberación de otros neurotransmisores [glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), dopamina, acetilcolina, norepinefrina y adrenalina, entre otros], la regulación del flujo vascular, e interviene en los mecanismos de defensa cerebral y en procesos de aprendizaje y memoria. El óxido nítrico se encuentra además presente en el sistema nervioso periférico, participando en la transmisión sensorial. Además, está involucrado en otras funciones fisiológicas, muy diversas entre sí, como la inhibición de la agregación y la adhesión plaquetaria, la citotoxicidad producida por macrófagos, la relajación intestinal no colinérgica, la regulación de la secreción hormonal y el control del apetito.

Es importante tener en cuenta que el óxido nítrico puede presentar capacidad antioxidante o prooxidante. Por una parte, algunas de las especies reactivas del nitrógeno derivadas del óxido nítrico pueden reaccionar con proteínas, ADN y ácidos grasos poliinsaturados. Entre estos compuestos cabe destacar el peroxinitrito por su capacidad oxidante, sintetizado cuando se encuentran simultáneamente en el medio óxido nítrico y el anión superóxido. Por otra parte, el óxido nítrico potencialmente inhibe la peroxidación lipídica inducida por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, puesto que reacciona con radicales lipídicos dando lugar a productos no radicales del tipo nitrosolípidos. También se ha demostrado que modula el efecto prooxidante del hierro y de metales de transición en estado iónico al reaccionar con ellos. Este efecto antioxidante o prooxidante depende de la concentración de cada especie y del microambiente biológico en el que es liberado el óxido nítrico.

Su principal compuesto diana es la guanilato ciclasa soluble (GCs), que desencadena la producción de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Este último aparece como compuesto mediador de muchas de las acciones fisiológicas del óxido nítrico, al estar implicado en la transducción de señales vía una kinasas. Otra de las moléculas diana del óxido nítrico es la citocromo oxidasa, ya que al competir con el oxígeno por la unión a esta molécula en la cadena de transporte electrónico modula la respiración mitocondrial. Por otra parte, forma el complejo GSNO al unirse a glutatión oxidado, que origina posteriormente glutatión reducido (GSH) con gran actividad antioxidante. Además, las tres formas redox del óxido nítrico reaccionan con oxígeno, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, anión superóxido y metales de transición en estado iónico, dando lugar a especies reactivas del nitrógeno, entre las cuales cabe destacar el peroxinitrito por su capacidad oxidante.

Insecticidas organoclorados: metoxicloro

Los insecticidas organoclorados son compuestos aril, carbocíclicos o heterocíclicos de peso molecular entre 291 y 545 dalton, que actúan como insecticidas de ingestión y de contacto. Estos compuestos se pueden clasificar según su estructura molecular en:

- Derivados de hidrocarburos alicíclicos, como el hexaclorociclohexano o el lindano.
- Derivados de hidrocarburos ciclodiénicos, tales como el aldrín, endrín, dieldrín, clordano, endosulfán y heptacloro.
- Derivados de hidrocarburos terpénicos, entre los que destacan el toxafeno y la clordecona.
- Derivados de hidrocarburos aromáticos. En este grupo se encontrarían el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y el metoxicloro, en el cual nos centremos a continuación.

El nombre químico del metoxicloro es el 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-metoxifenil)etano. Se sintetizó con la finalidad de sustituir al DDT, puesto que presenta menor toxicidad y corta persistencia en los sistemas biológicos. El metoxicloro es eficaz contra una amplia variedad de insectos como moscas, mosquitos y cucarachas. Es un plaguicida ampliamente utilizado en cultivos agrícolas, en silos de almacenamiento de cereales, en jardinería y en animales domésticos.

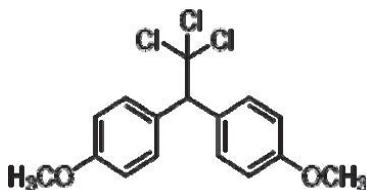


Figura 1. Estructura química del metoxicloro

Las vías más frecuentes de exposición al insecticida son la inhalatoria, la dérmica, y la ingesta alimentaria. Su presencia ha sido evidenciada en el 1,2% de las muestras de alimentos analizadas en EEUU, lo cual representa un consumo diario de 0,1 a 0,8 µg de metoxicloro en este país (Gunderson, 1988). Además, se han encontrado residuos de este plaguicida en muestras biológicas, concretamente en tejido adiposo y sangre de mujeres del sur de España (Botella y col., 2004).

Este xenobiótico ejerce su principal acción tóxica sobre el sistema nervioso al interferir en el flujo de iones a través de las membranas de las células nerviosas prolongando el tiempo de apertura de los canales de sodio. La intoxicación aguda por metoxicloro se

caracteriza por temblores, convulsiones y otros signos neurológicos de estimulación. En cuanto a la exposición crónica, el sistema reproductor es la principal diana de este plaguicida. Presenta actividad estrogénica, e induce diversos efectos sobre el sistema reproductor. Concretamente, se han observado cambios histopatológicos en los órganos del sistema reproductor y glándulas accesorias y alteraciones de los niveles de hormonas sexuales (Borgeest y col., 2002). Asimismo, este plaguicida es un depresor del sistema nervioso central, observándose alteraciones diversas en la concentración de neurotransmisores en distintas regiones cerebrales (Lafuente y col., 2007).

Metoxicloro, estrés oxidativo y óxido nítrico

El estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiado como mecanismo de toxicidad de los pesticidas entre los que se encuentra el metoxicloro (Koner y col., 1998; Kale y col., 1999; McCormack y col., 2005). En este sentido, diversos grupos de investigación han evidenciado alteraciones del sistema reproductor a través de un aumento del estrés oxidativo inducido por la exposición a este último pesticida. Más concretamente, el tratamiento con este xenobiótico conlleva un descenso de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa, así como un aumento de los niveles de peroxidación lipídica en testículo (Latchoumycandane y Mathur, 2002), epidídimo y esperma de rata (Latchoumycandane y col., 2002). Algunos de estos efectos pueden observarse en las Figuras 2 y 3, que se presentan a continuación.

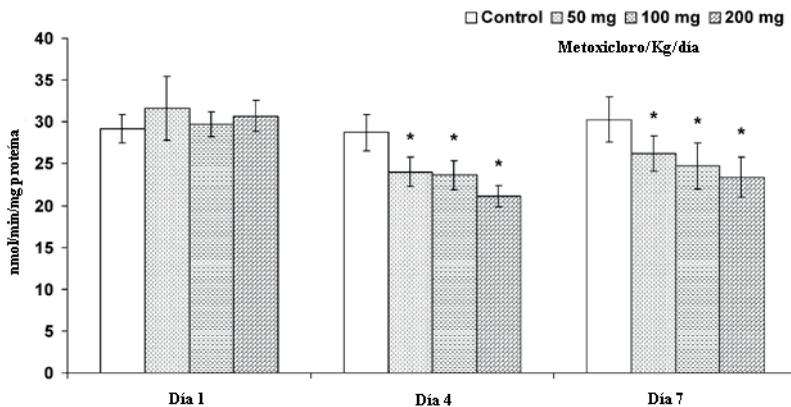


Figura 2. Efecto del metoxicloro sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa en testículo de rata adulta (adaptado de Latchoumycandane y Mathur, 2002)

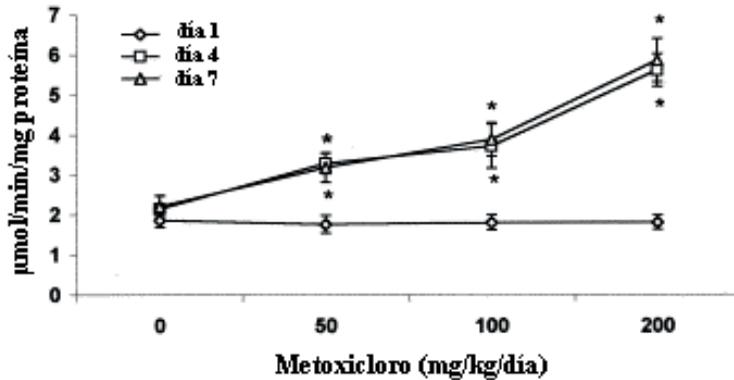


Figura 3. Efecto del metoxicloro sobre la peroxidación lipídica en epidídimo de rata adulta (adaptado de Latchoumycandane y col., 2002)

Estos mismos efectos han sido observados en ovario de ratón por Gupta y col. (2006). En este último estudio se evaluó, además, la producción de nitrotirosina, un marcador de la producción de especies reactivas del oxígeno, mediante inmunohistoquímica en ovario de animales tratados con el plaguicida.

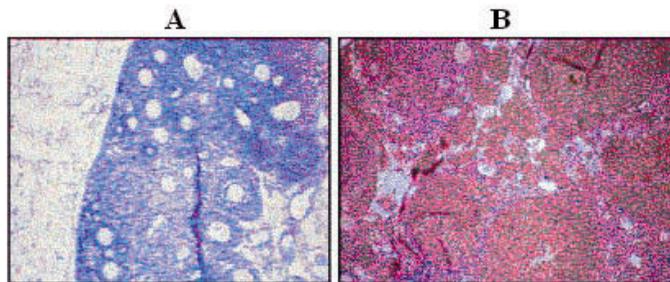


Figura 4. Efecto del metoxicloro sobre la producción de nitrotirosina en ovario de ratón control (panel A) y expuesto a metoxicloro (panel B). Se puede observar una tinción positiva para nitrotirosina (color rojo) en los animales tratados (adaptado de Gupta y col., 2006)

No sistema nervioso central, al igual que ocurre en el sistema reproductor, el metoxicloro induce efectos tóxicos a través de mecanismos en los que está implicado el estrés oxidativo. De hecho, Schuh y col. (2005) evidenciaron, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la exposición a este xenobiótico inhibe la respiración mitocondrial en

cerebro de rata (Figura 5), resultando en un incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno.

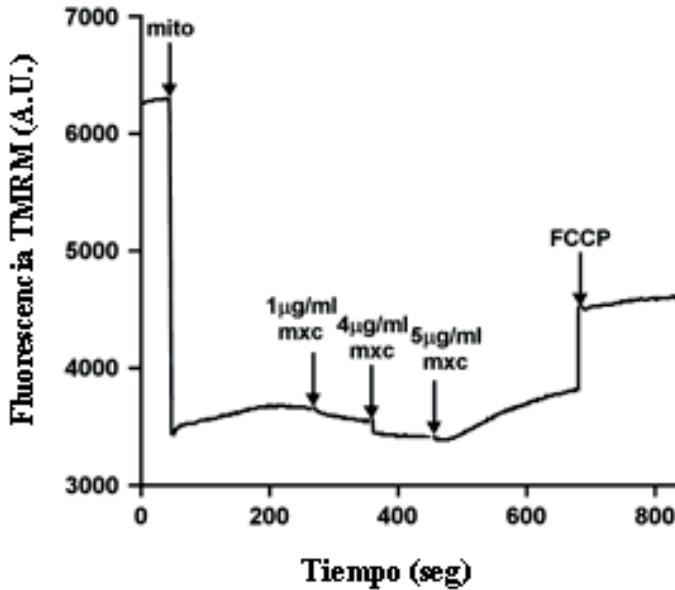


Figura 5. Representación gráfica de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, medido a través de la fluorescencia del tetrametil rodamina metil éster (TMRM), en muestras de cerebro de rata tras sucesivas adiciones de metoxicloro (mxc) (adaptado de Schuh y col., 2005)

Recientemente ha sido estudiado el papel del óxido nítrico en la inmunotoxicidad del metoxicloro. En este sentido, Kim y col. (2005) demostraron que este plaguicida altera la función inmune a través de un aumento de la expresión génica de iNOS y de la producción de óxido nítrico en macrófago de ratón. Este incremento de la síntesis de óxido nítrico conllevaría una sobreproducción de especies reactivas del nitrógeno, tales como peroxinitrito, relacionado con la patogénesis de numerosas enfermedades (Chirino y col., 2006).

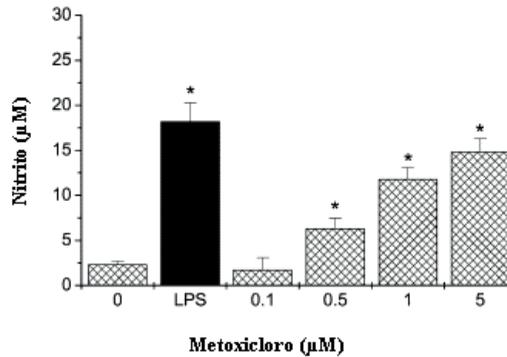


Figura 6. Efecto del metoxicloro sobre la producción de óxido nítrico en macrófago de ratón. Los niveles de producción de óxido nítrico se determinan mediante la medida de la acumulación de nitrito en el medio de cultivo (adaptado de Kim y col., 2005)

Por otra parte, tras el tratamiento con este mismo tóxico se han observado diversas alteraciones de la secreción episódica de prolactina a través de cambios en la síntesis de óxido nítrico en el eje hipotálamo-hipofisario (Lafuente y col., 2006).

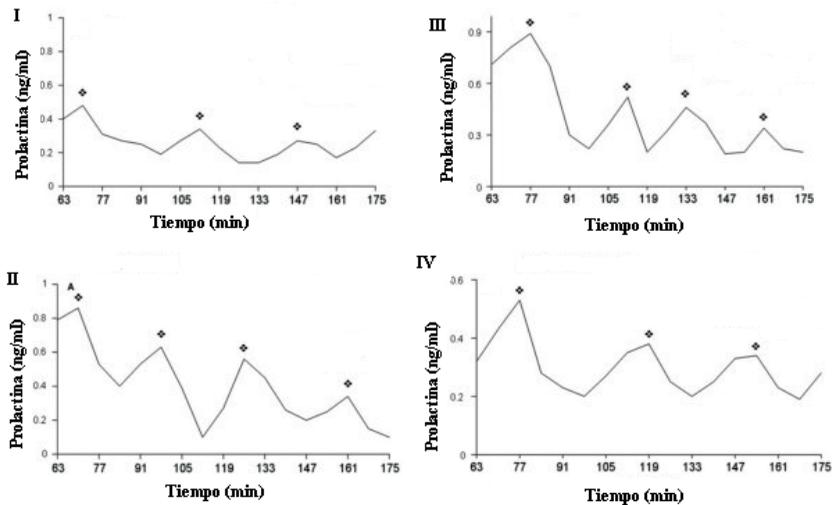


Figura 7. Patrón episódico de prolactina. Los asteriscos indican los pulsos de prolactina durante el periodo estudiado. Se muestra el patrón de prolactina en ratas control (panel I); en animales tratados con N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un bloqueante de la síntesis de óxido nítrico (panel II); en ratas expuestas a metoxicloro (panel III); y en animales tratados con metoxicloro y L-NAME (panel IV) (adaptado de Lafuente y col., 2006)

BIBLIOGRAFÍA

- Borgeest, C., Symonds, D., Mayer, L. P., y col. (2002). *Toxicol. Sci.*, 68, 473-478.
- Botella, B., Crespo, J., Rivas, A., y col. (2004). *Environ. Res.*, 96, 34-40.
- Chirino, Y. I., Orozco-Ibarra, M., Pedraza-Chaverri, J. (2006). *Rev. Invest. Clin.*, 58, 350-358.
- Fernández-Álvarez, A., Abudara, V., Morales, F. R. (1999). *Actas Fisiol.*, 5, 39-77.
- Gunderson, E. (1988). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1200-1209.
- Gupta, R. K., Schuh, R. A., Fiskum, G., y col. (2006). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 216, 436-445.
- Hogg, N., Kalyanaraman, B. (1999). *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 378-384.
- Kale, M., Rathore, N., John, S., y col. (1999). *Toxicol. Lett.*, 105, 197-205.
- Kim, J. Y., Oh, K. N., Han, E. H., y col. (2005). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333, 1234-1240.
- Koner, B. C., Bannerjee, B. D., Ray, A. (1998). *Ind. J. Exp. Biol.*, 36, 395-398.
- Lafuente, A., Cabaleiro, T., Cano, P., y col. (2006). *J. Circadian Rhythms*, 4, 3.
- Lafuente, A., Cabaleiro, T., Caride, A., y col. (2007). *J. Physiol. Biochem.*, 63, 171-177.
- Latchoumycandane, C., Chitra, K. C., Mathur, P. P. (2002). *Reprod. Toxicol.*, 16, 161-172.
- Latchoumycandane, C., Mathur, P. P. (2002). *Arch. Toxicol.*, 76, 692-698.
- McCormack, A. L., Atienza, J. G., Johnston, L. C., y col. (2005). *J. Neurochem.*, 93, 1030-1037.
- Schuh, R. A., Kristian, T., Gupta, R. K., y col. (2005). *Toxicol. Sci.*, 88, 495-504.

RADICALES LIBRES Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Rafael Balaña Fouce

Dpto. Ciencias Biomédicas. Facultad de Veterinaria. Universidad de León

La apoptosis es una forma de muerte celular programada (PCD del inglés “*programmed cell death*”) propia de los organismos pluricelulares. Se trata de uno de los principales tipos de PCD y comprende una serie de procesos bioquímicos que inducen cambios morfológicos específicos en las células anteriores a su muerte. Estos cambios morfológicos incluyen la vacuolización, cambios en la membrana celular como la pérdida de la asimetría y del acoplamiento, colapso celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina, y fragmentación del ADN genómico. Durante la apoptosis, las células desempeñan un papel activo y controlado de su propia muerte (por lo que se ha hablado de suicidio celular), mientras que en la necrosis la muerte celular es un proceso descontrolado que conduce a la lisis de las células y a la inducción de una respuesta inflamatoria.

La investigación en apoptosis ha experimentado un sustancial desarrollo durante la década de los noventa. Además de su importancia como fenómeno biológico, se han establecido relaciones entre procesos apoptóticos defectuosos y una gran variedad de enfermedades que no habían tenido explicación sin el conocimiento de dicho proceso. La importancia de este campo de investigación fue reconocida el 7 de octubre de 2002 con el Premio Nobel de Medicina concedido por las investigaciones sobre crecimiento y apoptosis en el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (Metzstein y col., 1998). El premio lo compartieron los Doctores H. Robert Horvitz del Instituto de Tecnología de Massachusetts (EEUU), Sydney Brenner del Instituto de Ciencias Moleculares Berkeley, CA (EEUU) y John E. Sulston, Instituto Wellcome Trust Sanger en Cambridge (GB).

Dada la novedad de este campo de investigación, muchos de los términos que se utilizan proceden de la literatura anglosajona, lo que les hace frecuentemente ilegibles para el lector no acostumbrado. Por esta razón hemos recopilado un amplio glosario de términos al final del capítulo.

La apoptosis como proceso fisiológico. La apoptosis se produce durante el desarrollo normal de los organismos pluricelulares y continúa durante toda su vida adulta (Lockshin y Zakeri, 2007). La combinación de la apoptosis y la proliferación celular es la encargada de dar forma a tejidos y órganos en el desarrollo embrionario (Penalosa y col., 2008). A diferencia de la necrosis, que es una forma traumática de muerte celular resultante de una lesión celular aguda, la apoptosis confiere ventajas al organismo durante su ciclo vital. Por ejemplo, la diferenciación de los dedos y los pies de un embrión humano en desarrollo se produce gracias a que las células de

los espacios interdigitales sufren un proceso de apoptosis; como resultado aparecen dedos separados. Se calcula que entre $50-70 \times 10^9$ células mueren cada día en un humano adulto medio debido a la apoptosis. Esto equivale a la proliferación y posterior destrucción de una masa celular igual al peso del cuerpo de un individuo en un año.

La apoptosis es también una parte importante de la regulación del sistema inmunológico. Los linfocitos T son células del sistema inmunológico responsables de la destrucción de células infectadas o dañadas en el cuerpo (Everett y McFadden, 1999). Los linfocitos T maduran en el timo, pero antes de que puedan entrar en el torrente sanguíneo, son puestas a prueba para asegurarse de que son eficaces contra antígenos extraños y para evitar que reaccionen frente a células sanas. Cualquier linfocito T inefectivo o auto-reactivo se elimina a través de la inducción de la apoptosis (Brenner y col., 2008).

Las alteraciones de la regulación de la apoptosis se han relacionado con procesos patológicos. El cáncer es una enfermedad que a menudo se caracteriza por una inhibición del proceso apoptótico. Las células cancerosas suelen tener cierto tipo de mutaciones que les permiten eludir las señales celulares de regulación de su crecimiento y proliferación. En circunstancias normales, las células dañadas se someten naturalmente a la apoptosis, a diferencia de las células cancerosas, cuyas mutaciones pueden haber ocurrido en los lugares que controlan este proceso. En estos casos no hay control de la proliferación celular y, en consecuencia, la enfermedad puede progresar a un tumor. Entender cómo se regula la apoptosis en procesos tumorales es de gran interés en el desarrollo de tratamientos contra esta enfermedad (Engelmann y Bauer, 2000; Pietsch y col., 2008).

Hay otras enfermedades relacionadas con una exacerbación del proceso apoptótico. Por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas como el parkinson o el alzheimer son procesos morbosos donde un exceso de apoptosis está relacionado con la pérdida progresiva de neuronas (Nunomura y col., 2007).

La apoptosis también es importante para el desarrollo normal de la placenta. En el trofoblasto las células de la placenta invaden el entorno uterino con el fin de remodelar los vasos sanguíneos maternos y ayudar a establecer y mantener la gestación (Dash y col., 2005). Para lograr este objetivo es necesario un control estricto sobre la proliferación celular y la apoptosis. En algunos casos este proceso puede verse comprometido y un exceso de apoptosis de las células de trofoblasto puede estar implicado en ciertas complicaciones de la gestación como la preeclampsia (Allaire y col., 2000).

La apoptosis desempeña un papel importante en la progresión de muchas enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, en la artritis reumatoide una excesiva proliferación

de células sinoviales puede ser debida en parte a la resistencia de estas células a los estímulos apoptóticos. En otros casos, la falta de regulación de la apoptosis de los linfocitos T puede originar células auto-reactivas que al entrar en la circulación sanguínea contribuyen a la aparición de enfermedades autoinmunes (Ortona y col., 2008).

El proceso de la apoptosis. Tras la recepción de señales específicas que inducen a las células a someterse a la apoptosis, se van a producir una serie de cambios morfológicos programados. Una familia de proteínas conocidas como caspasas (del inglés "*cysteine-aspartic acid proteases*") se activa normalmente en las primeras etapas de la apoptosis (Chowdhury y col., 2008). Estas proteasas se encargan de romper componentes celulares necesarios para la función normal de la célula incluyendo proteínas estructurales del citoesqueleto, proteínas nucleares y enzimas de reparación del ADN. Las caspasas también pueden activar otras enzimas degradativas, como ciertas endonucleasas, que desintegran el ADN genómico en pequeños fragmentos (Chen y Wang, 2002).

Las células apoptóticas cambian su morfología durante el proceso, empezando por una disminución en su volumen, como consecuencia de la destrucción de las láminas y los filamentos de actina del citoesqueleto. La ruptura de la cromatina en el núcleo conduce a menudo a la condensación nuclear (cariorrésis) que en muchos casos da lugar a que los núcleos apoptóticos adquieran forma de "herradura". Por último, la célula se fragmenta en pequeños cuerpos apoptóticos que facilitan su eliminación por los macrófagos sin inducir un proceso inflamatorio (Jin y El-Deiry, 2005). Estas células fagocíticas son las responsables de la limpieza de las células apoptóticas de los tejidos de una forma limpia y ordenada, evitando muchos de los problemas relacionados con la muerte celular necrótica. Con el fin de promover su fagocitosis, las células apoptóticas generan cambios en la membrana plasmática que desencadenan la respuesta de los macrófagos. Uno de esos cambios es la translocación de fosfatidilserina (PS) desde la cara interior de la membrana plasmática a la exterior (Kagan y col., 2000).

Los estímulos que inducen a una célula a entrar en apoptosis pueden ser extrínsecos, relacionados con la unión de ligandos inductores de muerte a receptores de membrana (Zimmermann y col., 2001). Estos ligandos puede ser factores solubles o pueden estar expresados en la superficie de las células como los linfocitos T citotóxicos. Estos últimos se producen cuando las células T reconocen células dañadas o infectadas con virus y ponen en marcha la apoptosis a fin de evitar que se conviertan en neoplásicas (cáncer) o que favorezcan la propagación de la infección. En otros casos la apoptosis puede iniciarse siguiendo señales intrínsecas que se producen como consecuencia de una situación de estrés. Las alteraciones de la fisiología celular que conducen a la apoptosis surgen en respuesta de la exposición a radiaciones, tóxicos,

deprivación de factores de crecimiento o estrés oxidativo causado por radicales libres. En general las señales intrínsecas inician la apoptosis por un proceso mediado por la mitocondria (Schultz y Harrington, 2003).

La proteína p53: arresto celular o apoptosis. La proteína p53 es un importante factor de transcripción de los organismos pluricelulares que participa activamente en la regulación del ciclo celular y actúa, por consiguiente, como supresor tumoral en la prevención del cáncer (Kern y col., 1991). La proteína p53 puede restringir el crecimiento celular induciendo la senescencia, parando el ciclo celular (en las fases G₁ y G₂) o induciendo la apoptosis. Los mecanismos bioquímicos utilizados por p53 para desencadenar estos procesos sólo se entienden parcialmente y son objeto de constante estudio. Entre los factores que intervienen en la activación de p53 se incluyen los niveles de expresión de la proteína, el tipo de señal de estrés, el tipo de células y el contexto celular en el momento del estrés (Haupt y col., 2003).

En condiciones normales p53 es una proteína de corta duración. El inhibidor Mdm2 de la p53 (Hdm2 en los seres humanos) es el responsable de la conservación de p53 en este estado. Mdm2 inhibe la actividad transcripcional de p53 y, lo que es más importante, promueve su degradación por el proteosoma (Chen y col., 1995). Sin embargo, la actividad transcripcional de p53 puede alterarse drásticamente cuando las células están expuestas a diferentes tipos de estrés, como la producción de radicales libres, el daño al ADN, la expresión inoportuna de oncogenes, la hipoxia y el agotamiento de nucleótidos, entre otros. La activación de p53 supone la estabilización de la proteína y el incremento de su unión al ADN y, por consiguiente, su actividad transcripcional. La participación de la proteína p53 en las diferentes rutas apoptóticas es uno de los objetivos que se comentarán en las diferentes secciones del presente capítulo.

La ruta extrínseca; papel de los receptores de muerte. Los receptores de muerte (DR del inglés “*death receptor*”) son proteínas de la superficie celular que transmiten las señales externas de muerte al unírseles ligandos específicos, tales como Fas, TNF- α y TRAIL. Desempeñan un papel importante en la apoptosis y pueden activar la cascada de caspasas en cuestión de segundos. La inducción de la apoptosis a través de este mecanismo es por lo tanto muy rápida (Schütze y col., 2008).

Se han descrito seis DRs: FasR, TNFR1, DR3, TRAIL-R1 (o DR4) TRAIL-R2 (o DR5), y DR6. Estos receptores están compuestos por tres cadenas polipéptidicas idénticas, tienen elementos de señalización y unión comunes, así como características individuales únicas. Cada uno de los seis DRs tiene un dominio de muerte (DD del inglés “*death domain*”) intracelular que funciona como un módulo de unión proteína-proteína que recluta diversas moléculas de señalización citosólica que conforman las rutas apoptóticas (Figura 1).

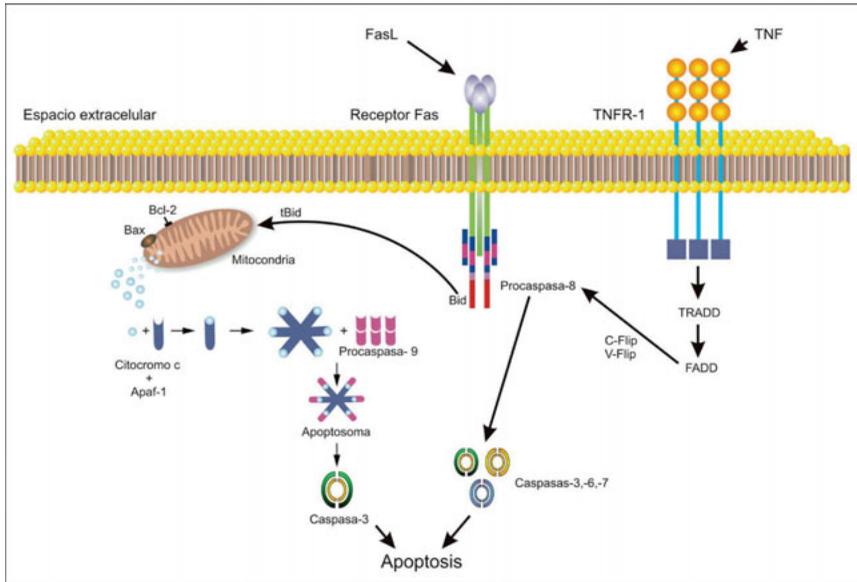


Figura 1. Rutas de regulación y control de la apoptosis

Aunque hay diferencias en las vías de señalización activadas por los distintos DR es posible diseñar un esquema general de este proceso. La unión de los ligandos de muerte a sus DR promueve su agrupamiento a gran escala en la superficie celular. Este agrupamiento de receptores es importante porque ayuda a completar la señalización de la apoptosis. En ausencia de dicha agrupación, algunas células como los linfocitos T son capaces de desencadenar la apoptosis, pero en la mayoría de los casos la amplificación de la vía de señalización es necesaria para activar una respuesta apoptótica completa.

Después de la unión del ligando se produce un cambio conformacional en los DD intracelulares de los receptores que permite el reclutamiento de varias proteínas apoptóticas citosólicas al receptor. Este complejo de proteínas se denomina DISC (del inglés “*Death-Inducing Signalling Complex*”). El paso final de este proceso es el reclutamiento de la pro-caspasa 8 por DISC que promueve su autoproteólisis y como consecuencia la iniciación de la apoptosis (Peter y Krammer, 2003).

Señalización ligada al receptor TNF- α . Las células T activadas y los macrófagos producen el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) como respuesta a la infección. Mediante la activación de su receptor, TNFR1, TNF- α puede inducir varios efectos (Chen y Goeddel, 2002). TNF- α puede inducir por sí sólo la apoptosis, pero a dife-

rencia del ligando Fas, TNF- α puede promover en cierto tipo de células, la activación de NF- κ B y AP-1, que son factores de transcripción primarios involucrados en la proliferación y supervivencia celular.

La unión de TNF- α a su receptor provoca su trimerización y la consecuente agrupación de sus DD. Esto permite la unión de una molécula adaptadora llamada TRADD (del inglés "*Tumor necrosis factor Receptor-1-Associated Death Domain protein*") a través de las interacciones entre los DD (Shakibaei y col., 2005). TRADD también puede asociarse con FADD (del inglés "*Fas-Associated Death Domain*") lo que conduce a la inducción de la apoptosis a través del reclutamiento y activación de la pro-caspasa 8.

Señalización por Fas (CD95). El ligando Fas (llamado también CD95L) activa la apoptosis de forma similar a la del receptor de TNF- α . La unión de Fas a su receptor (FasR) provoca su trimerización, el establecimiento intracelular de su correspondiente DISC y la activación de la cascada de caspasas (Schütze y col., 2008). Sin embargo, la señalización mediada por FasR es ligeramente más sencilla que la de TNFR1. La proteína adaptadora FADD puede ser reclutada directamente por el DD sin que sea necesaria la presencia de TRADD. FADD servirá para reclutar moléculas de pro-caspasa 8 al complejo de señalización Fas por interacciones homotípicas entre los dominios efectores de muerte de cada proteína (Scaffidi y col., 1998).

La inducción de la apoptosis por TRAIL. La inducción de la apoptosis por TRAIL (del inglés "*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*") es similar a la de Fas al unirse a su receptor (Bedi, 2002). La unión de TRAIL a sus receptores DR4 o DR5 desencadena rápidamente la apoptosis en la mayoría de las células estudiadas. Además, se han descrito receptores señuelo que pueden competir por la unión de TRAIL a DR4 y DR5. Estos señuelos se llaman DcR1 y DcR2 y son capaces de competir con DR4 o DR5 para la unión de su ligando, sin embargo la unión a estos receptores no desencadena la apoptosis. Por un lado DcR1 carece de DD, mientras que DcR2 tiene truncado un fragmento de 4 a 6 aminoácidos en el DD necesarios para el reclutamiento de proteínas adaptadoras (Ashkenazi y Dixit, 1999).

La ruta intrínseca. Papel de la mitocondria en la apoptosis. La mitocondria es el lugar donde se realiza el metabolismo oxidativo de los eucariotas, proporcionando ATP a través de la fosforilación oxidativa y el citocromo c. La función mitocondrial parece ser crítica en la ejecución del programa de muerte de algunas células, y la activación de estos orgánulos celulares es un elemento crucial para la coordinación e integración de la apoptosis (Smith y col., 2008). La mitocondria contiene muchas proteínas pro-apoptóticas tales como el Factor Inductor de la Apoptosis (AIF del inglés "*Apoptosis Inducing Factor*"), Smac (del inglés "*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*")/DIABLO y el citocromo c. Estos factores son liberados al

citoplasma a través de los denominados poros de permeabilidad transitoria (poros PT) que se forman en la membrana externa. Los poros PT se forman por la acción de ciertos miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, que a su vez son activados por factores tales como el estrés, los radicales libres de oxígeno (ROS) y nitrógeno o la privación de factores de crecimiento (Orrenius, 2007). La mitocondria participa también amplificando la señalización apoptótica de los receptores de muerte mediante la activación de la proteína Bid (un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) mediada por la caspasa 8.

El papel de las proteínas Bcl-2. Las proteínas de la familia Bcl-2 participan de distintas maneras en la ruta intrínseca de la apoptosis. Algunos de sus miembros (Bcl-2 y Bcl-XL) son proteínas anti-apoptóticas, mientras que otros (como Bad, Bax o Bid) son, por el contrario, proteínas pro-apoptóticas (Youle y Strasser, 2008). La sensibilidad de las células a los estímulos apoptóticos intrínsecos va a depender del balance en la expresión de los miembros de esta familia. Cuando hay un exceso de proteínas pro-apoptóticas las células son más sensibles a experimentar apoptosis, por el contrario, cuando existe un exceso de proteínas anti-apoptóticas las células son más resistentes a sufrir este proceso (Adams y Cory, 2001).

La familia Bcl-2 comprende tanto a proteínas anti-apoptóticas (pro-supervivencia) como pro-apoptóticas (pro-muerte). Los miembros de la familia se clasifican sobre la base de su semejanza estructural con los dominios de homología (BH) a Bcl-2 (BH₁, BH₂, BH₃ y BH₄) y un dominio de transmembrana. Los miembros con función anti-apoptótica son Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1 contienen los cuatro dominios BH conservados. Además de los dominios externos, los miembros de esta familia contienen dominios transmembrana que sirven para su anclaje a la membrana externa de la mitocondria. Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 contienen tres dominios BH (BH₁, BH₂ y BH₃) pero carecen del dominio BH₄; entre estas proteínas destacaremos Bak, Bax y Bok. A pesar de que todos los miembros de la familia Bcl-2 contienen un dominio BH₃, éste parece ser especialmente importante en las proteínas con función pro-apoptótica. La sobreexpresión de Bak promueve la muerte por apoptosis en contraposición de Bcl-2 expresado en condiciones salvajes. El dominio BH₃ es suficiente, aunque no necesario, para la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas. El tercer grupo de proteínas Bcl-2 son aquellas que tienen solamente en común el dominio BH₃, y que se comportan como proteínas pro-apoptóticas: Bad, Bid, Bik, Bim, Blk y Hrk. Bad y Bid carecen de dominio transmembrana y por lo tanto están dispersas en el citoplasma. Estas dos proteínas parecen ejercer su acción pro-apoptótica formando heterodímeros con Bcl-2 y Bcl-XL (Wong y Puthalakath, 2008).

Los miembros de la familia Bcl-2 asociados con la membrana externa de la mitocondria no sólo tienen actividad ligada al receptor mediada por sus dominios BH,

sino que también pueden afectar a la integridad de la mitocondria alterando el tráfico de ATP, el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y configurando poros PT por los que el citocromo c se va a liberar al citoplasma. La liberación de citocromo c al citosol va acompañada de una disipación del $\Delta\Psi$ mitocondrial que se atribuye a la apertura de los poros PT cuya composición bioquímica es aún desconocida.

En función de la composición en dominios BH las proteínas de la familia Bcl-2 homodimerizarán o heterodimerizarán, dando lugar a su función pro- o anti-apoptótica, respectivamente. Las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 tienen localización citoplasmática y actúan como sensores de estrés y/o daño celular. Tras una señal de estrés, estas proteínas se relocalizan en la superficie de la mitocondria donde interactúan con sus homólogos anti-apoptóticos alterando su función inhibitoria y originando la formación de poros PT (Murphy y col., 2000). La liberación de citocromo c de la mitocondria es un proceso particularmente importante en la inducción de la apoptosis, ya que conduce a la formación del apoptosoma, un complejo de proteasas muy activo en las fases finales de ejecución de la apoptosis (Ow y col., 2008).

Bid una unión entre las rutas extrínseca e intrínseca. La proteína pro-apoptótica Bid se distingue de otras por conectar la activación de los DR de la ruta extrínseca con la activación de los procesos asociados con los trastornos mitocondriales de la ruta intrínseca. La activación de Bid supone su procesamiento citoplasmático por la caspasa-8 para exponer un nuevo N-terminal de residuos de glicina que se somete a la miristoilación post-traducciona (Belka y col., 2000). La proteína Bid miristoilada se traslada a la mitocondria, se inserta en la membrana y activa Bax y Bak para iniciar la ruta intrínseca que conduce a la formación del apoptosoma. El gen *BID* es regulado post-transcripcionalmente por p53 como respuesta a la radiación- γ a través de elementos reactivos en el primer intrón del gen humano o en el promotor del gen del ratón. La quimiosensibilidad celular a los compuestos genotóxicos adriamicina y 5-fluorouracilo parece depender de la presencia de p53 y Bid inalterados. Mutantes nulos en Bid son resistentes a los efectos de estos fármacos.

La fase de ejecución: caspasas y apoptosis. Las caspasas son una familia de proteínas encargadas de la ejecución final de la apoptosis. Las caspasas pertenecen a un grupo de enzimas conocidas como cisteín-proteasas que existen dentro de la célula como zimógenos inactivos. La hidrólisis de estos zimógenos origina las formas enzimáticamente activas que participan en las fases finales de la apoptosis (Budihandjo y col., 1999).

La inducción de la apoptosis a través de los DR provoca la activación de caspasas iniciadoras 8 y 10 en la fase extrínseca. Por su parte, la activación de las caspasas 9 y 2 responde a los cambios en el $\Delta\Psi$ mitocondrial en la ruta intrínseca. La activación de las caspasas iniciadoras produce el procesamiento de las caspasas ejecutoras 3,

6 y 7 que son las responsables de la destrucción de las proteínas del citoesqueleto y originan los cambios morfológicos típicos observados en las células apoptóticas.

La proteína p53 estimula la activación de la cascada de caspasas por mecanismos dependientes e independientes de transcripción. Como respuesta a la irradiación- γ de extractos de células S100 (libres de núcleos) la p53 puede activar por sí sola la caspasa-8. Sin embargo, la muerte mediada por el compuesto genotóxico etopósido en fibroblastos procedentes de ratones deficientes en caspasa-8 no se ve afectada. Por lo tanto, la caspasa-8 puede contribuir, aunque no siempre es esencial, a inducir la muerte por apoptosis en células con el ADN dañado. Además, la proteína p53 estimula la caspasa-6 al interactuar con un elemento de respuesta en el tercer intrón de su gen codificante (MacLachlan y El-Deiry, 2002). La caspasa-6 destruye la proteína de la lámina nuclear A y varios factores de transcripción (Galande y col., 2001). Además, la caspasa-6 juega un papel importante en la muerte neuronal inducida por p53 y es la principal proteína implicada en la destrucción de la proteína precursora amiloide (LeBlanc y col., 1999).

El apoptosoma. Además de la activación de los DR, existen otros mecanismos moleculares para activar la cascada de caspasas. Por ejemplo, al añadir granzima B a linfocitos-T citotóxicos, se activan las caspasas 3, 7, 8 y 10. Las mitocondrias son también reguladores principales de la cascada de caspasas y de la apoptosis. La liberación del citocromo c de las mitocondrias puede conducir a la activación de la caspasa 9 y luego de la caspasa 3. Este proceso está mediado por la formación del apoptosoma, un complejo proteínico compuesto por citocromo c, Apaf-1 y procaspasa 9 (D'Amelio y col., 2008). La unión de ésta última facilita su autoprocésamiento, dando lugar a la forma activa de caspasa-9, que es una caspasa iniciadora capaz de activar caspasas ejecutoras tales como la caspasa 3 (Figura 1).

La proteína Apaf-1 (del inglés "*Apoptosis protease-activating factor-1*") es un regulador clave de la vía apoptótica mitocondrial, siendo el elemento central del apoptosoma. La proteína p53 induce la liberación de citocromo c de la mitocondria mediante la inducción de genes diana que codifican proteínas con un único dominio BH₃. Es importante destacar que p53 induce también la expresión del gen codificante *APAF-1* a través de un elemento de respuesta dentro de su promotor (Schuler y Green, 2001).

Caspasas y la destrucción de la cromatina. Una de las características de la apoptosis es la degradación del ADN cromosómico en unidades nucleosomales. Las caspasas juegan un papel importante en este proceso mediante la activación de endonucleasas que digieren el ADN en secuencias concretas, interviniendo además en la inhibición de enzimas de reparación del ADN y la destrucción de proteínas estructurales del núcleo.

En primer lugar, la fragmentación del ADN en unidades nucleosomales es producida por una endonucleasa conocida como CAD (del inglés “*Caspase Activated DNase*”). CAD existe normalmente como un complejo inactivado por la proteína ICAD (del inglés “*Inhibitor of CAD*”). Durante la apoptosis, ICAD es digerido por la caspasa 3 liberando CAD activo que produce la rápida fragmentación del ADN nuclear. En segundo lugar, se produce una inactivación de enzimas de reparación del ADN (Nagata, 2000). La enzima poli (ADP-ribosa)-polimerasa – que es una importante enzima de reparación – fue una de las primeras proteínas identificadas como sustrato de la caspasa 3 (Chiarugi y Moskowitz, 2002). Por último, las caspasas ejecutoras van a digerir las proteínas de la envoltura nuclear, como la lámina A que mantienen la forma del núcleo e intervienen en las interacciones entre la cromatina y la membrana nuclear. La degradación de la lámina A por la caspasa 6 origina la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo (Utz y Anderson, 2000).

Reconocimiento y eliminación de células apoptóticas. Después de todos los procesos descritos con anterioridad, se van a producir una serie de cambios en la membrana plasmática que conducen a la exposición de la PS desde la cara interna de la membrana plasmática al exterior de la célula. De los lípidos que componen la membrana plasmática, únicamente la PS se encuentra en su cara interna, no estando en contacto con los componentes de la sangre. Además, se van a producir cambios internos que afectan a la morfología del núcleo y a la desintegración del ADN genómico por CAD en fragmentos de 180 a 200 kpb (escaleras de ADN) que se separarán en los cuerpos y/o vesículas apoptóticas. Las vesículas apoptóticas son eliminadas por fagocitosis, por lo que para ser reconocidas por los macrófagos no es suficiente con que inviertan la posición de la PS, sino que deben existir otro tipo de receptores expresados específicamente para su reconocimiento. El anticoagulante Anexina V unido a un tinte fluorescente se une a la PS traslocada al exterior de la célula apoptótica permitiendo una fácil detección mediante técnicas de citometría de flujo y/o microscopía de fluorescencia (Blankenberg, 2008). Los cuerpos apoptóticos son rápidamente eliminados por macrófagos o células dendríticas antes de que puedan necrotizar y comenzar un proceso inflamatorio; de esta manera se evitan procesos autoreactivos y autoinmunes.

Abreviaturas: PCD: Programmed Cell Death; PS: fosfatidilserina; DR: Death Receptor; DD: Death Domain; DISC: Death-Inducing Signalling Complex; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa; TRADD: Tumor Necrosis Factor Receptor-1–Associated Death Domain; FADD: Fas-Associated Death Domain; TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand; AIF: Apoptosis Inducing Factor; SMAC: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases; poros PT: poros de Permeabilidad Transitoria; ROS: Reactive Oxygen Species; $\Delta\Psi$: potencial de membrana mitocondrial; Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1; CAD: Caspase Activated DNase; ICAD: Inhibidor de CAD

Glosario de términos en orden alfabético

Anexina V: Proteínas que se unen a fosfolípidos en presencia de calcio. Cuando se establece la apoptosis, la fosfatidil serina se trasloca a la cara externa de la membrana plasmática quedando expuesta al medio externo. Este movimiento de la fosfatidil serina es un indicador de apoptosis temprana. La anexina V se une fuerte y específicamente a la fosfatidil serina y sirve como indicador de apoptosis por métodos de microscopía y/o citometría de flujo.

Apaf-1: Factor activador de proteasas apoptósicas-1. Apaf-1 es una proteína adaptadora asociada a la ruta intrínseca de la apoptosis se une a la pro-caspasa 9 a través del dominio de activación y reclutamiento, originando la activación de la caspasa 9 en presencia de citocromo c y ATP conduciendo a la cascada de proteasas apoptóticas.

AIF: Factor inductor de la apoptosis. Flavoproteína mitocondrial con homología con las oxidoreductasas bacterianas. Puede inducir cambios morfológicos apoptóticos en el núcleo por una ruta independiente de las caspasas.

Bad: Miembro pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2. Bad comparte identidad con Bcl-2 únicamente en el dominio BH₃ y forma heterodímeros con Bcl-2 y Bcl-XL previniendo la acción anti-apoptótica de éstas y promoviendo la apoptosis.

Familia de proteínas Bcl-2: Los miembros de esta familia tienen tanto propiedades pro- como anti-apoptóticas. Todos los miembros tienen al menos uno de los cuatro motivos de homología con Bcl-2 o dominios BH (BH₁ a BH₄), que intervienen en la interacción entre proteínas. Los miembros con propiedades anti-apoptóticas incluyen: Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1. Por su parte los miembros con propiedades pro-apoptóticas incluye a: Bax, Bak y Bok y comparten tres dominios BH (BH1, BH2, BH3). Una subfamilia adicional con un único dominio BH₃ en común son las proteínas pro-apoptóticas: Bik, Hrk, Bim, BIK, Bad, y Bid. El dominio BH3 es el que confiere propiedades pro-apoptóticas al unirse y antagonizar con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL.

CAD: ADNasa activada por caspasas. Endonucleasa endógena que fragmenta el ADN celular y que se utiliza como marcador de la apoptosis.

Caspasas 1-14: Cisteín proteasas activadas por aspartato. Las caspasas existen como zimógenos inactivos y tienen que ser activadas de forma progresiva formando una cascada. Después de su activación, sus dianas son el ADN y el citoesqueleto de la célula, interviniendo de manera decisiva en la formación de los cuerpos o vesículas apoptóticas.

Citocromo c: Proteína mitocondrial asociada normalmente a la fosforilación oxidativa. Durante la ruta intrínseca de la apoptosis el citocromo c se libera al citoplasma a través de los poros PT, donde se une a Apaf-1 induciendo el autoprocésamiento de la pro-caspasa 9 en el apoptosoma. La liberación del citocromo c al citoplasma está regulada por los miembros de la familia de proteínas pro- y anti-apoptóticas Bcl-2.

DD: Dominio de muerte. Fragmento intracelular de los DR que es crítico en los procesos de señalización de la ruta extrínseca de la apoptosis.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte. Es un complejo de proteínas que incorpora a los DD citosólicos de los DR (por ejemplo de FasR), una proteína adaptadora (por ejemplo FADD) y la caspasa 8 en la ruta apoptótica extrínseca.

DR: Receptores de muerte. Miembros de la superfamilia de receptores del TNF. Intervienen en la señalización de la ruta extrínseca de la apoptosis.

FADD: Proteína adaptadora asociada al DD Fas. FADD es una molécula esencial en el reclutamiento de la pro-caspasa 8 durante la inducción de la apoptosis por el ligando Fas.

Fas: (llamado también CD95 y Apo-1) Ligando de Fas, proteína homotrimérica perteneciente a la familia de TNF.

FasR: Receptor del ligando Fas de la superficie celular miembro de la superfamilia de receptores TNF. El DD citoplasmático de Fas se asocia con FADD que actúa como adaptador en el reclutamiento de la pro-caspasa 8 que se autoprocésará para iniciar la ruta extrínseca de la apoptosis.

Granzima B: Serín proteasa presente en los gránulos de las células NK (natural killers) y de los linfocitos T citotóxicos. Granzima B pertenece a una familia de 11 serín proteasas que degradan proteínas induciendo PCD por la activación de diferentes cascadas de caspasas. La granzima B promueve la liberación del citocromo c de la mitocondria

ICAD: Inhibidor de la endonucleasa CAD. Tiene la función de una chaperona activada por caspasas durante su síntesis. Permanece acomplejada a CAD inhibiendo su actividad endonucleasa. Las caspasas activadas durante la apoptosis degradan ICAD liberando la endonucleasa en el núcleo y permitiendo la degradación del ADN genómico en fragmentos de 180 a 200 kpb.

p53: Supresor proteico nuclear del cáncer humano que actúa como regulador crítico en la supervivencia y proliferación celular. Esta fosfoproteína nuclear de 393 amino ácidos regula la expresión de los genes codificantes DR en la inducción de la apoptosis. Estos incluyen Fas y el TNF relacionado con la inducción de apoptosis ligada a DR5. En algunos tipos de tumores (como en el cáncer de mama) puede establecerse una relación entre el funcionamiento anormal de p53 y un pronóstico adverso.

poroPT: poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria: poro reversible de la membrana interna mitocondrial inducido por Ca^{2+} que permite la liberación de componentes mitocondriales presentes en el espacio intermembranoso.

PS: fosfatidil serina. Lípido situado en la cara interna de la membrana plasmática que se externaliza durante la apoptosis y sirve como criterio diagnóstico.

Smac/DIABLO: Activador secundario de caspasas derivado de la mitocondria humana. El equivalente murino, DIABLO es un inhibidor directo de la apoptosis por unión a proteínas con bajo punto isoeléctrico. Tras la liberación de las mitocondrias, elimina el efecto inhibitorio de muchos inhibidores de proteínas apoptóticas.

TNF: Familia de ligandos del factor de necrosis tumoral. Han sido identificados al menos 16 miembros. La mayoría de los miembros se sintetizan como precursores transmembrana de tipo II. Sus dominios extracelulares pueden ser escindidos por metaloproteínas formando citoquinas solubles. Tanto las formas solubles como las de membrana se unen a los receptores de la familia de receptores TNF.

TNFR1: Miembro de la superfamilia de receptores del TNF que posee un DD. Otros miembros de esta superfamilia: FasR, DR3, TRAIL1, TRAIL2 y DR6. Cada uno de estos receptores puede iniciar directamente la apoptosis.

TRADD: Dominio de muerte asociado al receptor de TNF. Se une TFR1, pero a diferencia del DD asociado a Fas, el TRADD no lleva un dominio efector de muerte, y su DD es responsable de la apoptosis mediada.

Actúa como una plataforma adaptadora en el reclutamiento de varias moléculas de señalización para la activación del receptor.

TRAIL: TNF relacionado con el ligando inductor de apoptosis (también llamado Apo-2) es un tipo de proteína transmembrana de tipo II que pertenece a la superfamilia del TNF, que inducen la apoptosis en una amplia gama de células transformadas pero no en células normales. Se han descrito dos DR (TRAILR1/DR4 y TRAILR2/DR5) y otros dos receptores no inductores de muerte (TRAILR3/DcR1 y TRAILR4/DcR2). Participan de manera crucial en la supresión de la metástasis tumoral e inhiben la activación de los linfocitos T, progresión del ciclo celular, y producción de citoquinas en células T autoreactivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.M., Cory, S. (2001). *Trends in Biochem. Sc.*, 26, 61-66.
- Allaire, A.D., Ballenger, K.A., Wells, S.R., y col. (2000). *Obstet. and Gynecol.*, 96, 271-276.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1999). *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 255-60.
- Bedi, A. (2002). *Cancer Biol. Ther.*, 1, 638-639.
- Belka, C., Rudner, J., Wesselborg, S., y col. (2000). *Oncogene*, 19, 1181-1190.
- Blankenberg, F.G. (2008). *J. Nucl. Med.*, 49, 81S-95S.
- Brenner, D., Krammer, P.H., Arnold, R. (2008). *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, 66, 52-64.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., y col. (1999). *Ann. Rev. of Cell Develop. Biol.*, 15, 269-290.
- Chen, G., Goeddel, D.V. (2002). *Science*, 296, 1634-1635.
- Chen, J., Lin, J., Levine, A.J. (1995). *Mol. Med.*, 1, 142-152.
- Chen, M., Wang, J. (2002). *Apoptosis*, 7, 313-319 (2002).
- Chiarugi, A., Moskowitz, M.A. (2002). *Science*, 297, 259-263.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K. (2008). *Comp. Biochem. and Physiol. B*, 151, 10-27.
- D'Amelio, M., Tino, E., Cecconi, F. (2008). *Pharma. Res.*, 25, 740-751.
- Dash, P.R., Whitley, G.S., Ayling, L.J., y col. (2005). *Cell. Signall.*, 17, 571-580.
- Engelmann, I., Bauer, G. (2000). *Anticancer Res.*, 20, 2297-2306.
- Everett, H., McFadden, G. (1999). *Trends Microbiol.*, 7, 160-165.
- Galande, S., Dickinson, L.A., Mian, I.S., y col. (2001). *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5591-5604.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., y col., (2003). *J. Cell Sc.*, 116, 4077-4085.
- Jin, Z., El-Deiry, W.S. (2005). *Cancer Biol. Ther.*, 4, 139-163.
- Kagan, V.E., Fabisiak, J.P., Shvedova, A.A., y col. (2000). *FEBS Lett.*, 477, 1-7.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., y col. (1991). *Science*, 252, 1708-1711.
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., y col. (1999). *J. Biol. Chem.*, 274, 23426-23436.
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z. (2007). *J. Cell. Mol. Med.*, 11, 1214-1224.
- MacLachlan, T.K., El-Deiry, W.S. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 9492-9497.
- Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., Horvitz, H.R. (1998). *Trends Genet.*, 14, 410-416.
- Murphy, K.M., Ranganathan, V., Farnsworth, M.L., y col. (2000). *Cell Death Differ.*, 7, 102-111.
- Nagata, S. (2000). *Exp. Cell Res.*, 256, 12-18.
- Nunomura, A., Moreira, P.I., Lee, H.G., y col. (2007). *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets*, 6, 411-423.
- Orrenius, S. (2007). *Drug Metab. Rev.*, 39, 443-455

Ortona, E., Margutti, P., Matarrese, P., y col. (2008). *Autoimmun. Rev.*, 7, 579-584.

Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., y col. (2008). *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 532-542.

Penaloza, C., Orlanski, S., Ye, Y., y col. (2008). *Curr. Pharma. Design*, 14, 184-196.

Peter, M.E., Krammer, P.H. (2003). *Cell Death Differ.*, 10, 26-35.

Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B., y col. (2008). *Oncogene*, 27, 6507-6521.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., y col (1998). *EMBO J.*, 17, 1675-1687.

Schuler, M., Green, D.R. (2001). *Biochem. Soc. T.*, 29, 684-688.

Schultz, D.R., Harrington, W.J. Jr. (2003). *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32, 345-369.

Schütze, S., Tchikov, V., Schneider-Brachert, W. (2008). *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 655-662

Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., Takada, Y., y col (2005). *Antiox. Redox Sign.*, 7, 482-496.

Smith, D.J., Ng, H., Kluck, R.M., Nagley, P. (2008). *IUBMB Life*, 60, 383-389.

Utz, P.J., Anderson, P. (2000). *Cell Death Differ.*, 7, 589-602.

Wong, W.W., Puthalakath, H. (2008). *IUBMB Life*, 60, 390-397.

Youle, R.J., Strasser, A. (2008). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 47-59.

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. (2001). *Pharma. Therapeut.*, 92, 57-70.

NEUROTOXICIDAD, ESTRÉS OXIDATIVO, ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y ANTIOXIDANTES

M^a. Anunciación Lafuente

Laboratorio de Toxicología. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo

Estrés oxidativo y neurotoxicidad

Durante la evolución de los organismos, la supervivencia en un medio ambiente aeróbico pasó por la generación de respuestas de adaptación, tanto para el metabolismo oxidativo endógeno como para los productos químicos y radiación de bajo nivel a que se encontraban expuestos y que conllevaban la generación de radicales libres, lo que dio lugar a diversos sistemas de defensa antioxidantes (Genestra, 2007). En el organismo se produce un estado de estrés oxidativo debido a la generación excesiva de radicales libres y/o al déficit en estos mecanismos antioxidantes, con el consiguiente daño celular y tisular, lesiones agudas o degenerativas, necrosis, muerte celular, etc. (Sies, 1991).

La mayor parte de las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas en la célula están relacionadas con la reducción incompleta del oxígeno en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, estimándose que el 1% del flujo de electrones mitocondrial interviene en la formación de radicales superóxido (Lass y col., 1997). Como podemos observar en la Figura 1 (Sayre y col., 2008), la producción mitocondrial de ROS parte de la formación del anión superóxido al captar el O_2 , un electrón de la cadena de transporte electrónico. Este anión puede transformarse en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente, el H_2O_2 dará lugar al radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (en la que participan metales de transición en estado iónico). En ausencia de SOD, la dismutación del anión superóxido da lugar a la generación del oxígeno singlete, o bien puede reaccionar con óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito.

El daño oxidativo producido en las macromoléculas biológicas por ROS ha sido vinculado a la fisiopatología de numerosas enfermedades, tales como la aterosclerosis, cáncer, cataratas, enfermedad de parkinson (EP), enfermedad de alzheimer (EA), diabetes, artritis, enfermedades autoinmunes e inflamaciones crónicas, entre otras, y acelera el proceso biológico del envejecimiento. En el caso del cáncer, las ROS producen una oxidación del material genético y en lípidos, dando lugar a productos como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, que son potentes mutágenos y modulan las vías de señalización implicadas en la proliferación y la apoptosis, dos procesos relacionados con el desarrollo de cáncer (Márquez y col., 2007).

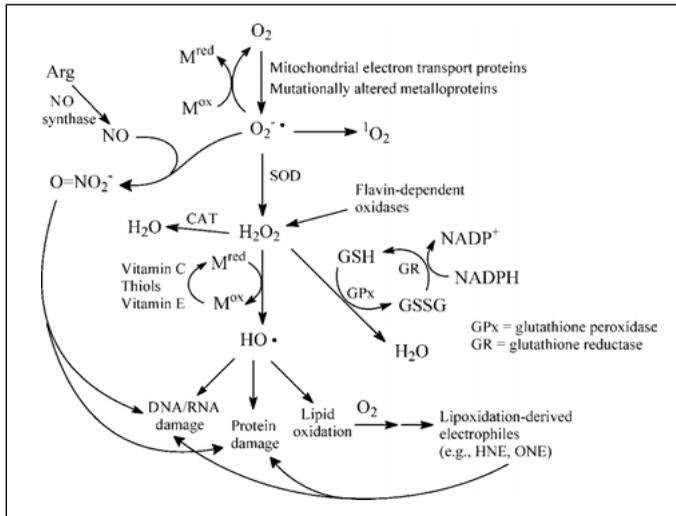


Figura 1. Producción mitocondrial de ROS

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente sensible al estrés oxidativo debido a su gran consumo de O_2 , y a que presenta concentraciones relativamente bajas de antioxidantes endógenos (vitamina C, catalasa, superóxido dismutasa, etc.), y niveles elevados de lípidos poliinsaturados, los cuales son muy susceptibles a la oxidación. A nivel de SNC, los radicales libres se pueden generar como resultado de la respiración mitocondrial, como consecuencia de procesos inflamatorios, o bien por una excesiva exposición a radiaciones o compuestos tóxicos (Blass y Gibson, 1999). Durante los procesos inflamatorios el sistema mielóide, que constituye un mecanismo de defensa frente a infecciones a través de la producción de radicales libres y ROS, se activa y sufre cambios morfológicos transformándose en microglía amebóide (Kreutzberg, 1996; Aloisi y col., 1999). Ésta secreta factores solubles, la mayoría de los cuales son proinflamatorios y neurotóxicos, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina-1 β (IL-1 β), prostaglandina E2 (PGE2), NO

y ROS (Blanco y col., 2008). La sobreproducción y acumulación de estos factores proinflamatorios tiene carácter neurotóxico (Block y Hong, 2005) y juega un papel fundamental en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas.

Otro aspecto a tener en cuenta es la excitotoxicidad inducida por glutamato. El glutamato es un aminoácido neurotransmisor, responsable de la mayor parte de la actividad sináptica excitatoria en el cerebro de mamíferos (Fonnum, 1984), involucrado en los procesos de estrés oxidativo que tienen lugar en el cerebro a través de dos mecanismos. El primero de ellos está mediado por sus receptores ionotrópicos, cuya sobreactivación induce una entrada masiva de calcio al citosol y consecuentemente a la mitocondria, provocando estrés oxidativo y activación de mecanismos moleculares responsables de desencadenar muerte neuronal apoptótica, tales como:

- Proteasas, nucleasas y lipasas. La peptidasa calpaina I cataliza la conversión de xantino deshidrogenasa a xantino oxidasa, que participa en reacciones a través de las cuales se producen ROS.
- Óxido nítrico sintasa.
- Fosfolipasa A2, enzima que induce un aumento de los niveles de ácido araquidónico, el cual activa la prostaglandina H sintetasa, generándose ROS en este proceso. Además, esta enzima estimula la autooxidación de la dopamina, que conlleva la producción de ROS.

El segundo mecanismo a través del cual el glutamato induce neurotoxicidad está mediado por su unión al transportador de cisteína, puesto que la privación de este último aminoácido causa un descenso de la concentración intracelular de glutatión y una acumulación de ROS (Bannai y Kitamura, 1980). A su vez, el aumento en los niveles de ROS se ha relacionado con un incremento de la secreción de glutamato (Pellegrini-Giampietro y col., 1990).

Por otra parte, el glutamato puede tener un papel neuroprotector (Frade y col., 2008). Tal y como se muestra en el Figura 2 (Frade y col., 2008), este aminoácido neurotransmisor regula la liberación de glutatión reducido desde los astrocitos, ya que induce extracelularmente un incremento de los niveles del mismo, que puede ser empleado por las neuronas para incrementar el contenido intracelular de glutatión reducido (Dringen, 2000), haciéndolas más resistentes al estrés oxidativo inducido por glutamato (Gegg y col., 2005). Además el glutatión reducido podría competir por la unión a los receptores de glutamato (Oja y col., 2000).

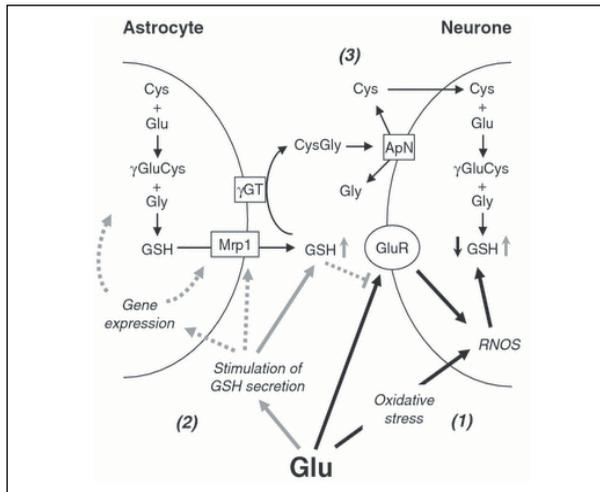


Figura 2. Regulación de los niveles de glutatión reducido por glutamato (Frade y col., 2008)

Envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas

Existen multitud de teorías sobre el de envejecimiento. Medvedev, en su revisión de 1990, describió más de 300 mecanismos para explicar este proceso. En la actualidad se aceptan dos de estas teorías:

- Teorías deterministas. Según las cuales los procesos de envejecimiento están programados dentro de la información del material genético.
- Teorías estocásticas. El envejecimiento estaría ligado a alteraciones genéticas y a la desorganización celular inducidas por el estrés oxidativo.

Ligadas al proceso de envejecimiento se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, entre las que destacan la EA y la EP por ser las que presentan una mayor incidencia. En la patogénesis de estas enfermedades está implicado el estrés oxidativo, considerado la principal causa de daño neuronal, aunque no está claro si es una causa, un resultado o un epifenómeno del proceso patológico al estar íntimamente ligado a otros componentes de la evolución degenerativa. Inicialmente el estrés oxidativo promueve la formación de péptido β -amiloide en el caso de la EA y la agregación de la proteína α -sinucleína en EP. Posteriormente, en ambas patologías se observa neurotoxicidad inducida por glutamato y un aumento de la concentración intracelular de calcio, con la consiguiente activación de enzimas calcio-dependientes (NADPH oxidasa, fosfolipasa A2 citosólica, xantino oxidasa y óxido nítrico sintasa neuronal), produciéndose un aumento de ROS y RNS. Al mismo tiempo, el daño mi-

tocondrial inducido por estas especies induce una activación de la síntesis de ROS y de la liberación de calcio. El estrés oxidativo puede también estimular los astrositos y la microglia, lo que induciría un aumento de la secreción de citoquinas y el inicio de la respuesta inflamatoria (Shibata y Kobayashi, 2008).

En las áreas cerebrales afectadas en EA y la EP se ha observado una pérdida de la homeostasis de metales de transición redox-activos (como cobre y hierro) y redox-inactivos (como zinc). Estos metales que son esenciales en los sistemas biológicos (por ejemplo, participan en la reacción de Fenton), en situaciones patológicas se acumulan en tejidos y pueden tener propiedades neurotóxicas, ya que median reacciones de estrés oxidativo (Sayre y col., 2000), y pueden producir daños estructurales en péptidos y proteínas.

La EP se caracteriza por una alteración en el control motor debido a la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc). Existen diversas hipótesis para explicar la degeneración neuronal en esta estructura cerebral. La hipótesis del estrés oxidativo se basa en estudios en los que se demuestra la potencial generación de H_2O_2 y de otras ROS durante el metabolismo de la dopamina (DA) (Graham, 1978). Este neurotransmisor puede ser metabolizado por enzimas endógenos como las monoamina oxidasas (MAO), o bien espontáneamente mediante autooxidación, generándose H_2O_2 y quinonas (Sulzer y Zecca, 2000), con capacidad de dañar proteínas con grupos sulfhidrilo como es el caso del glutatión. Estos hechos han sido corroborados en análisis postmortem de cerebros de enfermos de EP, en los que se han observado niveles elevados de estrés oxidativo y de hierro en la SNpc, bajas concentraciones de glutatión, un aumento de la peroxidación lipídica y oxidación de ADN y proteínas (Sian y col., 1994; Alam y col., 1997).

Es importante mencionar el descenso en la actividad del complejo I en la cadena de transporte electrónico mitocondrial observado en enfermos de EP (Schapira y col., 1990), lo que conllevaría un incremento de la generación de ROS, que podría alterar la cadena respiratoria, con la consiguiente producción de ROS y daño mitocondrial (Zhang y col., 1990). Al mismo tiempo, la consecuente depleción energética podría alterar el almacenamiento vesicular de DA, incrementándose la concentración citosólica de DA autooxidable (Dauer y Przedborski, 2003).

La inflamación ha sido también implicada en la patogénesis de la EP. En este sentido, se han observado niveles elevados de ciclooxigenasa-2 y microglía reactiva en cerebros de enfermos de EP (Teismann y col., 2003). Por otra parte, la activación de la microglia está asociada con una alteración de la regulación de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que resultaría en un aumento de la producción de NO. Esto sugiere que el estrés nitrosativo podría jugar un papel importante en esta enfermedad. Además, estos enfermos presentan una mayor concentración de glutamato en SNP.

En cuanto a la EA, ésta se caracteriza por una pérdida progresiva de memoria, debido a la deposición extracelular del péptido β -amiloide en las placas seniles, y la aparición de ovillos neurofibrilares. El péptido β -amiloide se produce a partir de la división enzimática de la proteína precursora de amiloide, mientras que los ovillos neurofibrilares están compuestos por una proteína del citoesqueleto, denominada *TAU*. El péptido β -amiloide induce una neurodegeneración a través de un aumento extracelular de glutamato, un incremento de la concentración intracelular de calcio, apoptosis y la generación de radicales libres. En enfermos de alzheimer se han encontrado niveles elevados de zinc, hierro y cobre en el cerebro, que podrían participar en la agregación de péptidos β -amiloide (Connor y col., 2001).

Datos epidemiológicos y estudios experimentales recientes indican que la exposición a diversos tóxicos ambientales, como herbicidas, metales pesados y el compuesto metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP), están relacionados con la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. En el caso del paraquat, la exposición a este herbicida se ha relacionado con una pérdida de neuronas dopaminérgicas y muerte celular por apoptosis (Peng y col., 2004). Se ha evidenciado también que el fungicida rotenona induce una degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal, alteraciones motoras (Inden y col., 2007) y una inhibición del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, lo que conduce a un agotamiento del glutatión y un incremento del estrés oxidativo (Schuler y Casida, 2001). El cadmio está también implicado en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas a través de un incremento en la producción de ROS (Chen y col., 2008).

Antioxidantes

Los antioxidantes podrían proteger contra la neurotoxicidad inducida por el estrés oxidativo (Quintanilla y col., 2005). De hecho, se ha visto en un estudio *in vitro* que la oxidación de proteínas, peroxidación lipídica y neurotoxicidad inducidos por el péptido β -amiloide son inhibidos tras el tratamiento con vitamina E (Behl, 1999).

Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona sintetizada fundamentalmente en los pinealocitos a partir del aminoácido triptófano. Está implicada en numerosas funciones, como la regulación de los ritmos circadianos, del sueño, la función inmune, la presión sanguínea, etc. Es también un potente antioxidante, pudiendo actuar directamente como scavenger de radicales libres, o indirectamente, a través de la inducción de enzimas antioxidantes, la estimulación de la síntesis de glutatión, el incremento de la actividad de otras sustancias antioxidantes, la protección de enzimas antioxidantes frente al daño oxidativo, y el aumento de la eficiencia de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Reiter y col., 1998). Es una

sustancia de carácter lipofílico con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. De hecho, el cerebral es el tejido del organismo con una mayor concentración de este compuesto, concentración que depende de los niveles circulantes de esta neurohormona.

Durante el envejecimiento descienden los niveles de melatonina (Iguchi y col., 1982). Esto es importante ya que se ha visto que mitiga algunos de los cambios indeseables asociados con dicho proceso fisiológico, así como los ligados a enfermedades neurodegenerativas y a la exposición a agentes tóxicos implicados en la patogénesis de estas enfermedades (Mayo y col., 2005). Su uso tiene interés en la prevención y tratamiento de la EA (Pappolla y col., 2000), ya que, además de presentar propiedades antioxidantes, es potencialmente antiinflamatorio, al regular la actividad de la ciclooxigenasa-2, y tiene un papel protector frente a excitotoxinas (Hardeland, 2005). Asimismo, regula los efectos del metabolismo de la proteína precursora amiloide, mediante la inhibición de su secreción y la reducción de la síntesis y deposición del péptido β -amiloide (Lahiri y col., 2004), y previene la fosforilación de la proteína *TAU*.

También han sido descritos efectos beneficiosos del tratamiento con melatonina en la EP, puesto que puede evitar la acumulación de radicales libres en la mitocondria y el daño del ADN mitocondrial (Chen y col., 2005), y promueve la reparación del citoesqueleto (Benitez-King y col., 2004). Se ha demostrado que protege al sistema nigro-estriatal del estrés oxidativo causado por la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina en ratón (Thomas y Mohanakumar, 2004) y por la 6-hidroxidopamina en rata (Dabbeni-Sala y col., 2001). Así mismo, ejerce un posible papel protector frente a la neurotoxicidad del cadmio (Romero y col., 2008).

Taurina

La taurina (ácido 2-aminoetano sulfónico) es ingerida a través de la dieta y sintetizada a partir de la cisteína. Es un aminoácido con funciones importantes en el SNC, ya que es neurotransmisor (Kuriyama y col., 1983), osmoregulador (Solís y col., 1988), mejora la integridad de membrana (Wright y col., 1986), modula la diferenciación, migración y desarrollo neuronal (El Idrissi y col., 1998), y es un neuroprotector frente a la muerte celular por excitotoxicidad (Huxtable, 1989). No se conocen con claridad los mecanismos a través de los cuales ejerce su papel protector, pero podría actuar directamente como antioxidante al ser scavenger de radicales libres, o indirectamente debido a su papel protector frente a los cambios en la permeabilidad de membrana causados por el estrés oxidativo y a la reducción de la peroxidación lipídica (Banks y col., 1992).

En los últimos años se ha estudiado el valor terapéutico de la taurina en el tratamiento de la enfermedad de Huntington (El Idrissi y col., 2003), y su papel protector frente a la neurotoxicidad de numerosos xenobióticos, tales como la micotoxina ácido 3-nitropropiónico (Tadros y col., 2005) y el cadmio (Sinha y col., 2008).

Estradiol

El estradiol atenúa el daño neuronal debido a traumatismos (Dubal y col., 2006), excitotoxicidad (Perrella y Bhavnani, 2005) y estrés oxidativo (Behl y col., 1995), esto último debido a su capacidad antioxidante, evidenciada tanto *in vitro* (Vedder y col., 1999) como *in vivo* (Rontu y col., 2004), debida tanto a la capacidad antioxidante endógena de la molécula de estradiol (el grupo libre fenil hidroxilo presente en el anillo A de la molécula interrumpe la cadena de reacciones que conduce a la formación de radicales libres), así como a la activación de factores de transcripción que conlleva un aumento de la expresión y de la actividad de enzimas antioxidantes (Strehlow y col., 2003). La protección tiene lugar mediante mecanismos dependientes e independientes de receptor, tales como el descenso de la producción de ROS (Prokai y col., 2003), atenuación de corrientes de calcio (Hilton y col., 2006) y activación de cascadas de transducción de señales para la promoción de la supervivencia (Honda y col., 2000).

La administración de estrógenos ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de numerosos modelos de patologías neuronales, como la esclerosis múltiple, EP, epilepsia y EA (Leranth y col., 2000; Sribnick y col., 2003; Sierra y col., 2003; Heikkinen y col., 2004). Concretamente, protege frente a la toxicidad inducida por el péptido β -amiloide (Pike, 1999), frente a la toxicidad inducida por glutamato (Zaulyanov y col., 1999), por H_2O_2 (Moosmann and Behl, 1999), de la privación de oxígeno y glucosa (Regan y Guo, 1997), hierro (Blum-Degen y col., 1998), hemoglobina y tóxicos que actúan a nivel mitocondrial (Regan y Guo, 1997). De hecho, estudios epidemiológicos han demostrado que la terapia estrogénica tras la menopausia está relacionada con un descenso de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas (Zandi y col., 2002), aunque esta acción neuroprotectora no se limita a hembras, sino que también ha sido observada en machos (Hawk y col., 1998; Toung y col., 1998).

BIBLIOGRAFÍA

- Alam, Z. I., Jenner, A., Daniel, S. E., y col. (1997). *J. Neurochem.*, 69, 1196-1203.
- Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., y col. (1999). *Eur. J. Immunol.*, 29, 2705-2714.
- Banks, M.A., Porter, D.W., Martín, y col. (1992). *En: Lombardini JB, Schaffer SW, Azuma J, eds. Taurine: Nutritional Value and Mechanisms of Action. New York: Plenum Press, 341-359.*
- Bannai, S., Kitamura, E. (1980). *J. Biol. Chem.*, 255, 2372-2376.
- Behl, C., Widmann, M., Trapp, T., y col. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216, 473-482.

- Behl, C. (1999). *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 69, 213-219.
- Benítez-King, G., Ramírez-Rodríguez, G., Ortiz, L., y col. (2004). *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 3, 515-533.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., y col. (2008). *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19, 41-52. Review.
- Blass, J.P., Gibson, G.E. (1999). *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 10, 335-358.
- Block, M.L., Hong, J.S. (2005). *Prog. Neurobiol.*, 76, 77-98. Review.
- Blum-Degen, D., Haas, M., Pohli, S., y col. (1998). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152, 49-55.
- Chen, L., Liu, L., Huang, S. (2008). *Radic. Biol. Med.*, 45, 1035-1044.
- Chen, L.J., Gao, E.Q., Li, X.J., y col. (2005). *J. Pineal. Res.*, 39, 34-42.
- Connor, J. R., Milward, E.A., Moalem, S., y col. (2001). *J. Alzheimers. Dis.*, 3, 471-477.
- Dabbeni-Sala, F., Di Santo, S., Franceschini, D., y col. (2001). *FASEB J.*, 15, 164-170.
- Dauer, W., Przedborski, S. (2003). *Neuron.*, 39, 889-909.
- Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000). *Eur. J. Biochem.*, 267, 4912-4916. Review.
- Dubal, D.B., Rau, S.W., Shughrue, P.J., y col. (2006). *Endocrinology.*, 147, 3076-3084.
- El Idrissi, A., Harris, C., Trenkner, E. (1998). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 442, 385-396.
- El Idrissi, A., Messing, J., Scalia, J., (2003). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 526, 515-525.
- Fonnum, F. (1984). *J. Neurochem.*, 42, 1-11. Review.
- Frade, J., Pope, S., Schmidt, M., y col. (2008) *J. Neurochem.*, 105, 1144-1152.
- Graham, D.G. (1978). *Mol. Pharmacol.*, 14, 633-643.
- Gegg, M.E., Clark, J.B., Heales, S.J. (2005). *Brain. Res.*, 1036, 1-6.
- Genestra, M. (2007). *Cell. Signal.*, 19, 1807-1819.
- Hawk, T., Zhang, E.Q., Rajakumar, G., y col. (1998). *Brain. Res.*, 796, 296-298.
- Hardeland, R. (2005). *Endocrine.*, 27, 119-130.
- Heikinen, T., Kalesnykas, G., Rissanen, A., y col. (2004). *Exp. Neuro.*, 187, 105-117.
- Hilton, G.D., Bambrick, L.L., Thompson, S.M., y col. (2006). *Endocrinology.*, 147, 1246-1255.
- Honda, K., Sawada, H., Kihara, T., y col. (2000). *J. Neurosci. Res.*, 60, 321-327.
- Huxtable, R.J. (1989). *Prog. Neurobiol.*, 32, 471-533.
- Iguchi, H., Kato, K.I., Ibayashi, H. (1982). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55, 27-29.
- Inden, M., Kitamura, E., Takeuchi, H., y col. (2007). *J. Neurochem.*, 101, 1491-1504.
- Jenner, P. (2003). *Ann. Neurol.*, 53, 26-36.
- Kuriyama, K., Ida, S., Nishimura, C., Ohkuma, S. (1983). *Prog. Clin. Biol. Res.*, 125, 127-140.
- Kreutzberg, G.W. (1996). *Trends. Neurosci.*, 19, 312-318. Review.
- Lahiri, D.K., Chen, D., Ge, E.W., y col. (2004). *J. Pineal. Res.*, 36, 224-231.
- Lass, A., Agarwal, S., Sohal, R.S. (1997). *J. Biol. Chem.*, 272, 19199-19204.
- Leranth, C., Roth, R.H., Elsworth, J.D., y col. (2000). *J. Neurosci.*, 20, 8604-8609.
- Marquez, A., Villa-Trevino, S., Gueraud, F. (2007). *Redox. Rep.*, 12, 35-39.
- Mayo, J.C., Sainz, R.M., Tan, D.X., y col. (2005). *J. Neuroimmunol.*, 165, 139-149.
- Moorsmann, B., Behlm, C. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 8867-8872.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, M. (1990). *J. Neurosci.*, 10, 1035-1042.
- Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Perjesi, P., y col. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100, 11741-1176.

- Oja, S.S., Janaky, R., Varga, V., y col. (2000). *Neurochem. Int.*, 37, 299-306.
- Pappolla, M.A., Chyan, E.J., Poeggeler, B., y col. (2000). *J. Neural. Transm.*, 107, 203-231.
- Peng, J., Mao, X.O., Stevenson, F.F., y col. (2004). *J. Biol. Chem.*, 279, 32626-3232.
- Perrella, J., Bhavnani, B.R. (2005). *BMC. Neurosci.*, 6, 34.
- Pike, C.J. (1999). *J. Neurochem.*, 72, 1552-1563.
- Quintanilla, R. A., Munoz, F.J., Metcalfe, M.J., y col. (2005). *J. Biol. Chem.*, 280, 11615-11625.
- Reiter, R.J., García, J.J., Pie, J. (1998). *Restor. Neurol. Neurosci.*, 12, 135-142.
- Regan, R.F., Guo, E. (1997). *Brain. Res.*, 764, 133-140.
- Romero, A., Cabaleiro, T., Caride, A., y col. (2008). *Revista de Toxicología*, 25, 3-11.
- Rontu, R., Solakivi, T., Teisala, K., y col. (2004). *Free. Radic. Res.*, 38, 129-137.
- Sayre, L.M., Perry, G., Atwood, C.S., y col. (2000). *Cell. Mol. Biol.*, 46, 731-741.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., y col. (1990). *J. Neurochem.*, 54, 823-827.
- Schuler, F., Casida, J.E. (2001). *Pest. Manag. Sci.*, 57, 932-940.
- Shibata, N., Kobayashi, M. (2008). *Brain. Nerve.*, 60, 157-170.
- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., y col. (1994). *Ann. Neurol.*, 36, 348-355.
- Sierra, A., Azcoitia, I., García-Segura, L. (2003). *Endocrine.*, 21, 43-51.
- Sies, H. (1991). *Klin Wochenschr*, 69, 965-968. Review.
- Sinha, M., Manna, P., Sil, P.C. (2008.) *J. Appl. Toxicol.*, 28, 974-986.
- Solis, J.M., Herranz, A.S., Herreras, O., y col. (1988). *Neurosci. Lett.*, 91, 53-58.
- Sribnick, E.A., Wingrave, J.M., Matzelle, D.D., y col (2003). *Ann N Y Acad Sci*, 993, 125-133.
- Strehlow, K., Rotter, S., Wassmann, S., y col. (2003). *Circ. Res.*, 93, 170-177.
- Sulzer, D., Zecca, L. (2000). *Neurotox. Res.*, 1, 181-195.
- Tadros, M.G., Khalifa, A.E., Abdel-Naim, y col. (2005). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 82, 574-582.
- Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.K., y col. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 5473-5478.
- Thomas, B., Mohanakumar, K.P. (2004). *J. Pineal. Res.*, 36, 25-32.
- Toung, T.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D. (1998.) *Stroke.*, 29, 1666-1670.
- Vedder, H., Anthes, N., Stumm, G., y col. (1999). *J. Neurochem.*, 72, 2531-2538.
- Wright, C.E., Tallan, H.H., Lin, Y.Y., y col. (1986). *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 427-453.
- Zandi, P.P., Breitner, J.C., Anthony, J.C. (2002). *Expert. Opin. Pharmacother.*, 3, 365-380.
- Zaulyanov, L.L., Green, P.S., Simpkins, J.W. (1999). *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19, 705-718.
- Zhang, E., Marcillat, O., Giulivi, y col. (1990). *J. Biol. Chem.*, 265, 16330-16336

RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO Y CARCINOGENESIS

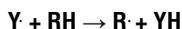
Arturo Hardisson de la Torre

Área de Toxicología. Universidad de la Laguna

Un radical libre es una estructura química capaz de existir independientemente, de vida media corta y que posee uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Los radicales libres pueden formarse por la ruptura homolítica de un enlace molecular. Una vez formados, pueden iniciar un variado número de reacciones que se producen en cadena.

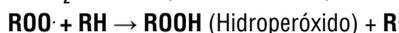
Estrés oxidativo, el mecanismo de estrés oxidativo o mecanismo de autooxidación, se explica mediante tres tipos de reacciones secuenciales:

1. Reacción de INICIACIÓN:

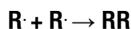
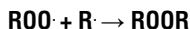
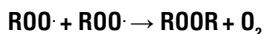


RH es una estructura que tiene ácidos grasos poliinsaturados.

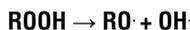
2. Reacción de PROPAGACIÓN (ocurre en presencia de oxígeno):



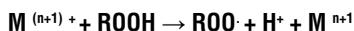
3. Reacción de TERMINACIÓN:



Puede existir, asimismo, una reacción de iniciación secundaria originada por ruptura homolítica de hidroperóxidos:



También es de sumo interés el papel que juegan los metales pesados en la catálisis de las reacciones de estrés oxidativo. Si representamos a las especies metálicas como M^{n+} , las reacciones que pueden producirse son:



Los metales que más frecuentemente son catalizadores de este tipo de reacciones son Fe y Cu.

Principales especies reactivas de oxígeno que se producen en los sistemas biológicos

En la Tabla 1 se describen las especies oxígeno activas con sus respectivas vidas medias a la temperatura corporal (37°C). En la Tabla 2, se presentan las especies nitrógeno activas que también se forman en los organismos y que tienen capacidad oxidante.

La molécula de oxígeno O₂ puede reducirse secuencialmente según las reacciones siguientes:

1. $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ Anión superóxido.
2. $O_2^{\cdot-} + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2 O_2$. Peróxido de hidrógeno.
3. $H_2 O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2 O + OH\cdot$. Radical hidroxilo.
4. $OH\cdot + e^- + H^+ \rightarrow H_2 O$

		Vida media (37°C)
O ₂ ^{·-}	Radical anión superóxido	>10 ⁻⁶
HO ₂ [·]	Radical perhidroxilo	Inestable
[H ₂ O ₂]	Peróxido de hidrógeno	
OH [·]	Radical hidroxilo	10 ⁻⁹
RO [·]	Radical alcoxilo	10 ⁻⁶
ROO [·]	Radical peroxilo	10 ⁻²
[ROOH]	Hidroperóxido	
[1 O ₂ [·]]	Oxígeno singlete	10 ⁻⁸
O ₂	Oxígeno molecular	>10 ²
[-R-R]-O	Epóxido	

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno que se producen en los sistemas biológicos

Como se observa, si la reducción no es completa hasta la formación de agua, se producen especies oxígeno activas muy oxidantes y dañinas para los tejidos como son el radical superóxido, el agua oxigenada y el radical hidroxilo, éste último es el radical más oxidante de todos.

		Vida media (37°C/S)
NO	Radical óxido nítrico	>1 ⁻¹⁰
NO ₂ [·]	Radical dióxido de nitrógeno	
ONOO [·]	Peróxinitrito	0,05-1

Tabla 2. Especies reactivas de nitrógeno que se producen en los sistemas biológicos

Propiedades de las principales especies de oxígeno activas

a. Oxígeno singlete o singulete.

El oxígeno singlete se presenta en dos formas; el oxígeno singulete delta $^1\Delta_g \text{O}_2$ y el oxígeno singlete sigma $^1\Sigma_g \text{O}_2$. El más importante biológicamente es el delta, ya que tiene una larga vida media frente al sigma que es una especie con vida media muy corta y alta reactividad.

b. Radical superóxido.

El radical superóxido resulta de la captación de un electrón por parte de la molécula de oxígeno. A su vez, la reacción entre dos radicales superóxido con dos protones y catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) da lugar a agua oxigenada. Si el pH disminuye, se puede formar el radical perhidroxilo.

c. Peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada es un potente oxidante de los sistemas biológicos, que actúa sobre macromoléculas orgánicas disueltas en agua. Difunde pasivamente a través de las membranas celulares y se convierte en un oxidante citotóxico. Como se ha visto en el apartado anterior, puede formarse en la reacción entre dos radicales superóxido catalizada por la superóxido dismutasa.

d. Radical hidroxilo.

Es el radical más oxidante. La principal fuente de radicales OH es la denominada reacción de HABER-WEISS.

Producción de especies oxígeno activas en los tejidos

La producción de radicales libres de oxígeno se puede llevar a cabo en los sistemas biológicos mediante:

1. La acción de radicales sobre moléculas como el retinol, la riboflavina, la clorofila o la bilirrubina.
2. Las reacciones REDOX con metales de transición como el Fe.
3. Las reacciones REDOX catalizadas por enzimas.

Fuentes exógenas y endógenas de radicales libres de oxígeno

Las fuentes que proceden del medio exterior al organismo son múltiples y variadas. Podemos destacar inflamaciones, el humo del tabaco, el exceso de ejercicio físico, los

contaminantes atmosféricos (SO_2 , NO_2), las radiaciones ionizantes y ultravioleta, ciertos medicamentos como anestésicos, antimicrobianos y citostáticos, una dieta muy rica en PUFA's, y la presencia de xenobióticos.

Las fuentes intracelulares o endógenas de radicales libres de oxígeno son también diversas. Entre ellas se pueden citar los compuestos de bajo peso molecular presentes en el citosol (flavinas, catecolaminas, quinonas, tioles y difenoles), las moléculas que contienen pigmentos como la hemoglobina y la mioglobina; las proteínas enzimáticas (monoaminoxidasa (MAO), aldehído oxidasa o ciclooxigenasa); los peroxisomas que son orgánulos que forman H_2O_2 pues tienen muchas oxidasas y las cadenas de transporte electrónico mitocondrial y microsomal.

Daño molecular de los radicales libres de oxígeno

La producción de radicales libres de especies oxígeno activo conduce a una interacción con las principales moléculas del organismo, tales como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Ello provoca una alteración del metabolismo celular con daño subcelular, originando unas alteraciones de la homeostasis celular (citotoxicidad) que puede conducir al envejecimiento y a la enfermedad (enfermedades coronarias, cáncer, cataratas, etc.).

Normalmente, las especies oxígeno activas y entre ellas el radical OH^* desnaturalizan las proteínas por escisión de las cadenas polipeptídicas, despolimerizan los polisacáridos, escinden las hebras de ADN o modifican sus bases y peroxidan los lípidos. Asimismo, las moléculas de bajo peso molecular pierden su funcionalidad.

a. Daño radicalario a las proteínas.

Los radicales actúan sobre moléculas proteicas que tienen dobles enlaces y sobre moléculas con grupos azufrados. De esta forma, las proteínas con los aminoácidos triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína, son las más sensibles al ataque radicalario.

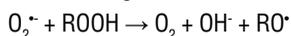
Un potente carcinógeno como es el humo del tabaco cuando entra en contacto reiterado con los pulmones incrementa los neutrófilos y cuando éstos se activan generan más radicales libres. Estos radicales A^* actúan preferentemente sobre los grupos tiólicos de las proteínas (-SH).



b. Daño radicalario a los lípidos.

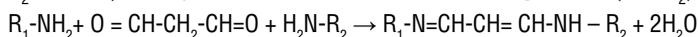
Los radicales libres actúan sobre la fracción insaturada de los lípidos originando peróxidos. Los peróxidos son potentes oxidantes que actúan sobre la membrana celular y sobre biomoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, etc.

El fenómeno de peroxidación lipídica es iniciado por los radicales OH^\bullet y por los hidroperóxidos ROOH . No interviene el radical O_2^\bullet ; éste es capaz de reaccionar con los hidroperóxidos originando radicales alcoxilos:



$\text{RO}^\bullet \equiv$ Radical alcoxilo.

El indicador de la peroxidación lipídica es el aldehído malónico o malondialdehído ($\text{O} = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{O}$). Este puede reaccionar con bases nitrogenadas ($\text{R}-\text{NH}_2$) del ADN.



c. Daño radicalario a los ácidos nucleicos.

El daño radicalario a los ácidos ADN y ARN implica la posible aparición de cáncer. Se sabe que el radical más activo sobre estas moléculas es el OH^\bullet . Mutaciones y muerte celular se asocian a las reacciones de radicales libres con el ADN. Se conocen los lugares más sensibles del ADN, que son: pirimidinas (timina y citosina), purinas (adeninas y guanina), y el monosacárido desoxirribosa.

La exposición del ADN a los radicales libres de oxígeno a los radicales libres de oxígeno puede provocar la ruptura de las cadenas de este ácido nucleico, o bien generan sitiosapurínicos o apirimidínicos. Asimismo, e indirectamente la rotura de las hebras de ADN puede deberse a la activación de endonucleasas (proteasas y fosfolipasas) mediante el calcio, debido a una alteración de la homeostasis de este ión divalente por daño a los canales de calcio de la membrana celular.

También, el ADN mitocondrial es una diana muy sensible a los radicales de oxígeno reactivos, ya que la mitocondria es la principal fuente de aniones superóxido y de agua oxigenada.

d. Daño radicalario a los carbohidratos.

El daño a los hidratos de carbono por parte de los radicales libres abarca desde los monosacáridos hasta las macromoléculas poliméricas. Así, pueden verse afectados monosacáridos como la glucosa, el manitol y los desoxiazúcares; los nucleótidos que reaccionan con el radical OH^\bullet , produciéndose nuevos radicales libres altamente reactivos y los hidratos de carbono complejos que pueden sufrir fragmentaciones en sus estructuras poliméricas.

El ácido hialurónico es un compuesto formado por unidades de ácido glucurónico y de N- acetilglicosamina. Su función es mantener la viscosidad del líquido sinovial. Cuando el ácido hialurónico se despolimeriza, pierde su acción lubricante.

Otra enfermedad de las articulaciones, como es la artritis reumatoide, también parece tener su origen en un mecanismo radicalario.

Sistemas de defensa antioxidante

Existen en el organismo diversos sistemas que nos defienden de las agresiones de los radicales y que mantienen la homeostasis del medio interno.

Podemos clasificar estos sistemas en dos grupos: los sistemas defensivos primarios que son preventivos y reaccionan con los radicales directamente generados del oxígeno bloqueando la fase de iniciación y los sistemas defensivos secundarios que son "scavenger" de radicales propagadores.

Los sistemas primarios pueden ser de tipo enzimático o no enzimático. Entre los primeros se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y DT-diaforasa. Los secundarios no enzimáticos son: proteínas, glutatión, la vitamina C, el ácido úrico y la taurina.

Los sistemas de defensa antioxidante secundarios también, al igual que los primarios, pueden ser de tipo enzimático y de tipo no enzimático.

Las especies más representativas en la defensa antioxidante de carácter secundario son: oxidoreductasas específicas de proteínas, proteasas, glutatión peroxidasa no selenio dependiente, fosfolipasas y diversos sistemas de reparación del ADN. Dentro de los no enzimáticos nos encontramos con los tocoferoles, los carotenoides, la bilirrubina y la ubiquinona.

Mecanismo de la carcinogénesis

La aparición de cáncer en los individuos puede deberse a factores genéticos y a factores ambientales. Los factores dependientes del medio ambiente son probablemente dominantes en la génesis del cáncer. Algunos autores consideran que los factores nutricionales y otros factores englobados en el denominado "estilo de vida", pueden tener relación con la aparición del 30% de los cánceres.

En la carcinogénesis, se consideran tales fases sucesivas, desde que una célula normal se transforma en maligna.

La fase de iniciación, en la cual se produce una mutación (alteración de la información genética) en una molécula normal. Cabe la posibilidad de la reparación del ADN. En esta iniciación intervienen factores genotóxicos o carcinógenos como los hidrocarburos aromáticos polinucleares, las nitrosaminas o las aminas heterocíclicas.

La fase de promoción, es una fase de proliferación celular con un periodo de latencia muy largo, que puede estar comprendido entre 10 y 30 años. Se trataría de células premalignas que pueden retornar a la normalidad, o por el contrario, convertirse lentamente en una neoplasia.

En esta fase las células premalignas pueden pasar a células iniciadas mediante la utilización de vitaminas antioxidantes. Es decir, puede ser posible la reversión.

La fase de progresión, es una fase con el cáncer en estado constituyente, donde se produce metástasis, bien por invasión de tejidos vecinos, o bien por metástasis sistémicas.

En esta fase ya no es posible la prevención y lo que procede es el tratamiento con cirugía, radioterapia y/o quimioterapia.

Nutrientes antioxidantes

Los nutrientes antioxidantes son fundamentalmente cuatro: la vitamina E, la vitamina C, los carotenoides y el selenio.

Vitamina E

Esta vitamina está compuesta por 8 estructuras, 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles. De estos 8 vitámeros, el de mayor actividad vitamínica es el α -tocoferol. Esta vitamina está presente en algunos frutos secos, en el germen de trigo en aceites de semillas (aceite de oliva, girasol, etc.). También está presente en verduras, hortalizas y cereales. Las propiedades de la vitamina E consisten en actuar como antioxidante neutralizando los radicales libres. La vitamina E estabiliza las membranas biológicas y las protege de la peroxidación lipídica. Además, interviene en la agregación plaquetaria, la hemólisis y en la activación de ciertas enzimas. También mejora la respuesta inmunológica del organismo. La vitamina E es un antioxidante sinérgico con ciertos sistemas antioxidantes endógenos como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD). A su vez, la vitamina C y el glutatión reducido pueden regenerar el α -tocoferol a partir del radical tocoferilo. También la vitamina E protege a la vitamina A e inhibe la conversión de nitritos en nitrosaminas potencialmente cancerígenos.

Vitamina C

El ser humano necesita vitamina C para evitar una enfermedad carencial llamada escorbuto. Químicamente es el ácido L-ascórbico, la forma D es inactiva. El ácido L-

ascórbico se encuentra fundamentalmente en los vegetales frescos. Los alimentos que contienen más vitamina C son la acerola, la grosella y la fresa. Sin embargo, las fuentes más importantes para la población son los cítricos (naranja, limón, lima y kiwi). La vitamina C es un potente agente reductor y como se trata de una vitamina hidrosoluble, se le atribuyen las mejores propiedades antioxidantes del líquido extracelular, aunque también tiene efectos en el líquido intracelular.

Carotenoides

Estos compuestos de color amarillo rojizo o naranja se dividen en dos grupos: los carotenos y las xantofilas. Dentro de los carotenos, encontramos compuestos provitamina A, tales como el α -caroteno, el β -caroteno y el γ -caroteno y otros no provitamínicos, tales como el licopeno, el fitoeno y el fitoflueno. A su vez, las xantofilas tienen compuestos provitamínicos como la β -criptoxantina y no provitamínicos como la luteína, la zeaxantina, la cantaxantina y la equinenona. Los mecanismos de protección que ejercen los carotenoides sobre las células se fundamentan en su acción fotoprotectora frente a los efectos masivos de las radiaciones solares, o también actuando sobre los radicales de oxígeno activo responsables del estrés oxidativo celular. No todos los carotenoides tienen acción antioxidante, pero los que tienen actividad son los siguientes: el β -caroteno, el α -caroteno, la β -criptoxantina, la luteína y el licopeno, éste último es el captador de radicales más potente del grupo, que no tiene actividad provitamínica y que se encuentra presente en cantidades altas en el tomate.

Selenio

El selenio forma parte del sistema defensivo del cuerpo y es un protector del daño originado por los radicales libres del oxígeno. El selenio es un componente de la enzima glutatión-peroxidasa que destruye los peróxidos de los ácidos grasos. Una molécula de esta enzima contiene 4 átomos de selenio, por ello se le considera una enzima selenio dependiente.

Dada la capacidad que tiene el Se para sustituir al S de los aminoácidos azufrados, este oligoelemento se encuentra predominantemente presente en los alimentos proteicos. Por tanto, se encuentra mayoritariamente en alimentos de origen animal, como la carne, las vísceras, los mariscos. También está presente en alimentos vegetales del grupo de las legumbres, cereales y frutos secos. Obviamente, éstos últimos al consumirse en poca cantidad no aportan suficiente selenio a la dieta. Otros alimentos vegetales como las frutas y las hortalizas apenas tienen selenio. Los grupos de riesgo que presenten aportes subclínicos de selenio son personas jóvenes con dietas desequilibradas, vegetarianos, ancianos que viven solos y no cuidan su dieta, mujeres gestantes y lactantes, fumadores y enfermos crónicos.

Los efectos del selenio son los siguientes:

- Es un antioxidante que previene la peroxidación de los lípidos celulares.
- Previene la formación de coágulos inhibiendo la formación plaquetaria.
- Aumenta la resistencia del sistema inmune.
- Inhibe el daño a los cromosomas, las infecciones y el cáncer.
- Es fundamental para la producción de hormonas tiroideas.
- Tiene un efecto antitóxico contra los efectos perjudiciales de los metales pesados.

El selenio activa a los linfocitos T y a los macrófagos, por lo que se le considera un potente estimulador del sistema inmune. Hay zonas del mundo con muy bajos niveles de selenio, como Escandinavia o como la región de Keshan en China, donde se ha presentado una enfermedad que afecta al músculo cardíaco sobre todo en mujeres jóvenes y niños.

Antioxidantes no nutrientes

Está compuesto por grupos fenólicos y polifenólicos, entre los que destacan los bioflavonoides. También debemos destacar a la ubiquinona, que es un antioxidante liposoluble sintetizado por las células animales.

Los bioflavonoides no tienen acción vitamínica, pero reducen la permeabilidad y/o fragilidad capilar. También forman complejos con metales divalentes tales como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} , lo que evitaría el papel catalítico de estos iones en el estrés oxidativo. Se encuentran en alimentos estimulantes como el té o el café, el vino tinto, las aceitunas, la soja, etc.

La ubiquinona es el coenzima Q de tanta importancia en el metabolismo intermediario, actúa como molécula antioxidante y regeneradora de la vitamina E, una vez que el tocoferol ha reaccionado con una especie radicalaria.

Ejemplos de xenobióticos con mecanismo de toxicidad radicalario

Tetracloruro de carbono: es un potente agente hepatocarcinógeno que genera el radical $\text{Cl}_3\text{C}^{\bullet}$, que es un potente agente alquilante, fuertemente electrofílico y capaz de reaccionar con moléculas nucleofílicas como el ADN.

Aflatoxina B_1 : es otro potente hepatocarcinógeno, que se encuentra en cereales y piensos contaminados por el hongo del género *Aspergillus*. Esta molécula se metaboliza siguiendo reacciones de oxidación. Su biotransformación origina varios metabolitos, uno de los cuales es la aflatoxina B_1 Epóxido, que es capaz de reaccionar con macromoléculas celulares como el ADN.

En la Figura 1 se presentan los metabolitos de la aflatoxina B_1 que se producen en su biotransformación.

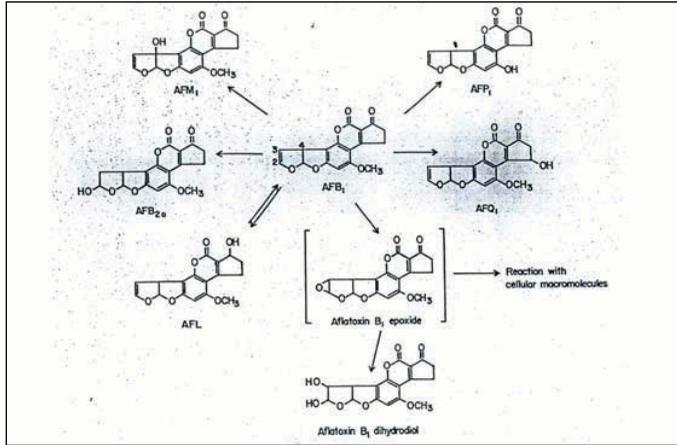


Figura 1. Metabolismo de la aflatoxina B₁

Nitrosaminas: son compuestos presentes en los alimentos que resultan de la reacción de los nitritos con aminas secundarias o terciarias. Son cancerígenos de diversos órganos y su mecanismo de toxicidad degenera en la formación de 3 agentes alquilantes, que son: diazoalcano, sal de diazonio, ión carbonio.

En la Figura 2, se muestra el proceso de formación y descomposición de las nitrosaminas con aparición de agentes alquilantes.

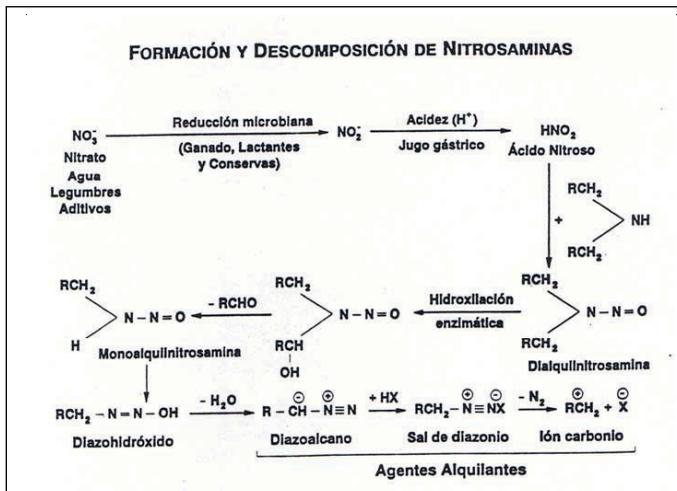


Figura 2. Formación y descomposición de nitrosaminas

3,4-Benzopireno: este hidrocarburo aromático policíclico es un compuesto presente en el humo del tabaco y en alimentos ahumados. Se le considera el agente productor del cáncer de pulmón en los fumadores. Su mecanismo de toxicidad proviene de su biotransformación oxidativa en metabolitos “epoxi”. El epóxido- benzopireno se une a la guanina del ADN, colocándose entre la doble hélice de este ácido nucleico, lo que conlleva a una replicación defectuosa de esta molécula y en la posterior aparición de cáncer.

La Figura 3 representa la interacción del 3,4-benzopireno y la doble hélice del ADN.

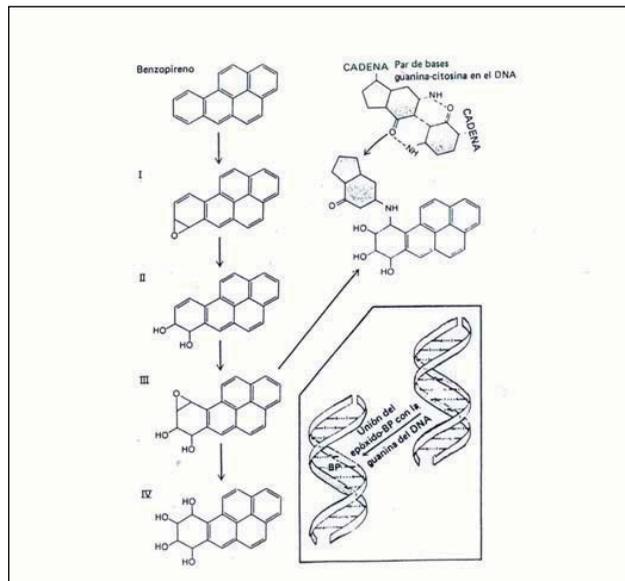


Figura 3. Interacción del benzopireno con el ADN

BIBLIOGRAFÍA

- Gil, A. (2005). Tratado de nutrición (Tomo I). Acción médica. Madrid.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2005). Aplicaciones prácticas. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Tolonen, M. (1995). Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Rojas, E. Vitaminas y acción antioxidante. Merk. Madrid (1996).
- Mijavila, M.T., López, D., Saiz, M.P. (2001). Los radicales libres y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos. NCP Documenta. No 258, 1-7.
- Steven, S.I. (1997). Salemh. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor and Francis. Washington DC.
- Hardisson, A., González Weller, D.M., Revert, C. (2006). En: Canean, A.M., Repetto, M. ed. Toxicología alimentaria. Díaz de Santos. Madrid, 593-608.

BLOQUE III. APLICACIONES

QUIMIOMETRÍA Y ANTIOXIDANTES

Carlos Herrero Latorre

Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias. Universidad de Santiago de Compostela

La quimiometría es una rama de la química analítica que se define como la utilización de técnicas estadísticas, matemáticas y de lógica formal para: (a) diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, (b) extraer la máxima información relevante mediante el análisis de datos químicos y (c) obtener cualquier conocimiento de sistemas químicos. En los últimos años, la quimiometría se ha convertido en una herramienta fundamental en la investigación acerca de antioxidantes: "In the research on the antioxidant capacity..., the improvement of the current methods and the development of new evaluation tools are clearly prime objectives for the future... One very recent solution looks highly promising, it involves subjecting a set of samples to various analysis methods and then processing the results through chemometric procedures..." (M. Laguerre y col., 2007). Los aspectos de mayor utilización de técnicas quimiométricas en la investigación en antioxidantes son los siguientes:

- Proponer, desarrollar y optimizar metodologías analíticas para la determinación de compuestos con capacidad antioxidante.
- Evaluar y modelizar la capacidad antioxidante de diferentes compuestos.
- Caracterizar diferentes tipos de alimentos (por su origen geográfico, calidad...) en relación con su composición química y, en especial, en función de su aporte en compuestos antioxidantes.

Esta ponencia se divide en dos partes: 1. Fundamentos quimiométricos y 2. Aplicaciones quimiométricas en la investigación sobre antioxidantes.

Fundamentos quimiométricos

Los procedimientos agrupados según las diferentes técnicas fueron los siguientes:

- Técnicas de visualización.
 - Análisis en componentes principales
 - Análisis de Clusters
- Técnicas de regresión multivariada.
 - PLS (*Partial least squares regression*)
 - PCR (*Principal component regression*)
 - Redes neuronales

- Técnicas de reconocimiento de modelos supervisadas.
 - Análisis discriminante.
 - KNN (*K-nearest neighbours*)
 - SIMCA (*Soft independent modelling of class analogy*)
 - Redes neuronales

En el presente resumen no se pretende profundizar en la explicación de éstos procedimientos matemáticos, por lo que únicamente se recomienda un conjunto de textos básicos de quimiometría que pueden servir al interesado para conocer las bases matemáticas y estadísticas de las técnicas antes indicadas. Véanse por ejemplo: Meloun y col., 1992; Vandeginste y col., 1998 y Kowalski, 1984.

Aplicaciones quimiométricas en la investigación sobre antioxidantes

1. Proposición, desarrollo y optimización de metodologías analíticas para la determinación de compuestos con capacidad antioxidante

Mediante diversos ejemplos se ilustra la posibilidad de desarrollar nuevas metodologías analíticas en las que la medida de un conjunto amplio de variables o señales analíticas permite calibrar y determinar simultáneamente diferentes tipos de agentes oxidantes en una única medida de forma rápida y eficiente. Véanse como ejemplos la determinación de Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Propyl gallate (PG) y tert-Butylhydroquinone (TBHQ) a partir de una medida voltamétrica y posterior calibración multivariada (Ni y col., 2000); o el uso de otra diferente señal analítica como la absorción infrarroja, que sirvió para la determinación, en este caso, de antioxidantes (Irganox 1010 e Irgafos 168) en polietileno empleando una regresión PLS para la cuantificación de los dos citados antioxidantes (Camacho e Karlsson, 2002).

2. Evaluación y modelización de la capacidad antioxidante de diferentes compuestos

Los estudios de evaluación y, en su caso, posterior modelización de la actividad antioxidante de diferentes compuestos en diferentes condiciones, constituyen la aplicación más habitual de la quimiometría a la investigación en antioxidantes. Se han empleado diversas técnicas de regresión multivariada y de clasificación para la predicción de la capacidad oxidante de ciertos compuestos en función de su estructura molecular (estudios estructura-actividad: *QSAR*). Un ejemplo muy ilustrativo son los trabajos de Weber y col. (2006a, 2006b), en el primero de éstos se desarrolla un modelo de regresión multivariada en el que, en función de las características químicas de diferentes flavonoides, se predice con éxito su actividad antioxidante. En el segundo caso el enfoque es distinto, basándose en las mismas propiedades se

clasifican los flavonoides en cuestión mediante diversos sistemas multidimensionales, quedando éstos agrupados en función de su actividad antioxidante. Otros ejemplos pueden ser: Farkas y col. (2004) que emplearon PLS para la predicción de la actividad antioxidante de otro conjunto de diferentes flavonoides; Kamal y Anderson (1997) que evaluaron la actividad antioxidante de tocoferol proveniente de diferentes aceites vegetales; y Dumarey y col. (2008) que mediante los diferentes modelos de regresión (PCR y PLS) modelizaron la actividad antioxidante de té verde en función de datos cromatográficos.

3. Caracterización de diferentes tipos de alimentos en función de su aporte de compuestos antioxidantes

En éste último bloque de aplicaciones se presentaron diversos ejemplos de uso de distintas técnicas de clasificación para la caracterización y tipificación de alimentos en función de su composición química, y en especial, teniendo en cuenta el posible aporte a la dieta de compuestos con poder antioxidante. García y col. (2003) demostraron la diferente composición polifenólica de cuatro aceites de oliva virgen procedentes de cuatro variedades de oliva diferentes (Picual, Arbequina, Hojiblanca y Cornicabra) y por ende, su diferente capacidad de aporte de antioxidantes. En este trabajo desarrollaron un modelo de clasificación que permite la diferenciación de las cuatro clases de aceites. Similares planteamientos han sido llevados a cabo por otros autores en diferentes tipos de alimentos: Betroncelj y col. (2007) en miel, Rebolo y col. (2000) en vinos, Hernández y col. (2005) en tomate, Jahan (2005) en carne de pollo, entre otros.

Conclusión

La aplicación de técnicas quimiométricas a la información química obtenida en la investigación sobre antioxidantes es una herramienta útil. El uso de diferentes técnicas matemáticas y estadísticas permite, en base a señales analíticas apropiadas, la obtención de sistemas de predicción de la actividad antioxidante de diferentes compuestos y/o productos, así como la clasificación de los mismos en función de su capacidad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Betroncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., y col. (2007). *Food Chem.*, 105, 822.
Camacho, W., Karlsson, S. (2002). *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 7, 41.
Dumarey, M., Naderkassel, A., Deconick, E., y col. (2008). *J. Chromatog. A*, 1192, 81.
Farkas, O., Jakus, J. y Heberger, K. (2004). *Molecules.*, 9, 1079
García, A., Brenes, M., García, P., y col. (2003). *Eur. Food Res. Technol.*, 216, 520.
Hernández M. y col. (2005). *EJEAFChe.*, 4, 1043.
Jahan. K. (2005). *Poultry Sci.*, 84, 158.

- Kamal-Eldin, A., y Andersson, R. A. (1997). *JAOCS.*, 74, 375.
- Kowalski, B. R. (1984). *Mathematics and statistics in chemistry*. Riedel Publishing, Dordrecht, Holland.
- Laguerre, M., Leconte, J. P., y Villeneuve, P. (2007). *Progr. Lipid Res.*, 46, 244.
- Meloun, M., Militky, M., y Forina, M. (1992). *Chemometric for analytical chemistry* E. Horwood, Chichester, England.
- Nin, E., Wang, L., y Kokot, S. (2000). *Anal. Chim. Acta*, 412, 185.
- Rebolo, S., Pena, R. M., Latorre, M. J., y col. (2000). *Anal. Chim. Acta*, 417, 211.
- Vandeginste, B. G., Massart, D. L., Buydens, L. M., y col. (1998). *Handbook of chemometrics and qualitative metrics*, Elsevier, Amsterdam, Holland.
- Weber, C., Honorio, K., Bruni, A., y col. (2006a). *Struc. Chem.*, 17, 307.
- Weber, C., Honorio, K., Bruni, A., y col. (2006b). *J. Mol. Model.*, 12, 915.

ASPECTOS LEGALES DEL USO DE ANTIOXIDANTES EN ENVASES DE ALIMENTOS, NUEVAS FORMULACIONES DE ENVASES ACTIVOS

Víctor Teruel Muñoz

Área de Gestión de Riesgos Químicos. Subdirección General de Gestión de Riesgos Alimentarios

Introducción

En su concepto inicial, los envases tenían las funciones de conservar, contener, transportar y proteger los alimentos. La aparición de nuevos materiales de síntesis, sin un historial de uso a lo largo de la historia, dio lugar a que surgiese una preocupación de la salud de los consumidores y se empezó a legislar las sustancias autorizadas para su uso en los materiales que forman parte de los envases, así como sus restricciones de uso. De forma, surgió en el año 1976 la primera norma comunitaria en este sentido, llegando hasta el actual marco legislativo regulado mediante el Reglamento 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE.

Este Reglamento 1935/2004 introduce aspectos novedosos en las funciones de los envases, entendiendo que éstos pueden también informar sobre el estado de los alimentos y alargar su vida útil.

La finalidad de este nuevo marco legal es garantizar el mercado interior y proporcionar la base para cumplir el elevado nivel de protección relativo a la salud humana y a los intereses de los consumidores. Su ámbito de aplicación abarca los materiales y objetos terminados, incluidos los activos e inteligentes, en contacto con alimentos tanto aquellos que estén destinados a entrar en contacto con alimentos como aquellos de los que quepa esperar razonablemente, que entrarán en contacto con alimentos o que transferirán sus componentes a los alimentos en condiciones normales o previsibles de empleo.

Nuevos conceptos

El Reglamento 1935/2004 introduce como novedad destacable la incorporación de los materiales y objetos activos e inteligentes.

Los materiales y objetos activos están destinados a ampliar el tiempo de conservación de los alimentos o a mantener o mejorar su estado, y para ello pueden:

- Incorporar componentes que transmitan sustancias a los alimentos envasados o al entorno de éstos o
- Absorber sustancias de los alimentos envasados o del entorno de éstos.

Por otro lado, los materiales y objetos inteligentes son aquellos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno de ellos.

Requisitos generales de legislación sobre envases

Los envases destinados a estar en contacto con alimentos deben ser fabricados de conformidad con las buenas prácticas de fabricación para que en las condiciones normales o previsibles de empleo no transfieran sus componentes a los alimentos en cantidades que puedan:

- Representar un peligro para la salud humana
- Provocar una modificación inaceptable de la composición de los alimentos
- Provocar una alteración de las características organolépticas de éstos.

Además, el etiquetado, la publicidad y la presentación de los materiales u objetos no deberán inducir a error a los consumidores.

Requisitos especiales de los envases activos e inteligentes

El Reglamento 1935/2004 también establece requisitos especiales aplicables a los materiales y objetos activos e inteligentes:

- Pueden ocasionar modificaciones de la composición o de las características organolépticas de los alimentos a condición de que dichas modificaciones cumplan las disposiciones comunitarias aplicables a los alimentos, como pueden ser las disposiciones sobre los aditivos alimentarios y las medidas de aplicación correspondientes, o, de no existir normativa comunitaria, las disposiciones nacionales aplicables a los alimentos.
- Deben utilizarse sustancias autorizadas por disposiciones comunitarias hasta la adopción de las medidas específicas que se están preparando.
- Las sustancias que se incorporen a los alimentos tienen consideración de “ingredientes”, por lo que están sujetas a los requisitos de etiquetado previstos en la Directiva 2000/13/CE.
- Los materiales y objetos activos no pueden ocasionar modificaciones de la composición ni de las características organolépticas de los alimentos, como por ejemplo enmascarando su deterioro, que puedan inducir a error a los consumidores
- Deben llevar un etiquetado adecuado que permita al consumidor identificar las partes no comestibles, cuando estén ya en contacto con alimentos.

- Deben estar convenientemente etiquetados para indicar que dichos materiales y objetos son activos o inteligentes, o ambas cosas.

Medidas legislativas específicas sobre envases activos e inteligentes

El Reglamento 1935/2004 cubre aspectos globales de materiales y objetos activos e inteligentes pero no todos los detalles necesarios, de ahí la necesidad de disponer de una medida específica que se está debatiendo a nivel europeo.

La propuesta que se está trabajando incorpora la definición de “componente” como la sustancia individual o combinación de éstas que causan la función activa y/o inteligente de un material, incluyendo los productos de reacción in situ de estas sustancias. En esta definición no se incluyen las partes pasivas del envase que no son responsables de la función activa e inteligente.

Existen tres tipos de componentes que pueden formar parte de estos materiales y objetos:

- Los que estén en la lista comunitaria de sustancias que pueden usarse en componentes activos e inteligentes (a establecer en la medida específica).
- Sustancias incorporadas para liberarse en alimentos o en su entorno, que deben cumplir con la normativa nacional o comunitaria aplicable a los alimentos.
- Sustancias que no van a entrar en contacto con el alimento ni el entorno por existir una separación con una barrera funcional, por lo que la migración va a ser inferior a 0,01 ppm, aunque están sujetas a ciertas restricciones.

En cuanto a los aspectos de etiquetado, se propone incluir el texto “NO COMER” en las partes del envase que no sean comestibles y, si es técnicamente posible, la incorporación del logotipo (Figura 1).



Figura 1. Logotipo del texto "NO COMER"

Por último, la medida específica va a incluir la información que debe figurar en la declaración de conformidad que debe acompañar a los envases. Esta declaración de conformidad sirve para que el fabricante certifique la conformidad del envase con la legislación aplicable.

Se estima que la lista comunitaria de sustancias que pueden usarse en componentes activos e inteligentes va a estar disponible a los 3 años y medio de la publicación de la medida específica, que será un reglamento comunitario.

Normativa aplicable a los alimentos

La medida específica establece que las sustancias incorporadas para liberarse en alimentos o en su entorno deben cumplir con la normativa nacional o comunitaria aplicable a los alimentos.

La normativa actual es bastante extensa y abarca a distintos grupos de sustancias en función de su aplicación. A continuación se hace un repaso de los distintos tipos de sustancias que podrían emplearse con este fin, sujetos lógicamente a las condiciones de sus legislaciones establecidas.

- **Aditivos alimentarios:** se definen como sustancias que ordinariamente no se consumen como alimentos en sí mismas y que se añaden expresamente para que sean componentes de los productos alimenticios. Su adición es intencionada y tiene un propósito tecnológico. La utilización de aditivos alimentarios como componentes en materiales y objetos activos solo puede realizarse si se encuentran recogidos en la lista de aditivos alimentarios autorizados y cumplen con las condiciones de uso y con las especificaciones de identidad y pureza. Su utilización implica su incorporación en los alimentos, por lo que van a ser ingredientes de los mismos y deben figurar en su etiquetado.
- **Coadyuvantes tecnológicos:** cualquier sustancia que no se consuma como ingrediente alimenticio o en sí, que se utilice intencionadamente en la transformación de materias primas, de productos alimenticios o de sus ingredientes, para cumplir un objetivo tecnológico determinado durante el tratamiento o la transformación, y que pueda tener como resultado la presencia no intencionada, pero técnicamente inevitable, de residuos de dicha sustancia o de sus derivados en el producto acabado siempre que dichos residuos no presenten riesgo sanitario y no tengan efectos tecnológicos sobre el producto acabado. No tienen consideración de ingrediente, por lo que no van a figurar en el etiquetado de los alimentos.
- **Aromas alimentarios:** su función es dar a los alimentos olor y/o sabor.
- **Enzimas alimentarios:** son un tipo de coadyuvante tecnológico que es objeto de una regulación específica.

- **Productos fitosanitarios:** una de las funciones de los productos fitosanitarios es mejorar la conservación de los productos vegetales, siempre y cuando dichas sustancias o productos no estén sujetos a disposiciones particulares del Consejo o de la Comisión sobre conservantes.
- **Agentes descontaminantes:** el Reglamento 853/2004 establece que los operadores de empresa alimentaria no utilizarán para eliminar la contaminación de superficie de los productos de origen animal ninguna sustancia distinta del agua potable, salvo que se autorice su uso por el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y Sanidad Animal. La utilización de este tipo de sustancias en materiales activos estaría condicionada a su autorización previa y siempre y cuando exista una eliminación tras su uso impongán indicaciones de etiquetado.

Por último indicar que los biocidas, regulados por la Directiva 98/2/CE, no tienen cabida en los materiales activos, puesto que su uso no está contemplado en alimentos.

Procedimiento de autorización del uso de sustancias

El esquema de autorización del uso de sustancias para su uso en los materiales y objetos destinados a estar en contacto con los alimentos se encuentra recogido en el Reglamento 1831/2003. La solicitud se presenta ante la autoridad competente de un Estado miembro de la Unión Europea, que se remite para opinión de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). El dictamen de EFSA va a incluir:

- Designación de la sustancia y sus especificaciones
- Recomendaciones sobre las condiciones o restricciones de uso de la sustancia evaluada y del material u objeto en que se utiliza
- Evaluación de la adecuación del método analítico propuesto para los fines de control previstos.

Finalmente, la Comisión Europea, con el dictamen favorable de los Estados miembros de la UE a través del Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y Sanidad Animal, adopta una medida con la autorización, si procede, de la sustancia.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establecerá unas directrices con la documentación necesaria para la evaluación del riesgo de los materiales y objetos activos e inteligentes, que deberá estar disponible antes de que se abra el plazo de presentación de las solicitudes de acuerdo con la medida específica de estos materiales que se está tramitando.

INTERÉS DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

Nick Hedges

Unilever. Colworth House. UK

Unilever es una de las mayores compañías industriales dedicadas a la alimentación en el mundo. Su misión es añadir vitalidad a la vida teniendo en cuenta las necesidades diarias de nutrición, higiene y cuidado personal que ayudan a las personas a sentirse bien y saludables. Unilever realiza una extensiva investigación internacional para establecer las necesidades de los consumidores y focaliza sus capacidades investigadoras e innovadoras para abordar estas necesidades. Simultáneamente, la empresa tiene el objetivo de transmitir valor desde la Ciencia y la Tecnología hacia los consumidores, siendo sus principales líneas de investigación y desarrollo la ciencia de consumidores, las ciencias de materiales y nanotecnología, las biociencias, la ingeniería de procesos, las ciencias de datos y mediciones y la nutrición. Dado que vitalidad y nutrición son significativamente importantes en Unilever, los productos pesqueros son una parte importante de la producción de la empresa, que además tiene presente la sostenibilidad en la producción de alimentos.

En esta área de mercado, Unilever trabaja fundamentalmente en producto pesquero congelado. La empresa considera que la investigación sobre la calidad nutricional, los ingredientes naturales y la preservación de origen natural son cruciales. La prevención de la oxidación de las grasas y la pérdida de textura es fundamental para mantener los componentes saludables y la calidad de los productos pesqueros. En este sentido, Unilever ha participado en el proyecto europeo SeafoodPlus: *Health promoting, safe seafood of high eating quality in a consumer driven fork-to-farm concept*, en concreto en el subproyecto LIPIDTEXT: *Preventing seafood lipid oxidation and texture softening to maintain healthy components and quality of seafood*. En el marco de este proyecto, Unilever ha colaborado con el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo en el desarrollo de antioxidantes naturales basados en ácidos hidroxicinámicos para estabilizar las pérdidas de calidad de filetes de pescado congelados debidas al desarrollo de la rancidez oxidativa y la pérdida de textura. La oxidación de las grasas del pescado provoca la aparición de aromas y sabores rancios, cambios en color y textura, y la pérdida de importantes compuestos desde el punto de vista nutricional como ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes naturales. Durante el desarrollo de este proyecto de investigación se ha estudiado la prevención de la oxidación lipídica y de los cambios de textura mediante la adición de compuestos antioxidantes. Los compuestos estudiados demostraron una significativa inhibición de la oxidación, especialmente en los ensayos realizados en pescado refrigerado. La efectividad antioxidante mostró una elevada dependencia

con la estructura molecular de los compuestos. El orden de efectividad antioxidante determinado en los ensayos efectuados en músculo refrigerado fue similar al orden calculado en los ensayos en músculo en congelado. En estos últimos la eficacia antioxidante alcanzada fue menor probablemente debido a una menor difusión de los compuestos en la matriz del pescado, y por tanto a una menor interacción con los compuestos que intervienen en la reacción de oxidación lipídica.

Sin embargo, los estudios efectuados sobre las alteraciones en las proteínas asociados a una pérdida en la capacidad de retención de agua y modificaciones en la textura del músculo de pescado demostraron que no hubo diferencias entre las muestras tratadas con antioxidantes y por tanto, no oxidadas, frente a aquellas no tratadas con antioxidantes y que mostraban un elevado grado de oxidación. Es decir, no se encontraron evidencias que sugieran que los tratamientos antioxidantes reduzcan los cambios en textura del músculo de pescado durante la conservación en congelado. Asimismo, la agregación proteica que se produjo durante el almacenamiento a baja temperatura y evidenciada en el estudio de los cambios en la solubilidad de las proteínas, no fue acompañada de una significativa desnaturalización proteica determinada mediante calorimetría diferencial de barrido.

Puede concluirse que es posible emplear compuestos de origen natural para proteger el músculo de pescado de la oxidación durante la conservación a baja temperatura y que los ensayos realizados en músculo refrigerado pueden emplearse para predecir la eficacia de los antioxidantes en músculo congelado.

Agradecimientos

Al Proyecto Integrado SEAFOODplus, financiado por la Unión Europea, contrato No 506359.

ENVASES ACTIVOS ANTIOXIDANTES. DESARROLLO Y PERSPECTIVAS DE USO EN EL ENVASADO DE CARNE FRESCA

Pedro Roncalés Rabinal

Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

Las formas tradicionales de comercialización y venta de carne han dado paso rápidamente a otros sistemas basados en el autoservicio en los que, por una parte, el consumidor no dispone ya del consejo profesional del carnicero, y por otra, a que el establecimiento de venta deba asegurar una larga conservación de la carne en los lineales de los supermercados. A ello se suma el hecho de que los consumidores demandan cada vez más calidad, seguridad y comodidad en los alimentos que compran, sin olvidar que “se compra con los ojos”.

Para alcanzar estas metas se han desarrollado sistemas de mejora del etiquetado y trazabilidad y, lo que es más importante, sistemas de envasado que permiten mantener la carne en buenas condiciones sensoriales e higiénicas durante más tiempo. La implantación de las atmósferas modificadas en el envasado de la carne ha sido un hito crucial en la mejora de la conservación de la misma. Sin embargo, la necesaria presencia de oxígeno en el envase da lugar a la oxidación de la carne. Así, la vida útil de la carne no es todo lo extensa que sería de desear. La utilización de antioxidantes puede contribuir a disminuir la velocidad de oxidación y aumentar por tanto la vida útil de la carne. De hecho, el uso de extractos de plantas y otros antioxidantes naturales se ha demostrado de gran utilidad para este propósito. Los desarrollos actuales en este campo hacen prever un nuevo avance; los envases activos, tanto antioxidantes como antimicrobianos, son un buen ejemplo de ello. Sólo falta que la legislación al respecto esté a la altura que las nuevas circunstancias requieren.

Envasado en atmósfera modificada con antioxidantes

El estado actual de los sistemas de envasado de la carne permite mantener la vida útil de la carne durante periodos de tiempo relativamente largos. Sin embargo, las formas de distribución reclaman tiempos aún más extendidos que permitan una rotación más lenta de las bandejas expuestas en los lineales. En todo caso, los cambios deteriorativos que se producen son resultado de reacciones de oxidación. Tales reacciones tienen como sustrato, bien la mioglobina, lo que da lugar a la formación de colores pardos, o bien los ácidos grasos, lo que conlleva la formación de olores “a carne vieja”. La oxidación, por otra parte, se ve favorecida por la presencia de la elevada presión de oxígeno en el envase, que es necesaria a su vez para que la mioglobina esté oxigenada

y tenga por tanto el color rojo típico de la carne fresca. La iluminación a que deben ser sometidos los envases para su exposición en los lineales de los supermercados también contribuye a la oxidación. Es sabido que la luz, y en particular las radiaciones ultravioletas, son un fuerte catalizador de las reacciones oxidativas. Así pues, el límite de la vida útil de la carne envasada en las atmósferas modificadas usadas comúnmente viene determinado por la velocidad de las reacciones de oxidación, si bien esta velocidad está influida también por la población microbiana de la carne.

Los antioxidantes naturales han sido utilizados desde antiguo para mejorar la conservación de los alimentos; los ejemplos son innumerables: especias, condimentos y todo tipo de hierbas. En los últimos años nuestro grupo de investigación ha dedicado un gran esfuerzo a evaluar el efecto de la adición directa de diversos antioxidantes a carnes frescas y algunos elaborados cárnicos frescos.

Resumen de la extensión de la vida útil

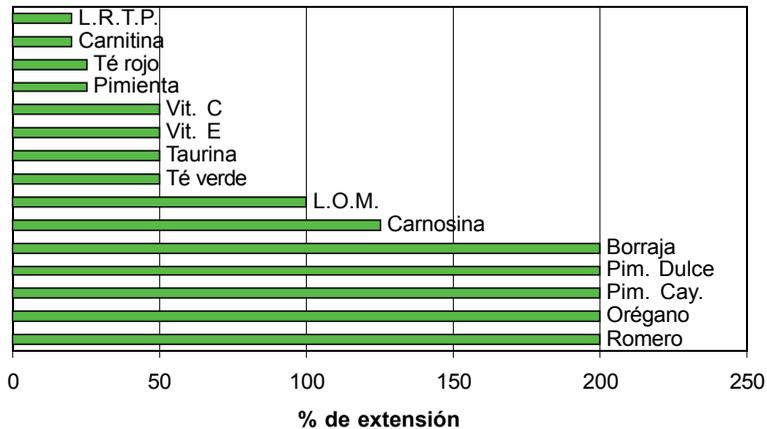


Figura 1. Extensión de la vida útil de la carne envasada en atmósfera modificada por diversos antioxidantes

La Figura 1 muestra de manera resumida la extensión de la vida útil de varias carnes frescas, evaluada por la medida sensorial de color y olor, por acción de algunos de los antioxidantes naturales evaluados. Se observa el extraordinario efecto de romero, orégano, pimienta dulce y picante y borraja. Todos ellos dan lugar a una inhibición de la oxidación, medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, superior al 90% durante los días de conservación de la carne envasada.

Sin embargo, tanto los pimientos, que proporcionan un color rojo y sabor fuerte, como la harina de borraja, que confiere un color blanquecino, modifican sustancialmente las características de la carne. Por el contrario, romero y orégano, que pueden ser utilizados en su forma desodorizada, ejercen su acción sin modificar prácticamente las propiedades sensoriales de la carne o del elaborado cárnico. En consecuencia, la mayor parte del desarrollo se centró en estos extractos de plantas de la familia de las Labiadas. Es de destacar que la extensión de la vida útil se consiguió incluso en las condiciones habituales de exposición de la carne en los supermercados, es decir, con fuerte iluminación en las vitrinas frigoríficas.

Los aspectos legales relativos a la utilización de condimentos en carnes frescas, sin embargo, impiden su adición en estos alimentos no elaborados. Así pues, el uso de antioxidantes está limitado a los preparados de carne, sea en forma de elaborados o en forma de marinados, adobados, etc. Este es un campo de desarrollo en clara expansión, en especial en mercados evolucionados y abiertos como son los EEUU o el Reino Unido.

Envases activos antioxidantes

En los últimos años hemos asistido al desarrollo de un nuevo tipo de envases, diseñados para frenar las reacciones oxidativas por una vía indirecta. Estos nuevos envases son los envases activos antioxidantes, que pueden ser definidos como aquellos que ejercen sobre la carne una acción inhibitoria de la oxidación sin que el agente activo esté en contacto directo con el alimento. Es decir, las moléculas antioxidantes están contenidas en el material del envase y actúan sobre la carne a través de la atmósfera protectora. Todavía está en discusión si dichas moléculas actúan en la carne al ser liberadas del material de envasado, o en el propio envase, secuestrando moléculas de oxidación que proceden de la carne (Pezo y col., 2008). Ni que decir tiene que los agentes antioxidantes en estudio son sustancias naturales; en general, extractos de plantas bien conocidas y utilizadas desde antiguo: romero, orégano y otras similares.

Las investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo utilizan uno de los varios posibles sistemas de generación del envase activo. En nuestro caso, un extracto de orégano o romero se inmoviliza en primer lugar en un barniz, aprobado para estar en contacto con los alimentos (Garcés y col., 2003). Dicho barniz con el agente antioxidante se incorpora a la cara interna del material plástico usado para construir el envase, normalmente un material barrera multilaminado, cuya cara interna está constituida por polietileno. Este polímero es necesario, a su vez, para asegurar el sellado del material plástico a la bandeja que contiene la carne y asegurar así la estanqueidad del envase.

Los primeros resultados se obtuvieron en carne de vacuno fileteada y envasada en una atmósfera modificada rica en oxígeno, utilizando una versión preliminar del envase activo, que fue mejorada con posterioridad. Previamente, se había demostrado que el

envase activo diseñado era capaz de ejercer una acción antioxidante significativa sobre diversas moléculas susceptibles de sufrir oxidación, en particular la mioglobina (Nerín y col., 2003).

El efecto del envase activo sobre la carne de vacuno se muestra en las Figuras 2 y 3. La Figura 2 demuestra el efecto de inhibición de la oxidación de mioglobina con envases conteniendo concentraciones crecientes de agente activo (barniz con romero); los resultados están expresados en porcentaje de metamioglobina (forma oxidada) en la superficie del filete. La utilización del envase activo dio lugar a que dicho porcentaje fuera inferior al 40% los 14 días de conservación de la carne; este porcentaje es aproximadamente el necesario para que el aspecto del filete aparezca como pardo al ojo humano (Djenane y col., 2002; Martínez y col., 2006). La Figura 3, por su parte, demuestra el efecto inhibitorio de la oxidación de ácidos grasos, responsable de la aparición de olores “a carne vieja”. En este caso, los resultados se representan como índice TBARS (sustancias reactivas al ácido barbitúrico, expresadas en forma de malonaldehído), forma habitual de medir la oxidación lipídica. Este índice apenas llegó a 1,5 al cabo de los 14 días, límite a partir del cual los olores anormales empiezan a percibirse por la nariz humana (Green y Cumuze, 1981; Sánchez-Escalante y col., 2003). La conclusión del estudio fue que, en las condiciones utilizadas, la carne en nuestro envase activo tuvo una vida útil de 12-14 días, frente a los 9 de la muestra control.

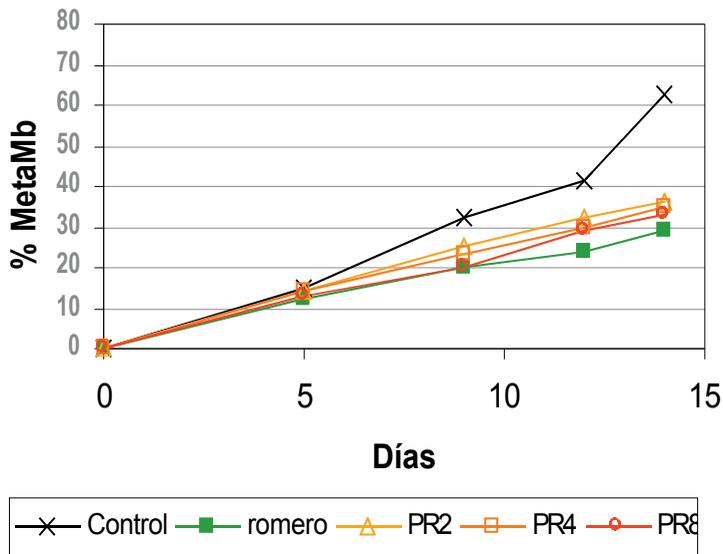


Figura 2. Evolución del porcentaje superficial de metamioglobina en filetes de vacuno envasados en atmósfera modificada con un material activo conteniendo concentraciones crecientes de extracto de romero

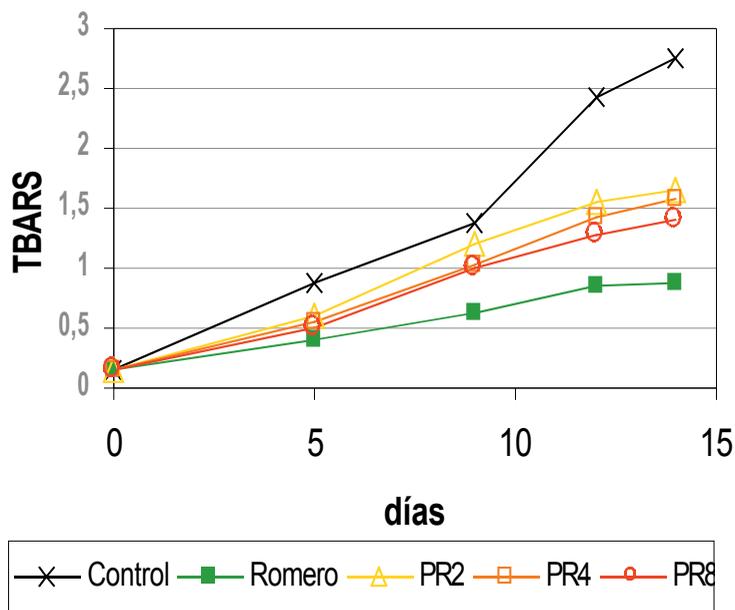


Figura 3. Evolución de las sustancias reactivas a TBA en filetes de vacuno envasados en atmósfera modificada con un material activo conteniendo concentraciones crecientes de extracto de romero

Una vez demostrado el efecto antioxidante del envase activo, estudiamos comparativamente la acción de romero u orégano como agente activo y lo aplicamos a carne de cordero fileteada. Para ello, se envasaron chuletas de pierna de ternasco en envases control o activos con uno u otro agente en presencia de una atmósfera modificada de 80% O₂ y 20% CO₂, y se mantuvieron en un expositor frigorífico a 1±1°C sometidas a iluminación; es decir, en condiciones similares a las de venta habitual en un supermercado (Camo y col. 2008). Es preciso recordar que la luz es un fuerte catalizador de las oxidaciones (Djenane y col., 2001). Se incluyeron además chuletas con un nebulizado superficial de extracto de romero, para comparar el efecto del agente activo en contacto o no con la carne.

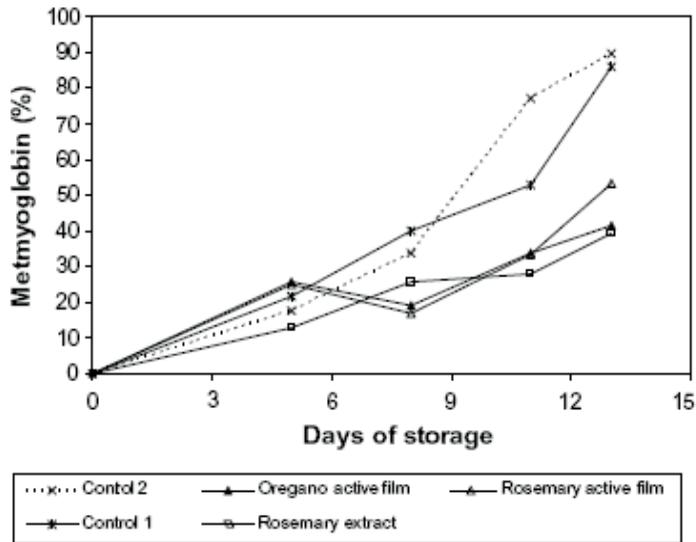


Figura 4. Evolución del porcentaje superficial de metamioglobina en filetes de cordero envasados en atmósfera modificada con un material activo conteniendo extractos de romero u orégano

La Figura 4 muestra los resultados de la formación de metamioglobina. Se aprecia claramente en ella el efecto inhibitor de la oxidación por parte de ambos envases activos, muy similar por otra parte al del extracto de romero añadido en superficie. El límite del 40% de metamioglobina se alcanzó después de los 11 días.

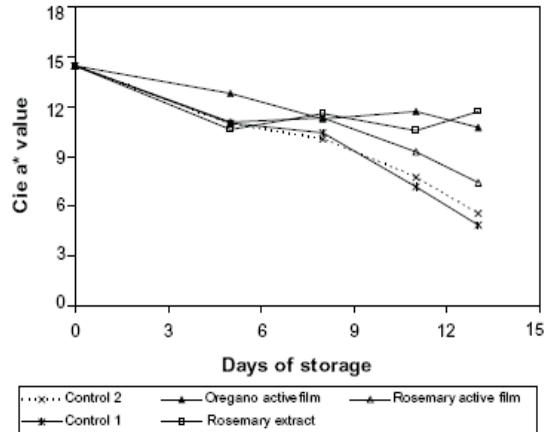


Figura 5. Evolución del índice de rojo (a*) en filetes de cordero envasados en atmósfera modificada con un material activo conteniendo extractos de romero u orégano

La Figura 5 representa la evolución del índice de rojo (a*). En concordancia con lo anterior, la carne mantuvo un valor de a* más elevado en los envases activos; sin embargo, el orégano parecía ser mucho más eficaz que el romero. En este caso, los valores de a* se mantuvieron por encima de 10, límite aproximado del color rojo típico de la carne fresca, hasta los 13 días de exposición.

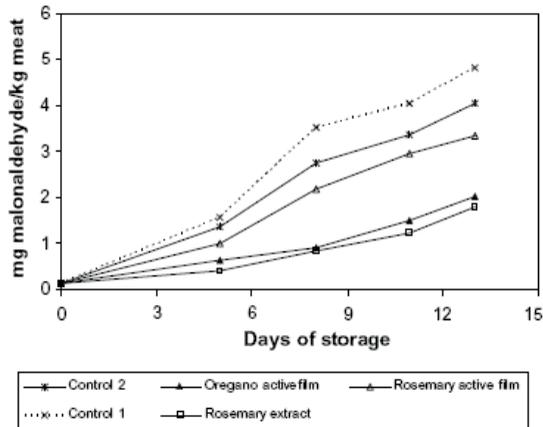


Figura 6. Evolución de las sustancias reactivas a TBA en filetes de cordero envasados en atmósfera modificada con un material activo conteniendo extractos de romero u orégano

En la Figura 6 se recogen los resultados de la evolución de la oxidación lipídica. Dicha oxidación fue muy eficazmente inhibida por el envase activo con orégano, mientras que el que contenía romero tenía sólo un ligero efecto; de hecho, el primero dio lugar a que las chuletas alcanzaran un valor superior a 1,5 sólo al final de la exposición, frente a los 6-7 días que tardaron en alcanzarlo las chuletas control.

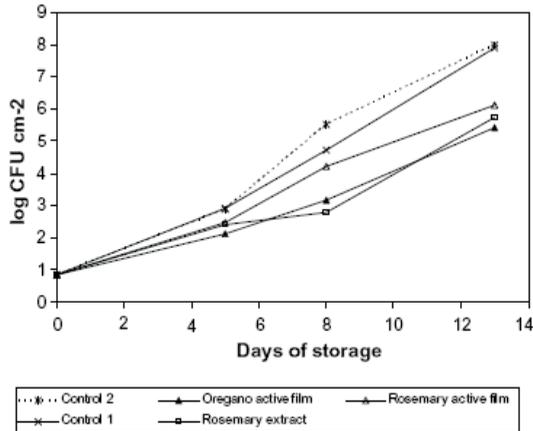


Figura 7. Evolución de la población de psicrotrofos aerobios en filetes de cordero envasados en atmósfera modificada con un material activo conteniendo extractos de romero u orégano

La Figura 7 muestra la evolución de la población microbiana en la superficie de la carne. La utilización de los envases activos dio lugar también a una inhibición significativa de la población microbiana habitual en la superficie de las chuletas, en particular cuando se utilizó orégano. Dicha inhibición dio como resultado unos recuentos inferiores en 1-2 órdenes de magnitud, aproximadamente, a los de los controles. Por otra parte, en el caso del envase activo con orégano, los recuentos no llegaron a 10^6 ni siquiera al final del periodo de exposición. Este efecto antimicrobiano de los extractos de romero y orégano, ya conocido, contribuirá también a la extensión de la vida útil de la carne, pues los cambios deteriorativos de la carne están relacionados, no sólo con la oxidación, sino también con la población microbiana presente.

Parameter	Sample	Days of storage				
		0	5	8	11	13
Red colour	Control 1	1	1	2	3	4
	Control 2	1	1	2	2	4
	Rosemary active film	1	1	1	2	3
	Oregano active film	1	1	1	1	2
	Rosemary extract	1	1	1	2	2
Discolouration	Control 1	1	1	2	3	5
	Control 2	1	1	1	2	4
	Rosemary active film	1	1	1	2	2
	Oregano active film	1	1	1	1	1
	Rosemary extract	1	1	1	2	2
Off-odour	Control 1	1	2	2	3	5
	Control 2	1	1	2	3	4
	Rosemary active film	1	1	1	2	3
	Oregano active film	1	1	1	1	1
	Rosemary extract	1	1	1	1	2

^a Red colour: 1 denoted extremely brilliant fresh-meat red and 5 denoted extremely faded red; discolouration referred to percentage of discoloured surface: 1 = none, 2 = 0–10%, 3 = 11–20%, 4 = 21–60%, and 5 = 61–100%; off-odour referred to the intensity of odours associated to lipid oxidation: 1 = none; 2 = slight; 3 = small; 4 = moderate; and 5 = extreme.

Tabla 1. Evolución de los valores sensoriales de filetes de cordero envasados en atmósfera modificada con un material activo conteniendo extractos de romero u orégano

Por último, la Tabla 1 recoge las puntuaciones sensoriales dadas por un panel de expertos para los parámetros color rojo, decoloración y “off-odour” (“olor a carne vieja”), utilizando una escala de 1 a 5, en la que 1 es el valor característico de la carne fresca y 5 el de la carne totalmente deteriorada. Debe hacerse hincapié en que, de acuerdo con esta escala, valores iguales o superiores a 3 en cada atributo significan que esa carne ha llegado al final de su vida útil, es decir, no es vendible. Obsérvense las notables diferencias entre las muestras. La vida útil de las carnes control no pasa de 8 días, mientras que la del envase activo con orégano alcanza una vida útil de 13 días.

En conclusión, la utilización de un envase activo con extracto de orégano dio lugar a una extensión muy significativa de la vida útil de la carne de cordero, en condiciones similares a las que se usan en su comercialización, que pasó de 8 a 13 días. Estos resultados, evidentemente, significan un gran avance en la mejora de los métodos de conservación en la distribución y venta de la carne de cordero. En la actualidad se prosigue con los experimentos para mejorar y optimizar esta forma de envasado ac-

tivo, con la vista puesta en su utilización industrial. No obstante, la situación legal de estos envases activos es confusa y tendrá que ser desarrollada en un futuro cercano.

BIBLIOGRAFÍA

- Camo, J., Beltrán, J. A. y Roncalés, P. (2008). *Meat Sci.*, 80, 1186-1191.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J.A., y col. (2001). *J. Food Sci.*, 66, 181-186.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán J.A. (2002). *Food Chem.*, 76, 407-415.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán J.A., y col. (2003). *Meat Sci.*, 64, 417-426.
- Djenane, D., Montañés, L., y Roncalés, P. (2005). *Eurocarne*, 133, 153-180.
- Garcés, O., Nerín, C., Beltrán, J. A., y col. (2003). *Pat. Eur.*, 03380302.4
- Martínez, L., Cilla, I., Beltrán, J. A., y col. (2006). *J. Food. Sci.*, 71, 48-53.
- Martínez, L., Cilla, I., Beltrán, J. A., y col. (2007). *Meat Sci.*, 75, 443-450.
- Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., y col. (2006). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7840-7846.
- Pezo, D., Salafranca, J., y Nerín, C. (2008). *J. Chromat.*, A 1178, 126-133.
- Sánchez-Escalante A., Djenane D., Torrescano, G., y col. (2001). *Meat Sci.*, 58, 421-429.
- Sánchez-Escalante A., Djenane D., Torrescano, G., y col. (2003). *J. Food Sci.*, 68, 339-344.

APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES PARA LA MEJORA DE LA SEGURIDAD Y LA CALIDAD SENSORIAL Y TECNOLÓGICA DE LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

José Antonio García Regueiro
IRTA. Tecnología de los Alimentos

La oxidación de los alimentos es uno de los problemas más importantes que afectan a su calidad y seguridad. Desde hace más de 60 años se está estudiando cómo prevenir el principal problema: la rancidez. La oxidación es un fenómeno que se atribuye a la formación de radicales que en una reacción en cadena y después de varias fases finaliza en la formación de compuestos que dan un flavor característico a los alimentos y que provoca el rechazo de los consumidores. Esta respuesta se puede asociar a la prevención de la ingesta de un alimento que ha perdido su estabilidad y que puede dañar la salud de la persona. Una forma de evitar o de reducir la oxidación es la utilización de antioxidantes o de procesos que la limiten.

Nuestro metabolismo emplea procesos oxidativos para obtener energía, lo que conlleva un control de la formación de radicales y de su eliminación mediante varios mecanismos en los que intervienen antioxidantes, enzimas y otras moléculas de modo coordinado. Sin embargo, si se produce un desequilibrio en esta regulación las células sufren daños en sus componentes que pueden llegar a desarrollar o contribuir a la aparición de enfermedades. Se ha demostrado la importancia del control de la oxidación de los alimentos para la salud humana. Un grupo de antioxidantes actúan de modo coordinado formando una red: Vitaminas C y E que son esenciales y los producidos en el organismo: glutatión (Glu, Cys, Gly), ácido lipoico (recicla glutatión), coenzima Q10 (relacionada con la función de la vitamina E). Estos antioxidantes actúan de modo distinto a otros antioxidantes (como los polifenoles). La vitamina E se localiza en las membranas celulares y en las lipoproteínas de transporte para prevenir la oxidación de lípidos. Los ácidos grasos “libres” no son componentes mayoritarios por ello la acción de los antioxidantes *in vivo* está destinada a proteger a estructuras críticas para la función celular y metabólica. Los antioxidantes que no realizan esta función pueden contribuir pero en general actúan en la reducción de radicales libres de modo menos específico en los tejidos.

Esta línea de investigación tiene un desarrollo muy activo, entre los años 2003-2008 se pueden encontrar más de 1200 artículos relacionados con la oxidación y la carne. En ellos se evidencia que el antioxidante más estudiado con aplicaciones prácticas es la vitamina E (α -tocoferol). Un factor que ha contribuido es la reducción del coste de la producción sintética de este antioxidante, aunque se obtiene en forma all-rac que es menos activa. Los organismos vivos poseen sistemas para controlar la oxidación

provocada por la generación de radicales libres mediante sistemas de alta eficacia y complejidad. En la producción de carne, cuando cesa el metabolismo por la muerte del animal, la acción de los mecanismos fisiológicos es nula o mínima y la oxidación puede progresar. Si un alimento puede sufrir un proceso de deterioro por la acción de oxidantes se tiene que proteger sobre todo si su consumo no es inmediato.

La efectividad de un antioxidante depende de su estructura molecular y de la polaridad de la molécula. Los antioxidantes sintéticos se han desechado para su uso en alimentación. Como indica Frankel (2000), esta decisión presenta cierta arbitrariedad sobre todo si se considera que muchos antioxidantes naturales no han sido estudiados para determinar posibles efectos secundarios cuando se usan en concentraciones superiores a las de una dieta de referencia.

Los factores que se consideran en el uso de antioxidantes en producción animal: genética, metabolismo de los lípidos, composición de la dieta, fuente de grasa. Los antioxidantes más utilizados son: vitamina E, carotenos, polifenoles, extractos de cítricos y de otras plantas.

Producción animal y antioxidantes

La producción de carne de calidad requiere, en las condiciones actuales, asegurar su valor nutritivo en procesos de conservación y elaboración que pueden modificar la calidad sensorial y su seguridad. La comercialización de la carne en lonchas envasadas en diferentes formas, sobre todo en atmósferas modificadas, necesita aumentar la estabilidad oxidativa para mantener el color y la calidad sensorial. La forma más sencilla de lograr un aumento de la estabilidad oxidativa es la adición en los piensos de α -tocoferol. Este compuesto se incorpora en el tejido muscular y, en particular, en las membranas celulares donde ejerce su efecto protector de modo eficaz. Numerosos trabajos han mostrado su eficacia y la acumulación en el tejido muscular con aumentos respecto al grupo control de entre 3-5 veces. El coste de esta práctica fue durante un tiempo una limitación pero el precio se ha reducido de modo que es viable. La reducción de la aparición de olores relacionados con la rancidez durante el cocinado de la carne y su posterior consumo ha sido demostrada.

Otros antioxidantes se pueden emplear en producción animal, pero su efectividad no es la misma que la del α -tocoferol. El empleo del β -caroteno en concentraciones superiores a 15 mg/Kg mostró en pollos una acción pro-oxidante, dependiente del tipo de grasa o aceite vegetal utilizado. Un grado elevado de instauración induce un mayor estrés oxidativo, y por ello resulta más crítico su control. El β -caroteno es un precursor de vitamina A y de derivados de la misma, con efectos filológicos complejos, como es el caso del ácido retinoico. Esto provoca que la cantidad suministrada deba ser ajustada para evitar efectos no deseados. Una dificultad para interpretar de

modo adecuado los efectos de algunos antioxidantes es la determinación analítica en el tejido muscular. La concentración de β -caroteno y licopeno, en el tejido muscular de animales alimentados con suplementos de estos antioxidantes, es muy baja por lo que o bien la metodología analítica no es óptima o bien su concentración es tan baja que resulta difícil poder explicar sus efectos antioxidantes o pro-oxidantes. Los antioxidantes luteína y zeaxantina se acumulan en la mácula de la retina en algunos animales, lo que muestra las diferencias de acción de los posibles antioxidantes a emplear en producción animal.

La acción del α -tocoferol y el β -caroteno en la composición de los ácidos grasos del tejido muscular es mínima y por ello el tipo de grasa o aceite usado en la dieta determina, junto con las condiciones de manejo, la composición de los lípidos corporales.

Determinación de la estabilidad antioxidante

La evaluación de la estabilidad antioxidante se suele efectuar en la mayor parte de estudios mediante la determinación de los TBARS (Substancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico). Este procedimiento es un índice global que indica el grado de oxidación producida después de la formación de peróxidos. Su aplicación, en prácticamente todos los trabajos publicados, permite una comparación efectiva dentro de un estudio, pero en menor grado entre estudios. Cuando se han realizado ejercicios de intercomparación, los valores obtenidos entre diferentes laboratorios presentaban una dispersión demasiado elevada. Uno de los problemas radica en que el fundamento del método reside en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malonaldehído que se forma a partir de la oxidación del ácido linoléico (C18:3). Sin embargo, esta reacción ocurre con otros aldehídos o compuestos que puedan reaccionar con el ácido tiobarbitúrico. A pesar de estos problemas, el TBARS está aceptado como un parámetro esencial en los estudios relacionados con la oxidación.

Otras medidas se basan en la actividad de los enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSPHx. En la figura podemos observar la actividad de estos enzimas en pechuga de pollo. Se puede apreciar como la actividad de la GSPHx es la más elevada en relación a las actividades de la CAT y de la SOD (Carreras y col., 2005).

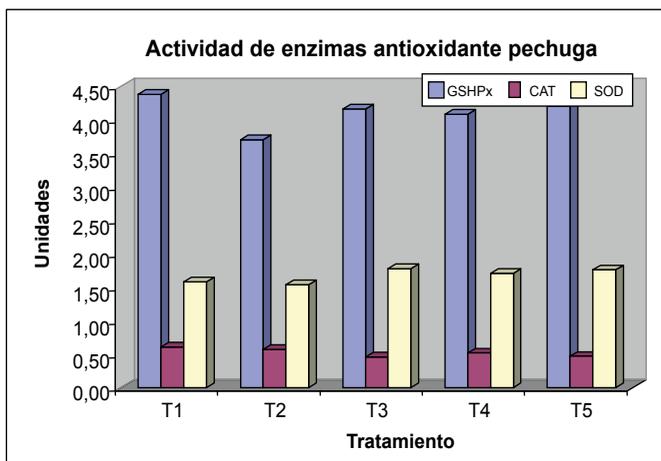


Figura 1. Actividades de enzimas antioxidantes en pechuga de pollo. Adaptado de Carreras (2005)

En la Figura 2 se observan las concentraciones de α -tocoferol, según esto podemos observar que, a pesar de una mayor concentración de este compuesto en los tratamientos T4 y T5, las actividades de los enzimas no se vieron afectadas. Se puede apreciar como la concentración de α -tocoferol es más elevada en el muslo que en la pechuga de pollo. En el muslo el tipo de músculos y su metabolismo facilitan una mayor acumulación de α -tocoferol.

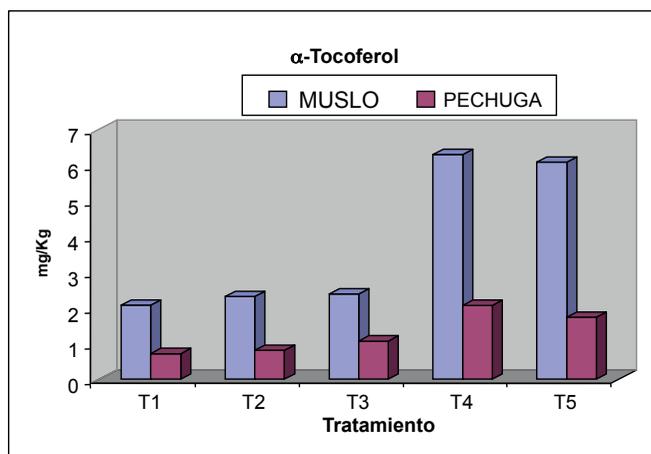


Figura 2. Concentración de α -tocoferol en muslo y pechuga de pollo. Adaptado de Carreras (2005)

Otras formas de determinar el grado de oxidación son el índice de peróxidos y la determinación de volátiles, entre ellos el hexanal que se asocia al descriptor sensorial de rancidez. Sin embargo, hay más alternativas para determinar el grado de oxidación y se están investigando métodos más fiables y adaptados a condiciones específicas en función del alimento a estudiar. La estabilidad de aceites vegetales mediante el empleo de la técnica Rancimat es un ejemplo de este enfoque.

BIBLIOGRAFÍA

Carreras, I. (2005). Tesis Doctoral. Universidad de Girona.

Carreras, I., Castellari, M., Valero, A., y col. (2005). *J. Sci. Food Agric.*, 85, 2407-2412.

APORTACIÓN A LA OPTIMIZACIÓN DEL PERFIL NUTRITIVO DE LA LECHE MEDIANTE LA ALIMENTACIÓN DEL GANADO: ANTIOXIDANTES

Ismael Martínez Lede
Dpto. de I+D de FEIRACO

Antioxidantes en la alimentación de rumiantes

Uno de los principales problemas al que se enfrentan los nutricionistas de vacas de leche en las fórmulas en base a ácidos grasos insaturados es la oxidación de los mismos. Los lípidos con dobles enlaces de carbono tales como los presentes en los ácidos grasos insaturados (p.e. C18:1, C18:2, C18:3, EPA, DHA) y las vitaminas es que son susceptibles de oxidarse. El átomo de carbono adyacente al doble enlace es oxidado formando metabolitos reactivos con oxígeno y radicales libres que propagarán aún más dicha reacción de oxidación. El resultado final es una pérdida de los ácidos grasos insaturados de la grasa dietética y la generación de radicales libres que atacarán a otros ácidos grasos insaturados. La oxidación de la grasa no sólo reduce el valor biológico y energético de la misma, sino que también propaga la oxidación a otros ingredientes lipídicos, tales como grasas añadidas, semillas oleaginosas y granos de destilación que, en caso de no ser estabilizados, pueden contribuir significativamente a la carga de radicales libres en el animal.

En el cuerpo existe un equilibrio natural entre la formación de radicales libres durante el metabolismo normal de las células y la capacidad antioxidante endógena del animal que evita que los radicales libres se acumulen y dañen las células. Sin embargo, en situaciones en que los niveles de radicales libres exceden la capacidad antioxidante del animal, puede darse una situación de estrés oxidativo. Las vacas de alta producción son propensas a sufrir un estrés oxidativo, y la situación puede verse incluso exacerbada en determinadas condiciones medioambientales, fisiológicas y dietéticas. Los radicales libres, mediante la oxidación de ácidos grasos esenciales de las membranas lipídicas, pueden dañar las células y afectar la producción y estado sanitario del animal.

La capacidad antioxidante endógena del animal consiste en tres grupos principales de antioxidantes (Miller y col., 1993). El primer grupo, antioxidantes enzimáticos, está representado por la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). Éstas forman parte del principal sistema de defensa intracelular y el principal sistema de defensa frente a radicales libres como son los peróxidos e hidroperóxidos. SOD es un enzima antioxidante involucrado en la eliminación de formas reactivas de oxígeno formadas en las células. Cu, Zn y Mn son elementos esenciales

en la actividad de SOD. Deficiencias en Cu, Zn y Mn resultan en una respuesta inmune comprometida en vacas de leche y ganado bovino de alta producción, haciendo que estos animales sean más propensos a sufrir un estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se da cuando existe un desequilibrio entre los niveles de materias primas altamente oxidables (MPO) y la capacidad antioxidante del animal. Una acumulación indeseable de radicales libres se da en las células, iniciándose entonces una reacción oxidativa en cadena y la oxidación lipídica. El efecto directo es principalmente un daño oxidativo a los lípidos y a diferentes macromoléculas. Este efecto altera la membrana celular, resultando en rutas metabólicas modificadas en una fisiología alterada y en patologías del propio animal. Debido a este motivo, el estrés oxidativo ha podido ser asociado a un incremento en la incidencia de desórdenes sanitarios tales como tetania de los prados (milk fever) y desplazamiento del abomaso (Weiss, 1998; Miller y col., 1993).

Los antioxidantes dietéticos pueden evitar la oxidación de los lípidos dietéticos el propio pienso y mejorar la productividad del animal. La literatura en aves ha descrito en profundidad la reducción significativa en ganancia de peso y en índice de conversión que experimentan los animales ante la inclusión de grasa oxidada en la dieta (Cabel y Waldroup., 1988; Dibner y col., 1996) y cómo la inclusión de aditivos antioxidantes dietéticos disminuye este efecto. Los antioxidantes dietéticos, mediante una reducción de los niveles de oxidación de las MPO y posterior oxidación lipídica, son capaces de reducir el impacto negativo de la grasa oxidada. Alimentar con grasa oxidada conlleva un incremento de la tasa de renovación intestinal y compromete la respuesta inmune del animal (Dibner y col., 1996). Los antioxidantes pueden, mediante una estabilización de las MPO en el medio, mantener la integridad de los biles intestinales y la tasa de renovación intestinal.

En ganado bovino de carne, estabulado, la integridad de la pared ruminal se ve comprometida cuando el animal es alimentado con dietas ricas en concentrado, permitiendo a las bacterias penetrar en el corriente sanguíneo, así como el desarrollo de abscesos hepáticos. En una recopilación de experimentos con bovino de carne, la suplementación con antioxidantes en la dieta permitió reducir la incidencia de abscesos hepáticos así como mejorar la ganancia de peso (Vázquez-Añón y col., 2006). La suplementación con antioxidantes permitió una mejora directa del estado oxidativo del animal tal y como se pudo observar en los superiores niveles séricos de vitaminas E y A y un inferior estado oxidativo lipídico de la carne picada (Krumnsiek y Owens, 1998). Los antioxidantes dietéticos, mediante una estabilización de las MPO, son capaces de reducir la carga de peróxidos en el animal y de mejorar la capacidad antioxidante del animal.

Alimentar con grasa oxidada al animal no tan sólo incrementa la carga de peróxidos del mismo, sino que también puede afectar negativamente la fermentación ruminal. El efecto de una alimentación con grasa oxidada sobre dicha fermentación ruminal fue comprobada mediante la utilización de sistemas de cultivo continuo de fermentación (Vázquez-Añón y col., 2006). Una alimentación con grasa oxidada redujo la síntesis proteica microbiana, así como su eficiencia, y el efecto pudo verse aliviado mediante la adición de antioxidantes en la dieta. La suplementación con antioxidantes también mejoró la digestibilidad de la fibra neutra y ácido detergente en la grasa fresca y oxidada, sugiriendo así un efecto global positivo del uso de antioxidantes sobre la microflora ruminal. La suplementación de antioxidante en la dieta es capaz de mejorar la productividad láctea y la eficacia de producción, así como la digestibilidad de materia orgánica en el rumen.

Las vacas de alta producción alimentadas con niveles moderados a elevados de ácidos grasos insaturados son propensas a sufrir estrés oxidativo. Niveles indeseables de radicales libres pueden oxidar la membrana lipídica, afectando a los rendimientos y a la salud de los animales. Los lípidos dietéticos tales como grasas añadidas, semillas oleaginosas y granos de destilación, si no son estabilizados, pueden contribuir significativamente a un incremento en la carga de radicales libres en el animal. Los antioxidantes dietéticos evitan la oxidación de los lípidos en el alimento final. En ganado bovino de leche, la suplementación con antioxidantes en la dieta mejora la función ruminal y la producción láctea. Así pues, se puede concluir cómo la suplementación con antioxidantes en la dieta puede estabilizar el contenido lipídico de la misma y mejorar la productividad y estado sanitario del rumiante.

Atendiendo a lo expuesto, la alimentación de las vacas que producen la leche UNICLA se suplementa con vitamina E y complejos orgánicos de minerales (zinc y manganeso en forma de quelatos de metionina, y selenio en forma de levaduras enriquecidas que aportan este mineral en forma de selenoaminoácidos). De esta forma protegemos a las vacas del estrés oxidativo. Además, la vitamina E protege a la materias primas de la oxidación.

FEIRACO ha cuantificado la presencia en leche del selenio incorporado a la alimentación de las vacas. Esto fue resultado de un proyecto de I+D realizado entre 2003 y 2005, titulado "Estudio de la corrección de déficit de selenio en la dieta mediante la suplementación de especies químicas biodisponibles para mejorar su aporte de forma natural a través de la leche". El objetivo del mismo fue la obtención de leche, de forma natural y a través de la alimentación de las vacas, de leche enriquecida con selenio en una forma biodisponible. En su desarrollo se realizó la suplementación del alimento del ganado con distintas especies químicas de selenio (selenio inorgánico y selenio orgánico) y se concluyó que la selenometionina es la forma que más incre-

menta el contenido de selenio en la leche, además de ser la forma más biodisponible para la especie humana (Cabel y Waldroup, 1988).

BIBLIOGRAFÍA

Cabel, M.C. y Waldroup, P.W. (1988). *Poult. Sci.*, 67, 1725-1730.

Dibner, J.J., Atwell, C.A., Kitchell, M.L., y col. (1996). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 62, 1-13.

Krumsiek, C.L. y Owens, F.N. (1998), *Oklahoma Agric. Exp. Stat. Res. Rep.*, 965, 64-68.

Miller, N.J., Diplock, A.T., Rice-Evans, C., y col. (1993). *Clinical Science*, 84, 407-412.

Vázquez-Añón, M., Kratzer, D., González-Esquerra, R., y col. (2006). *Poult. Sci.*, 85, 693-705.

Weiss, W.P. (1998). *J. Dairy Sci.*, 81, 2493-2501.

ANTIOXIDANTES Y OXIDACIÓN LIPÍDICA DE PRODUCTOS CÁRNICOS

Daniel Franco Ruiz

Dpto. Producción Animal. Centro Tecnológico de la Carne

Los nuevos retos a que se enfrentan las sociedades han avanzado de tal forma que los objetivos que persigue una “dieta equilibrada” se han ido modificando desde la mera satisfacción de necesidades nutricionales hasta el punto de promover el consumo de alimentos saludables que disminuyan el riesgo de enfermedades crónicas. Cada vez son mayores los esfuerzos en investigación para evaluar la influencia de la alimentación sobre la salud; entendiendo ésta no sólo como la ausencia de enfermedad, sino como un equilibrio entre bienestar físico y psicológico. Existen pruebas científicas que confirman la hipótesis de que ciertos alimentos y/o algunos de sus componentes tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana. Nace así la idea de una “nutrición óptima” centrada en la mejora de la calidad de la ingesta diaria en términos de nutrientes o no nutrientes que favorecen el mantenimiento de la salud.

A lo largo de los últimos 20 años diversos factores como el aumento del tiempo de ocio o la incorporación de la mujer al mercado laboral han provocado una disminución en el tiempo dedicado a la elaboración y preparación de la comida. Sumado esto al hecho de que las preferencias del consumidor han priorizado la seguridad alimentaria y el valor nutritivo a los criterios exclusivamente sensoriales (Hernández, 2002), es cada día más habitual la venta de platos congelados o productos de elevada preparación, como es el caso de carne fileteada y envasada en diferentes formatos y/o atmósferas. En sentido comercial hay que considerar que la decisión de compra de la carne por parte del cliente se basaba fundamentalmente en el color (Shackelford y col., 1992), y actualmente se tiene además en cuenta, con la misma importancia o más, los aspectos ya comentados como el valor nutricional o la garantía sanitaria.

Importancia de la grasa en la salud humana

El consumidor se interesa cada vez más por alimentos saludables con garantía sanitaria. La incidencia del contenido total y composición de la grasa sobre la obesidad y enfermedades cardiovasculares, derivadas del sedentarismo y alimentación desequilibrada, hace que el interés sea mayor por alimentos de contenido moderado en grasa. En el caso de la carne, se valoran los esfuerzos que se realicen para que sea más saludable, como es la disminución en ácidos grasos saturados (AGS) por su efecto perjudicial y el enriquecimiento en ácidos grasos polinsaturados (AGPS) $\omega 3$ y por su acción beneficiosa en problemas cardiovasculares y tumorales (Hu y col., 2002). Consumidores preocupados por estos aspectos nutricionales agradecen que

se les informe de la carne de animales que en razón de raza, peso/edad de sacrificio, alimentación y manejo tengan índices más favorables que los recomendados como mínimos o máximos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En este punto hay que destacar que cambios relativos a la producción animal como la dieta pueden modificar el perfil de ácidos grasos de sus productos, haciéndolos más atractivos desde el punto de vista de la salud (Scollan y col., 2001).

El consumidor demanda todo esto pero sin que desmerezca la calidad sensorial, ya que cuando se sienta a la mesa y para que sea fiel a una marca es necesario que la carne satisfaga sus expectativas de flavor, terneza y jugosidad.

Vida útil de la carne

Se entiende como vida útil de la carne al período que esta permanece en el expositor a disposición del cliente en el punto de venta. Comienza cuando la carne está madura y el final está marcado por la fecha de caducidad fijada previamente en condiciones normales de transporte almacenamiento y exposición; o incluso antes, por descarte debido a apreciación de zonas con degradación o alteración del color y/o enranciamiento de la grasa y/o degradación microbiana de los aminoácidos, provocando olores y sabores desagradables (Cornet y Bousset, 1990; Kato y col., 1989).

La fecha de caducidad es importante porque obliga a la retirada del producto siendo una información que consultan normalmente los consumidores. El producto debe llegar a esta fecha, normalmente, con todas sus características sensoriales. Pero la modificación de los parámetros del proceso que lleva desde la canal hasta la fecha de caducidad puede determinar el descarte de la carne como de cualquier otro alimento percedero antes de que se cumpla ésta. El descarte en la carne envasada en filetes se realiza, fundamentalmente, debido a cambios en el color de fácil percepción que incitan al rechazo del comprador, además de ser el primer signo de alteración de la calidad de la carne. Otra causa de rechazo es por la apreciación de viscosidad superficial, pegajosa al tacto, que indica una proliferación microbiana no deseable de *Pseudomonas* spp., entre las que hay que destacar *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. fragi*.

La duración de la vida útil es por tanto muy importante comercialmente porque prolonga la oportunidad de venta minimizando las pérdidas por descarte.

Los factores que afectan a la duración de la vida útil son numerosos, pudiéndose prolongar con la disminución de la contaminación microbiana (Borch y col., 1996), la reducción del tiempo de almacenamiento, las bajas temperaturas (Gill y Molin 1991), la ausencia de luz ultravioleta (Djenane y col., 2001), el tipo de envasado (Borch y col., 1996) y la adición de antioxidantes y/o antimicrobianos (Ahn y col., 2002; Sánchez-Escalante y col., 2003).

Influencia de la grasa en la vida útil de la carne y productos cárnicos

El contenido en grasa de la carne de vacuno depende de factores diversos como la raza o la edad de sacrificio y, fundamentalmente el porcentaje de ácidos grasos de la alimentación. Si bien un enriquecimiento de la carne en AGPI, ω 3 y CLA es beneficioso desde el punto de vista de la salud, estos componentes reducen la estabilidad oxidativa de la carne y la predisponen al enranciamiento.

Con excepción de la carga microbiana, el daño oxidativo es el factor más importante en el deterioro de la carne y se ve reflejado con el aumento de rancidez y pérdida de color debido a la oxidación de la grasa y de la mioglobina, respectivamente, y de las dos fracciones lipídicas de la carne, fosfolípidos de membrana y triglicéridos, los primeros contienen mayor proporción de AGPI y por ello son responsables de la iniciación de la oxidación lipídica. Incluso las carnes magras son susceptibles a dichos fenómenos oxidativos, ya que aunque tienen un reducido contenido en grasa, la que disminuye es la fracción triglicérida (compuesta fundamentalmente por AGS), mientras que la fracción fosfolipídica se ve menos afectada (Monahan, 2002).

Por tanto el enriquecimiento con antioxidantes es necesario para paliar al máximo el daño oxidativo (Jakobsen, 1999). Es necesario prever la presencia de suficiente contenido de estos compuestos en la alimentación del animal y/o añadirlos a la carne durante el almacenamiento.

Adición de antioxidantes

La utilización de antioxidantes permite prolongar el tiempo de conservación, lo que incrementa su oportunidad de venta sin que estén deterioradas sus características nutritivas y sensoriales, más aún en el momento actual en que el comercio de la carne maneja partidas más voluminosas y alcanza puntos de venta cada vez más distantes.

La estabilidad de la carne se puede ver incrementada por la adición de antioxidantes. Su principal acción en la extensión de la vida útil radica en las siguientes capacidades:

- *Aumentar la estabilidad del color* => principalmente por evitar la transición prematura de mioglobina a metamioglobina.
- *Mantener las condiciones organolépticas* => evitar o ralentizar el enranciamiento de la grasa. Acción especialmente importante en carne procedente de animales a los que se les han suplementado ácidos grasos poliinsaturados, los más fácilmente oxidables.
- *Evitar el oscurecimiento* (o pérdida de color) inducido por radicales libres generados por acción de luz a la que es expuesta la carne en las condiciones de

venta. Esta acción no es atribuible a todos los antioxidantes, pero sí a los de naturaleza polifenólica y a los extractos de plantas, que tienen la capacidad de captar la radiación ultravioleta.

- Ampliar la *resistencia al crecimiento bacteriano*, pues los antioxidantes de naturaleza polifenólica poseen frecuentemente actividad antimicrobiana.

Procesos oxidativos en carne y productos cárnicos

Una de las paradojas de la vida en este planeta es que una molécula que sustenta la vida aeróbica, el O_2 , esencial para el metabolismo energético y la respiración, pueda constituir el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como “estrés oxidativo”, consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos de defensa antioxidante (Marx, 1985). Estas sustancias se generan tanto a nivel intracelular como extracelular y son capaces de difundir por el citosol y a través de las membranas deteriorar los distintos componentes celulares (Chihuilaf y col., 2002). Los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos constituyen su principal blanco de actuación.

Acción sobre los lípidos

Es precisamente sobre estas biomoléculas donde recae el mayor daño derivado del estrés oxidativo, en un proceso conocido como peroxidación lipídica. Afecta a los ácidos grasos poliinsaturados y las consecuencias son evidentes cuando estos forman parte de los lípidos de las membranas celulares ya que se ve alterada su adhesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica (Yu, 1994).

La **peroxidación lipídica** y los cambios asociados a ella constituyen la principal causa de deterioro (Sevanian y Hochstein, 1985) ya que provoca la aparición de olores y sabores extraños, alteración del color y, en general, una reducción de la calidad organoléptica de la carne. Por otro lado, provoca una disminución del valor nutritivo de la carne y la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud relacionados con el riesgo de padecer diversas patologías.

De forma general, cabe destacar que los productos de oxidación más estudiados son los volátiles por sus efectos a nivel sensorial y la mayor facilidad de análisis; sin embargo, los productos no volátiles pueden ser más importantes cuantitativamente y con efectos, en general, desconocidos sobre la seguridad alimentaria y la calidad sensorial de la carne, como puedan ser los óxidos de colesterol (Maraschiello, 1998).

Acción sobre las proteínas

Aunque también constituyen un blanco para las especies reactivas, el efecto sobre ellas es menos intenso que en el caso de los lípidos a causa de la lenta progresión

de las reacciones. El ataque oxidativo a las proteínas puede provocar modificaciones en aminoácidos específicos, fragmentación de la cadena peptídica, agregaciones o entrecruzamientos, alteraciones de la carga eléctrica o incremento de la susceptibilidad a la proteólisis (Shacter, 2000).

El término **oxidación proteica** hace referencia a la modificación de una proteína inducida de forma directa mediante ROS o bien indirectamente por reacción con productos secundarios del estrés oxidativo. Las principales consecuencias sobre la calidad de la carne y productos cárnicos se aprecian en el color. La mioglobina, proteína conjugada constituida por una parte proteica (globina) y un grupo prostético no peptídico (grupo hemo), es la principal responsable del color rojo del músculo. En la carne fresca da un color rojo púrpura, en contacto con el aire se oxigena dando lugar a la oximioglobina de color rojo brillante y cuando la mioglobina se oxida se genera la forma férrica (Fe^{3+}), denominada metamioglobina, responsable de la coloración marrón de la carne. Las proporciones relativas de las formas oxigenadas y oxidadas en la carne dependen de la presión parcial de oxígeno, siendo favorecida la formación de metamioglobina por presiones de oxígeno bajas (Bodwell y McClain, 1971).

Acción sobre otras biomoléculas

El ADN mitocondrial constituye el principal blanco de ataque ya que por su localización se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de especies reactivas provenientes de la cadena respiratoria. También se ha observado que algunos productos de oxidación pueden producir una gran variedad de efectos biológicos adversos como la cooxidación de vitaminas y carotenoides, la inhibición de la biosíntesis del colesterol, aterogénesis, citotoxicidad o carcinogénesis (Kanner, 1994).

Antioxidantes endógenos presentes en productos cárnicos

Naturaleza proteica: carnosina y taurina

Se han aislado diferentes péptidos a partir de diversas fuentes proteicas cárnicas con actividades quelantes en el aparato digestivo y en el sistema inmunológico (como antimicrobianos e inmunomodulantes). Estos péptidos podrían utilizarse como aditivos funcionales alimentarios. Se han aislados péptidos con actividad antioxidante *in vitro* y psicológica (efecto antifatiga) *in vivo* a partir de carne de cerdo (Arihara y col., 2005), pollo (Arihara, 2006) y ternera (Jang y Lee 2005).

La carnosina es un dipéptido, abundante en el tejido muscular, que juega un papel importante como antioxidante en la oxidación lipídica (Boldryrev y col. 1997), ya que actúa capturando radicales libres en el sarcoplasma y como agente quelante de metales (Decker y Crum, 1993). Sus propiedades antioxidantes se basan en su

habilidad para actuar como quelante, como inactivador de radicales libres y como donador de H⁺. Es hidrosoluble, por lo tanto puede actuar en la fase acuosa del músculo donde se encuentran muchos catalizadores de la oxidación lipídica. Además, protege el color de la carne inhibiendo la oxidación de la mioglobina. Mantiene su eficacia antioxidante en un rango de pH de 5,1 a 7,1, incluso después del tratamiento térmico, por lo que ofrece un buen potencial como antioxidante en carnes procesadas (Kendler, 2002). La taurina, es un aminoácido que se encuentra en forma libre, por lo que no es constitutivo de la proteína, y es un potente antioxidante.

Naturaleza lipídica: Ácido dihidrolipoico (DHLLA)

Recibe este nombre por su solubilidad en lípidos. Factor crítico en el metabolismo energético mitocondrial, es producido endógenamente aunque en condiciones de estrés fisiológico puede no generarse en proporciones adecuadas y por eso se clasifica como un nutriente esencial. El ácido dihidrolipoico es un fuerte reductor capaz de interactuar con especies reactivas de oxígeno como los radicales hidroxilos, peróxido y superóxido, el ácido hipocloroso y el oxígeno singlete. También es capaz de quelar iones metálicos y de regenerar el ascorbato que, a su vez, interviene en el reciclaje de la vitamina E (Kendler, 2002).

Vitaminas: Vitaminas A, C y E

Vitamina A

Las más importantes fuentes de vitamina A son frutas y vegetales, pero la carne y el hígado también lo son debido a que la eficacia de conversión de β -caroteno en vitamina A es menor en vegetales que si la tomamos directamente del hígado o carne. Con 100 gramos de carne o hígado diarios se cubre el 100 % de la RDA. Según Biesalski (2005) si el β -caroteno de vegetales y frutas es la única fuente de vitamina A (p.e. dietas vegetarianas estrictas) se necesitan más de 500 g de vegetales ricos en β -caroteno diarios para alcanzar 1 mg de retinol (debido a su bajo índice de conversión 1:12). Esto se puede conseguir con 100 g de hígado consumidos 2 veces al mes; este autor también opina que la ingesta diaria de vegetales aporta más contaminantes que los supuestos o cuestionables que pueda tener el hígado (p.e. hormonas, metales o xenobióticos, etc.). Los animales y los humanos no son capaces de sintetizarlos y los absorben a través de la dieta (Olmedilla, 2002). El β -caroteno podría complementar el papel antioxidante de la vitamina E ya que esta es efectiva a presiones parciales de oxígeno superiores. Por el contrario, a altas presiones parciales de oxígeno, el β -caroteno genera especies radicalarias capaces de promover la oxidación. Estudios de suplementación de este carotenoide en la dieta animal ponen de manifiesto que el β -caroteno puede manifestar capacidad

antioxidante o prooxidante en función de la concentración a la que se encuentre y del tipo de grasa suministrada en la dieta (Ruiz y col., 1999; Maraschiello, 1998).

Vitamina C

El mecanismo antioxidante del ácido ascórbico (vitamina C) es complejo debido a sus múltiples funciones. Por un lado, tiene capacidad de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} que, a su vez, puede descomponer hidroperóxidos lipídicos (ROOH) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generando radicales libres alcoxilo o hidroxilo, respectivamente. Por lo tanto, en presencia de hierro, peróxidos lipídicos y/o peróxido de hidrógeno, el ácido ascórbico puede actuar como prooxidante (Niki, 1987). Por otro lado, el ácido ascórbico se considera el antioxidante hidrosoluble más importante en los fluidos extracelulares. Reacciona de forma directa con los radicales superóxido, hidroxilo y con hidroperóxidos lipídicos (Chihuilaf y col., 2002). Además, participa en el reciclaje de la vitamina E, reduciendo el radical tocoferil y regenerando el α -tocoferol nativo (Niki, 1987). Cuando los radicales libres se generan en la fase acuosa, los antioxidantes hidrosolubles como la vitamina C actúan en primer lugar, y cuando los radicales llegan a las membranas, actúa la vitamina E; en este caso, la vitamina E y la vitamina C tienen un efecto aditivo. En cambio, cuando los radicales libres se generan a nivel de la membrana, la vitamina E actúa sobre ellos en primer lugar y la función de la vitamina C consiste en regenerar el α -tocoferol, permitiendo así que este vuelva a actuar; en este caso, las dos vitaminas tienen un efecto sinérgico (Niki, 1987). En general, el ácido ascórbico tiende a ser prooxidante a bajas concentraciones y antioxidante a concentraciones elevadas (Morrissey y col., 1998).

Vitamina E

El término vitamina E hace referencia a una familia de compuestos relacionados estructuralmente y que incluye todos los derivados tocol y tocotrienol que manifiestan la actividad biológica del α -tocoferol. De forma general, el término vitamina E se utiliza para referirse al α -tocoferol. Es un compuesto minoritario, pero que está presente entre los constituyentes lipídicos de las membranas celulares y las lipoproteínas. La vitamina E es un nutriente esencial que no puede ser sintetizado por los animales por lo que su presencia en los tejidos de estos refleja la ingestión a través de la dieta. Debido a sus características liposolubles, la absorción de la vitamina E depende de la capacidad del animal para absorber y digerir la grasa de la dieta. Debido a sus características hidrofóbicas, la vitamina E se localiza principalmente en los depósitos de grasa y las membranas celulares. Es esta localización preferencial la que hace que la vitamina E sea tan eficaz en su papel antioxidante y estabilizador de las membranas celulares (Wang y Quinn, 1999). El hígado, músculo esquelético y tejido adiposo son los tejidos con más capacidad de acumulación de α -tocoferol (Bjorneboe y col., 1990). La vitamina E es el principal antioxidante liposoluble capaz

de romper la cadena de propagación de la oxidación lipídica. Protege principalmente los AGPI de los fosfolípidos de las membranas y de las lipoproteínas plasmáticas. Su principal papel consiste en capturar radicales peroxilo antes de que estos ataquen un sustrato lipídico diana y propaguen la peroxidación lipídica. Actúa cediendo el H del grupo hidroxilo del carbono 6 al radical peroxilo y se forma el radical α -tocoferoxil. El incremento de la concentración tisular de α -tocoferol protege de la oxidación, no solamente a los lípidos de membrana, sino también a la mioglobina, importante para el mantenimiento de la estabilidad del color especialmente en carnes rojas (Liu y col., 1995). La acumulación de vitamina E es músculo-dependiente. La capacidad de almacenar α -tocoferol difiere según la composición del músculo. Se ha observado que los músculos esqueléticos con más capacidad oxidativa (ricos en fibras del tipo I y IIA) tienen más capacidad de almacenaje. Esto podría deberse a que estos tipos de músculos poseen más capilares sanguíneos, por lo que el aporte de vitamina E es superior, contienen más mitocondrias y más membranas donde acumular la vitamina y el contenido lipídico también es superior, lo que supone más capacidad de almacenaje de la vitamina (Jensen y col., 1998). El α -tocoferol incorporado al tejido muscular no se degrada durante el almacenaje ni la cocción de la carne, por lo que su efecto protector se mantiene (Jensen y col., 1998). El suplemento de alfa-tocoferol se ha empleado como tratamiento para mantener el color de la carne, así como aumentar la estabilidad oxidativa de la grasa. Su principal influencia es el mantenimiento del color.

Sistema enzimático endógeno (Catalasa, SOD y GSPHx)

Glutati6n peroxidasa (GSHPx)

Es una selenoproteína que se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol de las células. Se considera el enzima con mayor capacidad para eliminar peróxidos. Actúa sobre el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos. La GSHPx necesita selenio (Se) en forma de selenocisteína, en el centro activo, aunque se ha descrito otra glutati6n peroxidasa independiente de Se que es reactiva únicamente frente a peróxidos lipídicos (Lawrence y Burk, 1976). Algunos estudios con animales han demostrado que la actividad GSHPx dependiente de Se está muy relacionada con la ingestión dietética de Se (DeVore y col., 1983).

Catalasa (CAT)

Es una hemoproteína de amplia distribución intracelular, pero se encuentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias. Descompone el peróxido de hidrógeno en H_2O y O_2 (Schwimmer, 1981). En general, bajas concentraciones de H_2O_2 estimulan la actividad de peroxidasa como la GSHPx, mientras que la CAT actúa a concentraciones superiores de H_2O_2 (Yu, 1994).

Superóxido dismutasa (SOD)

Es una metaloproteína presente en las células (citósol, mitocondrias, lisosomas, núcleo) y fluidos extracelulares. La biosíntesis de este enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa (Yu, 1994).

Estrategias de control de la oxidación lipídica

Existen tres fenómenos principales que disminuyen la calidad de la carne (desde el punto de vista organoléptico, nutricional y de seguridad) durante las etapas de producción, transformación, envasado, transporte y posterior exposición; en definitiva lo que se conoce como vida útil de un producto como son la oxidación proteica y lipídica y la contaminación microbiana. Si bien el factor limitante en la vida útil de la carne fresca es la carga microbiana, la oxidación lipídica y proteica son causas importantes de pérdida de calidad y son aspectos cruciales para consumidores y productores. La oxidación proteica en las carnes frescas (oxidación de la oximioglobina hasta metamioglobina) lleva consigo la pérdida de coloración desde rojo brillante hasta una coloración marrón y es una de las principales causas de rechazo del consumidor (Faustman y Cassens, 1990). Por otra parte la oxidación lipídica en principio en los fosfolípidos de membrana por ser de contenido más insaturado provoca la aparición de olores y sabores extraños e incluso la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud, como pueden ser aldehídos, cetonas, etc. Ambos tipos de oxidación están íntimamente relacionadas (Kanner y Harel, 1985).

Hay diferentes estrategias para el control de la oxidación lipídica, como pueden ser el control de sustancias prooxidantes, como radicales o catalizadores o intermediarios de las reacciones de peroxidación. Otras estrategias pueden basarse en alterar los sustratos de la oxidación, como podría ser aumentar la estabilidad oxidativa de la carne aumentando la proporción de ácidos grasos saturados en la dieta, pero esto no es del todo deseable desde un punto de vista nutricional. Si pensamos en alimentos como la carne nos encontramos con dos opciones a la hora de aplicar antioxidantes para extender la vida útil de la misma: alimentar al animal *in vivo* con los mismos o suplementar la carne con el antioxidante. La primera opción tiene como principales limitaciones la disponibilidad y coste del antioxidante, pero no limitaciones legales especiales. De hecho el suplemento se puede realizar no empleando concentrados de antioxidante o antioxidante puro, sino empleando materias vegetales donde se concentra la sustancia (como los carotenoides, por ejemplo). La segunda opción tiene más implicaciones desde el punto de vista legal y de seguridad alimentaria, si se pretende emplear un antioxidante más o menos purificado o concentrado, que es, entonces, un aditivo.

Antioxidantes en la dieta animal. Etapa *in vivo*

El pastoreo incrementa el contenido en ω 3 de la carne de vacuno debido al alto porcentaje de ácido linoléico de la hierba, mejora la relación PUFA:SFA y los índices ω 6/ ω 3 (Realini y col., 2005). Este aumento de la instauración de la fracción grasa conlleva un mayor estrés oxidativo *in vivo* pero que también es compensado en la dieta propia del pastoreo ya que es rica en antioxidantes, como ácido ascórbico, β -caroteno y α -tocoferol, aumentando sus niveles a nivel tisular (Descalzo y col., 2005) respecto a una alimentación mas intensiva. Con una alimentación intensiva rica en PUFAS también se puede paliar con una mayor suplementación de vitamina E (α -tocoferol) en la dieta. Sloan (2000) logró aumentar en 7 veces respecto a su nivel normal los niveles de vitamina E en terneros. Hay muchas situaciones en las que la adición *postmortem* de antioxidantes no es del todo efectiva debido a que estos compuestos no se sitúan en el lugar óptimo para bloquear las reacciones de oxidación (Schaefer y col., 1995), ello es debido a que la adición del antioxidante en el producto final puede resultar dificultosa, sin embargo la suplementación de antioxidantes en la dieta de forma continuada permite su incorporación en las membranas del tejido muscular y adiposo. Un claro ejemplo de la actuación sinérgica de antioxidantes *in vivo* es el formado por la pareja β -caroteno y α -tocoferol, pues mientras el primero se localiza dentro de la región hidrofóbica de las membranas celulares, la vitamina E está cerca de las superficies de dichas membranas, y siendo la vitamina E más efectiva contra la oxidación, ambos protegen de la oxidación las membranas celulares desde diferentes posiciones (Tsuchihashi y col., 1995).

Antioxidantes en el producto final. Etapa *postmortem*

La vida útil de la carne puede prolongarse con la adición de antioxidantes y/o antimicrobianos (Ahn y col., 2002; Sánchez-Escalante y col., 2003). Finaliza con su fecha de caducidad, fijada por la apreciación de zonas con degradación del color, ya que incitan el rechazo del comprador, y por el enranciamiento y daño oxidativo de las proteínas, que pueden sufrir cambios conformacionales y fragmentación de la cadena peptídica liberando aminoácidos, provocando olores y sabores desagradables. (Cornet y Bousset, 1990). En la prevención del enranciamiento de los alimentos se han utilizado antioxidantes sintéticos, la mayoría son derivados de estructuras fenólicas, siendo los más comunes: Butilato hidroxianisol (BHA), Butilato hidroxitolueno (BHT), esterres del ácido gálico y Terbutilhidroxiquinona (TBHQ). El uso de estos antioxidantes está limitado a ciertas cantidades y actualmente su uso se está cuestionando desde el punto de vista de la seguridad alimentaria ya que se sospecha de su posible rol como promotores del cáncer y/o teratógenos (Van Esch 1996). Si a estos hechos se suma una legislación en seguridad alimentaria, cada vez más restrictiva y compleja, se comprende que el interés se haya centrado en antioxidantes de origen natural, cuya aplicación inmediata sería el campo alimentario (Moure y col., 2001).

Se conocen un gran número de productos naturales, con propiedades antioxidantes, siendo los más comunes derivados de estructuras polifenólicas como flavonoides, tocoferoles, etc. Destaca el extracto de romero, debido a la presencia de carnosol, rosmanol, isorosmanol y rosmaridifenol, compuestos con elevado poder antioxidante. Se comercializa como aceite que contiene estos compuestos concentrados y que no presenta el olor ni el sabor característicos de la planta, los cuales modificarían las propiedades sensoriales de los productos a los que se aplicara. Se ha utilizado con éxito en diversos alimentos como salsas, mahonesas, carnes procesadas y pollo. En un estudio de Sánchez Escalante (2002) acerca de diversos sistemas antioxidantes para prolongar la vida útil de hamburguesas de vacuno envasadas en atmósfera modificada, el romero mostró una gran capacidad antioxidante además de cierto efecto antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, J., Grun, I. U., y Fernando, L.N. (2002). *J. Food Sci.*, 67, 1364-1369.
- Arihara, K., Tomita, K., Ishikawa, S., y col. (2005). Japan patent, submitted to government.
- Arihara, K. (2006). En: *Advanced technologies for meat processing* (pp. 245-274). N.M.L. Nollet y F. Toldra (Eds.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Biesalski, H.-K., (2005). *Meat Sci.*, 70, 509-524.
- Bjorneboe, A., Bjorneboe, G. A. y Drevon, C. A. (1990). *Am. Inst. Nutr.*, 233-242.
- Bodwell, C. E. y McClain, P. E. (1971). En: *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (Price, J.F., Schweigert, B.S., eds.) p.80-211, Editorial Acribia, Zaragoza, Espana.
- Boldyrev, A. A., Stvolinsky, S. L., Tyulina, O. V., y col. (1997). *Cell. Molecul. Neurobiol.*, 17, 259-271.
- Borch, E., Kant-Muemansb, M.-L., y Blixt, Y. (1996). *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 103-120.
- Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A. y Wittwer, F. G. (2002). *Vet. Mex.* 33, 265-283.
- Comet, M. y Bousset, J., (1990). *Proceedings of the 36th ICOMST, Havana* pp. 22623 1.
- Decker, E. A. y Crum, A. D. (1993). *Meat Sci.*, 34, 245-253.
- Descalzo, A. A., Insani, E. M., Biolatto, A., y col. (2005). *Meat Sci.*, 70, 35-44.
- DeVore, V. R., Colnago, G. L., Jensen, L. S., y col. (1983). *J. Food Sci.*, 48, 300-301.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., y col. (2001). *J. Food Sci.*, 66, 181-186.
- Faustman, C. y Cassens, R. G. (1990). *J. Mus. Foods*, 1, 217-243.
- Gill, C. D. y Molin, G. (1991). In: N. J. Rusell and G. W. Gould (editors). *Food Preservatives*. Blackie, Glasgow, 172-199.
- Hernández, J. M. (2002). *Eurocarne*, 106, 33-44.
- Hu, F. B., Bronner, L., Willett, W. C., y col. (2002). *J. Am. Med. Assoc.*, 287, 1815-1821.
- Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., y col. (2001). *Eur. Food Res. Technol.*, 212, 308-318.
- Jang, A., y Lee, M. (2005). *Meat Sci.*, 69, 653-661.
- Jensen, M., Essen-Gustavsson, B. y Hakkarainen, J. (1988). *J. Vet.Med.*, A35, 487-497.
- Kanner, J. (1994). *Meat Sci.*, 36, 169-189.
- Kanner, J., y Harel, S. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.*, 237, 314-319.

- Kato, H., Rhue, M. R. y Nishimura, T. (1989). En: *Flavor Chemistry. Trends and developments*. eds. R. Teranishi, R. G. Buttery y F. Shahidi, ACS Symp Series 388, 158-174. ACS, Washington DC.
- Kendler, B. S. (2002). *Nutr.*, 18, 700-701.
- Lawrence, R.A. y Burk, R.F. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71(4), 952.
- Liu, Q., Lanari, M. C. y Schaefer, D. M. (1995). *J. Anim. Sci.*, 73, 3131-3140.
- Maraschiello, C. (1998). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Marx, J. L. (1985). *Sci.*, 235, 529-531.
- Monahan, F. J. (2002). *Eurocarne*, 109, 89-96.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., y col. (1998). *Meat Sci.*, 49, S73-S86.
- Moure, A, Cruz, J. M., Franco, D., y col. (2001). *Food Chem.*, 72, 145-171.
- Niki, E. (1987). *Chem. Phys. Lipids*, 44, 227-253.
- Olmedilla, B. (2002). *Alimentaria*, 11-19.
- Realini, C. E., Duckett, S. K., Brito, Q. W., y col. (2005). *Meat Sci.*, 66, 567-577.
- Ruiz, J. A., Pérez-Vendrell, A. M. y Esteve-García, E. (1999). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 448-454.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., y col. (2003). *J. Food Sci.*, 68, 339-344.
- Schaefer, D. M., Liu, Q., Faustman, C., y col. (1995). *J. Nutr.*, 125, 1792-1798.
- Schwimmer, S. (1981). En: *Source Book of Food Enzymology*, 202-217, The AVI Publishing Company, INC Westport, Connecticut, USA.
- Scollan, N. D., Choi, N. J., Kurt, E., y col. (2001). *Br. J. Nutr.*, 85, 115-124.
- Sevanian, A. y Hochstein, P. (1985). *Ann. Rev. Nutr.*, 5, 365-390.
- Shackelford, S.D.; Purser, D.E.; Smith, (1992). *J. Anim.Sci.*, 70, 465-469.
- Shacter. (2000). *Drug Metab. Rev.*, 32 (3&4), 307-326.
- Sloan, E. A. (2000). *Food Trends. Food Technol.*, 54, 33-58
- Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M., y col. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.*, 323, 137-147.
- Van Esch, G. T. (1996). *Food Chem Toxicol.*, 24, 1063-1066.
- Wang, X. y Quinn, P. J. (1999). *Prog. Lipid Res.*, 38, 309-336.
- Yu, B. P. (1994). *Physiol. Rev.*, 74, 139-162.

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA RELACIONADOS CON LAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS Y FUNCIONALES

Celestino Santos-Buelga

Dpto. de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca

Introducción

Los compuestos fenólicos son los productos más importantes del metabolismo secundario de los vegetales y se encuentran ampliamente distribuidos en hortalizas, frutas y productos derivados de las mismas, incluyendo la uva y el vino. Químicamente se trata de sustancias que contienen al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, que derivan biosintéticamente de las rutas metabólicas del siquimato, que da lugar a estructuras fenilpropanoide (C6-C3), y de la de los poliquétidos (C6) o de ambas conjuntamente. En las plantas existen, no obstante, otras sustancias que pueden contener sustituyentes fenólicos en su estructura, pero que no se clasifican dentro de las familias de compuestos fenólicos al derivar de otras vías metabólicas, como es el caso de algunos productos de naturaleza terpenoide o de alcaloides. Se trata de compuestos que juegan importantes papeles en las plantas superiores, participando en funciones defensivas (frente a radiación UV, patógenos, patologías vegetales o distintos tipos de estrés fisiológico), nodulación (leguminosas), protección frente a herbívoros (como disuasores), pigmentación, etc. (Lattanzio y col., 2008). En los alimentos contribuyen a la definición de algunas características organolépticas, como color, sabor o astringencia, y se han relacionado también con potenciales beneficios para la salud humana, al tratarse de sustancias capaces de ejercer distintos tipos de actividades biológicas, bien establecidas en estudios *in vitro*, en particular, actividad antioxidante y captadora de radicales libres, capacidad para secuestrar metales de transición o para interactuar con proteínas y modular la actividad de algunas enzimas.

Clasificación

Dentro de los compuestos fenólicos se incluyen un grupo amplio de sustancias con estructuras diversas, que van desde moléculas sencillas hasta complejas estructuras poliméricas, siendo habitual clasificarlos de acuerdo a su esqueleto básico en: fenoles simples (C6), ácidos benzoicos (C6-C1), ácidos fenilacéticos (C6-C2), fenilpropanoides (C6-C3; ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, cromonas...), estilbenos (C6-C2-C6) y flavonoides (C6-C3-C6), así como derivados oligo/poliméricos de los mismos, como ligninas (C6-C3)_n o taninos hidrolizables (C6-C1)₂ y condensados (C6-C3-C6)_n.

El número de sustancias fenólicas identificadas supera ya las 8000 y continúa aumentando (Andersen y Markham, 2006).

En el caso particular de la uva, los compuestos fenólicos más representativos pertenecen a las familias de los ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico), derivados hidroxicinámicos (que se encuentran mayoritariamente esterificados con ácido tartárico), flavonoides, entre los que encontramos antocianos, flavanoles (catequinas y proantocianidinas o taninos condensados) y flavonoles; y, en cantidades menores, estilbenos (resveratrol y piceído). Además de los anteriores, en el vino se pueden encontrar también taninos hidrolizables (galo- y elagitaninos) procedentes de la madera de la barricas. En la Figura 1 se recogen los grupos de compuestos fenólicos más representativos de la uva (y el vino).

COMPUESTOS FENÓLICOS NO FLAVONOIDES



FLAVONOIDES

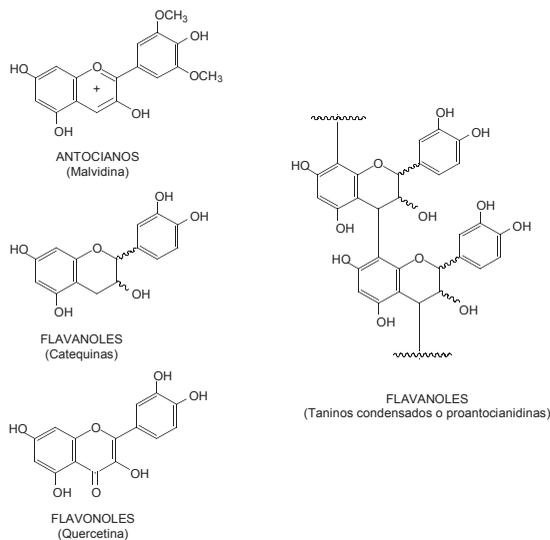


Figura 1. Compuestos fenólicos representativos de la uva y el vino

Composición fenólica de la uva y el vino

Las sustancias fenólicas se encuentran irregularmente distribuidas dentro de la uva, cada una de cuyas partes presenta una composición más o menos específica (Figura 2). Así, encontramos taninos condensados tanto en los raspones, como en hollejo y semillas, mientras que antocianos y flavonoles se encuentran casi exclusivamente en la piel y derivados hidroxicinámicos en la pulpa.

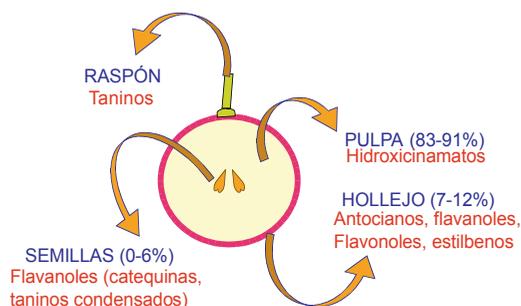


Figura 2. Distribución de los principales tipos de compuestos fenólicos en la uva

En la Tabla 1 se recogen los intervalos aproximados de concentración de compuestos fenólicos en las distintas partes de la uva. Estos contenidos deben considerarse exclusivamente orientativos, ya que existen notables diferencias dependiendo de la variedad de uva, grado de maduración, condiciones climáticas o características del cultivo (suelo, orientación, modo de conducción del viñedo, etc.). En principio, salvo por la presencia de antocianos, presentes exclusivamente en variedades tintas, no existen diferencias relevantes en cuanto a la composición fenólica en uvas blancas y tintas.

	Pieles	Semillas	Pulpa
Flavonoles monómeros (catequinas)	14-100	50-1000	Tr
Flavonoles condensados (taninos)			
Oligómeros	35-200	120-1400	Tr
Polímeros	20-750	>1200	
Antocianos	200-5000		*
Flavonoles	20-200		
Ácidos fenólicos	25-200		40-500
Estilbenos	Tr-20		

*Las variedades tintoreras, como Garnacha tintorera y Alicante-Bouchet, presentan también ciertas cantidades de antocianos en la pulpa.

Tabla 1. Concentraciones aproximadas de compuestos fenólicos en distintas partes de la uva (mg/Kg uva, expresado en peso fresco). Fuente: elaboración propia

El tipo y concentración de compuestos fenólicos presentes en el vino van a depender de la composición cualitativa y cuantitativa de la uva y del proceso de vinificación empleado, que determinará los fenómenos de difusión y extracción de compuestos desde las partes sólidas de la uva (y desde la madera de las barricas, si hay crianza) al mosto. También a modo orientativo, en la Tabla 2 se recogen los contenidos medios habituales que pueden ser encontrados en un vino joven.

	Vino tinto	Vino blanco
No flavonoides totales	240-500	160-260
Ácidos hidroxibenzoicos	0-250	0-100
Derivados hidroxicinámicos	60-330	130-150
Estilbenos (resveratrol)	Tr-15	Tr-4
Flavonoides totales	750-1100	25-30
Antocianos	20-500	Tr
Flavanoles	50-450	15-30
Flavonoles	10-200	Tr
Sustancias fenólicas totales	900-2500	190-290

Tabla 2. Concentración (mg/L) de sustancias fenólicas en el vino. Fuente: elaboración propia

Influencia de los compuestos fenólicos en las características sensoriales del vino

Las sustancias fenólicas juegan un papel determinante en la definición de las propiedades organolépticas y funcionales de los vinos. De manera general, se asume que las características de color, astringencia y de calidad global de los vinos tintos están positivamente relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos de naturaleza flavonoide. En los vinos blancos los compuestos fenólicos juegan, salvo excepciones, un papel sensorial menor, estando de hecho más bien en el origen de defectos de color y estabilidad, de modo que la calidad se asocia a otros parámetros, como “frescura” o componentes aromáticos.

De particular interés para la calidad sensorial de los vinos tintos son los antocianos y flavanoles (catequinas, proantocianidinas o taninos condensados). Los primeros son los principales responsables del color del vino tinto, mientras que los segundos influyen sobre el amargor y la astringencia y resultan determinantes para la estructura, complejidad y sensación en boca de los vinos; además, contribuyen también a la estabilidad y expresión del color de los antocianos, a través de su implicación en procesos de copigmentación. De la concentración y tipo de taninos presentes y su balance en relación con los antocianos depende, en gran medida, la aptitud de los vinos para el envejecimiento. Otros flavonoides, como los flavonoles, pueden tener también cierta influencia sobre el color y el amargor de los vinos, aunque su concentración en los mismos es mucho más baja; igualmente, pueden contribuir a la componente amarilla

del color en los vinos blancos. Los derivados hidroxicinámicos de la uva (y también los flavanoles) son sustratos preferentes en procesos de pardeamiento enzimático, que pueden deteriorar la calidad de los vinos, especialmente en el caso de los blancos. Aunque incoloros, todos estos compuestos pueden influir indirectamente sobre el color a través de sus interacciones con los antocianos (copigmentación). Por su parte, los ácidos fenólicos y taninos hidrolizables, extraídos de la madera de las barricas, pueden también influir sobre el sabor y color de los vinos.

El vino, no obstante, es un medio dinámico sometido a una evolución constante en su composición fenólica, que se va volviendo progresivamente más compleja. A lo largo de la vinificación, conservación y envejecimiento, se suceden una serie de procesos enzimáticos, microbiológicos y químicos, que afectan a los compuestos fenólicos y que conducen a productos de oxidación, degradación y de condensación de los mismos. Los nuevos compuestos formados poseen propiedades sensoriales diferentes a las de sus precursores, influyendo de este modo sobre la calidad y características de los vinos. A modo de ejemplo, se puede comentar el caso de los antocianos. Es conocido que a lo largo de la vida del vino, el color va modificándose, pasando de los tonos rojo púrpura inicial de los vinos tintos jóvenes a tonalidades teja, anaranjadas o pardas, propias de los vinos envejecidos. Estos cambios tienen su origen en las características estructurales y de estabilidad de los antocianos, los cuales existen bajo distintas formas dependiendo del medio disolvente en el que se encuentren, la composición y la acidez del mismo. Los antocianos suelen representarse como cationes flavilio, que poseen una coloración rojiza; estas formas en medios acuosos experimentan reacciones de transferencia de protón, que llevan a la formación de bases quinoidales azuladas, y procesos de hidratación, que generan aductos hemiacetal incoloro en equilibrio con estructuras calcona (Figura 3). La proporción de cada forma está determinada por el pH, de modo que los cationes flavilio sólo predominan en disoluciones muy ácidas (Brouillard, y col., 1977), mientras que en medios acuosos o hidroalcohólicos débilmente ácidos, como es el vino, existirían básicamente formas hemiacetal incoloras. Por otra parte, la normal presencia en los vinos de sulfitos, con los que los cationes flavilio forman también aductos incoloros, aporta motivos adicionales para la decoloración de los antocianos. Sin embargo, a pesar de todo ello, los vinos tintos continúan mostrando un más o menos intenso color rojo, lo que se atribuye a la existencia en el vino de, al menos, dos mecanismos de estabilización del color: (1) la asociación no covalente de los cromóforos antociánicos con otros componentes del vino (fundamentalmente compuestos fenólicos), a través de un proceso denominado copigmentación que los protegería de su hidratación y decoloración, y (2) la sustitución progresiva de los antocianos de la uva por pigmentos más estables resultantes de su transformación. El primer proceso tendría particular importancia en vinos tintos jóvenes, mientras que el segundo participaría principalmente en el color de los vinos envejecidos. Todos estos cambios no sólo tienen repercusiones sobre el color, sino que influyen también sobre otras características sensoriales, como la astringencia,

al implicar en los mismos a otras sustancias fenólicas y, en particular, a los flavanoles (Santos-Buelga y de Freitas, 2009).

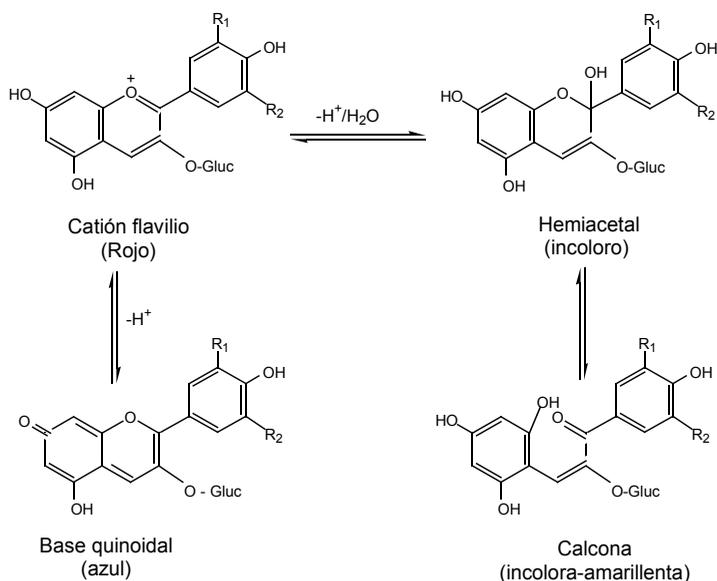


Figura 3. Equilibrios entre formas estructurales de los antocianos

Compuestos fenólicos del vino y propiedades saludables

En los últimos años se han difundido estudios donde se relaciona el consumo moderado y responsable de bebidas alcohólicas con beneficios para la salud en determinados individuos. En particular, estos beneficios se refieren a una mejor salud cardiovascular (St. Leger y col., 1979; Renaud y de Lorgeril, 1992), aunque hay trabajos que sugieren que podría también proteger frente otras patologías, como diabetes (Koppes y col., 2005), déficits cognitivos o demencias (Letenneur, 2004). Es conocido que el alcohol (etanol) favorece el aumento en los niveles circulantes de lipoproteínas de alta densidad (HDLs), ejerce actividad fibrinolítica y disminuye la agregación plaquetaria (Pellegrini y col., 1996), lo que, en cierta medida, podría explicar un posible efecto protector cardiovascular. Sin embargo, la mayor parte de los estudios prospectivos realizados por distintos investigadores apuntan a que existe un mayor efecto protector en el caso del vino que el de otras bebidas alcohólicas, como cerveza o bebidas espirituosas. Una razón que se ha aportado para justificar el mayor efecto protector observado entre consumidores de vino es que en los países donde su consumo es tradicional existen hábitos dietéticos más saludables (p.e. die-

ta mediterránea) y es ingerido junto con las comidas. Por otra parte, en poblaciones donde no es tradicional, el vino suele ser más consumido por gente de mayor nivel cultural y económico y con estilos de vida más saludables (Johansen y col., 2006). De este modo, los potenciales beneficios no derivarían tanto de los efectos del vino sino de los patrones de vida asociados a su consumo. En el caso de otras bebidas alcohólicas suele haber mayor tendencia a pautas de consumo irregular, concentrado y excesivo, estando establecido que este tipo de consumidores muestran tasas de mortalidad coronaria y global más elevadas que los bebedores que realizan un consumo ligero y regular de alcohol (Rehm y col., 2003). No obstante, la razón más comúnmente apuntada para justificar los mayores efectos protectores del vino es la presencia en el mismo además del alcohol de compuestos fenólicos, ausentes o presentes en menor cantidad en otras bebidas. En este sentido, cabe esperar efectos más positivos por parte de los vinos tintos que de los blancos o rosados, mucho menos ricos en este tipo de sustancias.

Muchos compuestos fenólicos que pueden encontrarse en la uva y en el vino se comportan como potentes antioxidantes en ensayos *in vitro* y se han encontrado, de hecho, relaciones entre capacidad antioxidante de los vinos y su contenido en sustancias fenólicas (Burns y col., 2001; Paixão y col., 2007). Asimismo, en distintos estudios se ha observado que extractos polifenólicos obtenidos de uva o vino tinto son capaces de disminuir la agregación plaquetaria, inducir vasorrelajación, inhibir la peroxidación lipídica, regular los niveles plasmáticos de triglicéridos, modular la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) induciendo la liberación de NO de manera dosis dependiente o inhibir la síntesis de endotelina-1, un péptido vasoactivo cuya sobreproducción es un factor clave en el desarrollo de enfermedad vascular y aterosclerosis (revisado por Dell'Agli y col., 2004). Estos efectos se han asociado sobre todo a las proantocianidinas (Corder y col., 2006), que constituyen, en general, la fracción polifenólica mayoritaria en los vinos tintos.

Otro compuesto fenólico también presente en el vino es el estilbeno resveratrol, para el cual también se ha demostrado una amplia variedad de actividades biológicas. Recientemente se ha visto que el resveratrol, a través de su actuación sobre las sirtuinas, una familia de enzimas deacetilasas implicadas en la regulación celular, era capaz de aumentar hasta en un 40% la duración de vida en diversos organismos habitualmente utilizados en ensayos de laboratorio, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* o ratón (Baur y Sinclair, 2006). De confirmarse estos efectos estaríamos ante un compuesto con gran potencialidad terapéutica, aunque parece improbable que con las concentraciones a las que se encuentra en el vino puedan llegar a inducirse efectos similares a los encontrados en animales de experimentación. A modo de ejemplo se puede indicar que un vino tinto con una concentración media (optimista) de resveratrol de 5 mg/L aportaría ~27 \pm g/kg peso en una persona de 70 kg con una ingesta de 375 mL/día, concentraciones

de magnitud en torno a ochocientas veces inferior a las ensayadas en ratones (22,4 mg/kg peso/día).

Con relación a los posibles efectos beneficiosos del vino, se debe tener en cuenta que los datos científicos de que se dispone al respecto son incompletos e indirectos, derivados de ensayos en modelos *in vitro* o con animales de experimentación, siendo difícil que puedan llegar a obtenerse evidencias definitivas en humanos, toda vez que la realización de estudios de intervención debe descartarse por razones éticas. Por ello, las evidencias disponibles se basan en observaciones epidemiológicas que, aunque sólidas y consistentes, no constituyen una prueba definitiva acerca de la existencia de efectos beneficiosos del vino, dada la diversidad de factores que pueden influir sobre las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, O.M. y Markham, K.R., eds., (2006). *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1237 pp
- Baur, J. A. y Sinclair, D.A. (2006). *Nature Reviews*, 5, 493-506.
- Brouillard, R., Delaporte, B. y Dubois, J. E. (1977). *Journal of the American Chemical Society*, 99, 8461-8468.
- Corder, R., Mullen, W., Khan, N. Q., y col. (2006). *Nature*, 444, 566.
- Dell'Agli, M., Busciala, A. y Bosio, E. (2004). *Cardiovascular Research*, 63, 593-602.
- Johansen, D., Friis, K., Skovenborg, E., y col. (2006). *British Medical Journal*, 332, 519-522
- Koppes, L. L., Dekker, J. M., Hendriks, H. F. J., y col. (2005). *Diabetes Care*, 28, 719-725.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau, S., y col. (2008). En: *Recent Advances in Polyphenols Research*. Vol II. (F. Daayf & V. Lattanzio, eds.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK., 1-35.
- Letenneur, L. (2004). *Biological Research*, 37, 189-193.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marqués, J.C., y col. (2007). *Food Chemistry* 105, 204-214.
- Pellegrini, N., Pareti, F., Stabile, F., y col. (1996). *European Journal of Clinical Nutrition*, 50, 209-213.
- Rehm, J., Sempos, C.T. y Trevisan, M. (2003). *Journal of Cardiovascular Risk*, 10, 15-20.
- Renaud, S. y de Lorgeril, M. (1992). *The Lancet*, 1, 1523-1526.
- St. Leger, A. S., Cochrane, A. L. y Moore, F. (1979). *The Lancet*, 1, 1017-1020.
- Santos-Buelga, C. y de Freitas, V. (2009). En: *Wine Chemistry and Biochemistry* (C. Polo & M.V. Moreno-Arribas, eds.), Springer Science. N. York, USA, 527-569.

INFLUENCIA DEL NIVEL DE MADURACIÓN DE LA UVA Y DE LAS TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN EN COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO

Fernando Zamora

Grupo de Investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL). Dpto. de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología de Tarragona. Universidad Rovira i Virgili.

El concepto de madurez fenólica no es un tema nuevo sino que es uno de los temas que durante las últimas dos décadas han suscitado mayor interés a los elaboradores de vinos tintos. No cabe la menor duda de que la concentración y extractabilidad de los antocianos presentes en la piel de la uva, así como la proporción de tanino de las semillas, son algunos de los principales factores que condicionarán la futura calidad del vino tinto (Ribéreau-Gayon y col., 1999). Por esta razón, durante los últimos años se ha hablado - y se continuará hablando - de la necesidad de disponer de metodologías eficaces para determinar el nivel de madurez fenólica real de las uvas, para de este modo disponer de un criterio más adecuado para decidir la fecha óptima de vendimia (Glories y Agustín, M., 1993; Lamadon, 1995; Izcarra y González, 2001; Zamora, 2002).

Para ilustrar estos conceptos es necesario mostrar la evolución de los compuestos fenólicos de la uva a lo largo del proceso de maduración (Figura 1).

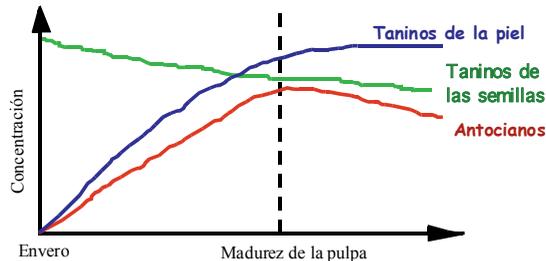


Figura 1. Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración

En la maduración se puede ver que la concentración de antocianos aumenta hasta alcanzar un valor máximo. Posteriormente se observa un ligero descenso. Por su parte los taninos de la piel aumentan durante el proceso de maduración, mientras que los de las semillas disminuyen (Ribéreau-Gayon y col., 1999).

Como se puede ver en la Figura 2, la astringencia de los taninos de la piel tiende a disminuir, mientras que la de los taninos de las semillas se mantiene constante a lo

largo del proceso de maduración. En su conjunto, la uva verde posee menos taninos que la madura, pero en cambio la contribución de taninos de las semillas, y por tanto su astringencia global, será mayor (Delteil, 1998; Ribéreau-Gayon y col., 1999).

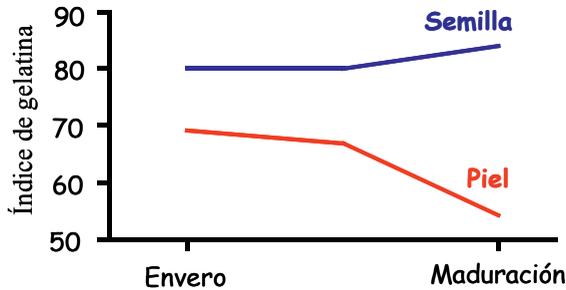


Figura 2. Evolución de la astringencia de los taninos durante la maduración

La principal razón por la cual los taninos de las semillas son más astringentes que los de las pieles está relacionada con el hecho de que los taninos de las semillas y los de las pieles no presentan la misma composición. Básicamente, los taninos de las pieles son ricos en prodelphinidinas y apenas poseen unidades galoiladas, mientras que los de las semillas son especialmente ricos en unidades galato de epicatequina, lo que les confiere su mayor astringencia (Vidal y col., 2003).

Otro factor importante a tener en cuenta es el hecho de que el grado de madurez de la uva también influye sobre la extractibilidad del color durante la vinificación. En la Figura 3 se muestra un esquema ilustrativo de este fenómeno (Zamora, 2003).

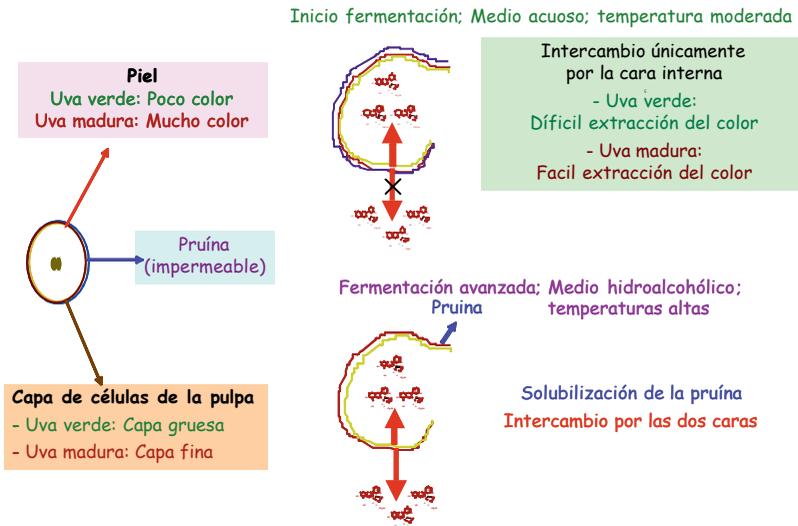


Figura 3. Influencia del grado de madurez sobre la solubilización de los antocianos

La piel del grano de uva está recubierta con una capa impermeable de una sustancia ceroide, la pruína. Al comienzo de la fermentación/maceración, el medio es acuoso y las temperaturas son por lo general bajas. En estas condiciones la pruína actúa impidiendo la solubilización de sustancias por la capa externa de la piel. En estas condiciones, la solubilización de los antocianos únicamente podrá tener lugar por la cara interna del grano de uva. No obstante, a medida que la fermentación avanza, se libera etanol y sube la temperatura. Ambos factores provocan la solubilización de la pruína y hacen posible que el intercambio también tenga lugar por la cara externa de la piel. Resumiendo todo lo expuesto, la uva verde posee una baja concentración de antocianos que además serán de difícil extracción. Así mismo, la uva verde presenta una gran concentración de taninos de las semillas, por lo que si se fuerza la maceración, a fin y efecto de extraer el suficiente color, se extraerá también tanino astringente y herbáceo. Por el contrario, la uva madura tendrá una alta concentración de antocianos fácilmente extraíbles y dará lugar a vinos con cuerpo y de taninos suaves. Por todo lo expuesto resulta evidente que el grado de madurez fenólica de la uva es un factor determinante de la calidad del vino tinto y que por tanto la determinación de la fecha de vendimia debiera de ser efectuada utilizando este criterio.

La Figura 4 muestra la cinética de solubilización de los compuestos fenólicos a lo largo de la maceración.

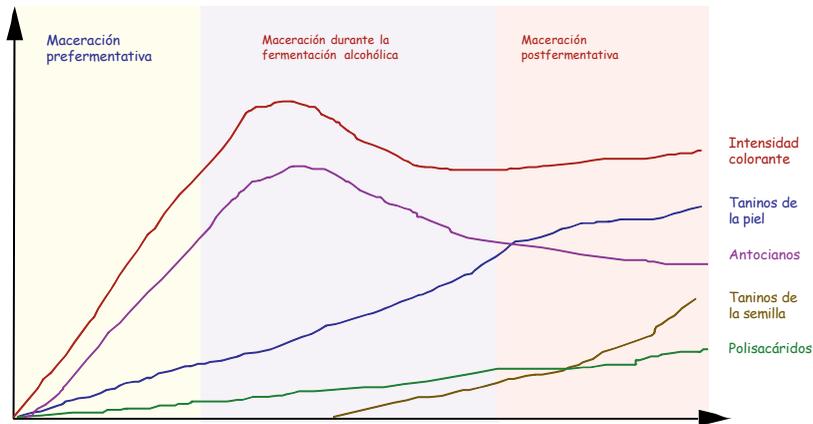


Figura 4. Cinética de extracción de los compuestos fenólicos durante la fermentación/maceración

Como se ve, los antocianos se extraen relativamente rápido, si bien la velocidad de solubilización dependerá, tal y como ya se comentó, del nivel de madurez fenólica de la uva, así como de diversos factores tecnológicos. De hecho, la máxima extracción de los antocianos tiene lugar en pocos días, para después observarse una tendencia a la disminución, debido principalmente a fenómenos de oxidación, precipitación y adsorción. Un comportamiento similar se observa en la intensidad colorante, si bien su disminución es en ocasiones más marcada, debido a que la aparición del etanol disminuye los fenómenos de copigmentación y a que se forman combinaciones antociano-flavanol, algunas de las cuales son inicialmente incoloras.

Los taninos se solubilizan más lentamente. De hecho durante la maceración prefermentativa, al no haber etanol en el medio y al ser las temperaturas moderadas, su extracción es muy limitada. Posteriormente al aparecer alcohol en el medio durante la fermentación alcohólica y al aumentar la temperatura del medio, se favorecerá su solubilización. Es necesario también distinguir entre los taninos de la piel y los de las semillas, ya que su cinética de extracción es diferente. Los taninos de la piel comienzan a solubilizarse conjuntamente a los antocianos, si bien su extracción se prolonga más tiempo. Por el contrario, los taninos de las semillas no se solubilizarán hasta la mitad de la fermentación, cuando el alcohol haya disuelto la cutícula. Por todo ello, la tancidad del vino se incrementa a medida que se alarga la maceración.

Finalmente, durante la vinificación se puede aplicar técnicas que permiten modificar la extracción de los diferentes compuestos fenólicos. La Figura 5 incluye los puntos clave, dentro del diagrama de flujo de la vinificación en tinto, donde se puede incidir para mejorar la extracción.

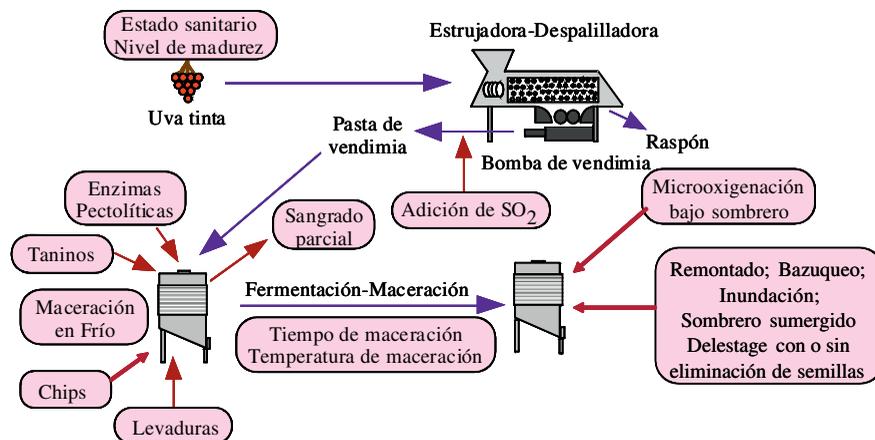


Figura 5. Vinificación en tinto. Puntos críticos para la extracción y estabilización del color

BIBLIOGRAFÍA

- Delteil, D. (1995). Les macerations en rouge: L'art du detail. *Rev. OEnol.*, 77, 23-25.
- Glories, Y. y Agustín, M. (1993). Actes du Colloque "Journé technique du CIVB", Bordeaux, 56-61.
- Izcarra, E. y González, M.L. (2001). *Enólogos*, 14, 14-18.
- Lamadon, F. (1995). *Rev. OEnolog. Techniq. Vitvini. OEnol.*, 76, 37-38.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., y col. (1999). En: *Handbook of enology*, Vol 2, John Wiley & sons, Ltd, Chichester, 129-186.
- Vidal, S., Francis L., Guyot S., y col. (2003) *J. Sci. Food Agric.*, 83, 564-573.
- Zamora, F. (2002). *Enólogos*, 18, 24-28
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto; aspectos científicos y prácticos*. Mundi-Prensa. AMV Ediciones, Madrid.

APLICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA EN EL APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN

Miguel Rodríguez Rodríguez

Dpto. de Ingeniería Química. Tecnología de los Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz

Los fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (FSC) puede considerarse como un “estado de agregación de la materia en condiciones de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico”.

Los fluidos supercríticos exhiben propiedades intermedias entre gases y líquidos. Presentan una viscosidad relativamente baja (próxima a la de los gases) y una difusividad alta por lo que pueden penetrar en los materiales sólidos porosos de forma más eficaz que los solventes líquidos.

El poder disolvente de un FSC depende de su densidad, la que a diferencia de los solventes líquidos se controla por cambios de presión y/o temperatura. Este hecho permite optimizar el proceso de extracción cambiando simplemente una o ambas variables.

La extracción supercrítica (ESC) emerge como una operación competitiva respecto de otras operaciones de separación convencionales como destilación, extracción con disolventes, evaporación, etc., que requieren con frecuencia operar en unas condiciones de temperaturas que pueden afectar a las sustancias termolábiles y/o la utilización de disolventes que por su naturaleza también pueden incidir negativamente sobre el medio ambiente, la calidad de los productos y la salud de los consumidores.

Actualmente, la mayoría de los procesos de extracción de productos naturales utilizan disolventes líquidos como agentes extractantes. Las principales ventajas que presentan dichas sustancias están asociadas a la alta solubilidad que presentan los diversos solutos en estos disolventes. Ahora bien, el hecho de que, en general, haya que eliminar el disolvente del producto extraído, requiere operaciones de evaporación o destilación que implican la utilización de temperaturas elevadas. En estas condiciones puede producirse la degradación térmica de sustancias termolábiles. Además la necesidad de adicionar una nueva operación encarece el proceso de producción.

Como alternativa, surge la extracción con disolventes en condiciones supercríticas y, más concretamente, con dióxido de carbono.

Los procesos de extracción con dióxido de carbono en condiciones supercríticas son más rápidos que los convencionales, debido a las excelentes propiedades difusionales del mismo. El hecho de que la temperatura crítica del dióxido de carbono este próxima a los 30°C permite que el proceso de extracción pueda realizarse a temperaturas relativamente bajas. Además, es gaseoso en condiciones ambientales, lo que facilita enormemente la separación del producto extraído.

El principal inconveniente de la utilización de esta sustancia como disolvente es su baja polaridad que lo hace poco adecuado para la extracción de sustancias polares. Sin embargo, surge la posibilidad de realizar la extracción en condiciones supercríticas con codisolventes. Esta técnica consiste en adicionar al dióxido de carbono una pequeña cantidad de una sustancia modificadora de su polaridad. Esta adición permite aumentar la polaridad de la mezcla disolvente, provocando un incremento del rendimiento en la extracción de sustancias polares.

Finalmente, investigaciones recientes utilizan mezclas líquidas a alta presión, técnica análoga a la anterior cuya diferencia estriba en que el porcentaje de codisolvente en la mezcla es mayor. Al aumentar este porcentaje, se pasa a condiciones subcríticas, es decir, se utilizarían mezclas de dióxido de carbono en estado líquido y un disolvente líquido convencional.

ESC de subproductos de vinificación

De forma genérica, el proceso de vinificación produce un residuo denominado orujo. Este subproducto de la vinificación está constituido, fundamentalmente, por semillas, raspones y hollejo.

Por un lado, las semillas pueden ser aprovechadas por su contenido en aceite que tiene un alto valor dietético y nutricional, mientras que el residuo puede ser destinado a alimentación animal. Por otra parte, el hollejo, puede sufrir una fermentación para la obtención de etanol, y el residuo resultante puede someterse a un proceso de extracción para la recuperación de antocianos y tartratos, dependiendo del tipo de vinificación. De todas las sustancias que pueden recuperarse, los antocianos son las sustancias que tienen mayor interés debido a sus aplicaciones como colorantes naturales y a sus propiedades antioxidantes.

Extracción de antocianos.

Los experimentos realizados se han dividido en función del proceso de extracción utilizado:

- Proceso de extracción supercrítica con CO₂ + codisolventes
- Proceso de extracción con mezclas líquidas de CO₂ + codisolventes a alta presión

- Proceso de extracción convencional con metanol.

Los disolventes utilizados han sido en cada caso dióxido de carbono y un 5% de metanol o agua para las pruebas supercríticas con codisolventes, dióxido de carbono y un 20% de metanol o agua, en el caso de las pruebas líquidas a alta presión y metanol para la extracción convencional.

Los valores de las variables de operación han sido los siguientes:

- 100 y 500 bar, para las pruebas a alta presión, y presión atmosférica, para la extracción convencional.
- 40 y 60°C de temperatura para garantizar que se está por encima del punto crítico del dióxido de carbono y evitar la posible degradación térmica de los antocianos.
- Con respecto al caudal, diversos estudios preliminares han indicado que la zona donde se encuentra el máximo rendimiento está comprendida entre 12 y 22,6 mmol/min.

Los resultados muestran que, en general, el rendimiento del proceso es mayor a 100 bar que a 500 bar. Mientras que parece claro que la solubilidad de un soluto aumenta con la presión, debido al aumento de densidad que experimenta el disolvente, los resultados obtenidos por diversos autores estudiando el proceso de extracción de carotenoides con codisolventes muestran una clara disminución del rendimiento de la extracción con la presión.

Esta divergencia puede atribuirse a un aumento con la presión de la solubilidad de los diversos cosolutos presentes en el hollejo, con respecto, al aumento de solubilidad de los antocianos, lo cual se traduce en una disminución de la solubilidad efectiva de estos.

Con respecto al efecto de la temperatura, el rendimiento del proceso de extracción más alto se obtiene a 60°C. Este hecho puede ser atribuido a varios factores: por un lado, al aumento de la presión de vapor del soluto con la temperatura, lo que facilita su disolución, y por otro, a un aumento de la difusividad del disolvente y a una disminución de la viscosidad con la temperatura, mejorando enormemente las propiedades de transferencia de materia del mismo.

Para evaluar cuál de los dos sistemas disolvente-codisolvente utilizados es mejor, se comparan los rendimientos obtenidos tras dos horas de extracción. Los resultados muestran claramente que las pruebas realizadas utilizando metanol como codisolvente presentan un rendimiento mucho mayor que cuando se utiliza agua, debido a las mejores propiedades difusionales de dicho sistema disolvente frente al formado con el agua.

Extracción de resveratrol, catequina y epicatequina

Se realizaron pruebas con hollejo de uva de dos variedades: tempranillo y garnacha a 100 bar y 400 bar de presión y a 35°C y 55°C de temperatura, utilizando CO₂ como disolvente y agua y etanol como codisolvente

Los resultados obtenidos muestran que:

- Para las sustancias estudiadas, los mejores resultados se obtienen cuando se opera a 400 bar de presión y 55 °C de temperatura.
- De las dos variedades estudiadas, las muestras de tempranillo proporcionan mejores resultados que las de garnacha en, prácticamente, todas las extracciones realizadas para las condiciones de presión y temperatura anteriores.

En el caso de los residuos de uva palomino se realizaron extracciones a muestras de semillas, raspón, hollejo y orujo en las mismas condiciones de presión y temperatura.

Los datos obtenidos sobre contenido en resveratrol indican que cuando se utiliza como sistema disolvente CO₂ + etanol a 400 bar y 55°C se obtienen resultados mejores que los obtenidos con la extracción convencional.

RECUPERACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES DE LOS RESIDUOS DE ALCOHOLERA

Beatriz Díaz Reinoso

Dpto. Ingeniería Química. Universidad de Vigo

Desde un punto de vista genérico, el proceso de vinificación produce un residuo denominado orujo, el cual está constituido, fundamentalmente, por semillas, raspones y hollejo. Este residuo se somete a un proceso de fermentación para posteriormente mediante un proceso de destilación de este orujo fermentado obtener bebidas espirituosas. La información existente sobre la presencia y extracción de antioxidantes usando este substrato es muy escasa, sobre todo si se compara con todas las publicaciones relacionadas con el orujo de vinificación y su empleo para la obtención de antioxidantes. Este residuo es uno de los más estudiados como fuente alternativa de antioxidantes naturales, incluso autores como Saura-Calixto (1998) proponen su uso directo.

La producción de bebidas espirituosas conlleva la generación de un bagazo fermentado agotado, el cual habitualmente es empleado como fertilizante en los propios viñedos de las empresas productoras, sin embargo las elevadas producciones anuales de este tipo de bebidas elevan a generación de estos residuos y hacen que esta reutilización no sea suficiente para su completa eliminación y los productores necesitan los servicios de empresas gestoras que se encarguen de su eliminación.

Algunos estudios (Cruz y col., 2004; Pinelo y col., 2005, Díaz-Reinoso y col., 2009) demostraron que los compuestos fenólicos presentes en estos residuos son más activos que los presentes en orujos no destilados, al mismo tiempo que se formula el aprovechamiento de los compuestos presentes en el disolvente embebido en el substrato después de la destilación (Cruz y col., 2004, Díaz-Reinoso y col., 2009). En estos licores se identificaron una amplia variedad de compuestos fenólicos, desde procianidinas, flavan-3-oles monoméricos como (catequina, epicatequina, epigallocatequina, quercetina y quercetina-3- glicósidos), ácidos gálicos esterificados con unidades de catequina (galatos de epigallocatequina) y ácidos benzoicos.

El empleo de la tecnología de membranas para concentrar y purificar compuestos bioactivos presentes en corrientes de procesado de industrias agroalimentarias es un campo de trabajo que adquirió un gran interés por parte de la comunidad investigadora en los últimos años. Ejemplos en este campo empleando residuos similares encontramos a Nawaz y col. (2006) que procesa extractos hidroalcohólicos de semillas de uva, y a Santamaría y col. (2002) y Kalbasi y Cisneros-Zavallos (2007) que fraccionan proantocianos y antiociananos.

El fraccionamiento de compuestos fenólicos presentes en extractos acuosos de champiñón (Cheung y Cheung, 2005) fue realizado logrando su separación en compuestos de alto y bajo peso molecular. Este tipo de procesos y la separación de compuestos presentes en corrientes líquidas pueden ser mejoradas empleando un tipo de membranas que presenten interacciones con los compuestos a separar. Un ejemplo de esto es la separación de flavonoides de extractos de Ginkgo biloba empleando membranas de PVP modificado que interaccionan con los compuestos presentes estableciendo puentes de hidrógeno y favoreciendo su separación (Xu y col., 2005).

Una alternativa a la tecnología de membranas para la separación y purificación de compuestos fenólicos en general y de antocianos, flavonoides y hidroxycinnamatos, en particular, es el empleo de resinas poliméricas (Llorach y col., 2004, Saleh y col., 2008; Scordino y col., 2005). Alternativas como la propuesta en este trabajo, en la cual se unen tecnología de membranas y tecnología de adsorción fue usada por Li y col., 2005 y D'Alvise y col., 2000, para recuperar o eliminar compuestos fenólicos de licores de té y concentrados proteicos de alfalfa.

La Figura 1 muestra diferentes alternativas para el aprovechamiento del residuo de alcoholera mediante la obtención de diferentes productos finales con diferentes características antioxidantes.

El orujo destilado fue cedido por la Cooperativa Vitivinícola do Ribeiro (Ourense). Los licores embebidos en el orujo se extraen por prensado y se obtiene un promedio de 0,3L de licores por cada kg de bagazo húmedo. Estos licores obtenidos por prensado contienen 4,4 g de compuestos fenólicos por litro determinados como equivalentes en ácido gálico.

El dispositivo experimental empleado consta de membranas comerciales de diferentes tamaños de corte, trabajando sobre condiciones optimizadas en anteriores trabajos del grupo (Díaz-reinoso y col., 2009). Los pasos de concentración y fraccionamiento por membranas se llevaron a cabo operando de manera cerrada recirculando al tanque de operación la corriente de permeado y rechazo, de esta manera se consiguen optimizar las condiciones hidráulicas que conducen a un mejor rendimiento del proceso. Y operando en modo abierto, recirculando la corriente de rechazo y eliminando la corriente de permeado consiguiendo una reducción del volumen de alimentación concentrado el efluente en compuestos bioactivos. Mediante este procedimiento se obtuvo el "producto 1" (Figura 1)

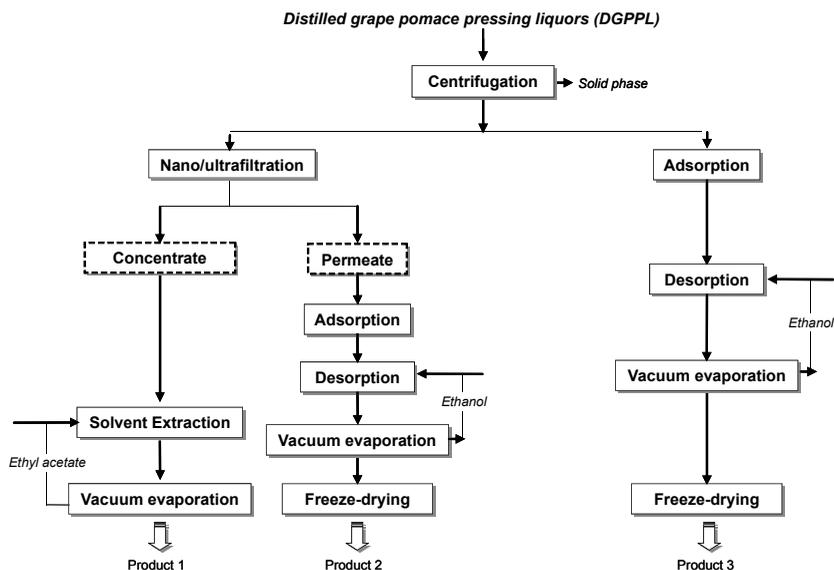


Figura 1. Alternativas para el aprovechamiento del residuo de la alcoholera

Los licores procedentes del proceso de filtración por membranas operando en abierto todavía presentan un alto contenido en compuestos polifenólicos de bajo peso molecular. Este tipo de compuestos pueden presentar alta actividad antioxidante en función del grado de sustitución de anillo fenólico. Estos compuestos son susceptibles de aprovechamiento mediante una recuperación de estos compuestos en resinas adsorbentes tipo poliméricas. En este trabajo se ha empleado la resina Sepabeads SP700, una resina comercial de grado alimentario suministrada por Resindion, S.R.L. (Mitsubishi Chemical Corporation).

En la Tabla 1 se muestra la caracterización de diversos productos obtenidos mediante las secuencias mostradas en la Figura 1.

	Contenido fenólico (g GAE ¹ /100 g producto)	TEAC (g Trolox/g producto)	DPPH (EC ₅₀) (g producto/L)	FRAP (mM Ácido Ascórbico/g producto)	Poder reductor (mM Ácid. ascórbico/g producto)	b-carote- no (AAC) (2 g producto/L)
a) Liofilizado						
Nanomax 95	9,5	0,385	1,51	0,413	0,207	189
Nanomax 50	10,3	0,395	1,64	0,464	0,232	213
Inside Céram	10,2	0,410	1,58	0,444	0,222	209
b) Extraído en acetato de etilo ² (Producto 1 ³)						
Nanomax 95	37,1	1,83	0,613	1,76	2,81	24
Nanomax 50	42,5	2,09	0,293	1,84	2,97	176
Inside Céram	38,6	2,00	0,533	1,79	2,70	126
c) Adsorción-desorción				(mMol Fe/g producto)		1 gr/L
DGPPL (Producto 3 ³)	49,9	9,9	0,255	5,48	2,12	230
Nanomax 50	53,6	10,3	0,218	5,37	1,94	177
Inside Céram	39,4	10,5	0,229	4,99	2,07	163
¹ Gallic acid equivalents (GAE)						
² Rendimientos de extracción: Nanomax 95: 3,79 g sólidos solubles/ 100 g sólidos iniciales; Nanomax 50: 2,91 g sólidos solubles / 100 g sólidos iniciales; Inside Céram: 3,51 g sólidos solubles / 100 g sólidos iniciales						
³ De acuerdo con la nomenclatura presentada en la Figura 1						

Tabla 1. Caracterización de rechazos procesados mediante a) liofilización, b) extracción con acetato de etilo y c) adsorción- desorción

El comportamiento de las diferentes membranas seleccionadas en este trabajo se puede ver en la Figura 2. El coeficiente de rechazo aparente se calcula a partir de los datos experimentales obtenidos en los experimentos en abierto y en los cuales se operó hasta alcanzar un factor de reducción de volumen (VRF, por sus siglas en inglés) de entre 3 y 5. Cuando se opera en condiciones de concentración (modo abierto) durante un periodo diferencial de tiempo, en el cual el volumen de retenido ha decrecido desde V_r hasta $V_r - dV_r$, un volumen de permeado dV_p (numéricamente igual a dV_r) pasa a través de la membrana. Si se considera que la concentración de solutos en el permeado y el retenido son C_p y C_r , respectivamente, se puede establecer un balance de materia a los solutos de la manera siguiente (Moure y col., 2006),

$$C_p dV_r = d(V_r \cdot C_r) \quad [1]$$

Si se asume que R es independiente de la concentración de retenido, C_r se obtiene como una función de C_r , y la ecuación se puede resolver para obtener una expresión como la que sigue:

$$\ln [C_r/C_{r0}] = R \ln [V_{r0}/V_r] \quad [2]$$

En la cual C_{r0} y V_{r0} son la concentración y el volumen de la alimentación, y el término V_{r0}/V_r es el denominado con anterioridad factor de reducción de volumen (VRF). Bajo esta hipótesis $\ln (C_r/C_{r0})$ varía linealmente con $\ln(\text{VRF})$ y R puede ser calculada como la pendiente de la curva representada, como se muestra en la Figura 2. Para la membrana Nanomax este valor del coeficiente de rechazo fue de 96,6%, mientras que para una membrana del mismo material pero con un tamaño de corte ligeramente menor, el valor del coeficiente de rechazo encontrado fue del 51,5%. A su vez el efecto del tipo de material de construcción de la membrana quedó reflejado en el valor del coeficiente de rechazo encontrado para una membrana de material cerámico (Inside ceram), 71,7 % con un tamaño de corte similar a la membrana nanomax 50.

Las capacidades como captadores de radicales libres de los productos procesados por membranas se muestran en la Tabla 1. En general estos valores para el catión ABTS fueron menores que la actividad dada por un antioxidante sintético (trolox), mientras que la actividad como captadores de radical DPPH fue intermedia entre la actividad encontrada para BHA y BHT. En general, los resultados para estos extractos resultaron ser ligeramente menores a los aportados para antioxidantes sintéticos, sin embargo comparados con extractos metanólicos obtenidos de uva por Jayaprakasha y col. (2001) la actividad mostrada fue del orden de 2,5 -3 veces superior.

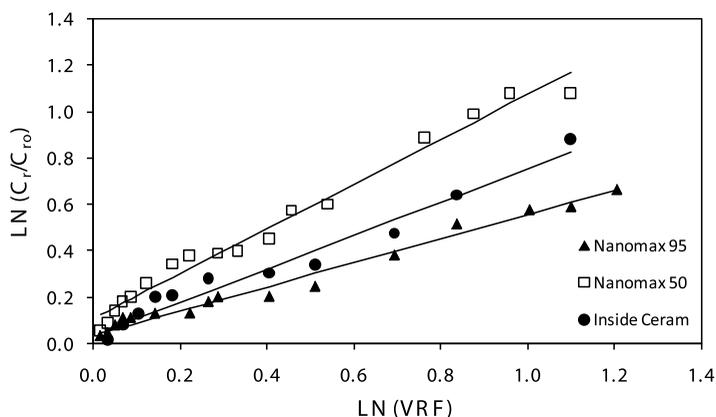


Figura 2. Coeficientes de rechazo aparente estimados mediante a linealización de $\ln (C_r/C_{r0})$ vs $\ln (VRF)$ para los compuestos fenólicos presentes en los licores de bagazo destilado obtenidos por prensado

En un intento de mejorar estos resultados, estos extractos fueron extraídos con acetato de etilo (Figura 1) y los rendimientos de la extracción y las actividades antioxidantes de los extractos obtenidos se muestran en la Tabla 1. El extracto de acetato de etilo obtenidos a partir del concentrado producido con la membrana Nanomax 50 es el que presenta una mayor actividad de captación del radical DPPH, teniendo una actividad similar a la de antioxidantes comerciales.

El siguiente paso para mejorar los resultados obtenidos hasta el momento fue probar los procesos de adsorción-desorción sobre resinas de los compuestos activos todavía presentes en el permeado de las corrientes ultrafiltradas (Figura 1). En la Tabla 2 se presentan los datos obtenidos para la resina Sepabeads SP700 cuando se adsorbió sobre ella el material de partida (DGPPL) o los permeados obtenidos de los procesos de ultrafiltración de este efluente inicial (DGPPL) por las membranas Nanomax 50 y Inside ceram.

De acuerdo con los datos aquí mostrados, la capacidad de adsorción de la resina, representada por q .

	q (mg GAE/g resina)	Adsorción (g GAE adsorbidos/ 100 gr GAE iniciales)	Desorción (g GAE desorbidos/100 g GAE adsorbidos)		TEAC (mMol Trolox)
			Total desorbido	Pico principal	
DGPPL	13,3	83,3	61,6	56,8	108,3
Nanomax 50 (Producto 2 ²)	8,23	91,7	65,0	56,3	57,0
Inside Céram (Producto 2 ²)	5,41	91,3	57,6	46,3	50,2

¹ Porcentaje de desorción del pico principal recuperado e identificado como extracto purificado
² De acuerdo con la nomenclatura mostrada en la Figura 1

Tabla 2. Capacidad de adsorción, porcentaje de adsorción-desorción (referenciado a la fracción adsorbida) y capacidad barredora del radical ABTS de los permeados

Es significativamente diferente en función de la corriente de alimentación empleada. El diferente comportamiento entre el uso de la corriente inicial (DGPPL) o los permeados está relacionado con los cambios producidos por el tratamiento de membranas en la composición química de las corrientes. La adsorción de compuestos fenólicos determinada como porcentaje de adsorción es mayor cuando se emplea los permeados que para la corriente inicial, sin embargo la actividad antioxidante del producto desorbido a partir de la corriente inicial es del orden de dos veces superior a los valores de actividad antioxidante encontrada para los productos desorbidos cuando la muestra empleada para el proceso de adsorción son los permeados del proceso de filtración.

En la Tabla 1, apartado c, se muestran el contenido fenólico y las actividades antioxidantes para estos productos de desorción. El producto final presenta concentraciones de compuestos fenólicos 4-5 veces superiores a la de los productos obtenidos únicamente mediante tecnología de membranas (Tabla 1c), y ligeramente superiores a los extractos de acetato de etilo (Tabla 1b). La actividad antioxidante como captadores de radicales libres (ABTS) es veinte veces mejor que la de los productos obtenidos únicamente por membranas y 5 veces que los extractos de acetato de etilo.

Como conclusión se puede decir que 1 gramo de extracto obtenido mediante liofilización de las mejores condiciones del procesos de desorción tiene una capacidad antioxidante comparable a la de casi 10 gramos de trolox y un valor de FRAP equivalente a 0,5 g de ácido ascórbico. Esto quiere decir que a ingestión de 0,18 g del concentrado podría llegar a ser equivalente al efecto de la vitamina C contenida en 100 g de kiwi, 100 g de guayaba, 600 g de limón o 250 gramos de pimiento rojo.

BIBLIOGRAFÍA

- Cruz, J. M., Domínguez, H., Parajo, J. C. (2004). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5612-5620
- D'Alvise, N., Lesueur-Lambert, C., Fertin, B., y col. (2002). *Sci. Technol.*, 35, 2453-2472.
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., y col. (2009). *J. Food Eng.*, 91, 587-593.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. PAX., y col. (2001). *Food Chem.*, 73, 285-290.
- Kalbasi, A., Cisneros-Zevallos, L. (2007). *J. Agric. Food Chem.* 55, 7036-7042.
- Llorach, R., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F. (2004). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5109-5116.
- Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., y col. (2006). *Pur. Technol.*, 48, 176-181.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., y col. (2005). *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 284-290.
- Saleh, Z. S., Wibisono, R., Lober, K. (2008). *Int. J. Food Eng.*, 4, 13.
- Saura-Calixto, F. (1998). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4303-4306.
- Scordino, M., Di Mauro, A., Passerini, A., y col. (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 651-658.

