

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT
PÚBLICA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y BIODISPONIBILIDAD
MINERAL DE ZUMOS DE FRUTAS ADICIONADOS DE
MINERALES Y/O LECHE.

ANTONIO CILLA TATAY

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 de gener de 2010 davant un tribunal format per:

- Dra. Rosaura Farré Rovira
- Dr. Gaspar Ros Berruezo
- Dr. Juan Carlos Espín de Gea
- Dra. Amparo Alegría Torán
- Dr. José Moisés Laparra Llopis

Va ser dirigida per:

Dra. Reyes Barberá Sáez

Dra. María Jesús Lagarda Blanch

©Copyright: Servei de Publicacions
Antonio Cilla Tatay

Dipòsit legal: V-1061-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7797-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències
de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal
- Àrea de Nutrició i Bromatologia -

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y BIODISPONIBILIDAD MINERAL DE ZUMOS DE FRUTAS ADICIONADOS DE MINERALES Y/O LECHE

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Antonio Cilla Tatay

Dirigida por:

Dra. Reyes Barberá Sáez

Dra. M^a Jesús Lagarda Blanch

Valencia, Septiembre de 2009



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal
Àrea de Nutrició i Bromatologia

REYES BARBERÁ SÁEZ y MARÍA JESÚS
LAGARDA BLANCH, profesoras titulares del Área de
Nutrición y Bromatología en el Departament de Medicina
Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació,
Toxicologia i Medicina Legal, de la Universitat de València,

CERTIFICAN QUE: el licenciado en Farmacia
ANTONIO CILLA TATAY ha realizado bajo su dirección y en
los laboratorios del área de Nutrición y Bromatología, un trabajo
que lleva por título **“Actividad antioxidante y
biodisponibilidad mineral de zumos de frutas adicionados de
minerales y/o leche”** y, autorizan su presentación para optar al
Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que conste a los efectos oportunos, en Burjassot,
Octubre de 2009.

Fdo: Reyes Barberá Sáez Fdo: María Jesús Lagarda Blanch

Este trabajo forma parte del siguiente proyecto concedido al grupo de investigación *Bionutest* (03/003):

AGL2004-07657-C02-01: “*Efectos de los antioxidantes y fosfopéptidos de la caseína sobre la biodisponibilidad de hierro y cinc, y de éstos sobre el poder antioxidante total. Estudios in vitro*” financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

También, una parte del mismo ha sido financiado con la ayuda concedida por la Generalitat Valenciana (GVARVIV2007-096) y el proyecto Consolider-Ingenio 2010 CSD2007-00063 (Fun-C-Food).

El doctorando Antonio Cilla Tatay, ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del MICINN.

A Amparo y Pablo

Me gustaría agradecer a esta Tesis doctoral y a todas las personas que han contribuido a ella de algún modo con su trabajo y ayuda desinteresada, por poder estar hoy aquí y por haber forjado y modelado mi carácter.

Gracias a mis directoras:

Dra. Reyes Barberá Sáez, por darme la gran oportunidad de realizar este trabajo en tu grupo humano de investigación, por guiarme durante estos años, por confiar en mí y por transmitirme tu sabia experiencia aunque a veces hayas perdido la voz en el empeño. Ya te dije una vez que eres mi “mamá científica”.

Y Dra. María Jesús Lagarda Blanch, por tu bondad y calidad humana, por estar siempre cerca, por tus constantes palabras de ánimo y sabios consejos científicos y por enseñarme que la paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos muy dulces.

Gracias a ambas por la dedicación, apoyo, amistad y cariño que me habéis brindado y por darme la oportunidad de seguir trabajando y aprendiendo en el departamento en una línea de investigación muy similar.

Gracias a la Dra. Rosaura Farré por mostrar su interés y ánimos para con mi trabajo y por ser un referente y un modelo a seguir en el mundo de la investigación y la docencia.

Gracias a la Dra. Amparo Alegría, por estar pendiente y ayudarme siempre que te lo he pedido, por poner la cordura cuando surgen dificultades, por hablar muchos ratos de todo un poco y por reírte con mis chistes.

Gracias al Dr. Moisés Laparra, por enseñarme a caminar en el laboratorio, por tu amistad y confianza en todo momento. Te estoy enormemente agradecido por todo lo que me has enseñado y por ser tu pequeño saltamontes. Como siempre me dices: “Chaval, de mayor quiero ser como tú”.

Gracias a Ramón, Jaime, Francisco y Vicente (mis “brothers in lab”) por las risas compartidas, la cervezas, las torrás, los partiditos de fútbol y de frontón, las cenitas y salidas nocturnas, la inestimable ayuda ante cualquier problema informático, por aguantar mis cabreos y hacer terapia de grupo cuando algo sale mal, y sobre todo por ser grandísimos amigos además de compañeros.

Gracias a las chicas del departamento que estaban cuando empecé y ya no están con nosotros, Giada, Sara, Lourdes, Ana Z., Esther, Celia, Rebeca y Jessica, a las que sí están, Lupe, Clara y M^a José, y a las nuevas incorporaciones, Marina, Laia, Saraí y María por las risas que relajan dentro de las horas de trabajo y por estar siempre dispuestas a ayudar y echarme una mano.

Gracias al Dr. Gonzalo Clemente por su ayuda estadísticamente significativa y a las Dras. Ana Frígola, M^a José Esteve, M^a Victoria Alonso, a la gente del Área de Toxicología, personal técnico y administrativo por vuestra amabilidad y hacer ameno el trabajo diario.

Gracias a Ana Flores y demás compañeros de cultivos celulares por vuestra sonrisa y ganas de ayudar y ser un público fiel de mis chistes y chorradas.

Gracias a los Drs. Juan Carlos Espín y Francisco Tomás-Barberán y la gente del CEBAS de Murcia por la acogida, aceptación y posibilidad de aprender muchísimo

en vuestro grupo de trabajo. Mención especial para Antonio, por las largas horas de trabajo codo con codo con las células, las risas y cervezas en el Troya, por aceptarme con mis chistes y chorradas, por acogerme en tu casa y por nuestra amistad. Espero que a pesar de la distancia nunca perdamos el contacto.

Gracias a la Dra. Laura Bravo por aceptarme en su grupo de investigación y posibilitar la colaboración con nuestro grupo, a Miren por las risas y el trabajo en equipo y al resto de compañeros del Instituto del Frío por su simpatía y amabilidad.

Y no por ser los últimos, sois menos importantes, ya que lo bueno se hace esperar:

Gracias a mis amigos (p.o.a.), Alba, Guillem, Irene, Javi Durá, Javi Gascó, Manolo, María, Pepe, Sergio, Toni y Yolanda, por ser mi otra familia y mi desconexión, por las risas, las fiestas, las excursiones y por compartir vuestra vida conmigo desde los cinco años.

Gracias a mi familia, y en especial a mis padres por su sacrificio diario para que pueda estar donde estoy, la educación, los valores y su amor, a mi hermana por abrirme y allanarme siempre el camino y ser un modelo a seguir, y a mis suegros y cuñados por su apoyo incondicional.

Gracias a mi yaya, que eres mi estrellita en el firmamento y estés donde estés, sé que estarás orgullosa del teu xiquet.

Gracias a Amparo por cruzarte en mi camino y llenar mi vida de felicidad. Por tu paciencia, apoyo, cariño y comprensión, ya que sin ti nada de esto habría sido posible. Y sobre todo, por el fruto de nuestro amor, el pequeño pelirrojo Pablito. Cada día que pasa estoy más enamorado de los dos.

Índice

	Página
Índice de cuadros	I
Índice de figuras	III
Introducción	3
Objetivos	9
Plan de trabajo	13
Antecedentes bibliográficos	17
1. Bebidas funcionales	17
1.1 Hierro	17
1.2 Cinc	20
1.3 Leche. Fuente de péptidos bioactivos	21
1.4 Ácido ascórbico	23
1.5 Polifenoles	25
2. Biodisponibilidad	28
2.1 Concepto	28
2.2 Evaluación de la biodisponibilidad	30
- Métodos <i>in vivo</i>	30
- Métodos <i>in vitro</i>	32
2.3 Cultivos celulares	34
- Células Caco-2 y biodisponibilidad de hierro	35
- Células Caco-2 y polifenoles	37
3. Efectos biológicos de bebidas a base de zumo de frutas ricas en	38

antioxidantes	
3.1 Estrés oxidativo y sistemas de defensa antioxidante	38
- Radicales libres y especies reactivas de oxígeno	39
- Sistemas de defensa antioxidante	40
- Mecanismos de acción de los antioxidantes	42
3.2 Métodos de medida de la capacidad antioxidante total (CAT)	43
- Método TEAC. Capacidad antioxidante equivalente al Trolox	46
- Método ORAC. Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno	47
- Método Folin-Ciocalteu. Determinación de polifenoles solubles totales	50
- Ventajas e inconvenientes de los métodos de medida de capacidad antioxidante total	52
3.3 Ensayos <i>in vitro</i> utilizando cultivos celulares	53
- Ciclo celular	58
- Apoptosis	61
3.4 Ensayos <i>in vivo</i> . Estudios de intervención en humanos	66
Parte experimental	73
1. Muestras	73
1.1 Relación de muestras	73
1.2 Descripción y composición de las bebidas a base de zumo de frutas	73
2. Diseño experimental	75

3. Métodos de análisis	77
- Digestión gastrointestinal simulada (obtención de las fracciones bioaccesibles)	77
A. Evaluación de la funcionalidad de una bebida a base de zumo de frutas rica en antioxidantes suplementada o no con hierro y cinc y/o leche	79
A.1 Propiedades antioxidantes (almacenamiento y digestión)	79
- Capacidad antioxidante total	79
a) Ensayo ORAC	80
b) Ensayo TEAC	81
- Ácido L-ascórbico	83
- Determinación de polifenoles	84
a) Polifenoles solubles totales	84
b) Análisis de compuestos polifenólicos mediante HPLC-DAD-MS/MS	85
A.2 Ensayos <i>in vitro</i> con cultivos celulares: citoprotección, actividad antiproliferativa y biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles mayoritarios	87
A.2.1 Efecto citoprotector frente a estrés oxidativo inducido	87
- Línea celular Caco-2	87
- Acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)	89
- Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	90
- Funcionalidad mitocondrial (test MTT)	91
- Contenido intracelular de glutatión reducido (GSH)	92

- Actividad enzimática glutatión reductasa (GSH-Rd)	94
- Actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD)	94
- Ciclo celular: análisis del contenido de ADN	96
- Apoptosis: actividad de la caspasa-3	97
A.2.2 Actividad antiproliferativa	98
- Líneas celulares Caco-2 y HT-29	98
- Viabilidad e inhibición de la proliferación celular	100
- Funcionalidad mitocondrial (test MTT)	101
- Ciclo celular: análisis del contenido de ADN	101
- Expresión de ciclinas	102
- Apoptosis	102
a) Tinción con Hoechst	102
b) Tinción fluorescente con yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína	103
A.2.3 Biodisponibilidad y metabolismo <i>in vitro</i> de polifenoles mayoritarios	105
A.3 Ensayos <i>in vivo</i>	106
- Estudio de intervención en humanos	106
a) Sujetos de estudio	106
b) Diseño del estudio de intervención	107
c) Protocolo de extracción y preparación de las muestras de sangre	109
- Capacidad antioxidante total sérica (métodos ORAC y TEAC)	109
- Actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria	110

- Determinación de hemoglobina eritrocitaria (método Drabkin)	110
B. Estudio de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de hierro y cinc mediante ensayos <i>in vitro</i>	112
B.1 Contenido mineral (Fe y Zn)	112
a) Destrucción de la materia orgánica	112
b) Determinación mineral	113
B.1.1 Bioaccesibilidad mineral (Fe y Zn)	114
B.1.2 Captación de Fe en células Caco-2 (síntesis de ferritina)	115
4. Análisis estadístico	116
Resultados y Discusión	121
A. Evaluación de la funcionalidad de una bebida a base de zumo de frutas rica en antioxidantes suplementada o no con hierro y cinc y/o leche	121
1. Propiedades antioxidantes de las bebidas a base de zumo de frutas durante el almacenamiento en refrigeración y tras una digestión gastrointestinal simulada	121
a) Almacenamiento en refrigeración	121
- Capacidad antioxidante total (CAT)	121
- Ácido ascórbico	130
b) Digestión gastrointestinal simulada	133
- Componentes que influyen en la capacidad antioxidante	135

total	
a) Polifenoles	135
b) Otros factores	149
c) Ácido ascórbico	149
2. Efecto citoprotector de las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas frente a estrés oxidativo inducido en células Caco-2	151
- Actividad de los enzimas mitocondriales (test MTT)	153
- Especies reactivas de oxígeno (ROS)	156
- Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	158
- Glutati3n reducido (GSH)	160
- Super3xido dismutasa (SOD)	164
- Glutati3n reductasa (GSH-Rd)	166
- Ciclo celular y apoptosis	168
3. Actividad antiproliferativa de las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas en células de c3ncer de colon	175
a) Fracciones bioaccesibles de BZ, BZFe y BZFeL (c3lulas Caco-2)	175
b) Fracciones bioaccesibles de BZZn, BZFeZn, BZZnL y BZFeZnL (c3lulas Caco-2 y HT-29)	184
4. Biodisponibilidad y metabolismo en c3lulas Caco-2 de los polifenoles mayoritarios en las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas	193

5. Estudio de intervención en humanos	195
a) Capacidad antioxidante total (CAT) sérica	195
b) Actividad SOD eritrocitaria	201
B. Estudio de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad mineral de hierro y cinc mediante ensayos <i>in vitro</i>	205
1. Bioaccesibilidad de hierro y cinc	205
- Hierro	207
- Cinc	209
2. Captación de hierro en células Caco-2: síntesis de ferritina	210
Conclusiones	217
Bibliografía	223
Anexos	259
- Abreviaturas	259
- Instrumentación	262
- Material	264
- Reactivos	265
Difusión de resultados	275

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de los polifenoles	25
2	Sistemas de defensa antioxidante del organismo	41
3	Características normalizadas de los métodos de medida de la capacidad antioxidante	45
4	Ventajas y desventajas de los métodos de medida de capacidad antioxidante total	52
5	Efecto citoprotector ejercido por compuestos bioactivos frente a H ₂ O ₂ en células Caco-2	55
6	Compuestos bioactivos y actividad antiproliferativa en células humanas de cáncer de colon	57
7	Ejemplos del efecto de estudios de intervención a corto (horas) y largo plazo (semanas) con zumos de frutas sobre la CAT en suero/plasma y/o la actividad SOD eritrocitaria	69
8	Valor energético (Kcal/100 mL) y composición (g/100 mL) de las bebidas a base de zumo de frutas estudiadas	74
9	Determinación de proteínas totales	93
10	Ensayo de actividad caspasa-3	98
11	Condiciones instrumentales para la determinación de hierro y cinc por EAA-llama	114
12	Bebidas a base de zumo de frutas: capacidad antioxidante total (métodos ORAC y TEAC) durante el almacenamiento en refrigeración	122
13	Bebidas a base de zumo de frutas: contenido de ácido ascórbico	131

Cuadro	Página
(mg/mL) a lo largo del almacenamiento en refrigeración	
14 Bebidas a base de zumo de frutas y sus fracciones bioaccesibles: capacidad antioxidante total (μM Trolox), polifenoles solubles totales (mg GAE/L) y contenido de ácido ascórbico (mg/mL)	134
15 Compuestos fenólicos mayoritarios en BZ, BZFe y BZFeL (mg/L) determinados por HPLC-DAD-MS/MS antes y después de la digestión gastrointestinal	139
16 Compuestos fenólicos mayoritarios en BZZn, BZFeZn, BZZnL y BZFeZnL (mg/L) determinados por HPLC-DAD antes y después de la digestión gastrointestinal	145
17 Estrés oxidativo inducido (H_2O_2 1 h) en células Caco-2	152
18 Actividad antiproliferativa (porcentaje de inhibición) de las fracciones bioaccesibles de BZ, BZFe y BZFeL y del blanco de digestión en células Caco-2	176
19 Actividad antiproliferativa (porcentaje de inhibición) de las fracciones bioaccesibles de BZZn, BZFeZn, BZZnL y BZFeZnL en células Caco-2 y HT-29	185
20 Estudio de intervención: capacidad antioxidante total sérica en los estudios 1-3 (BZ, BZL y BZFeL) determinada por los métodos ORAC y TEAC	197
21 Estudio de intervención: actividad enzimática SOD eritrocitaria en los estudios 1-3 (BZ, BZL y BZFeL)	202
22 Hierro: contenido total, bioaccesible y bioaccesibilidad	205
23 Cinc: contenido total, bioaccesible y bioaccesibilidad	206
24 Biodisponibilidad de hierro: síntesis de ferritina en Caco-2	210

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción	42
2	Mecanismo de reacción del método TEAC	47
3	Degradación de la fluoresceína por radicales peroxilo	49
4	Ciclo celular y proteínas encargadas de su regulación	59
5	Diferencias entre muerte celular por necrosis y apoptosis	62
6	Principales rutas desencadenantes de apoptosis	64
7	Esquema del diseño experimental	76
8	Acumulación de ROS intramitocondrial	89
9	Potencial de membrana mitocondrial	91
10	Fases del ciclo celular	97
11	Líneas celulares (Caco-2 y HT-29) utilizadas en los ensayos de actividad antiproliferativa	100
12	Condensación de cromatina en una célula apoptótica	103
13	Distribución de la población celular según el ensayo diacetato de fluoresceína-yoduro de propidio (FDA-IP)	105
14	Diseño del estudio de intervención	108
15	Evolución de la capacidad antioxidante total durante el almacenamiento determinada por los métodos ORAC y TEAC	125
16	Capacidad antioxidante total, de acuerdo a la formulación, determinada por los métodos ORAC y TEAC	126
17	Bebidas a base de zumo de frutas: interacción entre los factores tiempo de almacenamiento y formulación	129
18	Bebidas a base de zumo de frutas: evolución del contenido de	132

Figura	Página
ácido ascórbico durante el almacenamiento, independientemente de la formulación de la muestra	
19 Cromatograma de la muestra BZZn antes y después de la digestión gastrointestinal simulada	138
20 Efecto de la suplementación con hierro y presencia de leche sobre el contenido polifenólico antes y después de la digestión	140
21 Efecto de la suplementación con cinc con/sin hierro y/o leche sobre el contenido polifenólico antes y después de la digestión	146
22 Conversión del MTT en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H ₂ O ₂ 5 mM durante 1 h y 2 h	154
23 Producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en células Caco-2 preincubadas 24 h con fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas expuestas a H ₂ O ₂ 5 mM/1 h	156
24 Cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H ₂ O ₂ 5 mM/1 h	159
25 Cambios en el contenido intracelular de GSH en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H ₂ O ₂ 5 mM durante 1 h y 2 h	162
26 Actividad enzimática SOD en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H ₂ O ₂ 5 mM/1 h	165

Figura	Página
27 Actividad GSH-Rd en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H ₂ O ₂ 5 mM/2 h	167
28 Efectos del tratamiento con H ₂ O ₂ 5 mM/2 h en la progresión del ciclo celular en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas	170
29 Efectos del tratamiento con H ₂ O ₂ 5 mM/2 h en la actividad caspasa-3 en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas	173
30 Distribución del ciclo celular en células Caco-2 tratadas con la fracción bioaccesible de la muestra BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) en exposición repetitiva (4h/día durante 4 días)	178
31 Distribución del ciclo celular en células Caco-2 tratadas con la fracción bioaccesible de la muestra BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) en exposición continua (24h)	179
32 Efecto de la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) sobre la expresión de las ciclinas B ₁ y D ₁ en células Caco-2 tras exposición continua (24h)	180
33 Determinación morfológica de la apoptosis utilizando la sonda fluorescente Hoechst 33242 en células Caco-2. Exposición 24 h a la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v en medio de cultivo)	182
34 Determinación de apoptosis mediante citometría de flujo (ensayo FDA-IP) en células Caco-2. Exposición a la fracción bioaccesible de la muestra BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) en exposición repetitiva (4h/día durante 4 días) y continua (24 h)	183

Figura	Página
35 Conversión del MTT en células Caco-2 y HT-29 expuestas a las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas suplementadas con cinc (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h	187
36 Determinación morfológica de la apoptosis en células Caco-2 tratadas con la fracción bioaccesible de BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h utilizando la sonda fluorescente Hoechst 33242	188
37 Determinación morfológica de la apoptosis en células HT-29 tratadas con la fracción bioaccesible de BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h utilizando la sonda fluorescente Hoechst 33242	189
38 Distribución del ciclo celular en células Caco-2 y HT-29 expuestas a la fracción bioaccesible de la muestras BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h y 48 h	190
39 Distribución del ciclo celular en células Caco-2 y HT-29, 24 h y 48 h después de retirar la fracción bioaccesible de BZZnL del medio de cultivo	192
40 Cromatograma del medio de cultivo que contiene la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) tras la exposición de las células Caco-2 durante 24 h	194

Introducción

El aporte suficiente de nutrientes por parte de la dieta para cubrir los requerimientos nutricionales de un individuo y proporcionar bienestar es un aspecto básico y prioritario, ya que permite evitar gran número de enfermedades carenciales. Por otra parte, en las sociedades desarrolladas se ha producido un cambio en el concepto de “esencialidad” de nutriente, el cual está siendo sustituido por el concepto de nutrición “óptima”, que contempla la posibilidad de que algunos alimentos mejoren la salud de la población y reduzcan el riesgo de desarrollar determinadas enfermedades (Ramos et al., 2006).

En este contexto, en el que el binomio alimentación y salud reconoce otros beneficios que no se engloban en los aspectos meramente nutricionales, surge el concepto de “alimentación funcional”. Así pues, un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente mediante datos científicos generalmente aceptados (Artículo 6 del Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos) que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad. Además, los alimentos funcionales, según Roberfroid (2002) deben presentar unas determinadas características:

1. Tienen que ser alimentos con un beneficio extra, por eliminación, reducción o adición de algún componente.

2. Los alimentos funcionales son básicamente alimentos “clásicos” pero llevan incorporados nuevos componentes alimentarios, o no alimentarios, siempre que tengan un claro efecto beneficioso.
3. La base de la alimentación, es una alimentación completa y variada. Los alimentos funcionales, complementan la función nutritiva y la prevención de ciertas enfermedades. Hay que tener en cuenta que las cantidades deben ser las normalmente consumidas en la dieta.
4. La presentación de un alimento funcional, tiene que ser como la de un alimento, sin modificar sus características. Nunca deben presentarse en forma de cápsulas o comprimidos.

Las áreas temáticas de aplicación de los alimentos funcionales son muy diversas, siendo la defensa contra el estrés oxidativo y la modulación de los sistemas redox y antioxidantes del organismo una de las áreas más prometedoras (Roberfroid, 2000). Por ello, en la actualidad muchos alimentos funcionales tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales en la dieta con el objeto de modular las acciones de los radicales libres, promoviendo de esta manera los procesos de regeneración celular, ya que se ha asociado una dieta rica en frutas y verduras con una mayor protección frente a enfermedades cardiovasculares (Bazzano et al., 2002), así como frente a diversos tipos de cáncer como los del tracto gastrointestinal (Serafini et al., 2002).

Las ventajas de seguir una dieta rica en frutas y verduras llevó a la creación del programa de nutrición “Five a Day” en 2003, que aconseja consumir cinco o más raciones de fruta y/o verdura al día (Royo, 2004). No obstante, a pesar que la dieta española tradicional responde al patrón

alimentario definido como Dieta Mediterránea, se había observado una preocupante disminución en el consumo de frutas, verduras y hortalizas en el período 1960-2004 (MAPA, 2001) de especial importancia en grupos de población vulnerable (edad infantil y adolescencia) que podría traducirse en la ingesta inadecuada de diversas vitaminas A, C, E, y B₉ así como de minerales tales como calcio y hierro (Serra-Majem 2001). Sin embargo, datos más recientes (MARM, 2008) indican una estabilización en el consumo de frutas y hortalizas en el período 1987-2007. Del mismo modo, personas de edad avanzada, con problemas de masticación, pueden tener una modificación en sus patrones dietéticos incluyendo el abandono total o parcial del consumo de fruta. Como consecuencia de tales situaciones, los zumos de fruta emergen como una de las alternativas más útiles para complementar las recomendaciones dietéticas sobre el consumo diario de frutas y verduras (Paterson et al., 2006). En una revisión reciente (Ruxton et al., 2006) se concluye que el consumo de zumos de frutas y verduras puede ser tan efectivo como la ingesta de las mismas en relación a la reducción del riesgo de enfermedad crónica.

Los zumos de frutas pueden ser considerados alimentos funcionales naturales ya que, además del propio valor nutricional, proporcionan otra serie de componentes potencialmente beneficiosos para la salud (Bertsias et al., 2005):

- Fibra
- Ácido fólico o folatos (vitamina B₉)
- Vitaminas (C, E, A, B₁ y B₆)
- Minerales (Ca, Mg, K)

- Fitoquímicos bioactivos incluyendo carotenoides y compuestos fenólicos antioxidantes.

En los últimos años, la industria alimentaria ha incrementado su interés en el desarrollo de alimentos funcionales, siendo el enriquecimiento de bebidas a base de zumo de frutas con vitaminas y minerales uno de los métodos empleados. Esta estrategia persigue mejorar el estado nutricional de la población, o de grupos específicos de la población y/o corregir posibles deficiencias en la ingesta diaria de vitaminas o minerales, debidas a cambios en los hábitos alimentarios. No obstante, se precisa un mayor conocimiento sobre las interacciones que puedan producirse entre los compuestos bioactivos de las bebidas a base de zumo de frutas y los minerales adicionados, o viceversa.

Objetivos

El objetivo del presente estudio es evaluar la influencia del enriquecimiento de hierro y cinc sobre la capacidad antioxidante y bioactividad de compuestos antioxidantes en bebidas elaboradas a base de zumo de frutas, así como determinar la biodisponibilidad *in vitro* de dichos minerales en los zumos.

Objetivos específicos:

- I. Evaluación de la funcionalidad de una bebida a base de zumo de frutas rica en antioxidantes suplementada o no con hierro y/o cinc y/o leche.
- II. Estudio de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad mineral de hierro y cinc mediante ensayos *in vitro*.

Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos propuestos se propone un plan de trabajo que consta de las siguientes etapas:

1) Revisión de los antecedentes bibliográficos relativos a compuestos bioactivos en bebidas a base de zumo de frutas: biodisponibilidad y efectos biológicos.

2) Estudio de la influencia del almacenamiento en refrigeración y digestión gastrointestinal simulada en bebidas a base de zumo de frutas sobre:

- capacidad antioxidante total: métodos ORAC y TEAC.
- polifenoles solubles totales.
- ácido ascórbico.

3) Evaluación de los efectos biológicos, en cultivos celulares, de las fracciones bioaccesibles obtenidas de las bebidas objeto de estudio:

- actividad citoprotectora.
- actividad antiproliferativa.

4) Determinación de la biodisponibilidad *in vitro* de polifenoles y minerales:

- bioaccesibilidad y biodisponibilidad de polifenoles
- bioaccesibilidad de hierro y cinc.
- biodisponibilidad de hierro (síntesis de ferritina).

5) Estudio de la influencia del consumo de bebidas a base de zumo de frutas en el estatus antioxidante de mujeres sanas en edad fértil.

Antecedentes Bibliográficos

1. BEBIDAS FUNCIONALES

El tipo de alimentación es uno de los factores condicionantes de la salud del individuo. Por esta razón, existe un gran interés por parte de las industrias alimentarias y de los consumidores por los llamados alimentos funcionales, debido a sus beneficios en la salud y/o la prevención de enfermedades.

En los últimos años, se han incorporado al mercado una amplia variedad de bebidas a base de zumo de frutas suplementadas con vitaminas, minerales y leche. Este tipo de bebidas aporta al conjunto de la dieta distintos compuestos fitoquímicos bioactivos. La presencia de leche, tras la digestión gastrointestinal, aporta péptidos bioactivos derivados de la caseína (caseinofosfopéptidos) con efecto favorecedor sobre la biodisponibilidad mineral (Meisel & FitzGerald, 2003).

Las bebidas a base de zumo de frutas suplementadas con distintas vitaminas y/o minerales pueden ser útiles cuando por diferentes circunstancias la alimentación no resulta suficiente, variada y/o equilibrada.

A continuación se describen los principales compuestos con potencial efecto funcional presentes en la composición de las bebidas a base de zumo de frutas objeto de estudio de la presente tesis.

1.1 Hierro

El hierro es un micronutriente esencial para el hombre, cuya función fisiológica principal es la de formar parte de la mioglobina y hemoglobina

participando en los procesos de transferencia de electrones de la cadena respiratoria (Amaro & Cámara, 2004).

La anemia debida a la deficiencia de hierro es uno de los principales problemas nutricionales a nivel mundial, con más de 700 millones de personas afectadas. Un estatus de hierro deficiente se asocia con menor capacidad de trabajo y memoria, así como déficit de atención y aprendizaje (Webb, 2007).

Las recomendaciones diarias de ingesta (DRI-Dietary Reference Intake) de hierro varían entre 8 y 18 mg/día, según edad y sexo, pudiendo alcanzar los 27 mg/día en el caso de mujeres embarazadas (Food & Nutrition Board, 2004).

De las dos formas químicas de hierro presentes en los alimentos (hierro hemo y no hemo), la última es muy abundante en alimentos de origen vegetal y es la forma más utilizada para la suplementación de alimentos. Estas formas de hierro poseen diferente biodisponibilidad, siendo la del hierro hemo superior al 15% frente a menos de un 5% para el hierro no hemo (Schricker et al., 1982). La biodisponibilidad de hierro no hemo se puede ver afectada por diversos componentes de la dieta; así una serie de factores aumentan su biodisponibilidad, como la presencia de proteínas cárnicas, ácidos orgánicos (ácido ascórbico) y determinados caseinofosfopéptidos. Por el contrario, otros factores como el ácido fítico y polifenoles parecen ejercer un efecto inhibitor (Amaro & Cámara, 2004).

Existen diversas estrategias para mejorar el estado de hierro de una población (Webb, 2007):

- Promoción de cambios en la dieta para aumentar la cantidad de hierro disponible:
 - 1) Mayor consumo de carne y pescado (especial atención en personas vegetarianas)
 - 2) Consumo de alimentos ricos en vitamina C con las comidas (ej. zumos derivados de cítricos) para incrementar la absorción de hierro inorgánico.
 - 3) Evitar el consumo de bebidas ricas en taninos durante las comidas (ej. té) para evitar la inhibición de la absorción de hierro.
- Suplementación de ciertos alimentos con hierro: cereales para el desayuno, harinas (obligatorio su enriquecimiento en el Reino Unido), etc.
- Uso selectivo de complementos con hierro.

En este contexto, y frente a un déficit de Fe en amplios sectores poblacionales, parece lógico considerar desde un punto de vista nutricional que una bebida a base de zumo de frutas, incluyendo cítricos como es la naranja, puede ser un vehículo adecuado para la suplementación con hierro (Haro-Vicente et al., 2006):

Este tipo de alimentos presentan:

- Ausencia de algunos inhibidores de la absorción de hierro como fitatos y oxalatos.
- La ingesta y absorción es más rápida que en alimentos sólidos.
- En bebidas ácidas como los zumos de frutas es difícil que ocurran problemas de estabilidad y decoloración ya que el porcentaje de hierro añadido permanece en estado ferroso a pH bajo.

1.2 Cinc

El cinc es un elemento traza esencial en nutrición humana. Su presencia es necesaria en la expresión génica, crecimiento y diferenciación celular, cicatrización de heridas y respuesta inmune (Hambidge, 2000). Actúa como cofactor de más de 300 enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas, y es un nutriente necesario para el desarrollo del sistema nervioso central (Cámara & Amaro, 2003). Además, induce la formación de metalotioneínas, las cuales intervienen en la eliminación de elementos minerales tóxicos, como el cadmio, y en la protección frente al estrés oxidativo celular causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Barceloux, 1999). También actúa como antioxidante debido a su papel protector de los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Powell, 2000) así como por su presencia en la enzima Cu/Zn-superóxido dismutasa que forma parte del sistema enzimático endógeno implicada en la defensa frente al estrés oxidativo (Zodl et al., 2003).

La deficiencia de cinc es un problema frecuente en países desarrollados y en vías de desarrollo. Su deficiencia, en niños, produce retraso de crecimiento, incremento de las enfermedades infecciosas y alteración de la función cognitiva (Rosado, 1998).

Las recomendaciones diarias de ingesta (DRI) de cinc varían entre 8 y 11 mg/día, según edad y sexo, pudiendo alcanzar los 13 mg/día en el caso de mujeres lactantes (Food & Nutrition Board, 2004).

Las fuentes más ricas en cinc son alimentos ricos en proteínas como carne, alimentos marinos y huevos, además de cereales y leguminosas. Existen diversos factores dietéticos que parecen influir en la absorción y

biodisponibilidad del cinc. Concretamente, su absorción se reduce cuando se ingiere en presencia de fitatos, fibra, ácido fólico, selenio, o junto a consumos elevados de hierro y calcio (Cámara & Amaro, 2003). También se ha descrito una disminución en la absorción de dicho mineral en presencia de taninos (Salgueiro et al., 2000). Por el contrario, existen otros componentes de la dieta que favorecen la absorción de cinc, tales como el ácido picolínico secretado por el páncreas, la vitamina B₆ que favorece la secreción de ácido picolínico, ácidos orgánicos como el citrato y aminoácidos como la glicina, histidina, lisina, cisteína y metionina. Determinados componentes de la leche como la lactosa, polímeros de glucosa y caseinofosfopéptidos pueden favorecer su absorción (Cámara & Amaro, 2003).

Con todo ello, la utilidad potencial derivada de la suplementación de alimentos con cinc puede servir para:

- Complementar dietas con baja biodisponibilidad de cinc (ej. dietas vegetarianas).
- Reforzar el sistema inmune.
- Ampliar el aporte de antioxidantes procedentes de la dieta.

1.3 Leche. Fuente de péptidos bioactivos.

Dentro de las proteínas de la leche, la caseína (CN) representa un 76-86% del total de proteínas y el 20% restante está formado por las proteínas del suero (Primo Yúfera, 1998). A su vez, la CN incluye a cuatro familias en

función de la diferente secuencia de aminoácidos: α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -CN (FitzGerald, 1998).

Hasta hace poco, se consideraba que la función fisiológica de la CN era la de ser fuente de aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas. No obstante, en los últimos años, se han estudiado diversos péptidos procedentes de la secuencia de aminoácidos de la CN y que presentan actividad funcional, como los caseinfosfopéptidos (CPPs).

Los CPPs son péptidos fosforilados de la CN liberados por hidrólisis enzimática de la α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -CN *in vivo* o *in vitro* a partir de digestión gastrointestinal utilizando tripsina, pancreatina o mezclas de ambas, o durante el procesado de la leche y derivados lácteos (FitzGerald, 1998). Los CPPs contienen residuos de fosfato en forma de monoésteres de serina formando un entramado llamado *cluster* que contiene tres serinas fosfato seguido de dos residuos de ácido glutámico (Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu) y que constituyen regiones de elevada polaridad donde pueden unirse elementos minerales (Miquel et al., 2006), entre ellos hierro y cinc, pudiendo aumentar su solubilidad y posterior biodisponibilidad (FitzGerald & Meisel, 2003). Muchos minerales que son solubles al pH ácido del estómago, se insolubilizan al pH del duodeno. Los CPPs pueden formar complejos solubles con elementos minerales, que se caracterizan por uniones débiles que permiten la liberación lenta de los minerales evitando su precipitación en el intestino. Por ello, una de las posibles aplicaciones de los complejos formados entre Fe-CPPs sería su utilización en los casos de anemia y, en especial, en grupos de población como los vegetarianos donde la ingesta de productos de origen animal se suprime y los lácteos cobran especial importancia (Webb, 2007).

Otra de las actividades funcionales atribuidas a los CPPs es su capacidad antioxidante debida a la presencia de residuos de fosfoserina, los cuales podrían realizar dos actividades antioxidantes: el secuestro de metales pro-oxidantes y la donación de electrones o átomos de hidrógeno para estabilizar radicales libres (Kitts, 2005). Sin embargo, los residuos de serina fosforilados podrían no ser los únicos responsables de la actividad antioxidante de los CPPs, ya que se ha descrito que la secuencia de aminoácidos participa en dicha actividad. En este sentido se ha atribuido capacidad antioxidante a la cisteína (Kim et al., 2007); al triptófano y a la tirosina, por la capacidad de sus grupos fenol e indol para donar electrones (Philanto, 2006); y a la histidina, lisina, tirosina y prolina (Díaz & Decker, 2004).

1.4 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) se encuentra mayoritariamente en los vegetales y frutos frescos; destacan por su contenido la acerola, grosella negra y fresa, siguiéndole los frutos cítricos, que tradicionalmente han sido los alimentos de referencia en cuanto al contenido de vitamina C por su elevada contribución al aporte dietético. El AA es la más lábil de las vitaminas hidrosolubles, siendo termolábil y sensible a la acción del oxígeno y a la radiación ultravioleta, por lo que las pérdidas durante los procesos culinarios o el tratamiento con calor (especialmente en condiciones de alcalinidad) son importantes. La carencia, actualmente rara, da origen al escorbuto (no frecuente en países desarrollados) el cual se caracteriza por la aparición de hemorragias especialmente en los vasos de pequeño calibre.

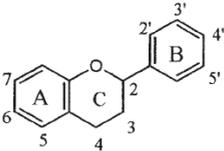
Las recomendaciones sobre las ingestas diarias de vitamina C, publicadas por el Instituto de Medicina de los EE. UU en el año 2000, son de 90 mg/día para un hombre adulto y 75 mg/día para una mujer adulta (Food and Nutrition Board, 2004). Por otra parte, las dosis máximas tolerables se sitúan en los 2000 mg/día. Se recomienda, en fumadores, que incrementen la recomendación general en 35 mg/día para prevenir el estrés oxidativo.

Las funciones del AA están basadas en sus propiedades de oxido-reducción. El AA actúa como cofactor enzimático en reacciones de hidroxilación de la lisina/prolina, en la biosíntesis de la carnitina, en la síntesis de hormonas de las glándulas suprarrenales y en el metabolismo de la tirosina. Además, por sus propiedades antioxidantes protege las LDL frente a la oxidación y regenera la vitamina E, y juega un papel importante en prevención de cataratas, algunos tipos de cáncer y otras enfermedades neurodegenerativas (Halliwell et al., 1995). Asimismo, mantiene el hierro no hemo en estado ferroso lo que permite su absorción intestinal (Salovaara et al., 2002).

1.5 Polifenoles

Los polifenoles se pueden clasificar en dos categorías principales atendiendo a su estructura básica (Waterhouse, 2002) (cuadro nº 1).

Cuadro n° 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.

FLAVONOIDES	Antocianos Flavonoles Flavan-3-oles Proantocianidinas (taninos no hidrolizables) Flavonas Flavanonas Isoflavonas
	Ácidos hidroxicinámicos Ácidos hidroxibenzóicos Taninos hidrolizables Estilbenos
NO FLAVONOIDES	

Los polifenoles se hallan ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal como frutas, verduras y derivados. En el caso de los zumos de frutas (uva-naranja-melocotón) objeto de estudio en la presente tesis, se encuentra una mezcla compleja de distintos grupos de polifenoles. Uva blanca (ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles y flavonoles) (Fernández de Simón et al., 1993; Mullen et al., 2007), naranja (ácidos hidroxicinámicos, flavanonas y flavonas) (Gil-Izquierdo et al., 2001) y melocotón (ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles y quercetina-3-rutinósido) (Dragovic-Uzelac et al., 2007).

En la actualidad no existen ingestas diarias recomendadas de polifenoles, aunque las recomendaciones podrían estar basadas en la cantidad de polifenoles ingeridas dentro del programa “5 al día” (Williamson & Holst, 2008). Por ello, utilizando datos de la USDA (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/>) de ingestas de polifenoles esperadas en individuos que consumen 5 piezas de frutas o verduras al día se podrían alcanzar valores de ingesta >500 mg/día, incrementándose dicho

valor entre 500-1000 mg/día si se considera la ingesta de otros alimentos ricos en polifenoles como café, té o cacao (Williamson & Holst, 2008).

Muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a los compuestos fenólicos, los cuales son los compuestos antioxidantes más abundantes en nuestra dieta (Manach et al., 2004). Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales:

- Por su facilidad para ceder un radical hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, dada la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie et al., 2003).
- Por su facilidad para quelar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton (Kokhar & Apenten, 2003).

Más allá de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuye otra serie de actividades biológicas beneficiosas para la salud incluyendo, entre otras, acciones cardioprotectoras, anticancerígenas y neuroprotectoras (Stevenson & Hurst, 2007), ya que pueden interactuar con funciones celulares a diferentes niveles tales como inducción de enzimas o cascadas de señalización intracelular por interacción con receptores de membrana y/o nucleares. Además, toda esta serie de acciones las podrían realizar a concentraciones mucho más pequeñas que las requeridas para desempeñar su actividad antioxidante (Virgili & Marino, 2008).

A continuación se enumeran posibles mecanismos mediante los cuales los compuestos bioactivos fitoquímicos de nuestra dieta (principalmente polifenoles) pueden prevenir el cáncer actuando de manera aditiva y/o sinérgica (Liu, 2004):

- Actividad antioxidante (eliminación de radicales libres y reducción del estrés oxidativo)
- Inhibición de proliferación y diferenciación celular
- Inducción de arresto en el ciclo celular
- Inducción de apoptosis
- Inducción enzimática (glutación peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa) y aumento de la detoxificación (enzimas de fase II)

2. BIODISPONIBILIDAD

2.1 Concepto

El significado del término biodisponibilidad (BD) varía en función del área de trabajo. Desde un punto de vista nutricional, indica la eficacia con la que los nutrientes son utilizados. En farmacología la BD hace referencia a la fracción de una dosis de fármaco que llega al torrente circulatorio después de una administración oral (Schümann et al., 1994). Así pues, la BD depende de los procesos de digestión de los alimentos, absorción de los nutrientes y disponibilidad de los mismos para las funciones metabólicas. A continuación, se recogen distintas definiciones de biodisponibilidad de nutrientes propuestas por varios autores que podrían ser también de aplicación a los polifenoles.

- La medida de la capacidad del hombre y de los animales, o la efectividad, por la cual los nutrientes, en una forma química determinada, son liberados de los alimentos en presencia de ciertos componentes dietéticos. Incluye además la absorción intestinal y el transporte de nutrientes a los órganos y células, donde finalmente cumplen su función biológica (Schelmmmer et al., 1995).
- Cantidad de nutriente disponible para absorberse en una forma fisiológicamente útil (Van Campen & Glahn, 1999).
- La fracción de elemento que es solubilizado y finalmente absorbido a partir del tracto gastrointestinal y que llega a la circulación sistémica (Caussy, 2003).

De las definiciones expuestas puede deducirse que el proceso de biodisponibilidad es el resultado de tres etapas (Watzke, 1998):

1. Disponibilidad química o física del elemento en el tracto gastrointestinal, es decir, fracción del elemento ingerido disponible para la posterior absorción, también denominada fracción bioaccesible (Ruby et al., 1999).
2. Absorción en la mucosa intestinal y estómago, que puede implicar un proceso de difusión pasiva o transporte paracelular no saturable y/o un proceso de captación o transporte transcelular por las células de la mucosa intestinal.
3. Transformación del elemento en su forma biológicamente activa o inactiva.

Son numerosos los factores que pueden influir en la BD de los elementos minerales: 1) fisiológicos o intrínsecos al organismo, y 2) dietéticos o extrínsecos. Sus efectos pueden ser acumulativos, de ahí la complejidad de las interacciones (Fairweather-Tait, 1996).

Entre los factores intrínsecos cabe mencionar: variabilidad interindividual, edad o etapa de desarrollo, posibles anomalías genéticas, estado fisiológico (embarazo, lactancia) y nutricional, eventuales estados patológicos, flora intestinal, y de una forma especial, la capacidad individual de adaptación a aportes variados de nutrientes, susceptibles de influir en su disponibilidad para su posterior absorción y metabolismo. Los factores de tipo extrínseco incluyen el aporte total por la dieta, forma química en que se

encuentre, solubilidad, y su interacción con otros componentes del alimento o dieta (Barberá & Farré, 1992).

En el caso de los polifenoles su BD está determinada principalmente por: su estructura química, tamaño molecular, grado de polimerización, hidrofobicidad, solubilidad, pKa, glicosilación/acilación, matriz en que se encuentren, otros componentes de la dieta, así como de factores biológicos como el tránsito gástrico e intestinal, el pH del lumen, la permeabilidad de membrana, y la excreción biliar (Bravo, 1998; Scalbert et al., 2002; Stahl et al., 2002).

La gran variabilidad de este grupo de sustancias, así como su presencia en alimentos de origen vegetal como mezclas complejas de compuestos fenólicos dificultan el estudio de su BD (Bravo, 1998).

2.2 Evaluación de la biodisponibilidad

Los métodos utilizados en los estudios de BD pueden clasificarse en dos grandes grupos: *in vivo* e *in vitro* (Barberá & Farré, 1992; Van Campen & Glahn, 1999).

Métodos in vivo

Los métodos *in vivo* evalúan la BD de un nutriente mediante la administración del mismo a un organismo vivo. En el organismo humano existen factores fisiológicos difícilmente reproducibles en el laboratorio, lo cual sitúa a los métodos *in vivo* como aquellos que proporcionan la mejor estimación de la BD de micronutrientes a partir de alimentos (Van Campen

& Glahn, 1999). Entre estos métodos cabe destacar el balance químico, el empleo de isótopos, tanto radioactivos como estables, así como los ensayos con animales, aunque en estos últimos el principal inconveniente radica en la imposibilidad de que la extrapolación al hombre de los resultados obtenidos sea completa, debido a las diferencias entre los metabolismos animal y humano (Wienk et al., 1999).

En el caso de los polifenoles la evaluación *in vivo* de su BD se lleva a cabo de forma indirecta, mediante el incremento de la capacidad antioxidante en plasma tras el consumo de alimentos ricos en polifenoles (D'archivio et al., 2007; Fernández-Pachón et al., 2008) o de forma directa midiendo la concentración de polifenoles en plasma u orina tras la ingesta tanto de compuestos puros como de alimentos con una cantidad conocida de los compuestos de interés (D'archivio et al., 2007). No obstante, se debe tener en cuenta que la mayoría de polifenoles presentes en los alimentos se encuentran en forma de ésteres, glúcósidos o polímeros que no son absorbidos en su forma nativa. Antes de su absorción, estos compuestos deben ser hidrolizados por las enzimas intestinales o la microflora colónica. Además, durante el transcurso de su absorción los polifenoles sufren modificaciones debido a las reacciones de conjugación (metilación, sulfatación y/o glucuronidación) que tienen lugar en las células intestinales e hígado. Como consecuencia, las formas que alcanzan la sangre y los tejidos son diferentes de las originales presentes en los alimentos y resulta difícil la identificación de todos los metabolitos formados (Day & Williamson, 2001).

Métodos in vitro

Como alternativa a los estudios *in vivo*, se han desarrollado sistemas *in vitro* que simulan las condiciones fisiológicas y pueden resultar predictivos de la situación *in vivo*. Características como su rapidez, relativo bajo coste, sencillez y mejor control de las variables experimentales, han propiciado su creciente utilización para evaluar la BD de distintos componentes de los alimentos (Ekmekcioglu, 2002).

Mediante estudios *in vitro* se pueden simular las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, tiempo de incubación) del tracto gastrointestinal, y evaluar las posibles transformaciones de los compuestos inicialmente presentes en el alimento, así como las interacciones entre los distintos componentes del alimento que puedan acontecer durante su tránsito intestinal. Sin embargo, estos métodos proporcionan estimaciones relativas y no absolutas de la BD, puesto que no tienen en cuenta determinados factores fisiológicos intrínsecos del organismo (estado nutricional, secreción gastrointestinal, flora intestinal, transporte activo, interacciones con la mucosa, cinética del tránsito intestinal, etc.) (Van Campen & Glahn, 1999; Wienk et al., 1999).

Solubilidad y diálisis

Se basan, generalmente, en la simulación del proceso de digestión gastrointestinal humano. Consiste en un tratamiento secuencial enzimático

en dos etapas, gástrica con pepsina a pH 1.8-2.5, e intestinal con pancreatina y sales biliares a pH 5-6.5, y posterior estimación de la fracción del componente estudiado soluble (fracción bioaccesible) o dializable a través de una membrana de determinado tamaño de poro.

Métodos basados en la solubilidad: Tras la digestión gastrointestinal se mide la cantidad de componente soluble en el sobrenadante obtenido por centrifugación (Crews et al., 1983) o filtración (Narasinga & Prabhavathi, 1978). Estiman la fracción máxima de componente ingerido disponible para ser absorbido (Versantvoort et al., 2005).

Métodos basados en la dializabilidad: Incorporan una membrana de diálisis durante el proceso de digestión intestinal, para simular una difusión pasiva a través del epitelio intestinal. El proceso de diálisis puede llevarse a cabo en equilibrio (Miller et al., 1981) o en continuo (Minihane et al., 1993). Estos métodos sólo proporcionan información relativa a la fracción del componente soluble que se halla potencialmente disponible para la absorción que tiene un tamaño inferior al de poro de la membrana de diálisis utilizada.

Los métodos de estudio de bioaccesibilidad *in vitro* (solubilidad y diálisis) únicamente miden la primera etapa en el proceso de BD, es decir, la solubilidad del compuesto objeto de estudio, requisito previo y necesario para su posterior absorción. A pesar de esta limitación, los estudios de bioaccesibilidad proporcionan datos útiles que permiten establecer comparaciones entre los distintos alimentos y determinar el efecto causado

por diferentes factores sobre la BD mineral (Azenha & Vasconcelos, 2000) y la BD de polifenoles (Argyri et al., 2006).

Los estudios aplicando un método de bioaccesibilidad mineral en zumos de frutas son escasos. Al respecto, cabe mencionar estudios de diálisis de hierro en harina blanca de trigo con zumos de frutas (naranja, manzana y pomelo) (Hazell & Johnson, 1987), diálisis de hierro en zumos de fruta cítricos (piña y fruta de la pasión) suplementados con distintas sales de hierro (Haro-Vicente et al., 2006) y diálisis y solubilidad de cinc (Perales et al., 2006) y hierro (Perales et al., 2007) en mezclas de zumos de frutas (piña y plátano, melocotón y manzana, y uva, naranja y plátano) con leche y cereales.

Los estudios de bioaccesibilidad de polifenoles en zumos de fruta son limitados: zumo de naranja (Gil-Izquierdo et al., 2002) y zumo de granada (Pérez-Vicente et al., 2002), en los que se aplica el método de diálisis, y zumo de *Aronia melanocarpa* (Bermúdez-Soto et al., 2007) en el que se utiliza el método de solubilidad.

2.3 Cultivos celulares

La solubilidad es un prerequisite para la absorción de un componente de un alimento, pero no toda la fracción soluble del mismo es absorbida. En un intento de aproximarse a las condiciones *in vivo*, desde hace varios años se ha introducido, en los sistemas *in vitro*, los cultivos celulares. La utilización de métodos que simulan el proceso de digestión humano en combinación con cultivos celulares, permite evaluar los procesos de captación y transporte en el epitelio intestinal a partir de la fracción

bioaccesible obtenida del alimento (Ekmekcioglu, 2002). La línea celular más utilizada, son las células Caco-2, modelo validado de epitelio intestinal.

La línea celular Caco-2 fue establecida en 1977 por Fogh y colaboradores a partir de un adenocarcinoma de colon humano, moderadamente bien diferenciado, obtenido de un paciente de 72 años de raza caucasiana. Estas células crecen en cultivo adheridas a un sustrato formando monocapa. Cuando alcanzan la confluencia se diferencian espontáneamente para dar lugar a una monocapa polarizada que presenta muchas de las características funcionales y morfológicas de los enterocitos humanos maduros: organización de las células dentro de una monocapa polarizada, formación de domas, uniones intercelulares estrechas, microvellosidades en el lado apical y enzimas de secreción propias de la membrana del borde en cepillo como fosfatasa alcalina, sacarasa-isomaltasa, lactasa, etc (Pinto et al., 1983).

Células Caco-2 y biodisponibilidad de hierro

La línea celular Caco-2 muestra una mayor captación de hierro ferroso que de hierro férrico y las células cultivadas con elevadas concentraciones de hierro exhiben un incremento de ferritina intracelular que disminuye la captación de hierro (Álvarez-Hernández et al., 1991; Gangloff et al., 1996). Estos autores demuestran una correlación inversa entre el estatus de hierro en la monocapa celular y la captación por las células. Basándose en estos estudios y tras someter las células a unas condiciones de cultivo deficitarias en hierro (condiciones óptimas para la

captación), Glahn et al. (1998) evalúan la formación de ferritina como indicador de la captación de hierro, a partir del hierro disponible procedente de los alimentos. Para ello, utilizan un modelo en el que combinan técnicas de digestión *in vitro* con técnicas de captación de hierro con células Caco-2. Para validar el método miden la formación de ferritina en células expuestas a digeridos que contienen hierro de alta y baja disponibilidad, con el objeto de determinar si dicha formación puede ser proporcional a la captación de hierro y si es suficientemente sensible para ser un indicador de la disponibilidad de hierro de alimentos digeridos. Demuestran que la formación de ferritina en las células Caco-2 es consecuencia de la captación del hierro y proporcional a la misma y que, por lo tanto, puede ser utilizada para evaluar el hierro captado por la célula.

No se conoce estudios que evalúen la determinación de la biodisponibilidad de hierro a través de la síntesis de ferritina en células Caco-2 a partir de bebidas a base de zumo de frutas con o sin suplementación de minerales y/o leche sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal. Únicamente, un trabajo en el que, tras someter a una digestión *in vitro* diferentes zumos (manzana, pera, uva blanca, uva roja, ciruela, pomelo y naranja) a los cuales se adiciona FeCl_3 (3.42 mg Fe/100 g; cantidad de hierro del mismo orden a las bebidas a base de zumo utilizadas en este trabajo), se determina la formación de ferritina intracelular en células Caco-2 (Boato et al., 2002). Asimismo, existen estudios a partir de leche (Etcheverry et al., 2003 y 2004; Argyri et al., 2007) y fórmulas para lactantes (Etcheverry et al., 2004; Viadel et al., 2007), a las cuales se les ha adicionado hierro, sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Células Caco-2 y polifenoles

Existen en la literatura diferentes estudios de captación, metabolismo y/o transporte en células Caco-2 con los distintos grupos de polifenoles presentes en las bebidas a base de zumo de frutas objeto de estudio de la presente tesis. Así pues, estudios con hesperetina y/o hesperidina (Kobayashi et al., 2008; Brand et al., 2008), y naringina (Tourniaire et al., 2005) (representativos de flavanonas); apigenina (Hu et al., 2003) (representativa de flavonas); ácidos ferúlico, caféico, sinápico y *p*-cumárico (representativos de ácidos hidroxicinámicos) (Kern et al., 2003) y procianidinas (Deprez et al., 2001) (representativas de flavan-3-oles) han sido llevados a cabo con células Caco-2 como modelo *in vitro* del epitelio intestinal humano. Sin embargo, estos estudios han sido realizados con disoluciones modelo y sin tener en cuenta el proceso de digestión. A este respecto, no conocemos estudios donde se haya evaluado el proceso de digestión, absorción y metabolismo en células Caco-2 a partir de bebidas a base de zumo de frutas con o sin suplementación de minerales y/o leche. Sólo se encuentran referenciados en la literatura dos trabajos en células Caco-2 que determinan la absorción de quercetina y quercetina-3-glucósido a partir de cebolla y extracto de piel de manzana (Boyer et al., 2004 y 2005), así como absorción de ácido clorogénico en café con leche (Dupas et al., 2006), ambos tras digestión gastrointestinal *in vitro*.

3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE BEBIDAS A BASE DE ZUMO DE FRUTAS RICAS EN ANTIOXIDANTES

3.1 Estrés oxidativo y sistemas de defensa antioxidante

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres (RL) durante el metabolismo celular aeróbico es un proceso normal y necesario que generalmente se encuentra compensado por los sistemas de defensa antioxidante endógenos, los cuales ayudan a mantener el equilibrio redox (Valko et al., 2007). No obstante, ciertas condiciones ambientales, estilo de vida o situaciones patológicas pueden derivar en un exceso de radicales libres que conduzca a una situación de estrés oxidativo. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes, debido por un lado a la sobreproducción de ROS, o por otra parte al déficit de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades (carcinogénesis, enfermedad cardiovascular, hipertensión, diabetes, enfermedades neurodegenerativas – Alzheimer y Parkinson- y artritis reumatoide) y al proceso normal de envejecimiento (Valko et al., 2007).

En este punto, la dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal, los cuales presentan efectos sinérgicos o aditivos (Liu, 2004) que pueden mejorar la defensa antioxidante directamente, o indirectamente activando y

potenciando los sistemas de detoxificación y antioxidantes endógenos (Masella et al., 2005).

Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) es un término genérico que incluye tanto radicales libres como a otras especies no radicales (incluso especies reactivas de nitrógeno, cloro o bromo) que son agentes oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O₃, ONNO⁻, ¹O₂, o H₂O₂ (Halliwell, 2006).

Algunas de las ROS de mayor significado biológico son: anión superóxido (O⁻²), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH[·]), óxido nítrico (NO[·]), peroxinitrito (ONOO⁻), radicales peroxilo (ROO[·]), oxígeno singlete (¹O₂).

Las ROS pueden tener origen endógeno (mitocondria, peroxisomas, lipooxigenasas, NADPH oxidasa y citocromo P450) y exógeno (radiaciones ultravioleta, radiaciones ionizantes, medicamentos, citoquinas inflamatorias y toxinas) (Finkel & Holbrook, 2000).

Actualmente es bien conocido que las ROS pueden desempeñar una doble función en el organismo. A elevadas concentraciones, pueden provocar efectos perjudiciales derivados del estrés oxidativo, hecho que puede originar daños en biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN. Por otra parte, se han descrito efectos beneficiosos de las ROS cuando se hallan a bajas concentraciones, debido a que estos compuestos intervienen en diversas rutas de señalización celular, en la defensa frente a agentes infecciosos y en la inducción de la respuesta mitogénica (Seifreid et al., 2007).

Sistemas de defensa antioxidante

Un antioxidante se define como aquella sustancia que, presente a baja concentración comparada con aquella de un sustrato oxidable, disminuye o inhibe significativamente la oxidación del sustrato (Halliwell, 1995).

Los sistemas de defensa antioxidante que operan en el organismo pueden tener un origen endógeno (integrado por sistemas enzimáticos y no enzimáticos) o provenir de fuentes externas (antioxidantes de la dieta). Éstos se resumen en el cuadro nº 2.

Cuadro nº 2. Sistemas de defensa antioxidante del organismo* .

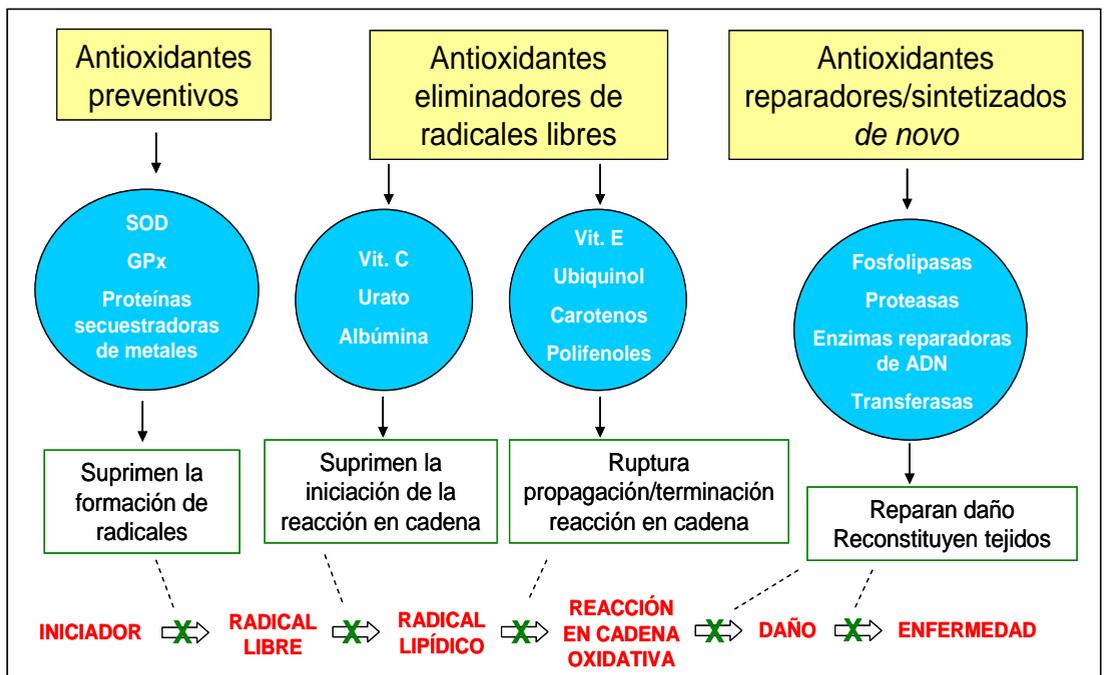
Endógenos	Enzimáticos	Superóxido dismutasa (SOD)
		Catalasa (CAT)
		Glutación peroxidasa (GPx)
		Glutación reductasa (GSH-Rd)
		Glutación-s-transferasa (GST)
	No enzimáticos	Sistemas de reparación del ADN
		Proteasas
		Fosfolipasas
		Ácido úrico
		Albúmina
Exógenos	Nutrientes	Bilirrubina
		Glutación reducido (GSH)
		Ubiquinol (coenzima Q)
	No nutrientes	Vitamina C
		Vitamina E
		Carotenos
		Minerales relacionados con enzimas antioxidantes (Se, Zn, Cu, Mn)
	Polifenoles	

* Basado en Halliwell & Gutteridge (1999) y Wilcox et al., (2004).

Mecanismos de acción de los antioxidantes

La defensa del organismo frente al daño oxidativo tiene lugar por distintas vías según se desarrolla la reacción en cadena de oxidación. Como primera línea de defensa antioxidante se encuentran los antioxidantes preventivos. A continuación, intervienen los antioxidantes eliminadores de radicales libres, y finalmente actúan los enzimas sintetizados *de novo* o de reparación (Wilcox et al., 2004) (ver explicación en figura nº 1).

Figura nº 1. Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción (Wilcox et al., 2004).



3.2 Métodos de medida de la capacidad antioxidante total (CAT)

En general, los métodos para determinar la CAT se basan en la inhibición de ciertas reacciones por la presencia de antioxidantes, siendo los más usados aquéllos que generan radicales libres en medios específicos y son fácilmente detectados por técnicas fotométricas. Cabe destacar, que en las medidas de CAT se miden los efectos de cooperación que existen entre los distintos antioxidantes (sinergismo), lo cual aporta una información más relevante que la cuantificación de compuestos antioxidantes aislados (Ghiselli et al., 2000).

Frankel & Meyer (2000) indican que la medida de la capacidad antioxidante depende de la heterogeneidad y la naturaleza heterofásica del sistema, del tipo de sustrato, de su estado de saturación y estado fisicoquímico, del tipo de iniciadores, de la presencia de metales de transición y otros componentes y de su interacción con el sistema. Para obtener una información más amplia y completa es más apropiado utilizar distintos métodos con diferentes condiciones de oxidación. Además, debido a la heterogeneidad de condiciones analíticas utilizadas incluso para un mismo método (longitud de onda, generador del radical y tiempo de análisis), los valores de capacidad antioxidante sólo deberían ser comparados cuando se aplica el mismo método y el mismo disolvente (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006). Asimismo, se ha descrito que ciertos componentes de los alimentos como glúcidos, aminoácidos y proteínas, pueden ejercer interferencias en distintos métodos de medida de

CAT (p. ej. ORAC y TEAC), sobreestimando los valores obtenidos (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

Los ensayos de CAT se dividen en dos grandes grupos atendiendo al mecanismo de las reacciones implicadas (Huang et al., 2005):

- Ensayos basados en transferencia de radical de hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer-HAT): presentan una reacción competitiva entre antioxidante y sustrato, los cuales compiten por los radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de azo compuestos.
- Ensayos basados en transferencia de electrón (Electron Transfer-ET): miden la capacidad de reducción de un oxidante (que cambia de color) por parte de un antioxidante. El grado de cambio de color se correlaciona con la concentración de antioxidante en la muestra determinada.

Algunos de los métodos más comúnmente utilizados para la medida de la CAT son: **TEAC** (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity), **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity), **Folin-Ciocalteu** (Polifenoles solubles totales), **TRAP** (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter), **DPPH** (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) y **FRAP** (Ferric Reduction Antioxidant Power) (Prior et al., 2005).

En el cuadro nº 3, se resumen las características más destacadas de los métodos de medida de capacidad antioxidante más frecuentemente usados.

Cuadro nº 3. Características normalizadas de los métodos de medida de la capacidad antioxidante (Prior et al., 2005; Fernández-Pachón et al., 2008).

<i>Método</i>	<i>Radical</i>	<i>Parámetro de medida y técnica</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Expresión de resultados</i>	<i>Muestras^a</i>
TEAC	ABTS ⁺	- Descenso de ABTS ⁺ - Espectrofotometría	ET/HAT	Equivalentes Trolox	1, 2 y 3
ORAC	AAPH	- Inhibición descenso fluorescencia PE/FL - Fluorimetría	HAT	Equivalentes Trolox	1, 2 y 3
Polifenoles solubles totales (Folin-Ciocalteu)	--	- Reducción reactivo fosfomolibdotúngstico - Espectrofotometría	ET	Equivalentes Ácido gálico ^b	2 y 3
TRAP	AAPH	- Consumo de oxígeno - Electrodo de oxígeno	HAT	Equivalentes Trolox	2 y 3
DPPH	DPPH [•]	- Descenso de DPPH [•] - Espectrofotometría	ET/HAT	EC ₅₀ (cantidad de muestra que reduce DPPH [•] al 50%)	1 y 2
FRAP	--	- Reducción TPTZ-Fe ³⁺ a TPTZ- Fe ²⁺ - Espectrofotometría	ET	μmol Fe ²⁺ /L	2 y 3

^a 1 = fenoles, 2 = alimentos, 3 = muestras biológicas

^b Patrón de referencia recomendado (Prior et al., 2005)

A partir de los datos presentados en el 1^{er} Congreso Internacional en Métodos Antioxidantes de 2004, literatura científica y los usos finales potenciales de los antioxidantes, se ha propuesto que los procedimientos y aplicaciones de tres métodos de medida de la capacidad antioxidante total

(TEAC, ORAC y Folin-Ciocalteu) se consideren para estandarización (Prior et al., 2005).

Método TEAC. Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

Fue puesto a punto por Miller et al. (1993) y Rice-Evans & Miller (1994) y posteriormente modificado por Re et al. (1999). Se basa en la reducción por medio de antioxidantes del radical catiónico ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)) obteniéndose una disminución en los valores de absorbancia.

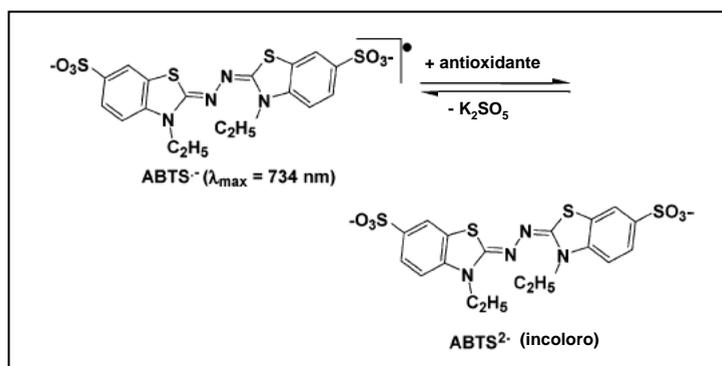
El ABTS^{•+} es soluble en solventes acuosos y orgánicos, lo cual lo hace un método apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológicos (Prior et al., 2005; Huang et al., 2005).

En el ensayo TEAC mejorado (Re et al., 1999) el radical ABTS^{•+} (de color verde azulado) se genera con persulfato potásico, mientras que en la versión original del ensayo, el radical se generaba con ferrilmioglobina, obtenida por la activación de metamioglobina con H₂O₂ (Prior et al., 2005; Huang et al., 2005).

El radical ABTS^{•+} es un compuesto estable en la oscuridad, muy soluble en agua y posee un espectro de absorción característico a varias longitudes de onda (645, 734 y 815 nm), empleándose comúnmente la de 734 nm porque en ella se minimizan las interferencias debidas a otros componentes y a la turbidez de la muestra. Al poner en contacto la muestra con la disolución del radical, el antioxidante le cede un electrón o radical de hidrógeno al radical, observándose un descenso de la absorbancia (ver figura nº 2). Se cuantifica en relación al Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcroman-2 carboxílico), análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E, que es el antioxidante patrón de uso más generalizado.

Figura nº 2. Mecanismo de reacción del método TEAC (Huang et al., 2005).



El método TEAC ha sido ampliamente utilizado en la determinación de la CAT de diversos alimentos, incluidos los zumos de frutas: zumo de manzana (Miller & Rice-Evans, 1997), zumo de naranja (Miller & Rice-Evans, 1997; Arena et al., 2001), zumos de naranja, albaricoque, pera, melocotón y zumos de frutas tropical (Pellegrini et al., 2003). Recientemente ha sido aplicado el método TEAC en el análisis de diversas bebidas a base de zumo de frutas enriquecidas con leche (Zulueta et al., 2007). No se conocen estudios en los que se determine el efecto de diferentes factores dietéticos (hierro y/o cinc y/o leche) sobre la CAT de alimentos (bebidas a base de zumo de frutas) utilizando este método.

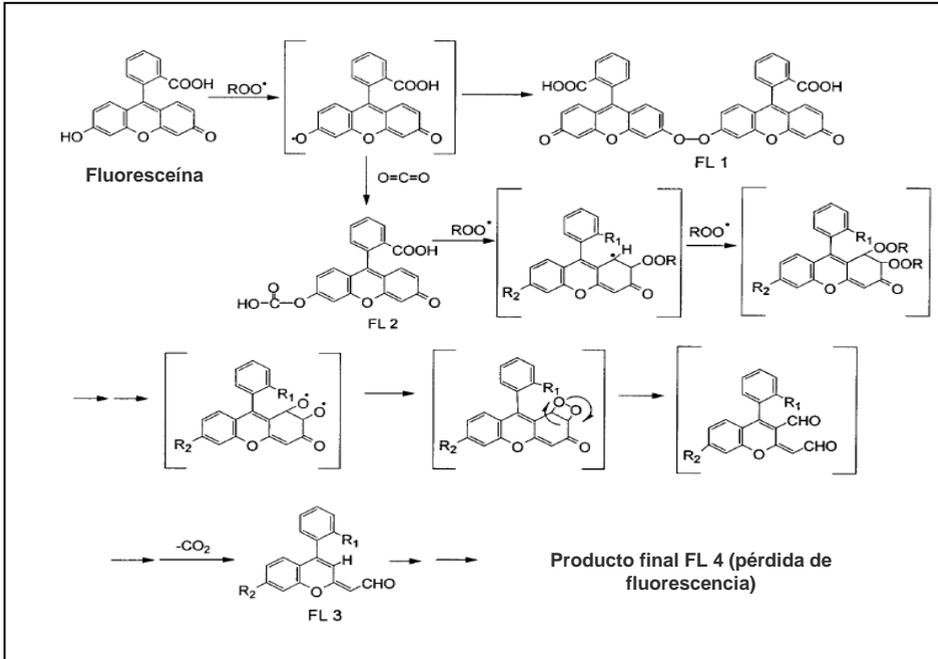
Método ORAC. Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno

El ensayo ORAC fue puesto a punto por Cao & Prior (1999)

basándose en el trabajo de Glazer (1990), utilizando la ficobiliproteína o β -ficoeritrina como diana del daño oxidativo. El método se basa en la medida del descenso de la fluorescencia de esta proteína como consecuencia de la pérdida de su conformación, al sufrir daño oxidativo provocado por radicales libres. En presencia de antioxidantes se preserva la conformación de la proteína por eliminación de los radicales libres mediante la transferencia de un radical de hidrógeno.

Posteriormente, Ou et al. (2001) introdujeron la fluoresceína (FL) (3',6'-dihidroxi-*spiro*[isobenzofuran-1(3H),9'(9H)-xanten]-3-ona) como marcador fluorescente estable. El fundamento del método es idéntico al del ensayo ORAC tradicional, pero contiene mejoras porque la FL es un compuesto fotoestable, termoestable, presenta homogeneidad entre los distintos lotes, no interacciona con los compuestos antioxidantes de la muestra y reduce el coste de los ensayos. Sin embargo, cabe señalar que la intensidad de fluorescencia de la FL es muy sensible al pH, ya que cuando el pH es menor de 7 la intensidad disminuye fuertemente. Además, debido a la alta sensibilidad de la FL, las muestras deben ser diluidas considerablemente antes de su análisis. No obstante debe indicarse que las ficobiliproteínas, son biomoléculas que siempre tendrán mayor significado biológico que una sustancia fluorescente sintetizada artificialmente, como la FL (Ou et al., 2001). En la figura nº 3 se muestra la degradación de la FL debido a la exposición a radicales peróxido.

Figura nº 3. Degradación de la fluoresceína por radicales peroxilo (Ou et al., 2001).



El radical libre que interviene en el ensayo es importante y no se deben hacer comparaciones directas entre procedimientos que usen diferentes radicales. Entre otros, se puede usar radicales peroxilo (ROO[•]), que son las ROS más importantes a nivel biológico por su abundancia e implicación en el daño oxidativo. Así pues, como especie generadora de radicales peroxilo se utiliza AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), que genera estos radicales tras sufrir descomposición térmica (Fernández-Pachón et al., 2008).

El ORAC es un método cinético que mide la reacción entre la

especie reactiva (radicales peroxilo) y el sustrato oxidable (FL). La cuantificación se lleva a cabo mediante la técnica del área bajo la curva (Area Under the Curve-AUC) de descenso de fluorescencia de la FL, que integra los porcentajes de inhibición del radical libre con el tiempo completo de reacción. Como patrón y para la expresión de resultados se utiliza el antioxidante estándar Trolox (Ou et al., 2001).

El método ORAC ha sido utilizado en la determinación de la CAT de diversos zumos de frutas tales como: uva, pomelo, tomate, naranja, manzana, limón y lima (Wang et al., 1996; Wu et al., 2004), y en bebidas a base de zumo de frutas con leche únicamente en zumos de grosella negra (Skrede et al., 2004) y zumo de naranja (Zulueta et al., 2009). Como se ha indicado anteriormente para el método TEAC, no se conocen estudios en los que se determine el efecto de diferentes factores dietéticos (hierro y/o cinc) sobre la CAT de alimentos (bebidas a base de zumo de frutas) utilizando este método.

Método Folin-Ciocalteu. Determinación de los polifenoles solubles totales

El método Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927) fue modificado por Singleton & Rossi en 1965, utilizando un heteropolianión fosfórico de molibdeno y tungsteno que oxida los fenoles con mayor especificidad, proporcionando un color azul con un máximo de absorción a 765 nm que es proporcional a la concentración total de polifenoles, y que se cuantifica por espectrofotometría utilizando una recta de calibrado de ácido gálico.

Este ensayo se utiliza como una medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos naturales y alimentos; como se trata de una reacción redox, puede considerarse como otro método de medida de la CAT (Prior et al., 2005; Huang et al., 2005). En este sentido, Magalhaes et al. (2008) indican que el mecanismo se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino, por parte de los compuestos fenólicos así como otras especies reductoras presentes en la muestra, al molibdeno del reactivo Folin-Ciocalteu.

Es un método simple y reproducible siempre y cuando se sigan los pasos y condiciones indicados (Prior et al., 2005): (1) volúmenes adecuados de álcali y reactivo Folin-Ciocalteu, (2) tiempos y temperaturas de reacción óptimos, (3) medida de absorbancia a 765 nm y (4) uso de ácido gálico como patrón de polifenoles.

El método puede sufrir interferencias por parte de sustancias de naturaleza no fenólica como azúcares, proteínas, ciertos aminoácidos, ácidos orgánicos (ácido ascórbico) y algunas sales inorgánicas; interferencias que deben ser eliminadas (Prior et al., 2005).

El método Folin-Ciocalteu ha sido ampliamente utilizado en la determinación de polifenoles solubles totales en zumos de frutas. Sin embargo, su utilización tras una digestión gastrointestinal simulada es escasa y sólo se conocen dos estudios, uno con zumo de naranja (Gil-Izquierdo et al., 2002) y otro con zumo de granada (Pérez-Vicente et al., 2002). El efecto de la adición de hierro y caseína sobre los polifenoles totales en té verde y vino tinto, respectivamente, utilizando el método de Folin-Ciocalteu ha sido estudiado por Alexandropoulou et al. (2006) y Argyri et al. (2006). No se conoce ningún estudio similar que determine el

efecto derivado de la adición de cinc sobre los polifenoles solubles totales en alimentos.

Ventajas e inconvenientes de los métodos de medida de capacidad antioxidante total

Como se ha indicado anteriormente, en la actualidad no existe un método normalizado para la medida de la CAT en alimentos. Por lo tanto, se recomienda que dicha evaluación se realice utilizando distintos métodos de medida y diferentes condiciones de oxidación (Frankel & Meyer, 2000). Ventajas e inconvenientes de los métodos considerados para estandarización (Prior et al., 2005) utilizados en la evaluación de la CAT se resumen en el cuadro n° 4 (Karadag et al., 2009).

Cuadro n° 4. Ventajas y desventajas de los métodos de medida de capacidad antioxidante total utilizados en la presente tesis.

	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
TEAC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Económico y fácil de usar. 2. pH estable (permite estudiar el efecto del pH sobre la CAT). 3. Tiempo de reacción rápido. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Etapa extra necesaria para generar el radical libre a partir del ABTS 2. El radical libre generado no es estable 3. No estandarizado. Dificultad al comparar valores entre laboratorios
ORAC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Usa radicales libres de relevancia biológica 2. Estandarizado. Permite comparar valores entre laboratorios 3. Los resultados integran el grado y el tiempo de reacción del antioxidante 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Equipo de medida caro 2. Variabilidad de datos según el equipo de medida utilizado 3. pH sensible 4. Tiempos largos para cuantificar resultados
Polifenoles solubles	<ol style="list-style-type: none"> 1. Económico y fácil de usar 2. Excelente correlación con 	<ol style="list-style-type: none"> 1. No estandarizado. Dificultad al comparar valores entre laboratorios

totales	métodos de medida de CAT	2. Interferencias (sustancias reductoras no fenólicas)
		3. No aplicable para antioxidantes lipófilos

3.3 Ensayos *in vitro* utilizando cultivos celulares

Dado que los estudios en humanos para la caracterización inicial de los efectos biológicos de alimentos ricos en antioxidantes (p. ej. bebidas a base de zumo de frutas) son difíciles de llevar a cabo y costosos, los estudios *in vitro* han cobrado protagonismo debido a su mayor sencillez, rapidez, reproducibilidad y menor coste, ya que suponen una herramienta útil para evaluar procesos bioquímicos, mecanismos de acción y actividad protectora derivada de compuestos bioactivos puros de los alimentos así como el alimento completo (Glei et al., 2003).

Desde un punto de vista fisiológico, tras su ingesta, los alimentos ricos en antioxidantes sufren un proceso de digestión gastrointestinal. Las células epiteliales del intestino y colon pueden estar expuestas a los componentes bioactivos presentes en los digeridos de alimentos ricos en antioxidantes. Por lo tanto, el uso de células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2 y HT-29) como modelo intestinal puede ser útil y asemejarse a la situación *in vivo*, teniendo siempre presente que la extrapolación de los efectos observados *in vitro* a la situación *in vivo* debe hacerse con precaución.

En este sentido, dos son las estrategias comúnmente usadas para determinar los efectos bioactivos de antioxidantes o alimentos ricos en antioxidantes utilizando modelos de células en cultivo (Kampa et al., 2007):

- 1) Modificación del estatus redox: evaluación de la protección ejercida frente al daño oxidativo producido por diversos agentes oxidantes.
- 2) Interferencia con funciones celulares básicas: valoración de la capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales (ciclo celular y apoptosis).

Para la determinación del efecto citoprotector de una determinada muestra frente a un daño oxidativo inducido, las células se deben suplementar con dosis no citotóxicas de la muestra objeto de estudio, para posteriormente ser expuestas a la acción de la sustancia oxidante. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es de las sustancias más frecuentemente utilizadas para inducir el estrés oxidativo, ya que este compuesto es capaz de inducir de forma eficaz la muerte celular y provocar daños a biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN (Alía et al., 2005). La valoración del efecto protector se evalúa a través de diferentes parámetros tales como:

- Viabilidad celular
- Acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)
- Integridad de la membrana mitocondrial (potencial de membrana)
- Actividad de sistemas enzimáticos antioxidantes y estatus redox (niveles de glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH))
- Cambios en el ciclo celular y apoptosis (muerte celular programada)

En el cuadro nº 5 se recogen algunos ejemplos de estudios sobre el efecto protector ejercido por diversos compuestos bioactivos frente a H_2O_2

en células Caco-2. No se conoce hasta la fecha estudios de esta índole realizados con zumos de frutas sometidos a digestión gastrointestinal simulada.

Cuadro nº 5. Efecto citoprotector ejercido por compuestos bioactivos frente a H₂O₂ en células Caco-2.

Compuesto bioactivo	Oxidante	Efectos	Referencia
Hidroxitiroso (250µM)	H ₂ O ₂ (10 mM)	↓ Muerte celular ↓ Peroxidación lipídica ↓ Mantenimiento integridad monocapa celular	Manna et al., (1997)
Miricetina, quercetina y rutina (0-200µM)	H ₂ O ₂ (50 µM)	↓ Daño al ADN	Aherne & O'brien (1999)
β-caroteno	H ₂ O ₂ (10 mM)	No efecto citoprotector	Bestwick & Milne (2000)
Quercetina, luteolina y kaempferol (50µM)	H ₂ O ₂ (50 µM)	↓ ROS	Yokomizo & Moriwaki (2006)
Oligofosfopéptidos de fosvitina (0.5 mg/mL)	H ₂ O ₂ (1 mM)	↓ inflamación (IL-8) ↓ Peroxidación lipídica ↑ GSH ↑ GSH-Rd	Katayama et al., (2006)
Oligofosfopéptidos de fosvitina (0.5 mg/mL)	H ₂ O ₂ (1 mM)	↑ GSH ↑ GSH-Rd ↑ GSH-S-Transferasa ↑ Catalasa	Katayama et al., (2007)
Extractos fenólicos de romero, salvia y orégano (15-250 µg/mL)	H ₂ O ₂ (50 µM)	↓ Muerte celular ↓ Daño al ADN	Aherne et al., (2007)
Lactoferrina de leche humana (50 µg/mL)	H ₂ O ₂ (250 µM)	↓ ROS	Shoji et al., (2007)

En cuanto a la segunda estrategia encaminada a evaluar la actividad antiproliferativa de células tumorales por parte de antioxidantes o alimentos ricos en antioxidantes, es frecuente, en una primera etapa, caracterizar las dosis citotóxicas de los componentes bioactivos de las muestras. A continuación, las células tumorales se suplementan con los componentes bioactivos en concentraciones dietéticamente relevantes y no tóxicas. Sin embargo, muchos estudios *in vitro* con cultivos celulares en los que se evalúa la actividad quimiopreventiva de polifenoles utilizan dosis farmacológicas en lugar de nutricionales durante elevados períodos de tiempo (hasta 96 h) (Larrosa et al., 2003; Seeram et al., 2004). Finalmente, se determinan diversos procesos celulares derivados de la interacción entre los componentes bioactivos del alimento con las células. Los principales efectos anticancerígenos determinados en cultivos celulares son: inhibición de la proliferación celular, distribución del ciclo celular (arresto en alguna determinada fase) e inducción de la muerte celular programada (apoptosis).

En el cuadro nº 6 se muestran diferentes estudios en los que se determina la capacidad para inhibir la proliferación de células de cáncer de colon (células Caco-2 y HT-29) por parte de compuestos bioactivos y zumos de frutas, incluyendo estudios con la fracción bioaccesible de muestras obtenidas tras una digestión gastrointestinal simulada.

Cuadro nº 6. Compuestos bioactivos y actividad antiproliferativa en células humanas de cáncer de colon.

Compuesto bioactivo	Línea celular	Efectos	Referencia
30 flavonoides (25-250 µM)	Caco-2 HT-29	↓ Proliferación celular No efecto citotóxico Inducción apoptosis	Kuntz et al., 1999
Flavonoides del té (70-100 µM)	Caco-2	No efecto citotóxico Arresto ciclo celular fase G ₂ /M No inducción apoptosis	Salucci et al., 2002
Caseinofosfopéptidos (0.1-1 mg/mL)	Caco-2	No efecto antiproliferativo No efecto citotóxico No inducción apoptosis	Hartmann & Meisel, 2004
Zumo de granada (12.5- 100 µg/mL)	HT-29	↓ Proliferación celular Inducción apoptosis	Seeram et al., 2005
Tangeretina y nobiletina (54-100 µM)	HT-29	↓ Proliferación celular Arresto ciclo celular fase G ₁ Efecto citostático No inducción apoptosis	Morley et al., 2007
Zumos de bayas (0-50 µL/mL)	Caco-2	↓ Proliferación celular Arresto ciclo celular fase G ₁ Inhibición expresión ciclinas D1, D3, cdk4 y cdk6 No inducción apoptosis Inhibición factor necrosis tumoral (NFκB)	Boivin et al., 2007
Extracto fenólico de frambuesa (0-50 µg/mL) (<i>digerido in vitro</i>)	HT-29	Arresto ciclo celular fase G ₁	Coates et al., 2007
Zumo <i>Aronia Melanocarpa</i> (85-220 µM) (<i>digerido in vitro</i>)	Caco-2	↓ Proliferación celular Arresto ciclo celular fase G ₂ /M Efecto citostático	Bermúdez-Soto et al., 2007

Ciclo celular y apoptosis

a) Ciclo celular

El ciclo celular es la secuencia cíclica de procesos en la vida de la célula eucariota, que consta de dos períodos denominados interfase (constituida por tres fases: G₁, S y G₂) y mitosis o fase M.

- Fase G₁ (primer período de crecimiento): Es la primera fase del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. Es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN.
- Fase S (fase de síntesis): segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio.
- Fase G₂ (segundo período de crecimiento): fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN. Termina cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis.
- Fase M (mitosis): Es la división celular en la que una célula progenitora se divide en dos células hijas idénticas.

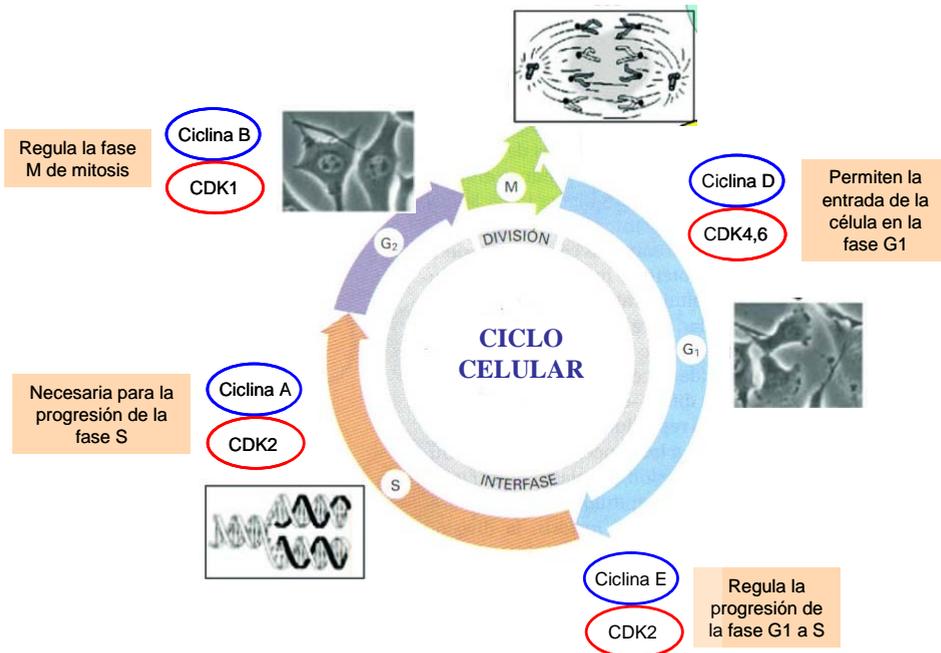
La progresión de las distintas fases del ciclo celular está controlada por una serie de proteínas, principalmente las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), cuya actividad está regulada por medio de interacciones con sus subunidades reguladoras activadoras (ciclinas) y con inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas (CDKIs). La transición de

una fase a otra del ciclo se produce por activación de varias ciclinas, proceso en el cual, las ciclinas y las CDKs forman un complejo unido no covalentemente que se activa por procesos de fosforilación (Singh et al., 2002).

Para la entrada en la fase G_1 es necesaria la unión entre las ciclinas tipo D (D_1 , D_2 y D_3) con las CDK_4 y CDK_6 . Por su parte, la transición de la fase G_1 a S está regulada por el complejo CDK_2 -ciclina E. Durante la fase S es necesaria la intervención del complejo ciclina A- CDK_2 , y finalmente, el complejo formado entre CDK_1 y la ciclina B se encarga de regular la transición de la fase G_2 a la fase M (Singh et al., 2002; Sa & Das, 2008).

En la figura n° 4 se muestra el ciclo de división celular así como las proteínas (ciclinas y CDKs) encargadas de su progresión y regulación.

Figura n° 4. Ciclo celular y proteínas encargadas de su regulación.



El ciclo celular también posee para su regulación puntos de restricción y de control. El punto de restricción en el ciclo celular es aquel punto de no retorno en G_1 , a partir del cual la célula entra en el proceso de división. En cambio, los puntos de control se definen como posiciones de control que aseguran un orden correcto de eventos durante el ciclo celular y que además integra la reparación del ADN, con la progresión del ciclo celular (Hartewell & Kastan, 1994). Así pues, los puntos de control presentan dos funciones primordiales (Kaufmann & Paules, 1996):

- Asegurar que todos los eventos del ciclo celular se han completado correctamente antes de pasar al siguiente.
- Permitir la parada del ciclo celular con el fin de proporcionar tiempo suficiente a la célula para reparar su ADN, en caso que éste haya sufrido algún tipo de daño.

Se han descrito puntos de control del ciclo celular en las fases G_1 , S y G_2 , los cuales permiten a las células que han sufrido algún daño, repararlo y reanudar nuevamente su secuencia cíclica. En este sentido, se ha descrito que daños provocados por peróxidos (H_2O_2 y tert-butilhidroperóxido) inducen la respuesta del punto de control en la fase G_1 , la cual puede ser atenuada mediante la aplicación de antioxidantes (Shackelford et al., 2000).

Son varios los efectos que los polifenoles pueden ejercer sobre el ciclo celular, los cuales pueden inducir arresto en las diferentes fases del mismo (G_1 , S y G_2/M) en distintas clases de líneas celulares de cáncer, incluyendo las de cáncer de colon.

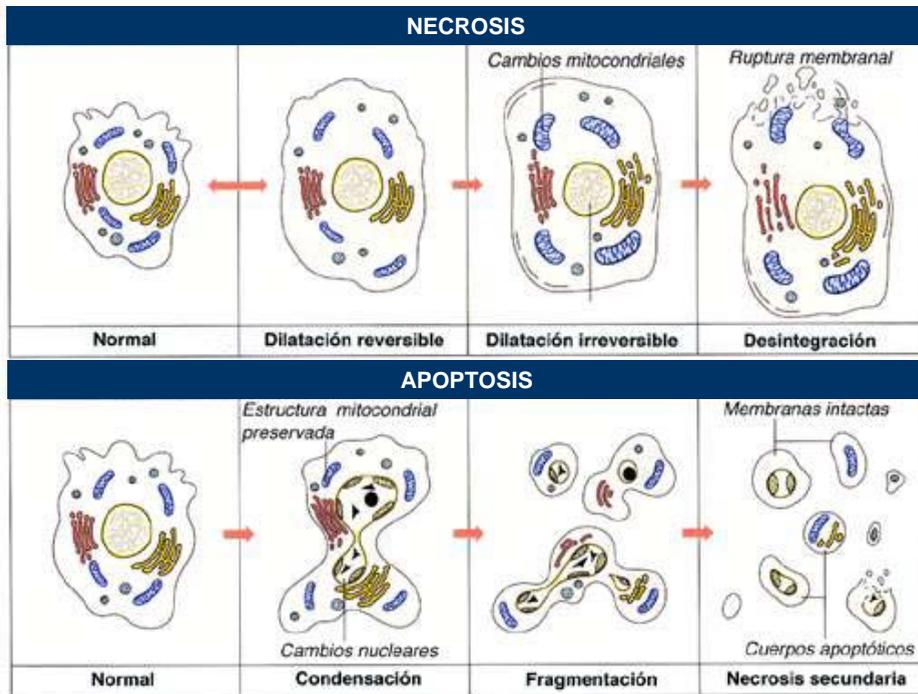
Se ha descrito en células HT-29 arresto en la fase G₁ causada por tangeretina y nobiletina (Morley et al., 2007) y por un extracto fenólico de frambuesa digerido *in vitro* (Coates et al., 2007). Del mismo modo, en células Caco-2 distintos zumos de bayas han inducido arresto en G₁ acompañado de la inhibición de las ciclinas D₁ y D₃ y CDK₄ y CDK₆ (Boivin et al., 2007). La detención del ciclo celular en fase S unida a la disminución en la expresión de las ciclinas A y B₁, junto a la sobreexpresión de la ciclina E mediada por ácido elágico, ha sido descrita en células Caco-2 (Larrosa et al., 2006); así como arresto en la fase G₂/M por la acción de epigallocatequina galato y ácido gálico (Salucci et al., 2002) o zumo de *Aronia melanocarpa* digerido *in vitro* (Bermúdez-Soto et al., 2007)

b) Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es el proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra o intracelulares tales como estrés oxidativo, daño en el ADN, fluctuaciones iónicas y citoquinas (Kampa et al., 2007).

Las características de la célula apoptótica difieren de las observadas en las células que sufren necrosis. En la figura nº 5 se muestra las principales diferencias entre la muerte celular provocada por apoptosis (programada genéticamente) y aquella producida por necrosis (accidental) (Arango et al., 1997).

Figura nº 5. Diferencias entre muerte celular por necrosis y apoptosis (<http://retina.umh.es>).



El proceso de apoptosis es fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas, en el mantenimiento de la homeostasis del número de células y en la defensa frente a patógenos. La supresión de la apoptosis contribuye al proceso de carcinogénesis (caracterizado por excesiva proliferación celular y limitada apoptosis) mediante diversos mecanismos (Larrosa et al., 2006):

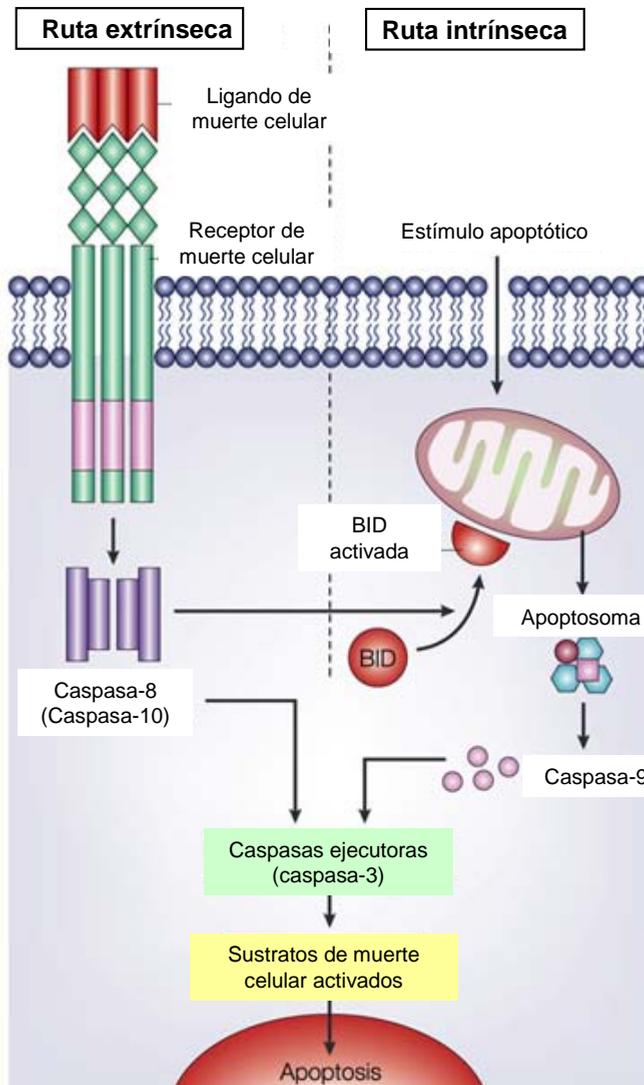
- Facilitando la acumulación de mutaciones genéticas.
- Permitiendo la supervivencia celular de forma independiente a los factores de crecimiento.

- Promoviendo la resistencia de las células tumorales a la citotoxicidad inducida frente a ellas por el sistema inmune.
- Escapando de los puntos de control del ciclo celular.

Los principales ejecutores implicados en la mayoría de los cambios morfológicos que caracterizan la muerte celular por apoptosis, comúnmente conocidos como caspasas, son unas enzimas cisteín proteasas que activan sus sustratos cortando los enlaces Asp-Xxx, es decir, después de los residuos de ácido aspártico en el extremo carboxi-terminal (Hengartner, 2000).

Actualmente se conocen 14 caspasas, de las cuales las caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10 están implicadas en la apoptosis. Dependiendo de su estructura y la función que desempeñan, las caspasas se clasifican en ejecutoras o iniciadoras. Las caspasas -3, -6, y -7, son caspasas ejecutoras que se activan por proteólisis de alguna de sus subunidades y, una vez activadas, procesan sustratos que conducen a toda la morfología característica del proceso apoptótico. Las caspasas iniciadoras (-2, -8, -9 y -10) son activadas por autocatálisis de alguna de sus subunidades por factores externos (vía receptor de membrana) o señales intracelulares (Kaufmann & Hengartner, 2001) (véase figura nº 6).

Figura n° 6. Principales rutas desencadenantes de apoptosis (Adaptada de Igney & Krammer, 2002).



Tal y como se muestra en la figura n° 6, la apoptosis se puede iniciar principalmente por dos rutas alternativas: (a) A través de receptores de muerte celular, situados en la superficie de la membrana celular (ruta

extrínseca), o (b) por medio de la mitocondria (ruta intrínseca). En ambos casos, la inducción de apoptosis conlleva la activación de una caspasa iniciadora: caspasa-8 y posiblemente caspasa-10 en la ruta extrínseca, y caspasa-9, la cual es activada cuando se forma el apoptosoma (requiere la unión en el citosol de procaspasa-9, ATP, Apaf-1 y el citocromo c liberado de la mitocondria) en la ruta intrínseca. A continuación, las caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras, las cuales a su vez actúan sobre los sustratos de muerte celular que finalmente desencadenan la apoptosis a nivel del núcleo celular. Las dos rutas pueden estar interconectadas si se produce la activación de la proteína BID por medio de la caspasa-8 (ruta extrínseca), desencadenando la ruta mitocondrial, hecho que puede ser usado por la células para amplificar la señal apoptótica (Igney & Krammer, 2002).

Entre otros ejemplos, se ha descrito que diversos flavonoides (Kuntz et al., 1999), el zumo de granada (Seeram et al., 2005) así como extractos fenólicos de uva (Yi et al., 2005), fresa, frambuesa, arándano y mora (Seeram et al., 2006), ciruela (Fujii et al., 2006) y manzana (Kern et al., 2007), pueden afectar el crecimiento celular no controlado en células cancerígenas de colon (Caco-2 y HT-29) mediante la inducción de apoptosis. Sin embargo, los polifenoles también podrían ejercer un efecto antiapoptótico, en células de cáncer de colon frente al daño oxidativo provocado en el ADN por parte de sustancias oxidantes como el H₂O₂ (ver cuadro n° 5).

3.4 Ensayos *in vivo*. Estudios de intervención en humanos

La hipótesis de la prevención del cáncer mediante la intervención con antioxidantes se basa en el hecho que los individuos que consumen frutas y verduras ricas en antioxidantes presentan menores tasas de cáncer (Collins, 2005), por lo que se recomienda aumentar el consumo de alimentos ricos en antioxidantes.

En los estudios de intervención en humanos con alimentos ricos en compuestos antioxidantes, es habitual la determinación de la capacidad antioxidante total (CAT) en suero o plasma (además del daño oxidativo en biomoléculas tales como ADN, lípidos y proteínas) como posible biomarcador del efecto de los antioxidantes en los individuos sujeto de estudio y como prueba concluyente de su funcionalidad (Collins, 2005).

La medida de la CAT en suero o plasma permite evaluar la acción combinada total de los antioxidantes en el organismo así como el estatus de las defensas antioxidantes de los individuos (Ghiselli et al., 2000), y la implicación del estrés oxidativo en distintas patologías (Yeum et al., 2004).

Fernández-Pachón et al. (2008), en un artículo de revisión bibliográfica indican que los principales métodos de medida de la CAT en suero/plasma en estudios de intervención en humanos son: ORAC, FRAP, ABTS o TEAC, TRAP, DCFH-DA (ensayo basado en diclorofluoresceína acetato), quimioluminiscencia y ensayo basado en la crocina. Se indica la conveniencia de utilizar más de un método de medida de CAT, preferiblemente una combinación de métodos con mecanismos de reacción basados en transferencia de radical de hidrógeno (HAT) y transferencia de electrón (ET). Ejemplos de dichos métodos son el método ORAC y el

TEAC, ambos utilizados en la presente tesis doctoral para la medida de la CAT en suero.

Las enzimas antioxidantes cooperan con los antioxidantes no enzimáticos endógenos (albúmina, bilirrubina, ácido úrico y glutatión) y exógenos (provenientes de la dieta) en la protección del daño celular inducido por estrés oxidativo, siendo la SOD la primera línea de defensa antioxidante enzimática del organismo, la cual cataliza la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es convertido en H_2O y O_2 por las enzimas CAT y GPx en sinergia con el GSH (Cheng et al., 2001). Además, existe la evidencia en la terapia antioxidante, que la inducción de las enzimas SOD y CAT *in vivo* es más efectiva que los efectos de los antioxidantes suplementados a través de la dieta, los cuales, como mucho, pueden eliminar estequiométricamente una pequeña parte de la producción oxidante total (Nelson et al., 2006).

Los estudios de intervención en humanos con alimentos ricos en antioxidantes pueden ser de dos tipos (Fernández-Pachón et al., 2008):

- Estudios a corto plazo: se caracterizan por una ingesta puntual del alimento rico en antioxidantes y la medida de la capacidad antioxidante total en plasma/suero a los pocos minutos, u horas, tras su ingesta. En la mayoría de casos se observan efectos positivos con incrementos en la capacidad antioxidante total del suero/plasma. Sin embargo, este tipo de estudios no reflejan la situación real derivada de un consumo regular.
- Estudios a largo plazo: en este tipo de estudios se mide la capacidad antioxidante total del suero/plasma del alimento rico en antioxidantes (expresado como porción ingerida/día) a nivel basal (día 0) y al final de

la suplementación (entre 1-3 semanas). Presentan el inconveniente de la dieta seguida por los voluntarios, ya que dietas ricas en antioxidantes pueden interferir en los resultados. Para excluir este problema, se elimina de la dieta, durante el estudio, todos los antioxidantes excepto aquellos presentes en el alimento objeto de estudio. Otro punto importante es el grupo control; éste puede estar formado por otros voluntarios distintos a los que ingieren el alimento estudiado, o por los mismos voluntarios pero sometidos a un período de lavado lo suficientemente largo para evitar el efecto de la ingesta repetida (es decir, deben recuperar el nivel basal antes de la siguiente intervención).

En el cuadro nº 7 se muestran algunos ejemplos de estudios de intervención en humanos con zumos de frutas y su efecto en el estatus antioxidante.

Cuadro nº 7. Ejemplos del efecto de estudios de intervención a corto (horas) y largo plazo (semanas) con zumos de frutas sobre la CAT en suero/plasma y/o la actividad SOD eritrocitaria.

Suplementación	Nº sujetos	Duración	Efectos	Referencia
Zumos de frambuesa y arándanos (500 mL/día)	9 mujeres sanas (23-41 años)	0-4 horas	↑ CAT plasmática (ESR y FRAP) sólo zumo frambuesa	Pedersen et al., 2000
Arándano liofilizado (100g en 500 mL agua)	8 hombres sanos (38-54 años)	0-4 horas	↑ CAT sérica (ORAC) ↑ CAT sérica transitoria (TEAC)	Kay & Holub, 2002
Zumo de bayas (400 mL)	6 individuos sanos (24-31 años)	0-8 horas	↑ CAT sérica transitoria (TEAC)	Netzel et al., 2002
Bebida a base de zumo de frutas (500 mL)	5 individuos sanos (26-3 años)	0-2 horas	↑ CAT sérica transitoria (TRAP) ↑ CAT plasmática transitoria (FRAP)	Böhm et al., 2004
Bebida a base de zumo de frutas (400 mL)	12 individuos sanos (23-43 años)	0-6 horas	No cambios en CAT sérica (FRAP)	García-Alonso et al., 2006
Zumo de manzana y grosella negra (750, 1000 ó 1500 mL/día)	5 individuos sanos (22-28 años)	1 semana cada intervención	↓ CAT plasmática con 1000 mL/día (TEAC). Resto dosis sin cambios. No cambios CAT (FRAP) ↑ SOD (1000 mL/día) ↓ SOD (1500 mL/día)	Young et al., 1999

Antecedentes bibliográficos

Cuadro nº 7. (continuación).

Suplementación	Nº sujetos	Duración	Efectos	Referencia
2 bebidas a base de zumo de frutas (330 mL/día)	27 hombres sanos (31-39 años)	2 semanas cada intervención	No cambios en CAT plasmática (FRAP)	Bub et al., 2003
Zumo de naranja (600 mL/día)	16 mujeres sanas (20-27 años)	3 semanas	No cambios en CAT plasmática (CUPRAC)	Riso et al., 2005
Zumo de pomelo (? mL/día)	92 mujeres sanas (18-30 años)	12 semanas	No cambios en CAT sérica (TRAP)	Burgess & Andrade, 2006
Zumo de frambuesa (750 mL/día)	20 mujeres sanas (18-40 años)	2 semanas	No cambios en CAT plasmática (ESR y FRAP) No cambios en SOD	Duthie et al., 2006
Zumos de grosella negra y "boysenberry" (200 mL/día)	52 ancianos (65-92 años)	24 semanas	↑ CAT plasmática (ORAC)	McGhie et al., 2007

Parte experimental

1. MUESTRAS

1.1 Relación de muestras

Para el desarrollo de la investigación se dispone de ocho combinaciones diferentes de bebidas a base de zumo de frutas en función de la presencia o ausencia de leche y/o minerales (Fe y Zn).

- Bebida a base de zumo de frutas (uva-naranja-melocotón) (**BZ**)
- BZ + hierro (**BZFe**)
- BZ + cinc (**BZZn**)
- BZ + hierro + cinc (**BZFeZn**)
- BZ + leche (**BZL**)
- BZ + hierro + leche (**BZFeL**)
- BZ + cinc + leche (**BZZnL**)
- BZ + hierro + cinc + leche (**BZFeZnL**)

1.2 Descripción y composición de las bebidas a base de zumo de frutas

Las bebidas a base de zumo de frutas han sido elaboradas por el Departamento de Investigación y Desarrollo de Hero España S. A., a partir de la mezcla de concentrados de melocotón de las variedades “Bullin” y “Carson” (24.5 %), uva de la variedad “Airén” (7.2 %) y naranja de la variedad “Hamlin” (4.2 %). En el cuadro nº 8 se muestra el valor energético

y la composición de las bebidas a base de zumo de frutas estudiadas (datos suministrados por el fabricante).

Cuadro nº 8. Valor energético (Kcal/100 mL) y composición (g/100 mL) de las bebidas a base de zumo de frutas estudiadas.

	BZ	BZL
Energía	50.8	57.2
Proteínas	0.4	0.7
Hidratos de carbono	12.2	13.5
Grasas	0.1	0.1
Fibra	0.3	0.1
Cenizas	0.2	0.2
Leche desnatada en polvo	--	1.04
Ácido L-ascórbico	0.054	0.054

BZ = bebidas a base de zumo de frutas con o sin suplementación mineral: hierro (3 mg/100 ml bebida) como sulfato y cinc (1.6 mg/100 ml bebida) como sulfato.

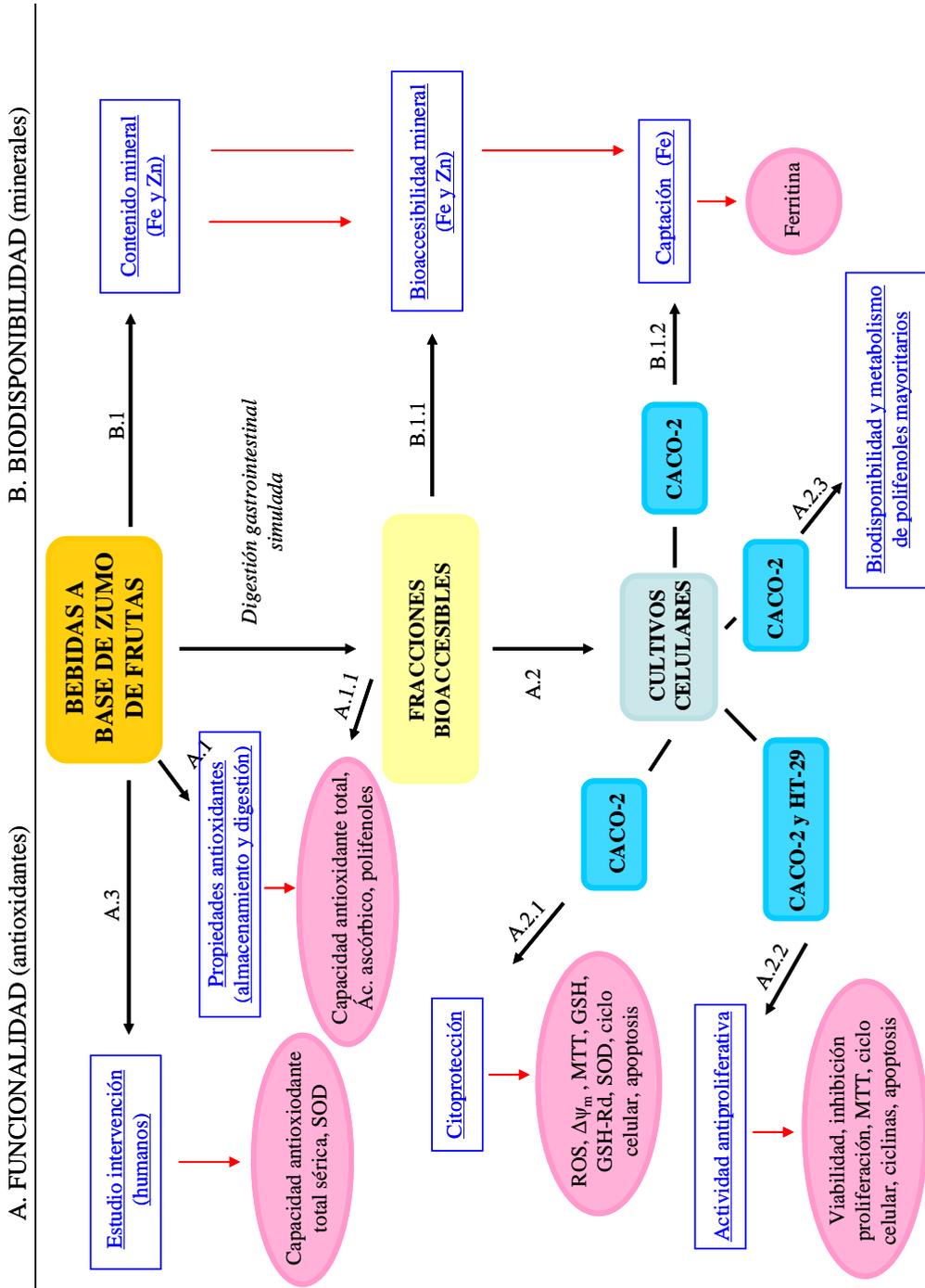
BZL = bebidas a base de zumo de frutas con leche desnatada suplementadas o no con minerales.

Las bebidas a base de zumo de frutas se pasteurizan (95 °C durante 45 segundos) y se envasan al vacío en condiciones asépticas después de su enfriamiento a temperatura ambiente en envases de vidrio.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se plantea un diseño experimental en base a los objetivos específicos indicados anteriormente (ver esquema en figura nº 7).

Figura nº 7. Esquema del diseño experimental.



3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los procedimientos analíticos se describen en base a los objetivos específicos indicados anteriormente.

Las muestras objeto de estudio son las bebidas a base de zumo de frutas descritas en el apartado Muestras de la Parte Experimental, así como sus fracciones bioaccesibles obtenidas mediante una digestión gastrointestinal simulada.

Digestión gastrointestinal simulada (obtención de las fracciones bioaccesibles)

El método utilizado simula el proceso de digestión gastrointestinal en sus dos etapas gástrica e intestinal.

Desmineralización de enzimas

Las enzimas utilizadas en la digestión gastrointestinal *in vitro* se desmineralizan según el protocolo descrito por Glahn et al. (1998) ligeramente modificado.

Inmediatamente antes de su uso, 0.125 g de pepsina se disuelven en 10 ml de HCl 0.1 N, se adicionan a 2 g de resina Chelex y se mantiene en agitación (mediante imán) durante 30 minutos. A continuación se transfiere a una columna de filtración de 2.0 cm de diámetro y se recoge el eluato de la disolución de pepsina. Se añade un volumen adicional de 5 ml de HCl 0.1 N y se recoge el eluato, el cual se une con el anterior.

Para la digestión intestinal, 0.05 g de pancreatina y 0.312 g de extracto biliar se disuelven en 12.5 ml de NaHCO_3 0.1 M. Se adicionan 3.125 g de Chelex y se mantiene en agitación (mediante imán) durante 30 minutos. La mezcla se introduce en una columna de filtración de 2.0 cm de diámetro y se recoge el eluato de la disolución de pancreatina-sales biliares. Un volumen adicional de 5 ml de NaHCO_3 0.1 M se añade a la columna y se recoge se recoge el eluato, el cual se une con el anterior.

Etapa gástrica

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad se pesan 80 g de bebida a base de zumo de frutas u 80 g de agua de grado de cultivo celular (blanco de digestión). Se ajusta el pH a 2 con HCl 6 M y transcurridos 15 minutos se reajusta el valor, si es necesario. Se añade un volumen de disolución de pepsina, previamente desmineralizada, equivalente a 0.02 g de pepsina y se completa a 100 g con agua de grado de cultivo celular. Se precinta el matraz Erlenmeyer con Parafilm[®] y se incuba 2 horas en un baño de agua a 37 °C y agitación controlada (120 golpes/minuto). Transcurrido este tiempo, el digerido gástrico se sumerge en un baño de hielo durante 10 minutos con el fin de interrumpir la actividad enzimática.

Etapa intestinal

El pH del digerido gástrico se ajusta a 6.5 con NaHCO_3 0.1 M. A continuación se adiciona al digerido gástrico un volumen de disolución de pancreatina-extracto biliar, previamente desmineralizada, equivalente a

0.005 g de pancreatina y 0.03 g de extracto biliar por cada 100 ml. El matraz Erlenmeyer se precinta con Parafilm® y se incuba a 37 °C durante 2 horas en un baño con agitación controlada (120 golpes/minuto). Transcurrido este tiempo se retira del baño y se sumerge en hielo durante 10 minutos.

Una vez finalizada la etapa intestinal, el pH se ajusta a 7.2 con NaOH 0.5 M. En tubos de centrifuga de propileno, de 50 ml de capacidad, se pesan alícuotas de 20 g del digerido intestinal y se centrifugan a 3500 g, a 4 °C durante 1 hora. La fracción soluble obtenida representa la cantidad de un constituyente de un alimento que está presente en el intestino como consecuencia de su liberación de la matriz alimentaria, y que podría ser potencialmente absorbida (Saura-Calixto et al., 2007); es por ello que se denomina “fracción bioaccesible”.

A. Evaluación de la funcionalidad de una bebida a base de zumo de frutas rica en antioxidantes suplementada o no con hierro y cinc y/o leche.

A.1 Propiedades antioxidantes (almacenamiento y digestión)

- Capacidad antioxidante total

Se determina la capacidad antioxidante total del producto recién elaborado y cada 45 días durante el período de vida útil (135 días) almacenado en frío (2-4 °C). Asimismo, se determina la capacidad

antioxidante total en las fracciones bioaccesibles obtenidas tras aplicar la digestión gastrointestinal simulada a los 135 días de almacenamiento.

a) Ensayo ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno)

El método ORAC se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de atrapar radicales oxígeno (Ou et al., 2001). El radical libre peroxilo, generado por descomposición térmica del AAPH disminuye la fluorescencia debida a la fluoresceína, y la adición de un antioxidante, que reacciona rápidamente con los radicales donándoles sus átomos de hidrógeno, inhibe la pérdida de la intensidad de la fluorescencia, y el grado de inhibición es proporcional a la actividad antioxidante.

Se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función del tiempo y porcentaje de protección frente a la pérdida de fluorescencia y se cuantifica utilizando Trolox como antioxidante patrón.

Es necesario optimizar la dilución de las muestras para la aplicación del método. Se selecciona la dilución necesaria para que a los 60 minutos la fluorescencia en el ensayo sea inferior al 5% de la fluorescencia inicial. La dilución utilizada para las bebidas a base de zumo de frutas y fracciones bioaccesibles objeto de estudio es 1/150 v/v en tampón fosfato.

En placas blancas de 96 pocillos no estériles atemperadas a 37 °C se adicionan 80 µL de la disolución de fluoresceína, 40µL de AAPH y 80 µL de muestra, Trolox o tampón fosfato (blanco). Se mide la fluorescencia a λ excitación = 485 nm y λ emisión = 535 nm al inicio (t = 0) y cada 5 minutos hasta los 60 minutos utilizando el lector de placas VICTOR³.

El valor ORAC de la muestra se obtiene calculando la diferencia de áreas bajo la curva de descenso de fluorescencia de la fluoresceína a lo largo del tiempo entre una muestra y el blanco. Los resultados finales se expresan en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol/L}$) y se calculan siguiendo la ecuación descrita por Cao & Prior, (1999):

$$\text{Valor ORAC } (\mu\text{M}) = 20 \times K \times (S_{\text{muestra}} - S_{\text{blanco}}) / (S_{\text{Trolox}} - S_{\text{blanco}})$$

siendo 20 la concentración μM de Trolox, K el factor de dilución de la muestra y S el área bajo la curva de descenso de fluorescencia de la muestra, patrón de Trolox o el blanco:

$$S = (0.5 + F_5/F_0 + F_{10}/F_0 + F_{15}/F_0 + \dots + F_{60}/F_0) \times 5$$

donde F_0 es la fluorescencia a $t = 0$ y F_5 - F_{60} es la fluorescencia medida cada cinco minutos.

b) Ensayo TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox)

Se basa en la capacidad para atrapar radicales libres presentes en el medio. El radical catiónico de color verde-azulado ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) se genera por interacción del ABTS con persulfato potásico (Re et al., 1999). El radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ es un compuesto estable, muy soluble en agua y con un espectro de absorción característico. Al adicionar la muestra a la disolución del radical se observa un descenso de la absorbancia. Se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la capacidad para disminuir la

concentración del radical. Se cuantifica en relación al Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), que es el antioxidante patrón de uso más generalizado.

Se toman 2 ml de la disolución del radical catiónico ABTS⁺ (ver Anexo IV-Reactivos) y se mide su absorbancia inicial a 734 nm. Se adicionan 0.1 ml del patrón Trolox o de la muestra convenientemente diluida con agua desionizada para que la medida de absorbancia se encuentre dentro del intervalo de linealidad y presente un porcentaje de inhibición aproximado al 50%. La dilución seleccionada para las bebidas a base de zumo de frutas y para las fracciones bioaccesibles es de 1/35. Las determinaciones se realizan a 30 °C, por triplicado y frente a un blanco de etanol. Se mide la absorbancia a $t = 0$ y a los 3 minutos, ya que no se observa una disminución significativa de la absorbancia a partir de este punto.

El porcentaje de inhibición se calcula como:

$$\text{Inhibición (\%)} = (1 - (A_f / A_o)) \times 100$$

donde A_o es la absorbancia a $t = 0$ min y A_f es la absorbancia a $t = 3$ min.

La cuantificación se realiza mediante interpolación de la muestra en una recta de calibrado determinando el porcentaje de inhibición de diferentes concentraciones de Trolox (0, 50, 100, 150, 200, 250 μM) en etanol. La capacidad antioxidante se expresa en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol/L}$).

- *Ácido L-ascórbico*

Se determina el contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento y tras la digestión gastrointestinal en las muestras indicadas en el apartado anterior (ver apartado Capacidad Antioxidante Total).

El ácido ascórbico (AA) se determina por el método volumétrico oficial para zumos y preparaciones vitamínicas (AOAC 967.21, 2000). La determinación se basa en el poder reductor del ácido ascórbico frente al 2,6-diclorofenolindofenol (2,6-DCFI), reactivo incoloro en forma reducida y coloreado en forma oxidada (azul en medio básico y rosa en medio ácido). El ácido ascórbico se extrae y valora en medio ácido acético-metafosfórico para mantener la acidez adecuada y evitar la autooxidación del AA a pH elevados.

Para determinar el contenido de ácido ascórbico en las bebidas a base de zumo de frutas y sus fracciones bioaccesibles, se prepara una disolución de la mismas en ácido acético-ácido metafosfórico a partes iguales. El contenido de ácido ascórbico se determina mediante valoración con la disolución de 2,6-DCFI. Paralelamente se valora un blanco.

La normalización de la disolución indicador 2,6-DCFI se realiza en presencia de una disolución patrón de ácido ascórbico (1 mg/ml).

Para valorar la posible contribución de sustancias interferentes que pueden intervenir en el proceso redox, se realiza un test con azul de metileno. Para ello se adicionan dos gotas de una solución acuosa de azul de metileno 0.05% (p/v) a 10 ml de una mezcla recién preparada de muestra y disolución ácido acético-ácido metafosfórico (1:1, v/v). La desaparición del

color azul al cabo de 5-10 segundos indica la presencia de sustancias interferentes.

- *Determinación de polifenoles*

Se determina el contenido de polifenoles en las bebidas a base de zumo de frutas antes y después de la digestión gastrointestinal simulada en el último punto de muestreo del período de almacenamiento (135 días)

a) *Polifenoles solubles totales*

Se aplica el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico. En presencia de un exceso de este reactivo, los polifenoles reducen a los ácidos anteriores a óxidos de tungsteno y molibdeno de color azul. Tratando la muestra problema con exceso de reactivo de Folin Ciocalteu, en presencia de Na_2CO_3 , la lectura de absorbancia a 765 nm es proporcional a la concentración total de polifenoles, y se expresa como mg de ácido gálico/L.

Los bebidas a base de zumo de frutas se diluyen 1:1 con agua desionizada antes de su medida. Por su parte, las fracciones bioaccesibles o los blancos de digestión no precisan ser diluidas para este análisis.

Se prepara una curva de calibrado de ácido gálico. Para ello se toman 0, 10, 30, 50, 70, 100 μl de la disolución patrón de ácido gálico que se completan a un volumen final de 10 ml con AD. La concentración de ácido gálico en estas disoluciones es de 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1 mg/ml,

respectivamente. Se toma 100 µl de muestra (bebidas a base de zumo de frutas, fracciones bioaccesibles o blanco de digestión) o disolución patrón y se añaden 3 ml de disolución carbonato sódico al 2%, y 100 µl de reactivo Folin-Ciocalteu; se agita por inversión y se deja reposar durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Se determina la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/L).

b) Análisis de compuestos polifenólicos mediante HPLC-DAD-MS/MS

Alícuotas de 10 ml de bebidas a base de zumo de frutas y fracciones bioaccesibles se centrifugan a 3890g durante 15 minutos a temperatura ambiente y se separa el sobrenadante y el precipitado. Los sobrenadantes (en el caso de bebidas a base de zumo de frutas, previa dilución con agua desionizada 1:2, v/v) se filtran a través de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) C-18 Sep-Pak, previamente activado con 10 ml de MeOH seguidos de 10 ml de agua desionizada. Cada 10 ml de sobrenadante se eluyen con 2 ml de MeOH. Las fracciones metanólicas se recogen, se filtran a través de un filtro de membrana Millex-HV₁₃ de 0.45 µm y se analizan en un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fotodiodos y acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones (HPLC-DAD-MS/MS).

Los precipitados obtenidos tras la centrifugación, se lavan con metanol ácido (MeOH/ácido fórmico, 97:3) en una proporción muestra-metanol ácido 1:2, se agitan en vórtex y se sonicán 5 minutos para extraer los compuestos polifenólicos. La solución obtenida se centrifuga como se ha indicado anteriormente, y el sobrenadante se filtra (0.45 µm) y se inyectan

(35 μ l) en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de masas que consta de un espectrómetro de masas equipado con una trampa de iones y un sistema de ionización de electrospray (ESI).

La temperatura y el voltaje capilar, para el sistema ESI se fijan a 350 °C y 4 kilovoltios (kv) respectivamente. El intervalo para el barrido de masas, tanto para el barrido total (MS) como para los correspondientes fragmentos o “iones producto” (MS-MS), se fija en m/z de 100 hasta 1000 y los datos de espectrometría de masas son registrados en modo negativo de ionización. Los parámetros de la fragmentación de iones mediante colisión inducida se realizan en el interior de la trampa utilizando helio como gas de colisión y la energía se ajusta al 50%.

La separación cromatográfica de las muestras se lleva a cabo en una columna C₁₈ Mediterranean Sea (250 x 4 mm, tamaño de partícula 5 μ m). Las fases móviles utilizadas son agua-ácido fórmico (99:1, v/v) (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 1 ml/min. El gradiente comienza con un 5% de B en A hasta alcanzar el 25% de B en A en el minuto 25, el 60% de B en A en el minuto 35, el 90% de B en A en el minuto 36 mantenido hasta el minuto 41.

La identificación de los polifenoles se lleva a cabo por comparación cromatográfica con compuestos estándares de acuerdo a sus espectros UV, tiempos de retención, espectro de masas (MS) y por sus correspondientes fragmentos producto (MS-MS). Los cromatogramas se registran a 350 nm (flavonas), 320 nm (derivados del ácido hidroxicinámico), 290 nm (flavanonas) y 280 nm (flavan-3-oles) y la cuantificación se lleva a cabo usando los estándares apigenina, ácido clorogénico, hesperidina y (+) catequina, respectivamente. La cantidad de polifenoles totales se calcula

como la suma de los diferentes compuestos fenólicos cuantificados y los resultados se expresan como miligramos de polifenoles por litro de bebida a base de zumo de frutas (mg/L).

A.2 Ensayos in vitro con cultivos celulares: citoprotección, actividad antiproliferativa y biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles mayoritarios

A.2.1 Efecto citoprotector frente a estrés oxidativo inducido

- Línea celular Caco-2

Las células Caco-2 proceden de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; número 86010202, Salysbury, UK). Todos los cultivos se utilizan entre los pases 53 al 71. El mantenimiento de las células se lleva a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adiciona 15 ml de Medio Mínimo Esencial (MEM) enriquecido con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 1% (v/v) de antibióticos, 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de HEPES, 1% (v/v) de piruvato sódico y 0.4% (v/v) de fungizona. Las células se incuban a 37 °C, en atmósfera con 95% de humedad relativa y con un flujo de CO₂ de 5%. El medio de cultivo se cambia cada 2 días.

Una vez el cultivo alcanza el 70% de confluencia, se elimina el MEM por aspiración y la monocapa celular se lava con 10 ml de una disolución fosfato tamponada (PBS) para eliminar los restos de medio de cultivo y las células no viables.

Para despegar la monocapa celular, se adicionan 10 ml de una disolución de Tripsina - EDTA, previamente atemperada a 37 °C. Se deja actuar durante 1-2 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se elimina por aspiración. El frasco se incuba durante 10 minutos a 37 °C, en atmósfera con 95% de humedad relativa y con un flujo de CO₂ de 5%. Transcurrido este tiempo, se recogen las células resuspendidas en MEM. Se toma una alícuota de la suspensión celular donde se lleva a cabo el recuento y se determina la viabilidad celular.

Para los ensayos de citoprotección, las células se siembran a una densidad de 5×10^4 células viables cm⁻² en placas de 24 pocillos y se incuban a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, cambiando el medio cada 2-3 días hasta alcanzar la diferenciación celular (15-18 días postsiembra), estado en que presenta la máxima actividad enzimática de los enzimas del borde en cepillo (Jovaní et al., 2001).

Los cultivos celulares se preincuban (37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa) durante 24 horas con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas, añadidas en proporción 1:1 (v/v) con MEM para preservar la viabilidad celular. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo y las células se lavan con PBS atemperado a 37 °C. Posteriormente, se induce el estrés oxidativo preincubando las células (37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa) con una solución de H₂O₂ 5 mM preparada en MEM durante 1 ó 2 horas. Previo a la realización de los distintos ensayos, se elimina el medio de cultivo y se lava la monocapa celular con PBS.

Paralelamente, se utilizan células Caco-2 no preincubadas con fracciones bioaccesibles ni H₂O₂ como control de los ensayos, y células

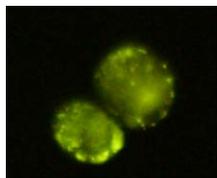
Caco-2 preincubadas únicamente con H_2O_2 como control de estrés oxidativo.

- *Acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)*

La acumulación intracelular de ROS en las células Caco-2 se mide utilizando dihidro-rodamina (DHR), la cual se acumula en la mitocondria debido a su naturaleza de catión lipofílico (Haugland, 1996), donde se oxida a rodamina fluorescente (verde) por la acción de peroxidasas mitocondriales (Gomes et al., 2005).

A partir de una solución 2 mM de DHR en dimetilsulfóxido (DMSO), se prepara una disolución μM de DHR en PBS, que debe preservarse de la luz para evitar la foto-oxidación. Se adicionan 1.5 ml de esta disolución al cultivo celular y se incuban durante 30 minutos a 37 °C, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa. Posteriormente, el sobrenadante se desecha y las células se recogen con disolución de Tripsina-EDTA. El cultivo celular se analiza mediante citometría de flujo a $\lambda_{excitación} = 355$ nm y $\lambda_{emisión} = 460$ nm. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia.

Figura nº 8. Acumulación de ROS intramitocondrial.



- *Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)*

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se evalúan usando el doble marcaje con DHR y yoduro de propidio (IP) (Cai et al., 2000).

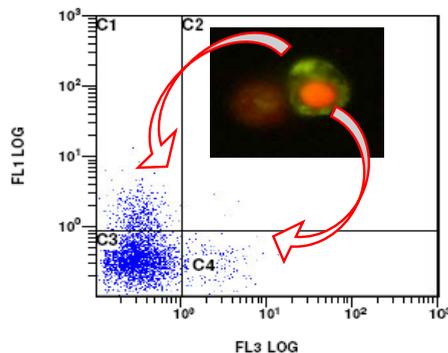
Previamente a la realización del ensayo, se procede a la calibración del citómetro de flujo mediante distintos controles de marcaje celular (sondas fluorescentes). En primer lugar, utilizando una disolución de Tripsina-EDTA se despega la monocapa celular de uno de los pocillos (no preincubado con fracciones bioaccesibles ni H_2O_2 ; no marcado con tinción fluorescente) que servirá como control para localizar la población celular. A continuación, se incuba ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa) otro de los pocillos (no preincubado con fracciones bioaccesibles ni H_2O_2) con 1 ml de la disolución de DHR durante 30 minutos para localizar la población marcada con DHR debido al metabolismo basal de la célula (color verde). Por otra parte, otro pocillo (no preincubado con fracciones bioaccesibles ni H_2O_2) se incuba ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa) con 0.5 ml de la disolución de IP durante 15 minutos para poder localizar la población celular marcada con IP en el ensayo (color rojo).

El resto de pocillos se incuban ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa) con 1 ml de la disolución de DHR durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se retira esta disolución y se adicionan 0.5 ml de la disolución de IP incubando ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa) durante 15 minutos. Después, se retira la solución de IP con ayuda de una pipeta y se tripsiniza el cultivo celular para, finalmente recoger la monocapa celular con 0.5 ml de PBS. Por último se procede al análisis mediante

citometría de flujo (Longitudes de onda de DHR $\lambda_{\text{excitación}} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 525 \text{ nm}$; IP $\lambda_{\text{excitación}} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 620 \text{ nm}$).

Los resultados se expresan como la cantidad relativa de población celular marcada con IP (región C4), la cual identifica subpoblaciones celulares con permeabilidad de membrana alterada asociado a una pérdida de integridad de membrana, respecto a la población celular marcada con DHR (región C1), que identifica subpoblaciones celulares con enzimas mitocondriales activas (peroxidasas que transforman DHR en rodamina). Así pues, $\Delta\psi_m = \text{IP (región C4)} / \text{DHR (región C1)}$, % respecto al control.

Figura n° 9. Potencial de membrana mitocondrial



- *Funcionalidad mitocondrial (test MTT)*

La funcionalidad de las mitocondrias se evalúa con el test MTT que proporciona una medida parcial del metabolismo celular. La reducción de MTT a formazán insoluble en las células viables está catalizada por deshidrogenasas mitocondriales acopladas al proceso de fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria (Ekmekcioglu et al., 1999).

Se adiciona MTT (concentración final de 0.5 mg/ml en PBS), y se incuba (37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa) durante 2 h. Se elimina el sobrenadante y la monocapa celular se lava con PBS. Se adicionan 2 ml de una disolución de isopropanol ácido y Tritón 10% (v/v), y se agita durante 5 minutos para disolver el formazán insoluble. Se mide la absorbancia a 570 nm frente a aire y el valor obtenido se corrige con la sustracción de fondo a 690nm. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia con respecto al control.

- *Contenido intracelular de glutatión reducido (GSH)*

El método utilizado se basa en la medida de la formación de un complejo fluorescente del o-ftalaldehído (OPA) con el glutatión reducido (GSH) (Hissin & Hilf, 1976).

A las células se les adiciona 0.5 ml de la disolución tampón 20 mM Tris - Tritón 0.1 % (v/v), y se agita hasta obtener un homogenizado celular. A continuación, 10 μ l del homogenizado celular se transfieren a placas negras de 96 pocillos, se les adiciona 10 μ l de tampón formaldehído, y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se adicionan 170 μ l del tampón Fosfato 0.1 M – EDTA 5 mM y 10 μ l de la disolución de OPA, manteniéndolo al abrigo de la luz. Paralelamente, se prepara una curva de calibrado de GSH con concentraciones 5, 10, 25, 50, 100, 150, y 200 μ g/ml. La fluorescencia se mide a $\lambda_{\text{excitación}} = 355$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 460$ nm, en un lector de placas multipocillos VICTOR³, después de agitar en agitador con plataforma universal y dejar en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 45 minutos.

Los resultados de GSH se expresan como nmol/mg proteína, por lo que es necesario determinar el contenido proteico de la monocapa celular, utilizando para ello el método de Lowry et al. (1951). El método se basa en la formación de un complejo entre el cobre y los enlaces peptídicos de las proteínas. A continuación, se añade el reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (ácido fosfomolibdotúngstico), el cual reacciona con los residuos de aminoácidos aromáticos (tirosina), lo que sumado al complejo anterior proporciona una intensa coloración azul (con un máximo de absorción a 750 nm). La determinación de proteínas se realiza según se indica en el siguiente cuadro utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como patrón.

Cuadro n° 9. Determinación de proteínas totales

	B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Muestras
ASB 0.2 mg/ml (ml)	--	0.05	0.10	0.30	0.40	0.50	0.70	
Homogeneizado celular (ml)	--	--	--	--	--	--	--	0.05
H ₂ O (ml)	0.70	0.65	0.60	0.40	0.30	0.20	--	0.65
Lowry A + B (ml)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50

Tras la adición de cada una de las disoluciones se agita por inversión y se deja a temperatura ambiente 10 minutos. Se adicionan 0.25 ml del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N y se agita por inversión. Se deja a temperatura ambiente, durante 30 minutos y se mide la absorbancia a 750 nm.

- *Actividad enzimática glutatión reductasa (GSH-Rd)*

La glutatión reductasa cataliza la reducción dependiente de NADPH del glutatión oxidado (GSSG) y esta actividad se evalúa monitorizando espectrofotométricamente la oxidación del cofactor NADPH (Carlberg & Mannervick, 1985).

Se adicionan 0.2 ml de la disolución tampón 20 mM Tris - Tritón 0.1 % (v/v) a las células, y se agita hasta obtener un homogenizado celular, que se transfiere a placas transparentes de 96 pocillos. A continuación, se añaden 140 µl de tampón fosfato, 15 µl de la disolución de NADPH y 50 µl del homogenizado celular, o tampón (blanco de reacción). Tras 5 minutos, durante los cuales se produce la oxidación del cofactor, se inicia la reacción mediante la adición de 100 µl de la disolución de GSSG. Finalmente, se monitoriza el descenso en la absorbancia de la muestra a 340 nm cada minuto durante 10 minutos usando un lector de placas multipocillos VICTOR³ atemperado a 25 °C.

Los cambios de absorbancia se convierten en unidades de GSH-Rd usando el coeficiente de extinción molar de $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Una unidad de actividad se define como la oxidación de 1 µmol de NADPH por minuto. Los resultados de actividad GSH-Rd se expresan como µmol/min/ml fracción enzimática en porcentaje respecto al control.

- *Actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD)*

La enzima superóxido dismutasa cataliza la destrucción del anión superóxido, O_2^- (radical tóxico) resultante de procesos oxidativos celulares,

a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. En este método se utiliza xantina y xantín-oxidasa (XOD), como generadores del radical superóxido. Una vez formado, el radical superóxido reacciona con un cromógeno, el cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (INT), para dar lugar a un compuesto coloreado, que presenta un máximo de absorción a 505 nm. La actividad enzimática de la SOD en la muestra se mide por el grado de inhibición de esta reacción coloreada. A mayor porcentaje de inhibición, mayor es la actividad SOD en la muestra analizada (García-García Saavedra, 1995).

La determinación se realiza utilizando el Kit Ransod SD125 comercializado por los laboratorios Randox (ver Anexo IV-Reactivos).

Se adicionan a las células 0.2 ml de la disolución tampón 20 mM Tris - Tritón 0.1 % (v/v), y se agita hasta obtener un homogenizado celular. A continuación, se pipetea en placas transparentes de 96 pocillos 7.5 μ l de homogeneizado celular, patrón de SOD o blanco. Seguidamente, se adicionan 255 μ l de mezcla sustrato (xantina 5 mM-INT 2.5 mM en tampón CAPS/EDTA), y 37.5 μ l de XOD. Se realizan dos lecturas a 505 nm: una a los 30 segundos de la adición de XOD y otra a los 3 minutos de ésta.

El porcentaje de inhibición se calcula como:

$$\text{inhibición (\%)} = 100 - [(\Delta DO_m / \Delta DO_b)]$$

siendo: ΔDO_m y ΔDO_b , el incremento de absorbancia ($A_2 - A_1$) de la muestra (o patrón) y del blanco, respectivamente.

El porcentaje de inhibición es directamente proporcional al logaritmo de la concentración, de manera que la curva de calibrado obedece a la ecuación:

$$\text{inhibición (\%)} = a + b \log \text{SOD}$$

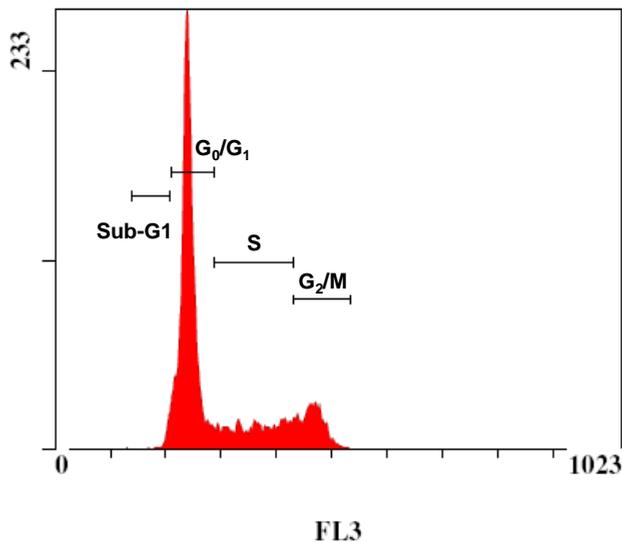
Los resultados se expresan como UI/ ml homogenizado celular. Una unidad de SOD es la que causa un 50% de inhibición del valor de reducción de INT bajo las condiciones de análisis.

- *Ciclo celular: análisis del contenido de ADN*

El ciclo celular es la secuencia cíclica de etapas por las cuales una célula coordina el proceso de duplicación de ADN y la división celular. Utilizando el yoduro de propidio, que se une específicamente al ADN de doble cadena, y la técnica de citometría de flujo, es posible cuantificar el contenido de ADN y estudiar la proporción celular en cada una de las etapas de su ciclo biológico.

Se adicionan al cultivo celular 0.5 ml de la disolución hipotónica de yoduro de propidio y se incuba durante 24h a 4 °C. Posteriormente, se homogeniza y se filtra utilizando filtros de nylon de 0.45 μm . Por último, se analiza mediante citometría de flujo $\lambda_{\text{excitación}} = 536 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 617 \text{ nm}$.

Figura n° 10. Fases del ciclo celular.



- Apoptosis: Actividad de la caspasa-3

La caspasa-3 es uno de los enzimas críticos en la señalización de la apoptosis celular. El ensayo está basado en la hidrólisis del sustrato peptídico acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) por la caspasa-3, con la subsiguiente liberación de p-nitroanilina (pNA), la cual puede ser determinada espectrofotométricamente a $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Para llevar a cabo el ensayo se utiliza el kit colorimétrico caspasa-3 (CASP-3-C) comercializado por Sigma con ligeras modificaciones (ver Anexo IV-Reactivos).

Se resuspenden las células con 250 μl de tampón de lisis celular y se transfieren a tubos Eppendorf (1.5 ml) que se mantienen 15-20 minutos en hielo, y posteriormente, se centrifuga a 11.000 g durante 15 minutos a 4 °C.

Parte experimental

En cubetas espectrofotométricas semi-micro se adicionan los reactivos en el orden indicado en el cuadro n° 10, se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Paralelamente, se prepara una curva de calibrado a partir de pNA con concentraciones 5, 10, 15, 25, 50 y 100 μM . La medida de absorbancia se realiza a 405 nm. Los resultados de actividad caspasa-3 se expresan en $\mu\text{mol pNA}/\text{min}/\text{ml}$, siendo una unidad de caspasa-3 la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de sustrato peptídico por minuto a pH 7.4 y 25 °C.

Cuadro n° 10. Ensayo de actividad caspasa-3.

Orden de adición	1°	2°	3°
	Tampón de reacción	Lisado celular	Sustrato peptídico
Blanco de reactivos	990 μl	--	10 μl
Células no inducidas	980 μl	10 μl	10 μl
Células inducidas	980 μl	10 μl	10 μl

A.2.2 Actividad antiproliferativa

- Líneas celulares Caco-2 y HT-29

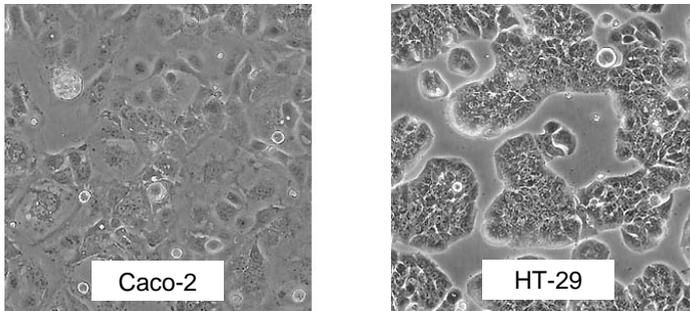
Las células Caco-2 se utilizan entre los pases 53-62, y crecen y se mantienen en las condiciones previamente mencionadas (Apartado A.2.1).

Las células HT-29 proceden de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC, n° HTB-38, Rockville, MD, USA) y se usan entre los pases 6-12. Crecen en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM+GlutaMAXTM-I) conteniendo 4.5 g/L glucosa y piruvato sódico, y suplementado con el resto de componentes antes indicados para las células Caco-2 (ver apartado A.2.1).

Posteriormente, las células se siembran a una densidad de 5×10^4 células viables cm^{-2} en placas de 6 pocillos y se incuban a 37 °C, en atmósfera con 95% de humedad relativa y con un flujo de CO₂ de 5%. El medio de cultivo es cambiado cada 2 días.

Ambas líneas celulares se utilizan en los ensayos de actividad antiproliferativa al 3^{er} día postsiembra. Son células subconfluentes indiferenciadas como modelo de células de cáncer de colon (Bermúdez-Soto et al., 2007). Las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas, así como el blanco de digestión, previamente a su preincubación con las células, se esterilizan por filtración (0.2 μm). Se ensayan concentraciones subtóxicas (2%, 5% y 7.5% v/v de fracción bioaccesible en medio de cultivo) en exposiciones repetitivas de 4 horas al día durante 4 días consecutivos. Tras cada período de 4 h de incubación, el medio de cultivo se elimina y se adiciona medio nuevo. Las concentraciones de fracciones bioaccesibles se seleccionan basándose en el pH (7-7.5) y osmolalidad (0.28-0.33 osmol/L), que son compatibles con la viabilidad celular. Además, se ensayan las mismas concentraciones de fracciones bioaccesibles durante un período de incubación de 24 h.

Figura n° 11. Líneas celulares (Caco-2 y HT-29) utilizadas en los ensayos de actividad antiproliferativa.



- *Viabilidad e inhibición de la proliferación celular*

La viabilidad y proliferación celular se determina mediante tinción con azul tripán (técnica de exclusión de colorante). Este ensayo permite determinar viabilidad y proliferación celular evaluando la integridad de membrana celular. Distingue entre células vivas y muertas, ya que el azul tripán sólo penetra en células muertas/no viables.

Se retira el medio de cultivo y las células se despegan con disolución de Tripsina-EDTA. A continuación, se agita bien la suspensión celular y se pipetea volúmenes iguales de la suspensión celular y de la disolución de azul tripán en un tubo Eppendorf. Tras agitar la mezcla, se transfiere una alícuota a uno de los compartimentos de una cámara Neubauer. Se cuentan, mediante microscopio invertido, células totales (vivas y muertas), así como células teñidas (muertas). Para un recuento más exacto pueden contarse las cuatro regiones de la cámara y obtener la media aritmética de los recuentos.

Los porcentajes de viabilidad celular y de inhibición de la proliferación celular se calculan mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ células viables}}{\text{n}^\circ \text{ células totales}} \right) \times 100$$

$$\text{Inhibición proliferación (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ células totales (muestras)}}{\text{n}^\circ \text{ células totales (blanco)}} \right) \times 100$$

- *Funcionalidad mitocondrial (test MTT)*

Se realiza como se ha indicado anteriormente en el apartado A.2.1.

- *Ciclo celular: análisis del contenido de ADN*

Para el análisis del contenido de ADN celular, las células se suspenden a una concentración de medio a un millón de células por ml en PBS. Para fijar las células se toman 100 μl de la suspensión celular a la que se añade 1 ml de EtOH-PBS a 4 $^\circ\text{C}$ y se mantiene durante 30 minutos a 4 $^\circ\text{C}$. Las células se centrifugan 5 minutos a 1.500 rpm y se descarta al sobrenadante. A continuación, se resuspenden las células en 400 μl de PBS al que se le añaden 50 μl de la disolución de RNasa A (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 50 μl de la disolución de IP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Tras la adición de RNasa A y IP, las células se incuban a 37 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos y se analizan mediante citometría de flujo utilizando $\lambda_{\text{excitación}} = 536 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 617 \text{ nm}$.

- *Expresión de ciclinas*

Las ciclinas son proteínas que regulan la transición entre las distintas fases del ciclo celular. Para su determinación se utiliza la técnica de expresión de proteínas Western Blot.

Se lavan las células dos veces con PBS a 4 °C y se lisan con tampón de lisis recogiéndolas con un rascador de células en tubos Eppendorf. Se centrifuga a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C tomando el sobrenadante y determinando la cantidad de proteína por el método Bradford (1976).

Para determinar las ciclinas D1 y B1, se utilizan 40 µg proteína/banda. Por su parte, el anticuerpo anti-GAPDH se usa para monitorizar la carga proteica total. Las proteínas se separan en geles de 10-12% de acrilamida SDS-PAGE y se transfieren a membranas de PVDF. A continuación, las membranas se incuban dos horas con los anticuerpos primarios anti-ciclinas D1 y B1, y una hora con el anticuerpo secundario. Las proteínas se detectan usando el sistema ECL plus. La cuantificación de la densidad de las bandas se realiza por medio de un densitómetro usando el software Syngene Genetools Analysis (Syngene, MA, USA).

- *Apoptosis*

a) *Tinción con Hoescht.*

La técnica se basa en la tinción de las células con el colorante Hoescht y posterior evaluación morfológica de los núcleos celulares mediante microscopía de fluorescencia. Este colorante es permeable a la

membrana celular y tiñe el ADN intercalándose en las regiones ricas en adenina y timina. Con esta tinción, la cromatina condensada de los núcleos de las células apoptóticas se observa de un blanco intenso, formando subgrupos de forma esférica o en cresta (Larrosa e tal., 2006).

Para la visualización de los núcleos celulares, las células se fijan con MeOH-ácido acético (3:1, v/v). En un primer paso, se sustituye la mitad del medio celular por esta mezcla y se deja actuar 15 minutos. Pasado este tiempo se retira el fijador y se dejan secar las placas. A continuación, las células se tiñen con Hoescht durante 20 minutos en oscuridad. Como control positivo de apoptosis se utiliza staurosporina 10 μ M. El exceso de colorante se elimina lavando las muestras con agua destilada y una vez secas se observan en un microscopio de fluorescencia a $\lambda_{\text{excitación}} = 346 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 460 \text{ nm}$.

Figura n° 12. Condensación de cromatina en una célula apoptótica.



b) Tinción fluorescente con yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína.

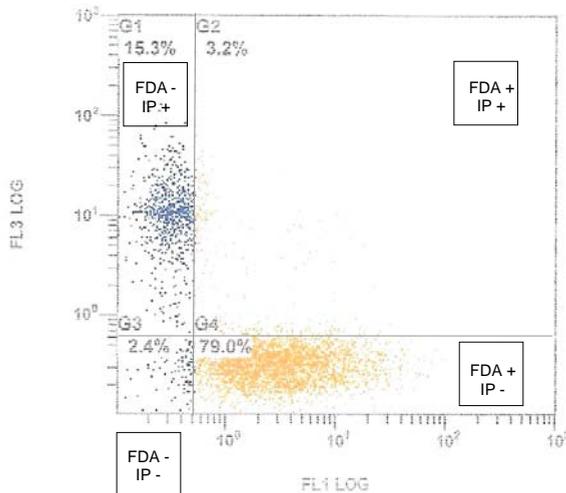
Mediante citometría de flujo se puede caracterizar las células vivas o muertas de una población celular usando colorantes vitales como el yoduro

de propidio (IP) (colorante de ácidos nucleicos que penetra en las células muertas y las tiñe con fluorescencia roja) y el diacetato de fluoresceína (FDA) (colorante tomado por las células vivas cuyas esterasas lo hidrolizan a fluoresceína que emite fluorescencia verde) (Sandström et al., 2000).

Se retira el medio de cultivo y las células se despegan con disolución de Tripsina-EDTA. Se lavan dos veces con tampón PBS (conteniendo 2% de suero bovino fetal) y las células se resuspenden con 200 μ l del anterior o tampón. A continuación las células se tratan con 30 μ l FDA/ml suspensión celular y 20 μ l IP/ml suspensión celular. Se incuban a 37 °C en oscuridad 30 minutos y se mantienen a 0 °C (en hielo) hasta su análisis por citometría. Como control positivo de apoptosis se utiliza staurosporina 4.6 μ M. Las longitudes de onda para FDA son $\lambda_{\text{excitación}} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 525 \text{ nm}$, mientras que para IP son $\lambda_{\text{excitación}} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 620 \text{ nm}$.

En el cuadrante inferior derecho (G4) (ver figura nº 13) se sitúan las células viables (teñidas sólo con FDA; FDA+, IP-), en el cuadrante inferior izquierdo (G3) se encuentran células no teñidas (FDA-, IP-), en el cuadrante superior izquierdo (G1) se hallan células muertas (teñidas con IP; FDA-, IP+) y en el cuadrante superior derecho (G2) se sitúan las células apoptóticas (doble tinción con FDA y IP; FDA+, IP+). La suma de las regiones G2, G3 y G4 se corresponden con los valores de viabilidad (células viables) obtenidos mediante tinción con azul tripán

Figura nº 13. Distribución de la población celular según el ensayo diacetato de fluoresceína- yoduro de propidio (FDA-IP).



A.2.3 Biodisponibilidad y metabolismo *in vitro* de polifenoles mayoritarios

Para conocer las biodisponibilidad y metabolismo resultante de los principales polifenoles presentes en las bebidas a base de zumo de frutas se utilizan las células Caco-2. Las determinaciones realizadas en el medio de cultivo informan sobre el metabolismo de los polifenoles, mientras que las determinaciones en las células informan sobre metabolismo y captación.

Para la identificación y determinación de metabolitos de los polifenoles mayoritarios presentes en las fracciones bioaccesibles de las muestras en células Caco-2, éstas se siembran en placas Petri de 9 cm de diámetro, a razón de 1 millón de células por placa, hasta alcanzar un 80% de confluencia. Seguidamente, a las células se les adiciona las fracciones bioaccesibles de las muestras objeto de estudio a una concentración de 7.5%

(v/v) en medio de cultivo EMEM sin rojo fenol. La exposición es a razón de 4h diarias durante 4 días consecutivos, ó 24h y 48h. Tras los períodos de exposición se recoge el medio de cultivo de las placas y las células se lavan dos veces con PBS, se lisan con 2 ml de MeOH y se recogen con un rascador. La suspensión celular se sonica 5 minutos (en hielo) y el MeOH se evapora en rotavapor a 40 °C. La muestra obtenida se filtra (filtro de 0.45 µm) y se inyecta 100 µl en el HPLC-DAD-MS/MS con las condiciones instrumentales descritas en el apartado A.1.

Por otro lado, el medio recogido se acidifica con ácido fórmico (1.5% concentración final en el medio) y se filtra a través de cartuchos Sep-Pak previamente activados con metanol. Las fracciones metanólicas obtenidas se reúnen, se concentran en rotavapor a 40 °C y se inyecta una alícuota de 100 µl en el HPLC-DAD-MS/MS.

A.3 Ensayos in vivo

- *Estudio de intervención en humanos*

a) *Sujetos de estudio*

Para la evaluación *in vivo* de las bebidas objeto de estudio, se selecciona una población de mujeres sanas, por muestreo no-probabilístico (voluntarias), con edades comprendidas entre 20-30 años (n = 32). Las voluntarias presentan valores de I.M.C. de $21.29 \pm 2.89 \text{ kg/m}^2$ clasificación

normal según la O.M.S.
(http://www.euro.who.int/nutrition/20030507_1language=french).

Todas ellas presentan hábitos de vida saludable, no son fumadoras, ni bebedoras habituales y su perfil bioquímico es normal, siendo su status nutricional en hierro “marginal” o bajo, pero sin presencia de síntomas bioquímicos-clínicos de deficiencia (Hemoglobina <120 g/L; VCM <80 fL) (Institute of Medicine, 2001).

Como criterios de exclusión se consideran: presencia de enfermedades que pudieran influir en la biodisponibilidad de carotenoides, vitaminas y/o minerales, un perfil bioquímico/hematológico compatible con deficiencia bioquímica-clínica de hierro, así como embarazo.

El protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Puerta de Hierro (Madrid), y cada participante firmó el consentimiento informado para la participación en el estudio.

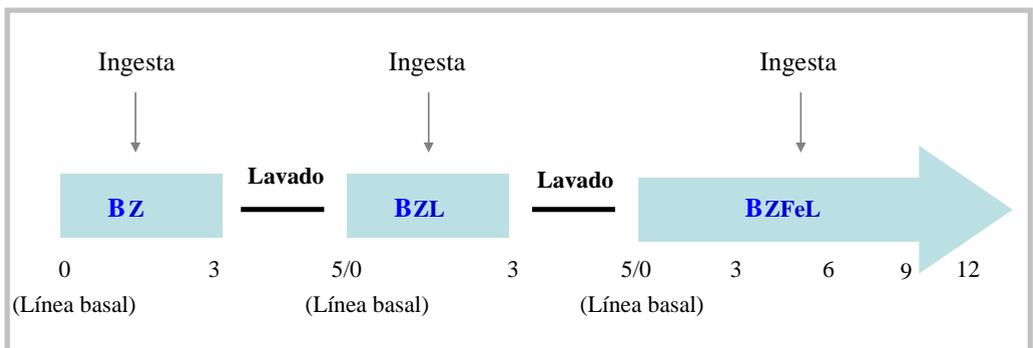
b) Diseño del estudio de intervención

La cantidad de bebida a base de zumo de frutas suministrada (tetrabrick de 250 ml/ 2 veces al día) es equivalente al consumo de 2-4 raciones de fruta/día, compatible con los hábitos y patrones dietéticos propios de una dieta variada y, por tanto, sin impacto significativo sobre la ingesta energética total del sujeto. Las cantidades máximas de hierro suplementadas (500 ml bebida/día) corresponden a 15 mg de hierro/día, cantidad que supone un 83 % del valor indicado por las Recomendaciones de Ingesta Diaria (18 mg/día) en mujeres con edad comprendida entre 19 y 30 años (Food & Nutrition Board, 2004).

Durante el estudio, las participantes no deben hacer grandes cambios en su dieta o estilo de vida, a excepción de evitar consumir las frutas base de las bebidas (naranja, mandarina, uva, melocotón y albaricoque). El cumplimiento de esta norma se valora al principio y durante el estudio, coincidiendo con la toma de muestras de sangre (cada 21 días), mediante la evaluación de los registros de dieta semanales que han de cumplimentar los participantes.

En el estudio de intervención, cada sujeto toma una de las 3 bebidas (BZ, BZL y BZFeL) en 3 períodos (estudio 1, estudio 2 y estudio 3, respectivamente). Los individuos toman las bebidas a base de zumo de frutas BZ y BZL durante 3 semanas ó 12 semanas en el caso de BZLFe, con un período de lavado de 2 semanas entre tratamientos. Para el estudio 3 (BZFeL) se requiere un mayor tiempo de suplementación para poder observar cambios en el estatus de hierro. En la figura nº 14 se indica el estudio de intervención a lo largo del tiempo.

Figura nº 14. Diseño del estudio de intervención.



Los números indican semanas y se corresponden con los puntos de extracción de sangre. El final del período de lavado coincide con el inicio del segundo y tercer estudio, respectivamente.

c) Protocolo de extracción y preparación de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtienen en los tiempos indicados en la figura nº 14, por extracción antecubital en ayunas (> 8 horas) y se recogen en vacutainers con EDTA-K₃ como anticoagulante.

Para las muestras de eritrocitos, 1 ml de sangre con anticoagulante se lava con suero salino fisiológico (NaCl al 0.9%) para evitar la lisis de las mismas, y se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos para eliminar la fracción plasmática remanente. Las muestras de eritrocitos se almacenan a -20 °C hasta su análisis.

Las muestras de suero se obtienen a partir de la sangre extraída y recogida sin anticoagulante. Tras la coagulación, las muestras se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero que se almacena a -80 °C hasta su análisis.

- Capacidad antioxidante total sérica (métodos ORAC y TEAC)

Para el análisis de la capacidad antioxidante total sérica, las muestras (suero) se diluyen 750 veces con tampón fosfato 75 mM a pH 7 para el ensayo ORAC, y 25 veces con agua desionizada para el ensayo TEAC. El procedimiento se describe en el apartado A.1.

- Actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria

La determinación de la actividad SOD eritrocitaria se realiza según se ha descrito en el apartado A.2.1 con ligeras modificaciones.

Se adiciona agua desionizada al tubo de ensayo que contiene los eritrocitos, hasta un volumen de 2 ml, y se agita para provocar su hemólisis completa. Se deja reposar 15 minutos a 4 °C, para favorecer la sedimentación de los restos de membranas celulares. Finalmente, el lisado se diluye con tampón fosfato 0.01 M (dilución 1/25) y se mide la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro UV-VIS termostatzado a 37 °C. Los resultados de actividad enzimática SOD se expresan como U/g Hb. Para ello es necesario determinar la concentración de hemoglobina en sangre completa.

- Determinación de hemoglobina eritrocitaria (método Drabkin)

El cianuro potásico oxida la hemoglobina a metahemoglobina que, por acción del ferricianuro potásico se transforma en cianometahemoglobina, compuesto que presenta un máximo de absorbancia a 546 nm (García-García-Saavedra, 1995).

Se adicionan a una cubeta espectrofotométrica que contiene 1 ml del reactivo de Drabkin diluído 20 µl de una disolución compuesta por 50 µl eritrocitos y 450 µl de agua desionizada. Se homogeniza por inversión y se deja reposar 20 minutos. Posteriormente, se mide la absorbancia a 546 nm, utilizando como blanco el reactivo de Drabkin diluído. La concentración de hemoglobina eritrocitaria se calcula del siguiente modo:

$$c^* = A/\varepsilon \cdot b$$

Donde:

c = concentración de hemoglobina en mol/L

A = absorbancia de la muestra

ε = coeficiente de extinción molar de la hemoglobina = 1.15×10^4 L/cm/mol

b= anchura de la cubeta espectrofotométrica = 1 cm

Finalmente, la concentración de hemoglobina en eritrocitos expresada en g/L, se obtiene aplicando a las muestras la expresión:

$$[\text{Hb}]_{\text{g/L}} = A_{546 \text{ nm}} \times 732.62$$

B. Estudio de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad mineral de hierro y cinc mediante ensayos *in vitro*

B.1 Contenido mineral (Fe y Zn)

Los contenidos de hierro y cinc de las bebidas a base de zumo de frutas analizados, así como de sus fracciones bioaccesibles obtenidas tras digestión gastrointestinal simulada se determinan por espectrofotometría de absorción atómica con detección de llama (EAA-llama) previa destrucción de la materia orgánica.

a) Destrucción de la materia orgánica

Las bebidas a base de zumo de frutas y sus fracciones bioaccesibles se introducen en vasos de precipitados de 100 ml y se llevan a sequedad en placa calefactora. Posteriormente se introducen en horno mufla con un incremento gradual de temperatura hasta alcanzar 450 °C, que se mantiene durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se retiran los vasos de la mufla, se dejan enfriar a T^a ambiente, se adiciona 1 ml de HNO₃ 65% (v/v), se llevan a sequedad en placa calefactora y se introducen de nuevo en la mufla a 450 °C (24 h) hasta la obtención de cenizas blancas. Las cenizas se disuelven con 2 ml de HCl fumante. Los vasos de precipitados se cubren con vidrios de reloj y se llevan a placa calefactora a una temperatura inferior a 70 °C durante tres horas y media. A continuación se adicionan otros 2 ml de HCl, se retiran los vidrios de reloj y los vasos se mantienen en la placa calefactora

hasta que el volumen se reduce aproximadamente a 1 ml, completando entonces a 10 ml con agua desionizada.

Control de contaminación: todo el material de vidrio utilizado en la determinación del contenido mineral se lava con agua y detergente; una vez limpio, se deja en contacto con HNO₃ 65% v/v, durante 15 minutos y se enjuaga tres veces con agua desionizada. De esta manera nos aseguramos un material libre de posibles interferentes.

b) Determinación mineral

Los contenidos de hierro y cinc de las muestras (bebidas a base de zumo de frutas y fracciones bioaccesibles) se determinan, una vez disueltas las cenizas, en un espectrofotómetro de absorción atómica con llama. En el cuadro n° 11 se indican las condiciones instrumentales para la determinación de hierro y cinc por EAA-llama.

Cuadro n° 11. Condiciones instrumentales para la determinación de hierro y cinc por EAA-llama.

	Hierro	Cinc
Longitud de onda (nm)	248.3	213.9
Rendija (nm)	0.7	0.2
Intensidad de lámpara (mA)	30	15
Flujo de aspiración (ml/min)	4	4
Flujo de acetileno (l/min)	2	2
Flujo de aire (l/min)	15.5	15.5
Nebulizador	Bola de impacto	

B.1.1 Bioaccesibilidad mineral (Fe y Zn)

La obtención de las fracciones bioaccesibles de las muestras objeto de estudio, se ha descrito al inicio del apartado 3 (Métodos de Análisis).

El porcentaje de bioaccesibilidad se calcula como:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = 100 \times S / C$$

siendo S el contenido de Fe y/o Zn de la fracción bioaccesible (muestra) y C el contenido total de Fe y/o Zn en la muestra ($\mu\text{g/g}$ muestra).

B.1.2 Captación de Fe en células Caco-2 (síntesis de ferritina)

El contenido intracelular de hierro regula de forma directa la síntesis de ferritina. A su vez, la ferritina actúa como un almacén intracelular citosólico de hierro (Glahn et al., 1998). Para la determinación del contenido de ferritina intracelular se utiliza un kit basado en un enzimoimmunoensayo (ELISA) acoplado a un detector UV-vis.

Las células Caco-2 se siembran en placas de cultivos de 6 pocillos a la densidad de 50.000 células/cm². Para favorecer la captación de hierro, las células se mantienen en medio de cultivo deficitario en dicho mineral. Para ello se procede a desmineralizar el suero bovino fetal, componente que aporta la mayor cantidad de hierro al medio, siguiendo el procedimiento descrito por Álvarez-Hernández et al., 1991. Cincuenta mililitros de suero bovino fetal se desmineralizan por agitación con 15 g de resina Chelex durante 2 h a pH 4.5. Posteriormente, se incrementa el pH a 7.4 con NaOH, se deja en reposo durante toda la noche y la mezcla se filtra a través de papel de filtro. El filtrado se esteriliza mediante un filtro de membrana de 0.2 µm de diámetro de poro.

Una vez el cultivo ha alcanzado la diferenciación celular (15-18 días post-siembra), se aspira el medio, y la monocapa celular se lava 3 veces con PBS a 37 °C. Se adiciona en cada pocillo 1 ml de fracción bioaccesible de las muestras objeto de estudio junto con 1 ml del medio de cultivo ó 2 ml de medio de cultivo (blanco) a 37 °C y las placas se incuban 2 horas a 37 °C, 5% CO₂ y 95% humedad relativa. A continuación se retira la solución

añadida a las células y se reemplaza por 2 ml de medio de cultivo, y se vuelve a introducir en el incubador otras 22 h.

Posteriormente, la monocapa celular se lava 3 veces con PBS (37 °C), las células se tripsinizan con tripsina-EDTA y se recogen con 2 ml de agua desionizada. La suspensión celular se homogeniza en un Polytron[®] a 17.000 rpm durante 3 minutos a 4 °C.

Para el ensayo ELISA se usa un kit con anticuerpos de ferritina humana conjugada con fosfatasa alcalina. Ésta reacciona con una disolución sustrato que consiste en fenilfosfato disódico y 4-amino-antipirina. Para el desarrollo del color se adiciona ferrocianuro potásico y se mide la densidad óptica a 500 ± 10 nm usando el lector de placas VICTOR³.

Para expresar el contenido de ferritina en función de la cantidad de proteína celular (ng ferritina/mg proteína celular), se determina el contenido proteico de la monocapa celular por el método Lowry descrito en el apartado A.2.1 (Contenido intracelular de glutatión reducido (GSH)).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los diferentes ensayos, se realiza aplicando los programas informáticos Statgraphics Plus v. 5.1 (Rockville, MD, USA) y SPSS v.15.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En todos los casos los niveles de significación se ajustan a un nivel de probabilidad del 95 % ($p < 0.05$).

Para el estudio del efecto del almacenamiento en refrigeración y de la digestión gastrointestinal simulada sobre la capacidad antioxidante total, vitamina C y polifenoles de los zumos de frutas se aplica un ANOVA de

dos factores (almacenamiento: tiempo (0, 45, 90, 135 días) y formulación; digestión: tipo de muestra (digerida o no) y formulación) y un test de Tukey.

En los estudios de citoprotección se utiliza un ANOVA de un factor seguido de los tests Tukey o LSD para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.

Por su parte, en los estudios de actividad antiproliferativa se utiliza el test de la t de Student, salvo en el caso de la cuantificación de polifenoles en que se aplica un ANOVA de un factor seguido del test de Tukey.

En el caso del estudio de intervención con humanos en donde se determina la capacidad antioxidante total sérica y la actividad SOD eritrocitaria, se realiza un ANOVA de medidas repetidas de 2 factores (factor tiempo: 0, 3 semanas para los estudios 1 y 2 (BZ y BZL), ó 12 semanas para el estudio 3 (BZFeL); factor estudio: 1, 2 y 3) y un ANOVA de medidas repetidas para el estudio 3 (factor tiempo: 0, 3, 6, 9 y 12 semanas). Para comprobar la distribución normal de los datos se aplica el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lillefors. Las interacciones entre tiempo y tipo de intervención (estudio) también se incluyen en el modelo. En caso de que alguna interacción sea significativa, la comparación se realiza por pares usando el ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni.

A los datos obtenidos de bioaccesibilidad mineral y síntesis de ferritina se aplica un ANOVA de un factor y el test de Tukey.

Resultados y Discusión

Los resultados y discusión se exponen en base a los objetivos previamente indicados.

A. Evaluación de la funcionalidad de una bebida a base de zumo de frutas rica en antioxidantes suplementada o no con hierro y cinc y/o leche.

1. Propiedades antioxidantes de las bebidas a base de zumo de frutas durante el almacenamiento en refrigeración y tras una digestión gastrointestinal simulada.

a) Almacenamiento en refrigeración

- Capacidad antioxidante total (CAT)

En el cuadro nº 12, se muestran los valores de CAT de las bebidas a base de zumo de frutas almacenadas en refrigeración (2-4 °C) durante el periodo de estudio (135 días) determinados mediante los métodos ORAC y TEAC.

Cuadro nº 12. Bebidas a base de zumo de frutas: capacidad antioxidante total (métodos ORAC y TEAC) durante el almacenamiento en refrigeración.

	ORAC				TEAC			
	0 días	45 días	90 días	135 días	0 días	45 días	90 días	135 días
BZ	9299 ± 539	7254 ± 225	4116 ± 72	9607 ± 256	5756 ± 185	5789 ± 168	5608 ± 346	6072 ± 348
BZFe	9087 ± 1198	7340 ± 140	3402 ± 996	7725 ± 107	4942 ± 425	5044 ± 273	4807 ± 969	5737 ± 237
BZZn	9564 ± 8	8308 ± 511	4731 ± 29	9128 ± 1165	5748 ± 371	5633 ± 326	5376 ± 445	6239 ± 313
BZFeZn	10025 ± 677	7072 ± 498	6418 ± 314	8467 ± 97	5831 ± 377	5519 ± 161	4648 ± 743	6242 ± 51
BZL	6617 ± 832	7285 ± 256	6396 ± 276	9390 ± 614	5314 ± 1498	5673 ± 95	4610 ± 678	6086 ± 644
BZFeL	6211 ± 796	7912 ± 1279	5235 ± 398	8258 ± 1160	3567 ± 461	5040 ± 536	4590 ± 23	4323 ± 25
BZZnL	4896 ± 319	6913 ± 598	7064 ± 434	10506 ± 1675	4064 ± 1724	5061 ± 73	4477 ± 539	5827 ± 436
BZFeZnL	4956 ± 610	6816 ± 657	6380 ± 206	9454 ± 1225	4224 ± 912	4740 ± 397	4821 ± 586	4743 ± 1344

Las unidades se expresan como μM Trolox [media \pm desviación estándar (n = 3)].

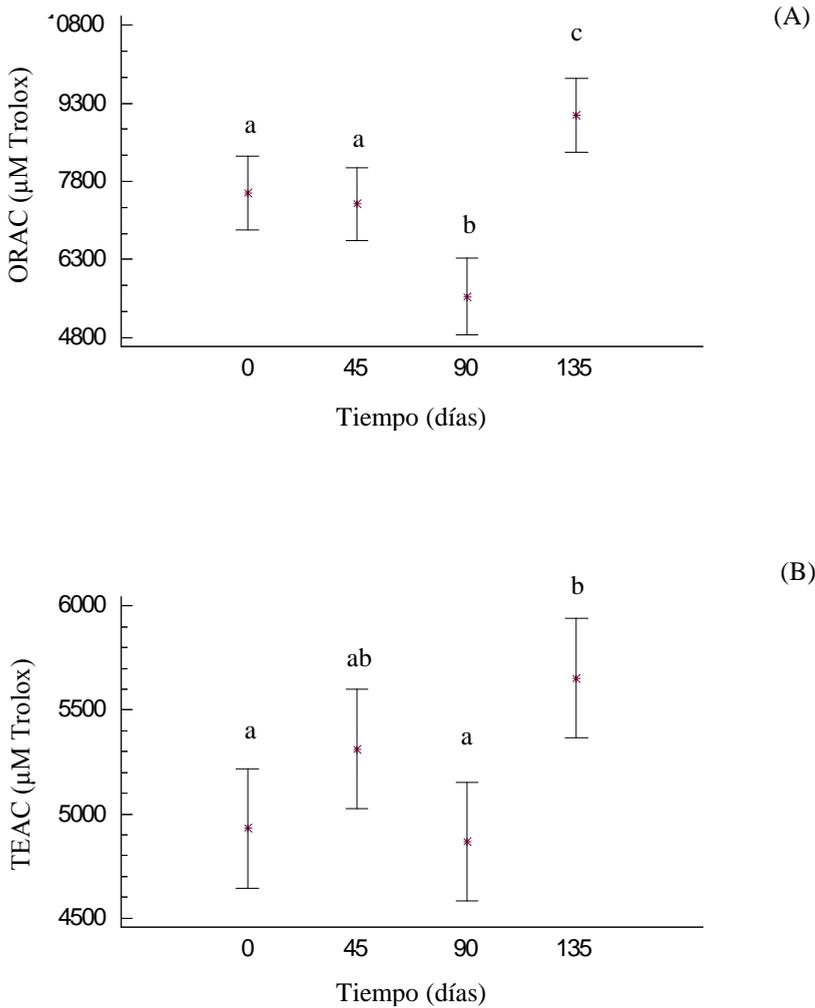
Los valores de CAT de las bebidas a base de zumo de frutas obtenidos a tiempo cero se hayan comprendidos en los intervalos 4896-10025 y 3567-5831 μM Trolox para los métodos ORAC y TEAC, respectivamente. Al comparar estos valores con los obtenidos en la bibliografía (Miller & Rice-Evans, 1997; Arena et al., 2001; Pellegrini et al., 2003; Wang et al., 1998) en diversos zumos de frutas mediante los métodos ORAC (3000-14900 μM Trolox) y TEAC (2190-5830 μM Trolox), se observa que nuestros resultados están incluidos en dichos intervalos. No obstante, no es posible realizar una comparación adecuada ya que no se dispone de información relativa a la misma mezcla de zumos de frutas (uva-naranja-melocotón) utilizadas en el presente trabajo, ni de la misma metodología (longitud de onda, tiempo de análisis y generador de radicales). Además, debe destacarse que los valores obtenidos con los métodos ORAC y TEAC sólo deben compararse cuando se utiliza el mismo método con el mismo disolvente (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

Al comparar ambos métodos, se observa una correlación lineal débil ($r = 0.460$, $p = 0.002$) entre ellos. Este hecho se corresponde con la ausencia de correlación entre los métodos ORAC y TEAC indicada por Cao & Prior (1998), ya que utilizan distintos mecanismos de reacción (HAT y ET, respectivamente) para cada método. Asimismo, nótese que en el presente estudio los valores de CAT son superiores con el método ORAC vs TEAC, hecho constatado por otros autores en zumos de frutas suplementados con leche (Skrede et al., 2004; Zulueta et al., 2008).

La leche desnatada, en la proporción presente en las bebidas (11% v/v), proporciona valores de CAT de 854.3 ± 115.9 y 461.0 ± 14.4 μM Trolox con los métodos ORAC y TEAC, respectivamente, por lo que cabría

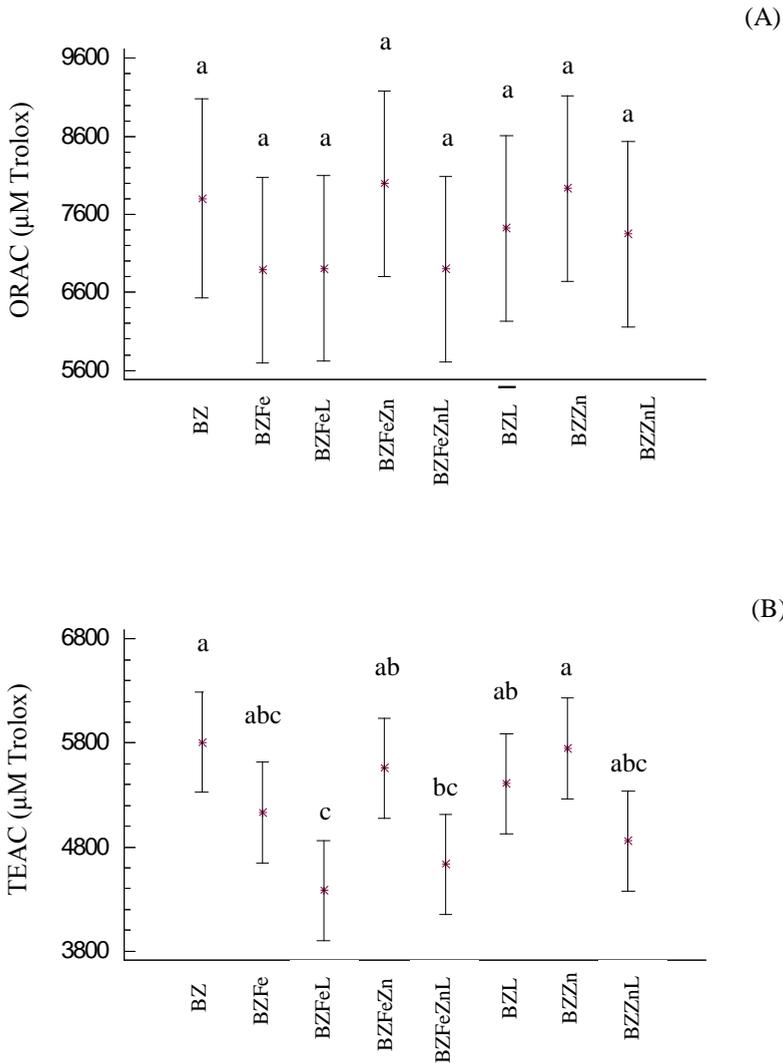
esperar un aumento en la CAT en las muestras conteniendo leche. A pesar de las propiedades antioxidantes descritas para la leche (Chen et al., 2003), las muestras que la contienen son las que presentan una menor CAT a tiempo cero. En este sentido, se han descrito interacciones entre los polifenoles y las proteínas de la leche en bebidas tales como té verde y té negro (Arts et al., 2002) y café (Dupas et al., 2006a). En té verde y té negro se ha descrito un enmascaramiento de la capacidad antioxidante debido a las interacciones entre los grupos prolina de la β -caseína y los grupos hidroxilo de la catequina, mientras que en el caso del café, las interacciones entre el ácido clorogénico y la leche no han mostrado un efecto significativo en la CAT.

Figura n° 15. Evolución de la capacidad antioxidante total durante el almacenamiento determinado por los métodos ORAC (A) y TEAC (B). Intervalos de las medias de los valores obtenidos en los cuatro periodos de estudio independientemente de la formulación de la muestra. Test de Tukey ($p < 0.05$). Los valores son media \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.



Resultados y discusión

Figura n° 16. Capacidad antioxidante total, de acuerdo a la formulación, determinada por los métodos ORAC (A) y TEAC (B). Intervalos de las medias de los valores obtenidos en las ocho formulaciones del estudio independientemente del tiempo de almacenamiento. Test de Tukey ($p < 0.05$). Los valores son media \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.



En la figura nº 15 se muestra la evolución de la capacidad antioxidante determinada por los métodos ORAC (15a) y TEAC (15b) durante el almacenamiento, considerando de manera conjunta todas las muestras. Se observa un incremento de la CAT estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con ambos métodos (16.4% y 12.8% para ORAC y TEAC, respectivamente) al final del periodo de vida útil del producto (135 días) vs al producto recién fabricado (0 días).

Este incremento podría ser debido a la mejora en las propiedades antioxidantes de compuestos presentes en las bebidas (p. ej. los polifenoles que han sufrido oxidación química o enzimática muestran mayor capacidad antioxidante en estados intermedios de oxidación frente a los no oxidados, debido a la mayor capacidad para donar un radical hidrógeno de los grupos hidroxilo del anillo aromático y/o a la capacidad del anillo aromático de soportar el electrón desapareado mediante deslocalización en su estructura resonante (Nicoli et al., 1999)). Además, según Pinelo et al. (2004), un incremento en la capacidad antioxidante podría justificarse por la elevada tendencia que presentan los polifenoles de sufrir reacciones de polimerización, mediante las cuales, los oligómeros formados poseen disponibles áreas mayores para soportar la deslocalización electrónica. Junto a ello, también debe considerarse la formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante (p. ej. formación de productos finales de la reacción de Maillard formados durante el almacenamiento prolongado con capacidad antioxidante (Nicoli et al., 1999; Lee, 1992; Klimczak et al., 2007)). En este sentido, Del Caro et al. (2004) encuentran un aumento en los valores TEAC en zumos de pomelo tras 15 días de almacenamiento en refrigeración, hecho

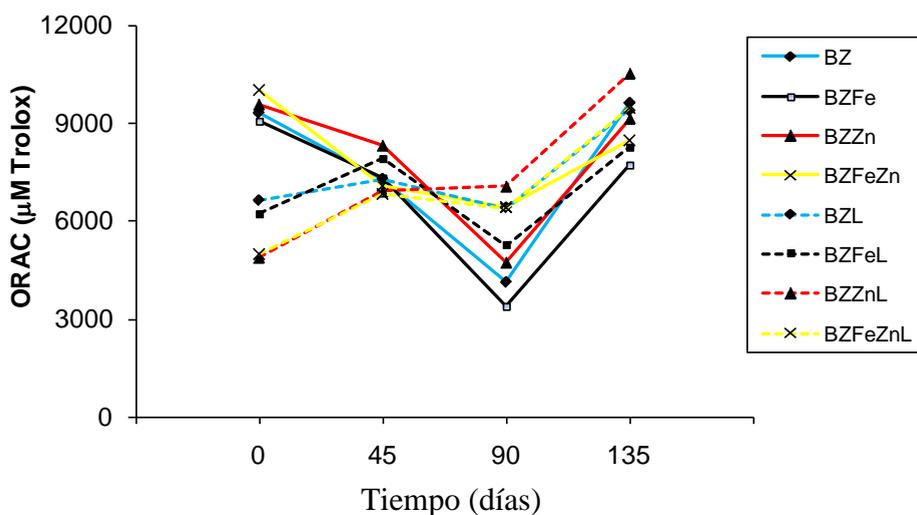
que atribuyen a la presencia de polifenoles en estados intermedios de oxidación o a la formación *de novo* de ácidos hidroxicinámicos.

Durante el periodo de almacenamiento ($t = 0$ a $t = 135$ días) se observan fluctuaciones en la CAT (ver figura nº 15). Se han mostrado variaciones en el contenido de flavonoides (Del Caro et al., 2004) así como en el contenido total de polifenoles (Piljac-Zegarac et al. 2009) en distintos zumos de frutas durante su almacenamiento en refrigeración; hecho que podría explicar los cambios descritos anteriormente para la capacidad antioxidante. Cuando la polimerización de polifenoles excede un valor crítico, puede producirse un descenso en la capacidad antirradicalaria debido a la complejidad molecular y al impedimento estérico, factores que disminuirían la disponibilidad de los grupos responsables de la capacidad antioxidante, los grupos hidroxilo (Pinelo et al., 2004). En un estudio llevado a cabo con zumo de naranja almacenado 6 meses a 18 °C (Klimczak et al., 2007) también se han observado fluctuaciones en los polifenoles totales y en la capacidad antioxidante. El descenso en la capacidad antioxidante se asocia a la disminución en el contenido de compuestos polifenólicos y de vitamina C, mientras que el incremento de la CAT se relaciona a la formación de productos finales de la reacción de Maillard.

En la figura nº 16, al considerar la formulación de las muestras independientemente del periodo de almacenamiento, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la CAT determinada por el método ORAC (16a), y sí en algunos casos con el método TEAC (16b), aunque no siguen una pauta clara.

En la figura n° 17, se muestra la interacción entre los factores tiempo de almacenamiento y formulación de muestras, en el caso de la determinación por ORAC.

Figura n° 17. Bebidas a base de zumo de frutas: interacción entre los factores tiempo de almacenamiento y formulación.



La interacción se manifiesta entre el periodo inicial y a los 45 días de almacenamiento. En este intervalo de tiempo (de 0 a 45 días), se observa que la CAT de las muestras con leche aumenta mientras que en las que no la contienen disminuye.

La suplementación mineral de las muestras con hierro y/o cinc, no influye sobre la CAT. Se ha descrito un efecto antioxidante para el cinc debido a la protección que ejerce sobre los grupos sulfhidrilo de las proteínas, así como reducción del radical $\text{OH}\cdot$ a H_2O_2 por antagonismo con

metales de transición tales como hierro y cobre (Powell, 2000). Para el hierro, se han descrito efectos pro-oxidantes por su participación en reacciones tipo Fenton (Herbert et al., 1996), o como consecuencia de las interacciones hierro-polifenoles tanto con hierro en estado ferroso como férrico disminuyendo la capacidad antioxidante en vino tinto (Argyri et al., 2006) y té verde (Alexandropoulou et al., 2006).

Los principales componentes presentes en la bebidas a base de zumo de frutas objeto de estudio que influyen en su capacidad antioxidante son el ácido ascórbico y los polifenoles.

- Ácido ascórbico

La evolución del contenido en ácido ascórbico de las muestras en el almacenamiento se indica en el cuadro nº 13.

Cuadro n° 13. Bebidas a base de zumo de frutas: contenido de ácido ascórbico (mg/mL) a lo largo del almacenamiento en refrigeración.

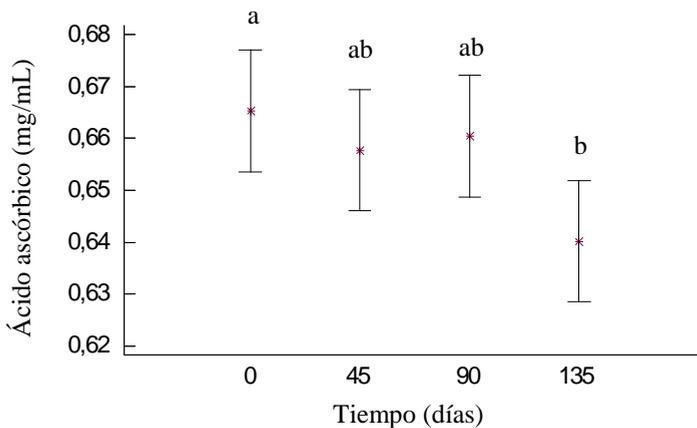
	0 días	45 días	90 días	135 días
BZ	0.662 ± 0.004	0.666 ± 0.008	0.673 ± 0.015	0.617 ± 0.052
BZFe	0.653 ± 0.008	0.633 ± 0.018	0.629 ± 0.084	0.622 ± 0.055
BZZn	0.668 ± 0.001	0.666 ± 0.002	0.671 ± 0.005	0.662 ± 0.012
BZFeZn	0.664 ± 0.002	0.655 ± 0.002	0.633 ± 0.000	0.682 ± 0.008
BZL	0.662 ± 0.008	0.660 ± 0.005	0.686 ± 0.002	0.644 ± 0.014
BZFeL	0.670 ± 0.001	0.658 ± 0.007	0.637 ± 0.005	0.608 ± 0.020
BZZnL	0.665 ± 0.002	0.678 ± 0.002	0.686 ± 0.002	0.660 ± 0.009
BZFeZnL	0.671 ± 0.000	0.645 ± 0.011	0.639 ± 0.008	0.625 ± 0.094

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3).

El mayor contenido de ácido ascórbico encontrado en las muestras analizadas, frente al contenido declarado por el fabricante, responde a la práctica habitual en la industria alimentaria de adicionar una mayor cantidad a la indicada en el etiquetado, en previsión a las pérdidas debidas al procesado.

En la figura n° 18, se muestra el resultado correspondiente al test de Tukey aplicado a los contenidos de ácido ascórbico obtenidos.

Figura nº 18. Bebidas a base de zumo de frutas: evolución del contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento, independientemente de la formulación de la muestra. Test de Tukey ($p < 0.05$). Los valores son media \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.



Se observa un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$) del contenido de ácido ascórbico entre el periodo inicial (0 días) y el final de la vida útil (135 días), aunque de escasa relevancia (4%), lo que indica que el contenido en ácido ascórbico se mantiene durante el almacenamiento. La presencia de polifenoles en derivados cítricos puede ejercer un efecto protector sobre el ácido ascórbico, evitando su oxidación, ya que los polifenoles poseen un potencial redox superior al ácido ascórbico (Miller & Rice-Evans, 1997).

No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) en función de la formulación de las bebidas de zumo de frutas analizadas independientemente del tiempo de almacenamiento.

b) Digestión gastrointestinal simulada

La capacidad antioxidante total, polifenoles solubles totales y contenido en ácido ascórbico de las bebidas objeto de estudio (135 días almacenadas a 2-4 °C) antes y después de la digestión gastrointestinal simulada se muestran en el cuadro nº 14.

Señalar que las bebidas son de un lote distinto a los indicados en apartados anteriores.

Resultados y discusión

Cuadro n° 14. Bebidas a base de zumo de frutas y sus fracciones bioaccesibles: capacidad antioxidante total (μM Trolox), polifenoles solubles totales (mg GAE/L) y contenido en ácido ascórbico (mg/mL).

	ORAC	TEAC	Polifenoles solubles totales	Ácido ascórbico
BZ	11860 \pm 616	6517 \pm 172	1066 \pm 33	0.421 \pm 0.017
	(9788 \pm 393)	(5826 \pm 202)	(1181 \pm 17)	(0.580 \pm 0.012)
BZFe	11528 \pm 420	5849 \pm 235	905 \pm 29	0.322 \pm 0.009
	(7649 \pm 461)	(5904 \pm 384)	(989 \pm 16)	(0.661 \pm 0.019)
BZZn	10391 \pm 827	6968 \pm 286	1056 \pm 59	0.426 \pm 0.010
	(8304 \pm 1378)	(6018 \pm 183)	(1380 \pm 27)	(0.654 \pm 0.025)
BZFeZn	11905 \pm 296	7138 \pm 305	952 \pm 40	0.394 \pm 0.019
	(8536 \pm 303)	(6206 \pm 339)	(1244 \pm 67)	(0.688 \pm 0.026)
BZL	19261 \pm 679	7947 \pm 204	1273 \pm 62	0.531 \pm 0.019
	(9824 \pm 92)	(6541 \pm 151)	(1327 \pm 52)	(0.634 \pm 0.026)
BZFeL	12813 \pm 870	5610 \pm 329	1131 \pm 56	0.442 \pm 0.020
	(7438 \pm 667)	(4305 \pm 183)	(1249 \pm 5)	(0.594 \pm 0.019)
BZZnL	11655 \pm 450	7605 \pm 377	1082 \pm 56	0.294 \pm 0.009
	(9322 \pm 380)	(5519 \pm 143)	(1476 \pm 60)	(0.667 \pm 0.025)
BZFeZnL	20917 \pm 107	5298 \pm 270	943 \pm 41	0.391 \pm 0.010
	(8588 \pm 522)	(3793 \pm 101)	(1162 \pm 50)	(0.559 \pm 0.019)

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3).

Entre paréntesis resultados correspondientes a las bebidas a base de zumo de frutas.

A los resultados de capacidad antioxidante total, polifenoles solubles totales y contenido en ácido ascórbico se les aplica un tratamiento estadístico ANOVA de dos factores (formulación de muestras y tipo de muestras – digeridas o no digeridas).

Se observa un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la capacidad antioxidante total (ORAC y TEAC) de las fracciones bioaccesibles respecto a las bebidas a base de zumo de frutas:

- ORAC: $13791 \pm 3967 \mu\text{M}$ Trolox en fracciones bioaccesibles vs. $8681 \pm 904 \mu\text{M}$ Trolox en bebidas a base de zumo de frutas.
 - TEAC: $6616 \pm 963 \mu\text{M}$ Trolox en fracciones bioaccesibles vs. $5514 \pm 960 \mu\text{M}$ Trolox en bebidas a base de zumo de frutas.
- Componentes que influyen en la capacidad antioxidante total.

a) Polifenoles

El incremento en la capacidad antioxidante total tras la digestión gastrointestinal es del 59% y 20% para ORAC y TEAC, respectivamente. Esta mejora en la capacidad antioxidante podría ser explicada, al menos en parte, por la liberación de antioxidantes (principalmente polifenoles) de la matriz alimentaria debido a la acción de los enzimas digestivos, tal y como se indica en diversos estudios en cereales (Nagah & Seal, 2005; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005) y en una dieta completa (Saura-Calixto et al., 2007). En estos estudios se sugiere que

con los tratamientos enzimáticos aplicados durante el proceso de digestión, se liberan compuestos fenólicos de carbohidratos y proteínas.

Para confirmar esta posibilidad, se determina el contenido de polifenoles solubles totales en las bebidas a base de zumo de frutas antes y después de la digestión gastrointestinal simulada (ver cuadro nº 14).

La muestra BZFe presenta el menor contenido polifenólico ($p < 0.05$), hecho que puede ser explicado por las interacciones Fe-polifenoles. Los compuestos polifenólicos presentan diferentes estructuras con distintas características de unión al hierro. Khokhar & Owusu Apenten (2003) han utilizado disoluciones modelo para estudiar la unión entre hierro y polifenoles y han sugerido que los siguientes grupos aromáticos hidroxilo son importantes en dicha unión: (1) grupos orto-dihidroxilo, (2) presencia de grupo hidroxilo 5-OH y/o 3-OH en conjunción con un grupo cetona en posición C4, y (3) un número elevado de grupos hidroxilo. En este sentido, se ha indicado un descenso en el contenido polifenólico total (determinado por el método Folin-Ciocalteu) en vino tinto (Argyri et al., 2006) y té verde (Alexandropolou et al., 2006), bajo condiciones de digestión gastrointestinal *in vitro*, tras la adición de hierro a concentraciones 0.25 mM y 1 mM (0.53 mM en las muestras suplementadas con hierro del presente estudio), hecho atribuido a la formación de quelatos.

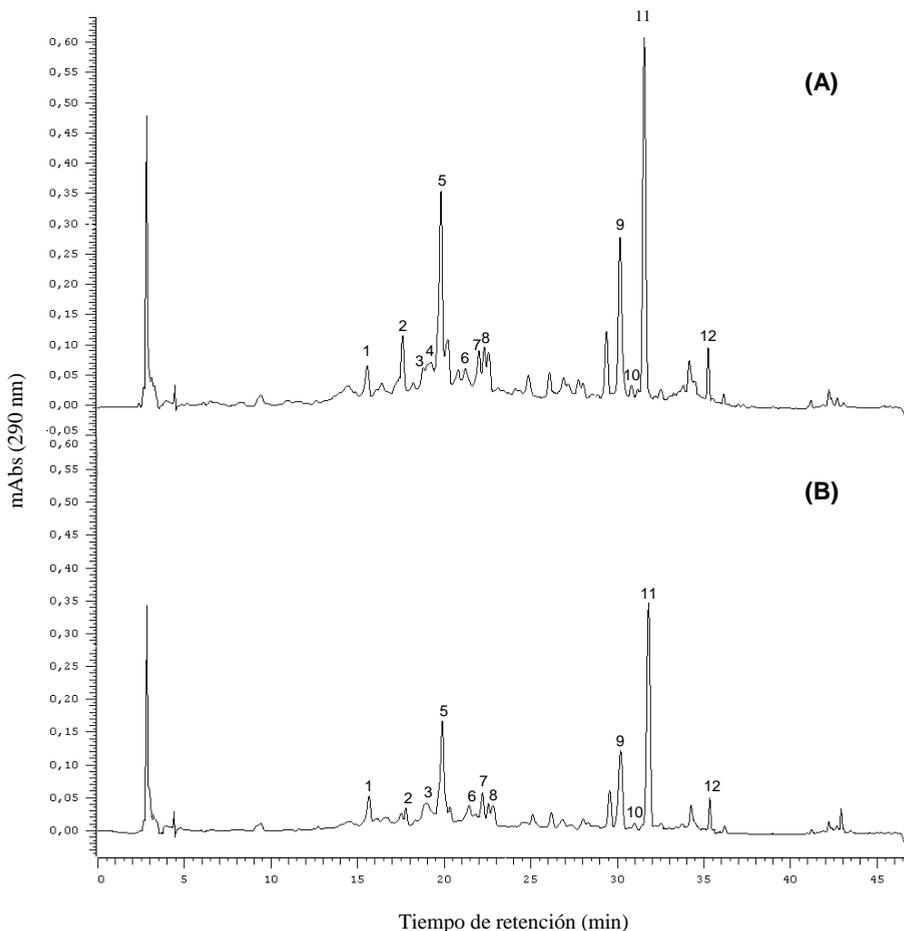
El contenido de polifenoles de las muestras sin digerir, se encuentra comprendido entre 989-1476 mg GAE/L, del orden de los valores indicados en zumos de cítricos (Gardner et al., 2000; Wu et al., 2004) y bebidas a base de zumo de frutas con leche (Zulueta et al., 2007) (504-3510 mg GAE/L y 265-999 mg GAE/L, respectivamente).

Tras la digestión, se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del 16% en el contenido de polifenoles solubles totales. Por lo tanto, parece que la liberación de polifenoles por el tratamiento enzimático, tal y como se ha indicado anteriormente, no es la razón del aumento en la capacidad antioxidante total. Estudios llevados a cabo con zumos de frutas sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* han mostrado un descenso en el contenido total de polifenoles. En zumo de *Aronia melanocarpa* se observó un descenso entre un 15.5% a un 50%, determinado por HPLC (Bermúdez-Soto et al., 2007b). Sin embargo, cuando el método de digestión *in vitro* incorpora una membrana de diálisis, las pérdidas en compuestos fenólicos determinados por el método Folin-Ciocalteu son siempre mayores, siendo superiores al 70% en zumo de naranja (Gil-Izquierdo et al., 2002) y zumo de granada (Pérez-Vicente et al., 2002). Esta disminución de polifenoles se atribuye al rápido descenso en la estabilidad de los polifenoles en las condiciones ligeramente alcalinas alcanzadas durante el proceso de digestión, hecho que podría ocasionar la formación de otros compuestos desconocidos y/o no detectables con diferentes propiedades químicas y distinta bioaccesibilidad (Bermúdez-Soto et al., 2007b).

Con el objeto de estudiar el perfil polifenólico en las bebidas a base de zumo de frutas, antes y después de la digestión, se han realizado determinaciones (en función de la instrumentación disponible) por HPLC-DAD-MS/MS para las bebidas base (BZ) y las suplementadas con hierro y hierro-leche (BZFe y BZFeL) y por HPLC-DAD todas las suplementadas con cinc (BZZn, BZFeZn, BZZnL y BZFeZnL).

En la figura n° 19 se muestra, a modo de ejemplo, los cromatogramas correspondientes a los polifenoles de la muestra BZZn antes y después de la digestión gastrointestinal. Asimismo, en el cuadro n° 15 se muestra el perfil de polifenoles y en la figura n° 20 el efecto de la suplementación con hierro y la presencia de leche antes y después de la digestión gastrointestinal.

Figura n° 19. Cromatograma de la muestra BZZn antes (A) y después (B) de la digestión gastrointestinal simulada. (1) Ácido neoclorogénico, (2) Procianidina dímero, (3) Procianidina trímero, (4) Procianidina trímero, (5) Ácido clorogénico, (6) Isómero de ácido clorogénico, (7) Vicenina-2 (apigenina di-C-hexósido), (8) Hexosil-narirutina, (9) Narirutina, (10) Procianidina trímero, (11) Hesperidina y (12) Didimina.

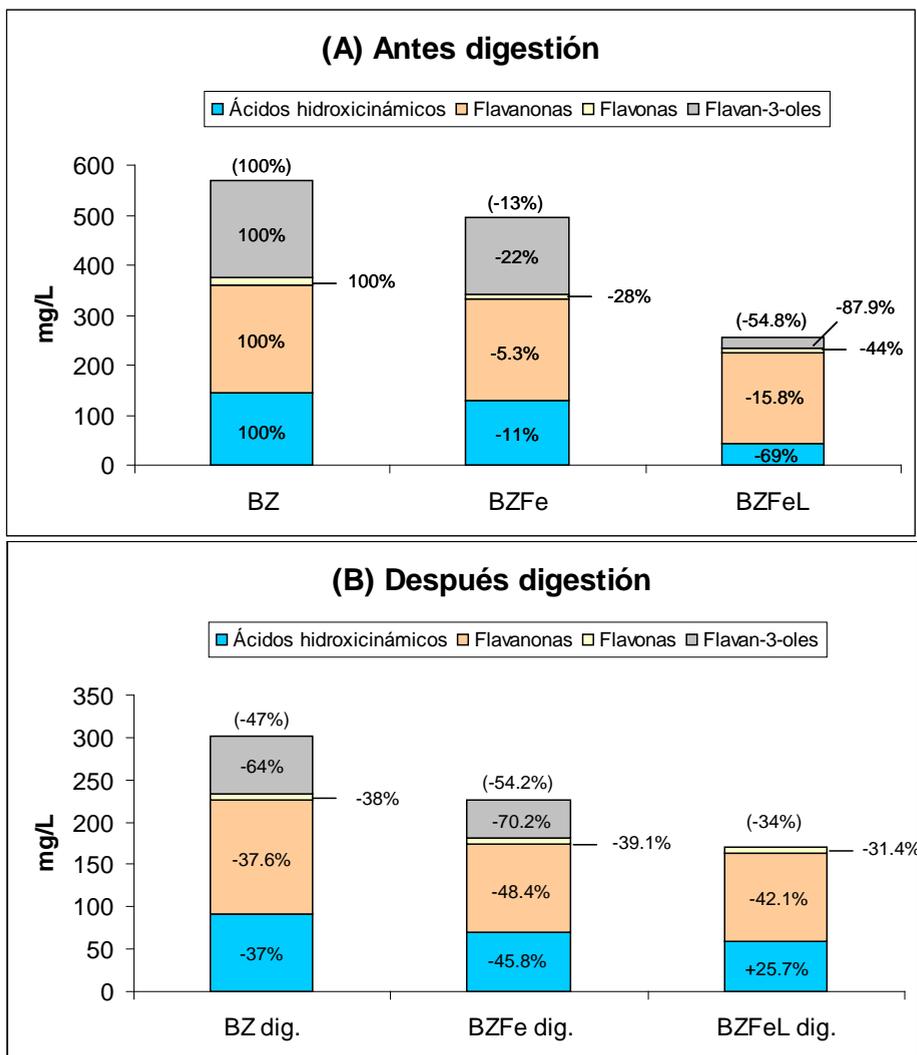


Cuadro n° 15. Compuestos fenólicos mayoritarios en BZ, BZFe y BZFeL (mg/L) determinados por HPLC-DAD-MS/MS antes y después de la digestión gastrointestinal.

N° Pico	Compuesto	MS [M-H]	MS/MS	BZ	BZFe	BZFeL	BZ (digerido)	BZFe (digerido)	BZFeL (digerido)
<i>Derivados del ácido hidroxicinámico</i>									
1	Ácido neoclorogénico	353	191, 179	36.3±0.5	30.9±0.5	8.0±1.0	11.3±0.8	7.7±0.7	8.7±1.1
5	Ácido clorogénico	353	191, 179	76.7±4.0	66.7±5.4	17.4±2.0	36.3±2.8	32.2±4.5	29.2±1.6
6	Isómero ácido clorogénico	353	191, 179	9.9±1.7	8.1±0.7	5.2±1.5	10.6±3.4	4.3±0.5	5.2±0.2
	<i>Total</i>			144.4±8.0	128.3±9.2	43.9±4.8	91.2±8.0	69.5±6.9	59.1±7.2
<i>Flavonas</i>									
7	Vicenina-2	593	473, 383, 353	10.0±1.5	7.9±0.5	6.1±0.4	7.2±1.6	5.6±1.9	3.9±0.1
	<i>Total</i>			15.3±3.6	11.0±0.7	8.6±0.5	9.5±1.9	6.7±2.2	5.9±0.7
<i>Flavan-3-oles</i>									
2	PCA dímero	577	289	56.0±2.1	48.1±3.1	10.5±1.9	26.0±3.3	14.8±1.8	ND
3	PCA trímero	865	577, 289	44.1±3.2	38.2±2.3	ND	19.5±2.1	14.0±1.4	ND
4	PCA trímero	865	577, 289	47.2±2.1	29.4±3.2	ND	13.6±0.5	4.4±0.1	ND
10	PCA trímero	865	577, 289	14.7±0.2	14.5±0.4	11.1±1.2	7.2±0.3	6.8±0.3	T
	<i>Total</i>			194.0±9.8	151.2±10.2	23.5±4.2	68.8±10.0	45.1±3.3	-
<i>Flavanonas</i>									
8	Hexosil-narirutina	777	580, 433, 271	17.8±0.7	13.0±3.2	10.3±1.4	16.1±1.6	9.6±2.8	9.8±0.4
9	Narirutina	579	271	41.6±7.8	40.2±1.7	34.8±2.1	33.8±1.9	25.0±1.5	24.5±1.2
11	Hesperidina	609	301	126.1±28.9	120.9±20.8	117.3±17.0	62.7±2.3	57.5±2.6	54.7±2.4
12	Didimina	593	285	10.0±1.8	9.7±0.8	8.5±1.0	7.3±0.3	5.8±0.8	5.1±0.6
	<i>Total</i>			215.0±37.0	203.5±31.0	180.9±24.4	134.1±7.3	105.0±7.7	104.7±9.7
<i>Polifenoles totales</i>				568.7±62.1	494.0±60.1	256.9±40.1	303.6±32.2	226.3±22.1	169.7±27.3

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Los polifenoles se agrupan según su estructura química. La cantidad total de cada grupo de polifenoles incluye otros compuestos minoritarios no mostrados en el cuadro. El n° de pico se corresponde con la figura n° 19. PCA: procianidina. ND: no detectado. T: traza (detectado por la masa iónica, pero no cuantificado).

Figura n° 20. Efecto de la suplementación con hierro y presencia de leche sobre el contenido polifenólico antes (A) y después (B) de la digestión. Antes de la digestión, los valores dentro de las barras y los valores entre paréntesis, son pérdidas de cada grupo de polifenoles y de polifenoles totales, respectivamente, referido a la muestra BZ. Tras la digestión, los valores dentro de las barras y los valores entre paréntesis, son pérdidas de cada grupo de polifenoles y de polifenoles totales, respectivamente, referido a su muestra homóloga sin digerir.



El contenido total de polifenoles antes de la digestión gastrointestinal de las muestras BZ, BZFe y BZFeL, está comprendido entre 257 y 569 mg/L (cuadro nº 15). El contenido en polifenoles determinado mediante HPLC es inferior al obtenido por el método de Folin-Ciocalteu (polifenoles solubles totales) debido a que no todos los polifenoles están caracterizados, o a que no presentan buena resolución cromatográfica. Por otra parte, los resultados obtenidos por el método Folin-Ciocalteu pueden estar sobreestimados, ya que en los alimentos existen otros componentes no fenólicos que actúan como agentes reductores (Spencer et al., 2008).

Se han identificado cuatro grupos principales de polifenoles en las bebidas a base de zumo de frutas: derivados del ácido hidroxicinámico, flavanonas, flavonas y flavan-3-oles. Asimismo, se han identificado 27 compuestos fenólicos individuales por su espectro UV y de masas, así como por sus iones producto, mostrándose sólo los más significativos (cuadro nº 15, figura nº 19).

La muestra BZ es la que presenta mayor contenido en compuestos fenólicos ($p < 0.05$), principalmente flavanonas y flavan-3-oles, seguido de derivados del ácido hidroxicinámico y en menor cantidad flavonas (cuadro nº 15, figura nº 20). La suplementación con hierro (BZFe) provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) (13%) en los polifenoles totales respecto a la muestra BZ, siendo las flavonas y los flavan-3-oles los compuestos más afectados (cuadro nº 15, figura 20a). En la muestra BZFeL se observa un descenso del 55% de polifenoles totales respecto a la muestra BZ. Este hecho es acorde con la formación de complejos entre caseína y polifenoles en té verde (Alexandropoulou et al., 2006) y vino tinto (Argyri et al., 2006),

así como en sus digeridos, suplementados con caseína, debido a interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

Se observa un descenso del 69% en los ácidos hidroxicinámicos de la muestra BZFeL respecto a la muestra BZ. Del mismo modo, se han descrito interacciones entre ácido clorogénico del café y leche desnatada en soluciones modelo (Dupas et al., 2006b). En esta muestra (BZFeL), los flavan-3-oles son los que presentan un descenso más acusado (88% respecto a la muestra BZ), hecho similar al hallado por Arts et al. (2002) en té verde y té negro, donde se observa un enmascaramiento de la capacidad antioxidante total debido a las interacciones entre epigallocatequina galato y ácido gálico con β -caseína.

Tras la digestión gastrointestinal, se observa en la muestra BZ los mismos compuestos fenólicos mayoritarios que antes de la digestión (figura n° 19) pero en menor cantidad, con pérdidas de hasta un 47% (cuadro n° 15, figura 20b). Como se ha indicado anteriormente, las condiciones ligeramente alcalinas alcanzadas durante el proceso de digestión, así como interacciones entre polifenoles y los enzimas digestivos podrían explicar este hecho (Friedman & Jurgens, 2000). Los ácidos hidroxicinámicos disminuyen un 37% tras la digestión (Figura 20b), y de éstos se pierde un 68% y 53% para el ácido neoclorogénico y clorogénico, respectivamente (cuadro n° 15). Estos resultados se corresponden con las elevadas pérdidas indicadas para estos dos compuestos en brócoli sometido a un proceso de digestión gastrointestinal (Vallejo et al., 2004). No obstante, difieren de los resultados de Bermúdez-Soto et al. (2007b) en zumo de *Aronia melanocarpa* digerido, donde el ácido neoclorogénico desciende un 28%, mientras que el ácido clorogénico aumenta un 24%. El efecto de la matriz

alimentaria (posibles interacciones con pectinas, proteínas, fibra...) podría ser la razón de estas diferencias. Con respecto a las flavanonas, se produce un descenso del 38% tras la digestión, siendo la hesperidina el compuesto que experimenta el mayor descenso ($p < 0.05$). Del mismo modo, las flavonas también se reducen un 38%. Estos resultados se corresponden con los indicados por Gil-Izquierdo et al. (2001) en zumo de naranja sometido a un proceso de digestión gastrointestinal, donde las flavanonas (hesperidina y narirutina) y la flavona vicenina-2 se hallaron en cantidades menores respecto al zumo original. En el caso de los flavan-3-oles, su descenso (64%) en la muestra BZ tras la digestión está acorde con lo indicado por Bermúdez-Soto et al. (2007b) en zumo de *Aronia melanocarpa* tras digestión gastrointestinal.

En la muestra BZFe los polifenoles totales descienden un 54% tras la digestión. El comportamiento de los polifenoles individuales de cada grupo es similar al comentado anteriormente para la muestra BZ, si bien se observa un menor contenido en los ácidos hidroxicinámicos, flavanonas y flavan-3-oles (cuadro nº 15, figura 20b) posiblemente debido a la presencia de hierro. Este hecho puede ser debido a las interacciones y formación de quelatos entre el hierro y los polifenoles. En este sentido, Boato et al. (2002), utilizando un modelo que combina digestión gastrointestinal *in vitro* y células Caco-2, han indicado que zumos de uva tinta y de ciruela presentan un efecto inhibitor sobre la biodisponibilidad de hierro, probablemente debido a la presencia de polifenoles con grupo galoilo, el cual presenta una elevada afinidad por el hierro. Asimismo, se ha constatado un descenso en la concentración de polifenoles debido a la presencia de

hierro, bajo condiciones de digestión gastrointestinal, en té verde (Alexandropoulou et al., 2006) y en vino tinto (Argyri et al., 2006).

Los polifenoles totales descienden un 34% por efecto de la digestión en la muestra BZFeL (cuadro n° 15, figura n° 20b). Se aprecia un incremento en el contenido de ácido clorogénico respecto a la muestra sin digerir. Este hecho podría ser en parte explicado por la presencia de CPPs formados durante el proceso de digestión, los cuales tienen una elevada capacidad de unión con el hierro (Miquel et al., 2005). Así pues, la formación de complejos solubles entre hierro y CPPs en la muestra BZFeL digerida podría parcialmente contrarrestar la interacción negativa entre hierro y polifenoles. Otra posible explicación podría ser la disrupción parcial de las interacciones polifenoles-leche durante el proceso de digestión indicada para el ácido clorogénico del café y leche desnatada (Dupas et al., 2006b). Sin embargo, este hecho no sucede en el caso de los flavan-3-oles, los cuales no son detectables después de la digestión, lo cual sugiere que la leche presenta un efecto crítico sobre estos compuestos en la muestra BZFeL digerida.

Como se ha indicado anteriormente, el perfil polifenólico de las bebidas y sus digeridos suplementados con cinc, se ha determinado por HPLC-DAD. Los resultados se indican en el cuadro n° 16. Asimismo, en la figura n° 21 se muestra el efecto del cinc sólo o suplementado conjuntamente con hierro y/o leche sobre el perfil polifenólico antes y después del proceso de digestión.

Cuadro n° 16. Compuestos fenólicos mayoritarios en BZZn, BZZnFe, BZZnL y BZZnFeL (mg/L) determinados por HPLC-DAD antes y después de la digestión gastrointestinal.

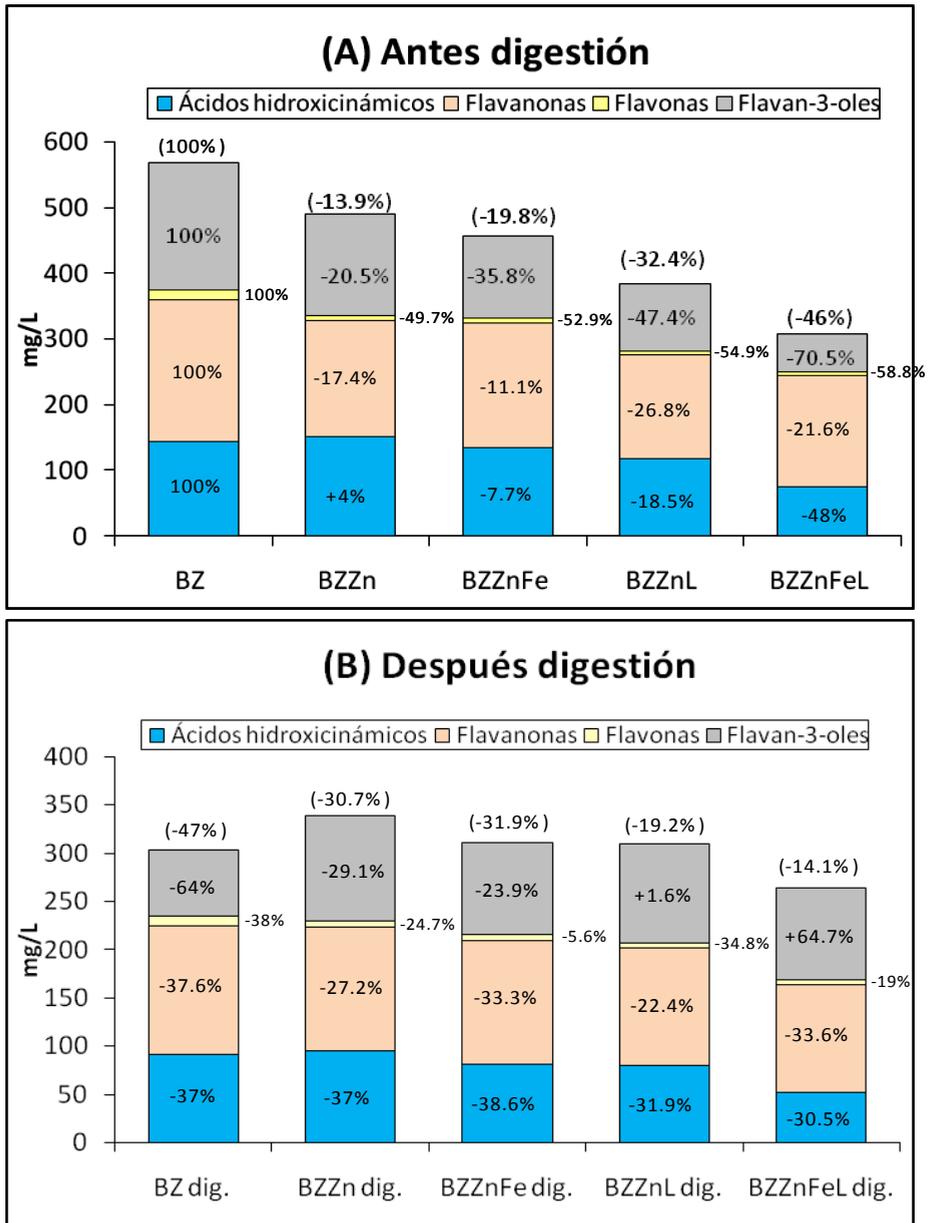
N° pico	Compuesto	BZZn	BZZnFe	BZZnL	BZZnFeL	BZZn dig.	BZZnFe dig.	BZZnL dig.	BZZnFeL dig.
<i>Derivados del ácido hidroxicinámico</i>									
1	Ácido neoclorogénico	28.0±4.1	21.0±0.4	19.4±0.7	12.2±0.8	11.5±0.3	12.8±0.4	12.7±0.6	6.0±0.1
5	Ácido clorogénico	78.8±5.7	71.6±3.5	63.8±0.8	38.9±2.2	55.5±0.6	45.7±2.0	47.8±5.7	25.8±1.7
6	Isómero ácido clorogénico	18.8±1.2	16.7±1.1	18.9±0.2	12.4±2.6	15.3±0.3	9.5±0.1	7.1±0.1	10.1±3.6
	<i>Total</i>	150.4±6.7	133.3±2.6	117.7±2.2	75.1±0.6	94.7±6.1	81.8±3.7	80.1±1.4	52.2±0.8
<i>Flavonas</i>									
7	Vicenina-2	5.8±0.7	5.7±0.2	6.3±1.2	5.0±0.2	4.7±1.9	5.6±0.6	3.7±0.6	4.1±0.1
	<i>Total</i>	7.7±0.4	7.2±0.1	6.9±0.1	6.3±0.2	5.8±1.9	6.8±0.3	4.5±0.7	5.1±0.1
<i>Flavan-3-oles</i>									
2	PCA dímero	67.5±1.7	59.8±15.2	35.8±0.2	28.7±4.5	44.4±4.0	31.2±8.0	36.6±1.1	ND
3	PCA trímero	67.1±0.6	52.5±16.2	54.2±0.4	19.5±0.1	47.7±4.6	53.3±10.8	58.2±7.1	85.7±8.1
4	PCA trímero	16.4±0.6	3.1±2.1	3.8±2.6	2.5±0.1	11.0±2.0	1.6±0.1	3.3±0.6	1.3±0.2
10	PCA trímero	5.3±0.4	9.1±1.6	4.0±1.1	7.7±3.7	6.2±0.1	7.4±1.4	5.4±0.6	7.2±1.5
	<i>Total</i>	154.3±5.3	124.5±1.5	102.1±7.1	57.2±6.5	109.4±12.5	94.7±0.3	103.7±23.5	94.2±9.9
<i>Flavanonas</i>									
8	Hexosil-narirutina	10.8±0.5	16.1±3.8	8.5±1.5	8.3±0.6	10.5±1.8	8.9±0.9	8.3±1.0	11.7±6.8
9	Narirutina	39.8±0.8	45.3±1.4	38.6±1.6	40.8±2.5	39.5±1.1	38.8±1.6	34.7±3.2	30.3±0.1
11	Hesperidina	108.9±2.7	103.0±4.8	86.9±2.9	96.1±6.0	64.7±4.7	57.6±1.6	50.8±5.8	48.6±0.8
12	Didimina	9.5±0.6	8.9±0.2	9.5±0.5	8.6±0.3	7.5±0.5	7.6±0.1	6.9±1.6	6.0±0.5
	<i>Total</i>	177.6±3.1	191.1±6.4	157.4±2.3	168.6±5.4	129.3±6.1	127.5±1.6	122.1±5.4	112.0±4.8
<i>Polifenoles totales</i>		489.7±5.2	456.0±5.5	384.2±7.1	307.1±11.4	339.2±1.6	310.7±2.1	310.4±17.6	263.8±5.7

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (n = 3). Los polifenoles se agrupan según su estructura química. La cantidad total de cada grupo de polifenoles incluye otros compuestos minoritarios no mostrados en el cuadro.

El n° de pico, se corresponde con el cromatograma indicado en la figura n° 19. PCA: procianidina. ND: no detectado.

Resultados y discusión

Figura n° 21. Efecto de la suplementación con cinc con/sin hierro y/o leche sobre el contenido polifenólico antes (A) y después (B) de la digestión. Antes de la digestión, los valores dentro de las barras y los valores entre paréntesis, son pérdidas de cada grupo de polifenoles y de polifenoles totales, respectivamente, referido a la muestra BZ. Tras la digestión, los valores dentro de las barras y los valores entre paréntesis, son pérdidas de cada grupo de polifenoles y de polifenoles totales, respectivamente, referido a su muestra homóloga sin digerir.



Los polifenoles totales en las bebidas a base de zumo de frutas suplementadas con cinc están comprendidos entre 307 y 490 mg/L, antes de la digestión (cuadro nº 16) y son inferiores ($p < 0.05$) a los de la muestra BZ (figura nº 21). De las muestras estudiadas (suplementadas con cinc), BZZn y BZZnFe son las que presentan los contenidos más altos de polifenoles totales ($p < 0.05$), con pérdidas de un 14% y un 20% vs BZ, siendo las flavonas y los flavan-3-oles los compuestos más afectados. Las muestras BZZnL y BZZnFeL son las que presentan los contenidos más bajos de polifenoles vs BZ, con pérdidas del 32% y 46%, respectivamente, siendo los derivados del ácido hidroxicinámico y los flavan-3-oles los compuestos más afectados cuando se compara con las mismas muestras sin leche (BZZn y BZZnFe). Los resultados obtenidos pueden atribuirse a la formación de quelatos entre metales divalentes y polifenoles, tal y como se ha descrito en bebidas ricas en polifenoles suplementadas con hierro (Hurrell et al., 1999) y a la formación de complejos por uniones hidrofóbicas entre cinc y ácido tánico en cervezas (Pohl & Prusisz, 2007), que podrían disminuir los polifenoles totales. Por otra parte, la formación de complejos entre caseína y polifenoles indicada anteriormente, también podría disminuir el contenido de polifenoles en las bebidas estudiadas. Por lo tanto, ambos factores podrían explicar el menor contenido de polifenoles totales en las muestras con leche y suplementadas con minerales.

Después de la digestión, se observa un descenso en los polifenoles totales, con pérdidas de hasta un 32% vs antes de la digestión, siendo esta pérdida menor que la hallada para las muestras BZ dig. (47%), BZFe dig. (54%) y BZFeL dig. (32%) (ver la figura nº 21). La mayor afinidad del hierro por los polifenoles frente al cinc podría justificar el mayor descenso

en la solubilidad de éstos en presencia de hierro. Tras el proceso de digestión, la menor pérdida de polifenoles totales se produce en la muestra BZFeZnL. El menor porcentaje de pérdida de polifenoles corresponde a las muestras que contienen leche, posiblemente debido a la formación de complejos Fe/Zn con los CPPs generados tras la digestión, lo que evitaría la interacción Fe/Zn-polifenoles.

Entre los grupos de polifenoles (ver cuadro nº 16, figura nº 21b), las flavonas son los compuestos más afectados por el proceso de digestión respecto a la muestra BZ digerida, con un descenso del 53% en la muestra BZZnL digerida. Sin embargo, este descenso es sólo significativo ($p < 0.05$) en las muestras suplementadas con leche. Los flavan-3-oles, por su parte, no muestran diferencias entre las muestras digeridas, pero sí se observa una mayor bioaccesibilidad en la muestra BZZnFeL dig. respecto a su homóloga no digerida, debido a un incremento en el compuesto PCA trímero (nº pico 3, cuadro nº 16); valores que difieren con los hallados para la muestra BZFeL dig., donde los flavan-3-oles no son detectables. En este sentido, se podría atribuir un efecto positivo debido a la presencia de cinc en las bebidas a base de zumo de frutas digeridas sobre el contenido de flavan-3-oles por la formación de quelatos Zn-flavan-3-oles más solubles que los quelatos Fe-flavan-3-oles. Se ha descrito que los flavan-3-oles presentan buenas propiedades de quelación sobre el hierro (Van Acker et al., 1996) y que los quelatos formados no son solubles (Brown et al., 1990). Sreenivasulu et al. (2008) han indicado que determinados polifenoles, como el ácido tánico o aquellos presentes en té y zumo de uva tinta, pueden formar quelatos con el cinc aumentando su captación en células Caco-2, lo cual podría explicar una mayor solubilidad de los quelatos Zn-polifenoles

frente a los Fe-polifenoles, que como se ha indicado anteriormente disminuyen la captación de dicho mineral en células Caco-2 (Boato et al., 2002).

b) Otros factores

Se ha descrito que determinados constituyentes no antioxidantes de los alimentos tales como aminoácidos, azúcares y ácidos urónicos pueden ser liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal y pueden ejercer interferencias positivas y sobreestimación de resultados en determinados métodos de medida de capacidad antioxidante total como ORAC y TEAC, siendo este efecto interferente menor en el caso del método TEAC (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

Otro factor implicado en el aumento de la capacidad antioxidante cuando se aplica el método ORAC y no así con el método TEAC, es la contribución de los enzimas utilizados en el proceso de digestión (pepsina y pancreatina sales-biliares). Utilizando un blanco de digestión (agua desionizada sometida al mismo proceso que las muestras) se observa una contribución a la capacidad antioxidante total entre 9%-12% para el método ORAC frente al 2%-3% para el método TEAC. Este hecho es acorde con lo indicado por Matsingou et al. (2000) quienes señalan que los enzimas digestivos y sales biliares actúan como quelantes de metales o eliminan radicales libres.

c) Ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico después de la digestión gastrointestinal (cuadro nº 14), desciende en un 36%. En la aplicación de un ANOVA de dos factores (formulación y tipo de muestras – digerida o no) no se detectan diferencias significativas en función de la formulación. Las pérdidas de ácido ascórbico pueden explicarse por los cambios de pH y la presencia de oxígeno durante el proceso de digestión. Pérez-Vicente et al. (2002) han mostrado pérdidas en el contenido de ácido ascórbico de un 29% en zumo de granada durante la etapa gástrica de la digestión gastrointestinal, llegando estas pérdidas a más de un 80% tras la etapa intestinal. Las diferencias en la composición de las muestras y el uso de diálisis en lugar de solubilidad podrían explicar las diferencias con nuestro estudio.

Dado que las muestras objeto de estudio se enriquecen con ácido ascórbico (54 mg/100 mL de bebida), se considera de interés estimar su contribución a la CAT. Dicha contribución se estima a partir de soluciones modelo con el mismo contenido de ácido ascórbico que las bebidas a base de zumo de frutas objeto de estudio.

La contribución del ácido ascórbico a la CAT en las bebidas a base de zumo de frutas oscila entre 37-59% y 36-56% para los métodos ORAC y TEAC, respectivamente.

Tras la digestión, en las fracciones bioaccesibles su contribución se sitúa entre 11-24% y 8-24%. Wang et al. (1996) encuentran que el ácido ascórbico de 5 zumos comerciales contribuye en menos de un 30% a la CAT medida por el método ORAC. Otros estudios llevados a cabo con el método TEAC (Miller & Rice-Evans, 1997) y los métodos FRAP y ESR (Gardner et al., 2000) han mostrado una contribución entre 60%-90% en zumos de cítricos y menos de 5% para zumos no cítricos, respectivamente.

2. Efecto citoprotector de las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas frente a estrés oxidativo inducido en células Caco-2

En los ensayos de citoprotección se utilizan las células Caco-2, las cuales cuando crecen en medio de cultivo llegan a diferenciarse formando una monocapa polarizada que se asemeja morfológica y funcionalmente a los enterocitos del epitelio intestinal humano (Pinto et al., 1983). El uso de células Caco-2 diferenciadas se considera un modelo adecuado para evaluar la respuesta de los enterocitos frente al estrés oxidativo (Baker & Baker, 1993).

Se induce el estrés oxidativo en células Caco-2 mediante peróxido de hidrógeno. Se ensayan 3 concentraciones (0.5, 5 y 10 mM) comprendidas en el amplio intervalo 10 μ M-10 mM previamente utilizado por otros autores para estudiar los efectos del estrés oxidativo en células Caco-2 (Bestwick & Milne, 2000; Wijeratne et al., 2005). En el cuadro n° 17, se muestran los parámetros ensayados en células Caco-2 con objeto de seleccionar la concentración de H₂O₂ de trabajo.

Cuadro n° 17. Estrés oxidativo inducido (H₂O₂ 1 h) en células Caco-2.

H ₂ O ₂ (mM)	Azul tripán (%)	MTT (%)	ROS (%)	Δψ _m
0	93.00 ± 4.24	100.01 ± 3.95	3.87 ± 1.53	2.45 ± 0.81
0.5	85.00 ± 1.40	110.74 ± 11.61	6.25 ± 0.38	1.55 ± 0.05
5	77.00 ± 1.40	82.67 ± 1.11	12.24 ± 0.33	11.44 ± 2.67
10	52.00 ± 9.90	61.45 ± 3.43	4.76 ± 0.28	15.43 ± 4.82

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n = 4)

MTT = (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil bromuro de tetrazolio)

ROS = Especies reactivas de oxígeno

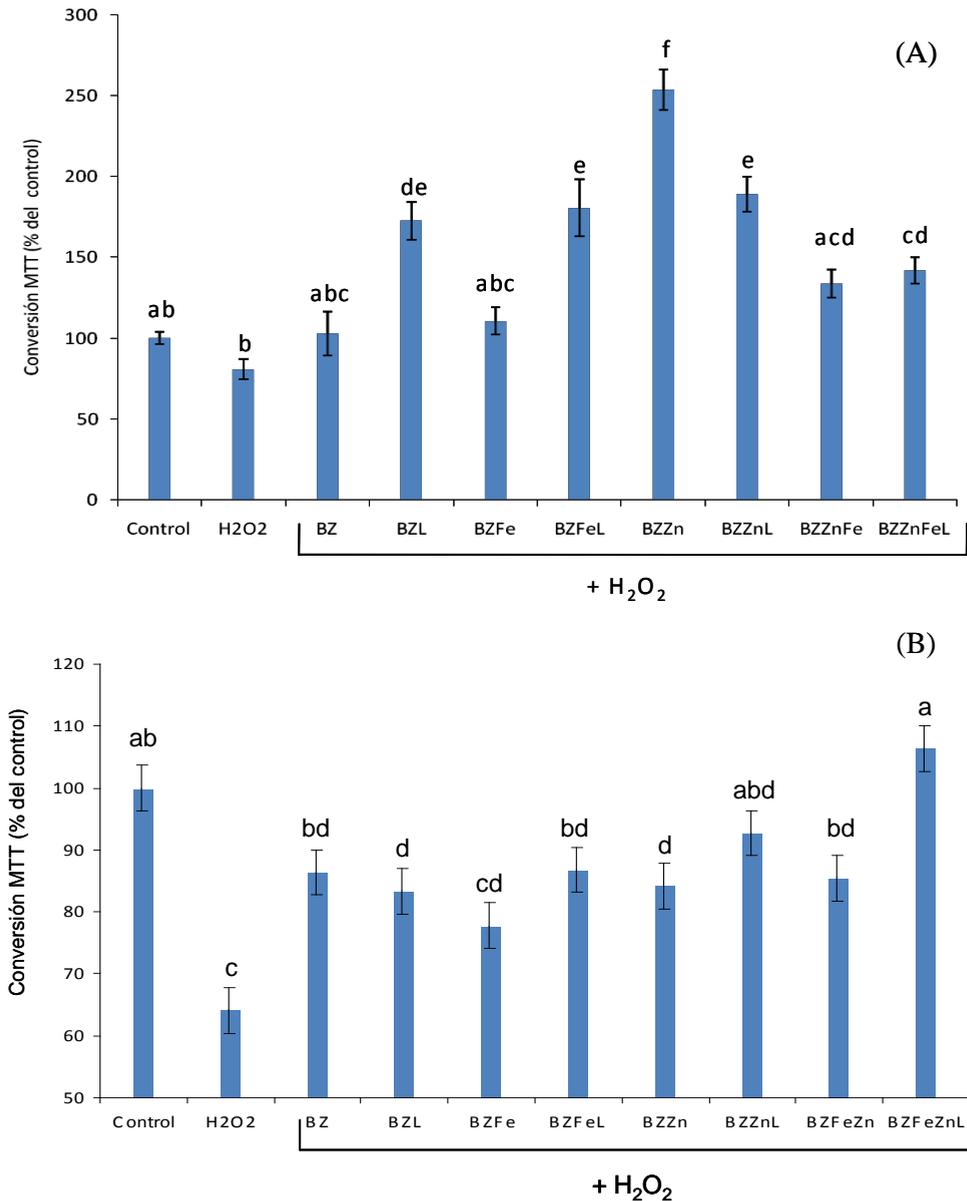
Δψ_m = Potencial de membrana expresado como PI/DHR (%)

Se selecciona la concentración de 5 mM, ya que a baja concentración de H₂O₂ (0.5 mM) no se aprecian alteraciones en el potencial de membrana ni en el metabolismo celular (MTT), mientras que a la concentración más elevada (10 mM) se observa una marcada alteración del potencial de membrana y de la viabilidad celular (azul tripán y MTT). La preincubación con las fracciones bioaccesibles durante 24 h no muestra efectos tóxicos en los cultivos celulares.

- Actividad de las enzimas mitocondriales (test MTT)

Los efectos del H_2O_2 sobre la función enzimática mitocondrial en las células preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las muestras (figura nº 22), se determinan mediante la conversión del MTT como medida indirecta del metabolismo mitocondrial, ya que la reducción del MTT a formazán en las células viables tiene lugar por medio de reacciones catalizadas por enzimas deshidrogenasas mitocondriales acopladas a fosforilación oxidativa (Ekmekcioglu et al., 1999).

Figura nº 22. Conversión del MTT en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H₂O₂ 5 mM durante 1 h (A) y 2 h (B). Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).



La exposición directa durante 1 h de las células al H_2O_2 no afecta la conversión del MTT respecto al control, mientras que al ampliar la exposición al agente oxidante a 2 horas se observa una disminución importante en la conversión del MTT, lo que implica que el periodo de exposición al H_2O_2 es relevante en los efectos oxidativos detectados.

La preincubación de las fracciones bioaccesibles objeto de estudio preserva la actividad mitocondrial en los dos periodos de inducción de estrés oxidativo (1 y 2 h con H_2O_2).

Se observa en algunas de las muestras una mayor conversión del MTT respecto al control (véase figura 22A). Estos resultados coinciden con la elevada conversión de MTT en células Caco-2 preincubadas con zumo de naranja descrita por Ekmekcioglu et al. (1999), quienes atribuyen tal efecto al ácido ascórbico, el cual estimula el metabolismo mitocondrial aumentando la actividad de la enzima succinato citocromo c reductasa. En el mismo sentido García-Alonso et al. (2006a) señalan un aumento en la conversión de MTT respecto al control de células HepG2 preincubadas con extractos de un zumo de frutas rico en polifenoles (0-30 μM) y posterior exposición a t-BOOH y H_2O_2 .

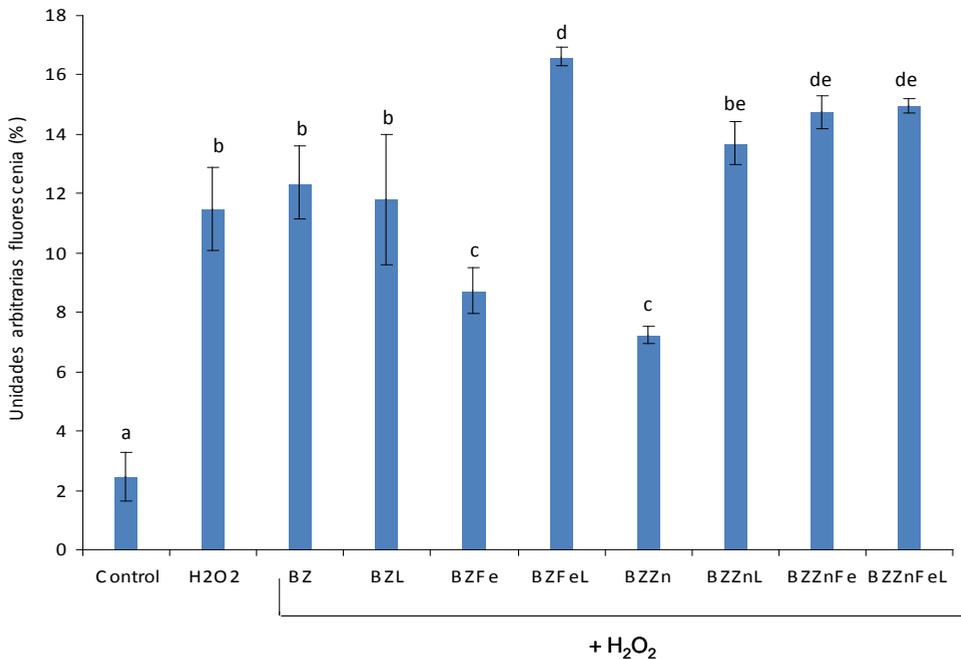
La suplementación mineral no modifica la conversión de MTT respecto a la muestra sin suplementación mineral (BZ). Debe destacarse el efecto observado en la muestra BZZn en el ensayo de inducción de estrés oxidativo con H_2O_2 1 h, lo que indicaría el efecto antioxidante del cinc frente a un menor estrés oxidativo. En células Caco-2 no sometidas a estrés oxidativo se ha observado una mayor conversión de MTT al exponer las células a concentraciones de cinc entre 30-200 μM (Zödl et al., 2003).

En general, la presencia de leche favorece la conversión de MTT frente al estrés oxidativo inducido; hecho más acusado cuando se incrementa el nivel de estrés.

- Especies reactivas de oxígeno (ROS)

En la figura n° 23, se muestra la acumulación intracelular de ROS en las células Caco-2 preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas, tras ser expuestas a H₂O₂ 5 mM.

Figura n° 23. Producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en células Caco-2 preincubadas 24 h con fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H₂O₂ 5 mM/1 h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).



Se observa un incremento de ROS para todas las muestras analizadas respecto al control. A pesar de la conocida capacidad antioxidante de las fracciones bioaccesibles de las muestras (véase apartado Propiedades antioxidantes de la bebidas – (b) digestión gastrointestinal), éstas no previenen la acumulación intracelular de ROS.

Al comparar los distintos niveles de ROS entre las diferentes muestras analizadas, se observa que las muestras BZFe y BZZn son las que producen la menor acumulación de ROS entre las muestras ensayadas ($p < 0.05$). Este hecho no se observa cuando los elementos minerales se suplementan de manera conjunta (BZFeZn).

Se ha descrito un efecto antioxidante para el Zn en relación con la inducción en la síntesis de metalotioneínas y enzimas antioxidantes (p. ej. glutatión peroxidasa (GSH-Px)), hecho que permite la protección de grupos sulfhidrilo proteicos y la acción de la enzima SOD citosólica (Zödl et al., 2003). Respecto al hierro, los datos de la bibliografía indican actividad tanto prooxidante (la más generalmente aceptada) como antioxidante. El Hajji et al. (2006) indican que los complejos Fe-quercetina tienen menor tendencia a la autooxidación que la quercetina libre. Además, se ha descrito que cuando existe sobreproducción de H_2O_2 o en ausencia de catalasa, la presencia de hierro puede transformar el H_2O_2 en radicales hidroxilo (Cremonesi et al., 2002). Estas características particulares del hierro en presencia de ciertos compuestos antioxidantes alimentarios y de concentraciones elevadas de H_2O_2 , podrían explicar los menores niveles de ROS en estas muestras.

La presencia de leche en las muestras (BZZn y BZFe) duplica el contenido de ROS, hecho que no se observa en las muestras BZL y BZFeZnL, donde las concentraciones de ROS no se diferencian de las que

no llevan leche (BZ y BZFeZn). Ello sugiere que los CPPs formados durante la digestión gastrointestinal *in vitro* no previenen la acumulación de ROS, a pesar de su capacidad antioxidante y actividad eliminadora de radicales libres; actividad descrita en soluciones modelo (Kitts, 2005).

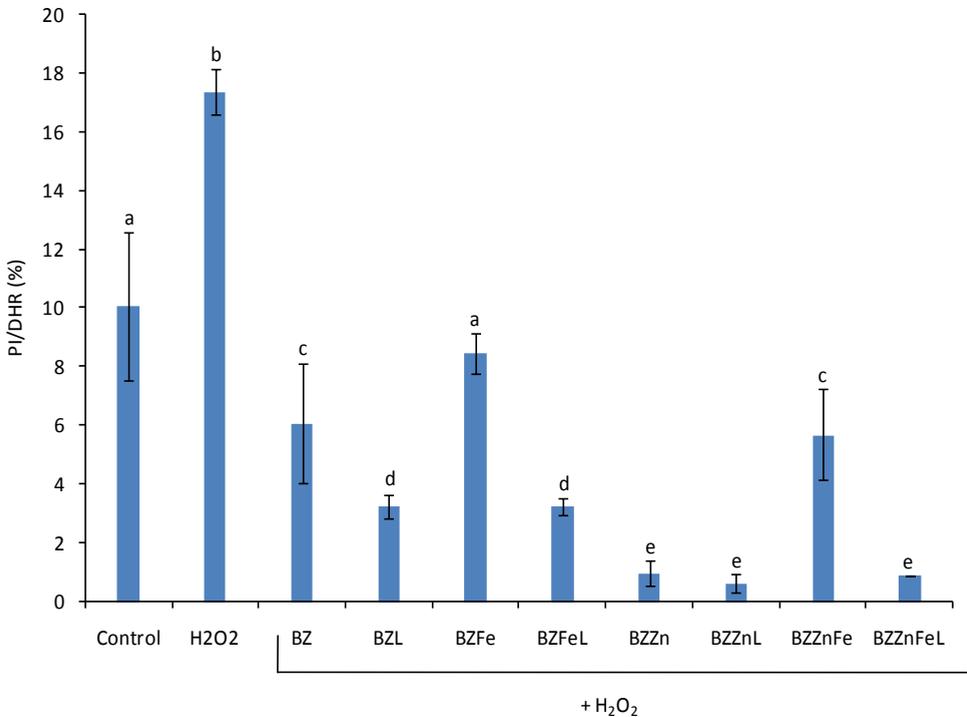
Los resultados hallados en la bibliografía relativos al efecto antioxidante de componentes de alimentos en la prevención de la acumulación de ROS en células Caco-2 no son concluyentes. Bestwick & Milne (2000) muestran que la preincubación (24h) con disoluciones de β -caroteno (0.1-50 μ M) no previene la acumulación de ROS. Sin embargo, Yokomizo & Moriwaki (2006) indican que la preincubación con quercetina, quercetina y luteolina disminuye significativamente la acumulación intracelular de ROS, y no así con apigenina y otros flavonoides debido a la distinta incorporación de estos compuestos en el interior de la célula, requisito necesario para poder reducir las ROS. Se ha descrito que los compuestos fenólicos pueden ejercer actividad pro-oxidante en condiciones *in vitro*, produciendo H_2O_2 (Lee et al., 2005; Schaefer et al., 2006; Yokomizo & Moriwaki, 2006). Este hecho podría justificar en parte la no prevención de acumulación de ROS por parte de las fracciones bioaccesibles objeto de estudio.

- Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Un estadio temprano en la citotoxicidad inducida por H_2O_2 se asocia a su difusión en el interior de la matriz mitocondrial con la pérdida de integridad de la misma y en última instancia la muerte celular debida a las alteraciones mitocondriales (Mronga et al., 2004). Así pues, se evalúan los

cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en las células Caco-2 preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas expuestas a H_2O_2 5 mM (ver figura n° 24).

Figura n° 24. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H_2O_2 5 mM/1 h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



Las células estimuladas únicamente con H_2O_2 muestran un descenso ($p < 0.05$) en el ($\Delta\psi_m$) ($> \text{PI/DHR} (\%)$) respecto al control, evidenciando el efecto tóxico del agente oxidante en el potencial de membrana mitocondrial.

Por el contrario, se observa que la preincubación de las células con las fracciones bioaccesibles da lugar a valores menores en el porcentaje PI/DHR, lo que implica mayor preservación de la integridad mitocondrial.

En general, se observa que las muestras conteniendo leche con o sin minerales presentan menor PI/DHR (%) ($p < 0.05$) frente a las que no contienen leche (BZL vs BZ, BZFeL vs BZFe, BZFeZnL vs BZFeZn), lo que sugiere un posible papel de los CPPs en la modulación de la respuesta celular. Asimismo, se observa valores menores de PI/DHR (%) ($p < 0.05$) en muestras suplementadas con Zn respecto a las suplementadas con Fe (BZZn vs BZFe, BZZnL vs BZFeL). También se observa el posible efecto del cinc en la preservación del potencial de membrana en las muestras suplementadas con ambos elementos. Zödl et al. (2003) utilizando disoluciones modelo de sulfato de cinc, indican que concentraciones superiores a $30 \mu\text{M}$ (en nuestro trabajo son superiores a $100 \mu\text{M}$ en las muestras suplementadas con cinc) podrían producir un efecto antioxidante en células Caco-2 post-confluentes, debido a la inducción de enzimas antioxidantes como catalasa y GSH-Px, contribuyendo de este modo a una mayor prevención del estrés oxidativo sobre proteínas y determinadas estructuras celulares.

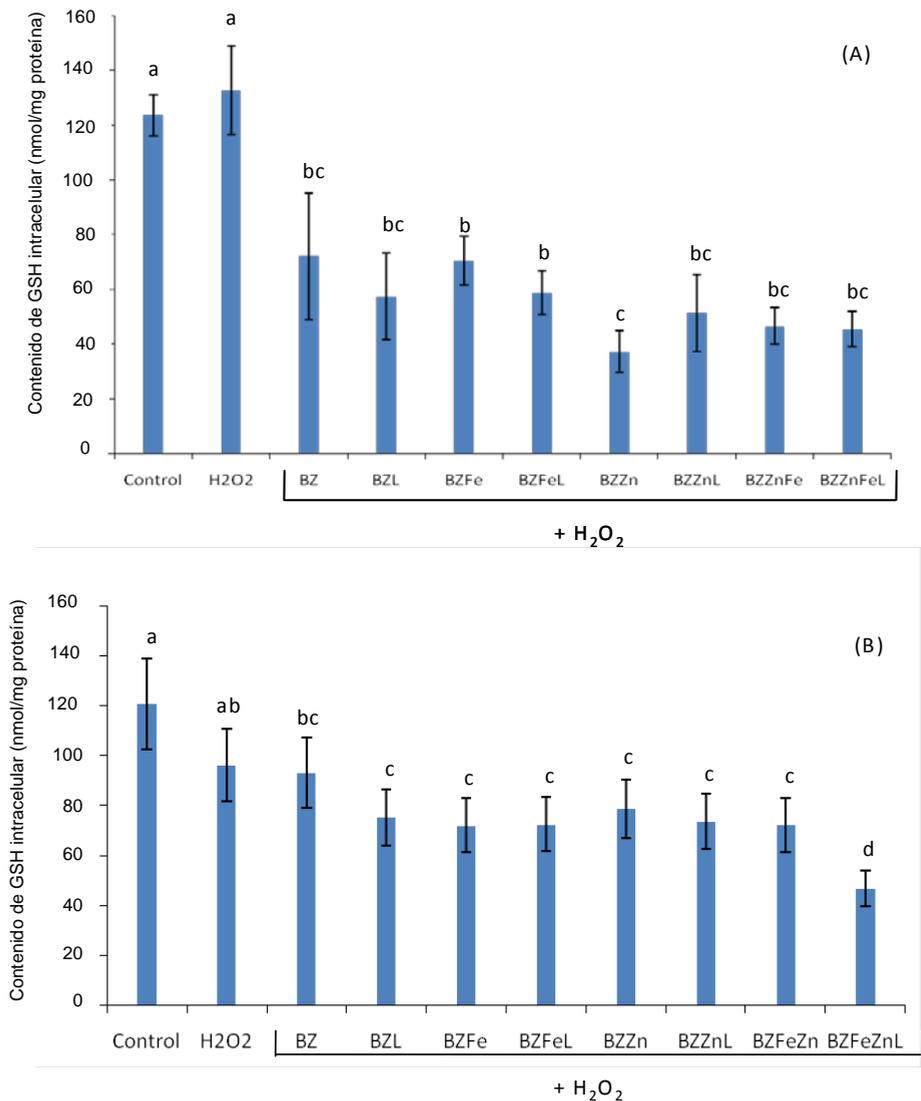
- Glutati6n reducido (GSH)

Entre los sistemas de defensa antioxidantes celulares, el GSH es uno de los principales antioxidantes no enzimáticos relacionados con la adaptaci6n y la prevenci6n del estr6s oxidativo celular (Baker & Baker, 1993). Adem6s, los cambios en enzimas relacionados con el ciclo del GSH

son marcadores sensibles de la respuesta de adaptación celular en células Caco-2 frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 (Bestwick and Milne, 2000; Wijeratne et al., 2005). A continuación se muestra el efecto de las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas sobre el contenido intracelular de GSH tras la exposición a H_2O_2 5 mM 1 y 2 h (figura nº 25).

Resultados y discusión

Figura n° 25. Cambios en el contenido intracelular de GSH en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H_2O_2 5 mM durante 1 h (A) y 2 h (B). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



Las células preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las muestras presentan menor contenido intracelular de GSH respecto al control ($p < 0.05$), mientras que las estimuladas con H_2O_2 no se diferencian estadísticamente ($p > 0.05$) de éste. Esta depleción del GSH en los cultivos celulares refleja claramente la alteración del estado redox celular, hecho acorde con los valores de ROS.

En general, las muestras que contienen leche no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de GSH con respecto a las que no la contienen, lo cual indicaría que los CPPs formados durante la digestión gastrointestinal *in vitro* no ayudan a mantener los niveles de GSH. No obstante, Katayama et al. (2006) muestran un incremento en la concentración de GSH en células Caco-2 tras su preincubación durante 2 h con oligofosfopéptidos aislados de yema de huevo y posterior exposición a H_2O_2 1 mM durante 6 h, hecho que atribuyen a la síntesis *de novo* de GSH debido al incremento de la actividad glutatión reductasa (GSH-Rd). La mayor concentración de H_2O_2 y el menor tiempo de incubación del mismo en nuestro estudio podría explicar las diferencias en la respuesta de adaptación celular respecto al anterior estudio citado. Por su parte, al analizar la suplementación mineral de las muestras, tanto la adición de hierro y cinc independiente o conjuntamente, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en cuanto al contenido de GSH.

No debe descartarse que aunque los compuestos fenólicos son generalmente reconocidos como antioxidantes, pueden actuar como prooxidantes bajo determinadas condiciones tales como la presencia de iones metálicos (Lee et al., 2005), hecho que podría contribuir al descenso en los niveles de GSH observados. En este sentido, sólo conocemos un

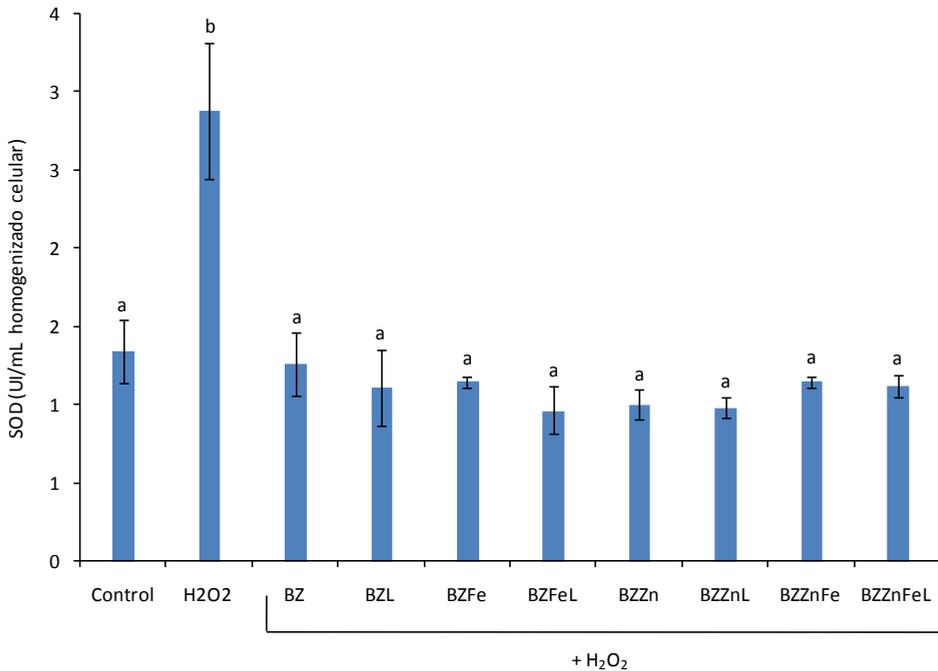
estudio en eritrocitos, que relaciona el descenso del ratio GSH/GSSG debido a la acción prooxidante de los polifenoles (Ko et al., 2006).

En el ciclo del glutatión, el GSH es oxidado a GSSG por la enzima GSH-Px, mientras que el GSSG es reducido por la enzima GSH-Rd que emplea el cofactor NADPH, el cual es regenerado vía hexosa monofosfato, para lo cual se requiere integridad mitocondrial (Stryer, 1988). Las células tratadas únicamente con H₂O₂ no se diferencian estadísticamente (p<0.05) del control en el contenido intracelular de GSH. No debe descartarse, que en esta situación se haya producido una inhibición o bloqueo en el ciclo del glutatión debido a la acumulación de radicales superóxido en la célula. En este sentido, se ha descrito un efecto protector en las funciones celulares de células Caco-2 por parte de la enzima SOD frente a la inactivación de la GSH-Px por radicales superóxido (Wijeratne et al., 2005).

- Superóxido dismutasa (SOD)

Basándonos en los resultados anteriormente mencionados, se evalúa la actividad de la enzima SOD en los cultivos celulares preincubados con las fracciones bioaccesibles de las muestras y posterior exposición a H₂O₂ (figura n° 26).

Figura n° 26. Actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H_2O_2 5 mM/1 h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



La estimulación con H_2O_2 provoca un aumento de la actividad de la SOD, mientras que la preincubación de las células con las fracciones bioaccesibles de las muestras objeto de estudio no induce la activación de la misma, respecto al control.

Bestwick & Milne (2000) han descrito en células Caco-2 preincubadas con disoluciones de β -caroteno (0.1-50 μM) 24 h o 5 días,

incrementos progresivos en las enzimas SOD, GSH-Rd, glutatión-S-transferasa y catalasa tras exposición a H_2O_2 10 mM durante 6 h. A pesar que los resultados de la presente tesis difieren del citado estudio, la respuesta celular observada para la enzima SOD es acorde al efecto citoprotector descrito en relación al potencial de membrana mitocondrial, el cual como se ha indicado anteriormente es necesario para la producción de equivalentes reductores en el ciclo GSH/GSSG. El hecho que las células preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las muestras preservan el potencial de membrana mitocondrial, podría explicar que no aumente la actividad de la enzima SOD, lo que implica que las funciones celulares no se hayan afectadas por la estimulación con H_2O_2 previa exposición a las fracciones bioaccesibles de las muestras.

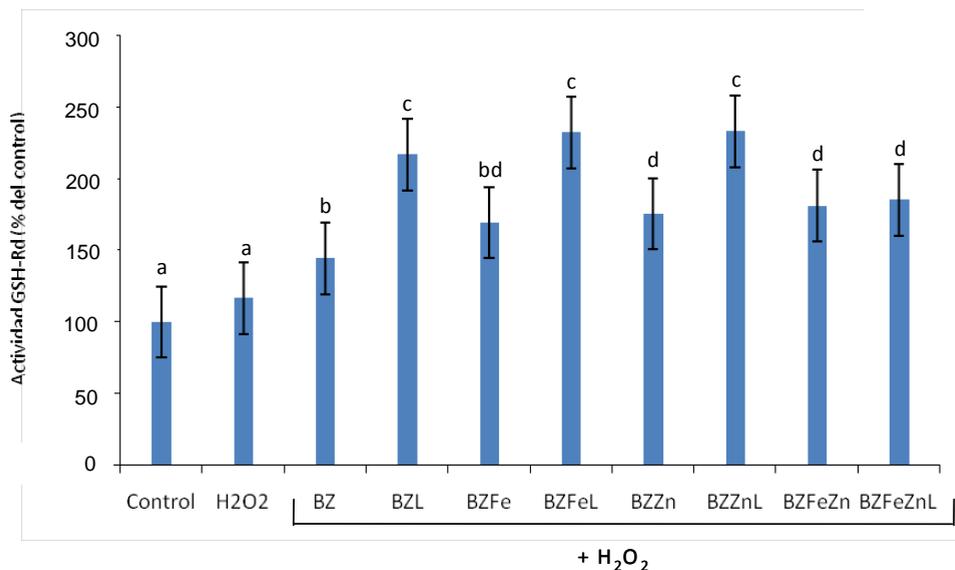
La suplementación mineral no provoca cambios en la enzima SOD. En este sentido, se ha descrito que la exposición de las células Caco-2 a soluciones de Zn (0-200 μM) o Fe (100-3000 μM) durante 24 h no afectan a dicha enzima (Zödl et al., 2003 y 2004).

- Glutatión reductasa (GSH-Rd)

Como se ha descrito anteriormente (véase apartado glutatión reducido), la preincubación con las fracciones bioaccesibles de las muestras no impide la depleción de GSH observada. Por ello interesa conocer la actividad de la GSH-Rd, enzima encargada de transformar el GSSG a GSH.

En la figura nº 27 se muestra la actividad de la GSH-Rd en las muestras objeto de estudio.

Figura n° 27 Actividad de la GSH-Rd en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas y expuestas a H_2O_2 5 mM/2 h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



La exposición del cultivo celular al H_2O_2 no induce la actividad de la GSH-Rd. Este hecho podría atribuirse a un bloqueo de la actividad de enzimas antioxidantes del ciclo del glutatión. En este sentido, Katayama et al. (2006) indican que si un tejido se expone a estrés oxidativo severo no puede mantener por mucho tiempo un elevado ratio GSH/GSSG, lo que conduce a la acumulación de GSSG.

La preincubación con las fracciones bioaccesibles de las muestras objeto de estudio aumenta la actividad de la GSH-Rd respecto al control y las células estimuladas únicamente con H_2O_2 . La suplementación con cinc (BZZn y BZFeZn) aumenta la actividad de la GSH-Rd respecto a la

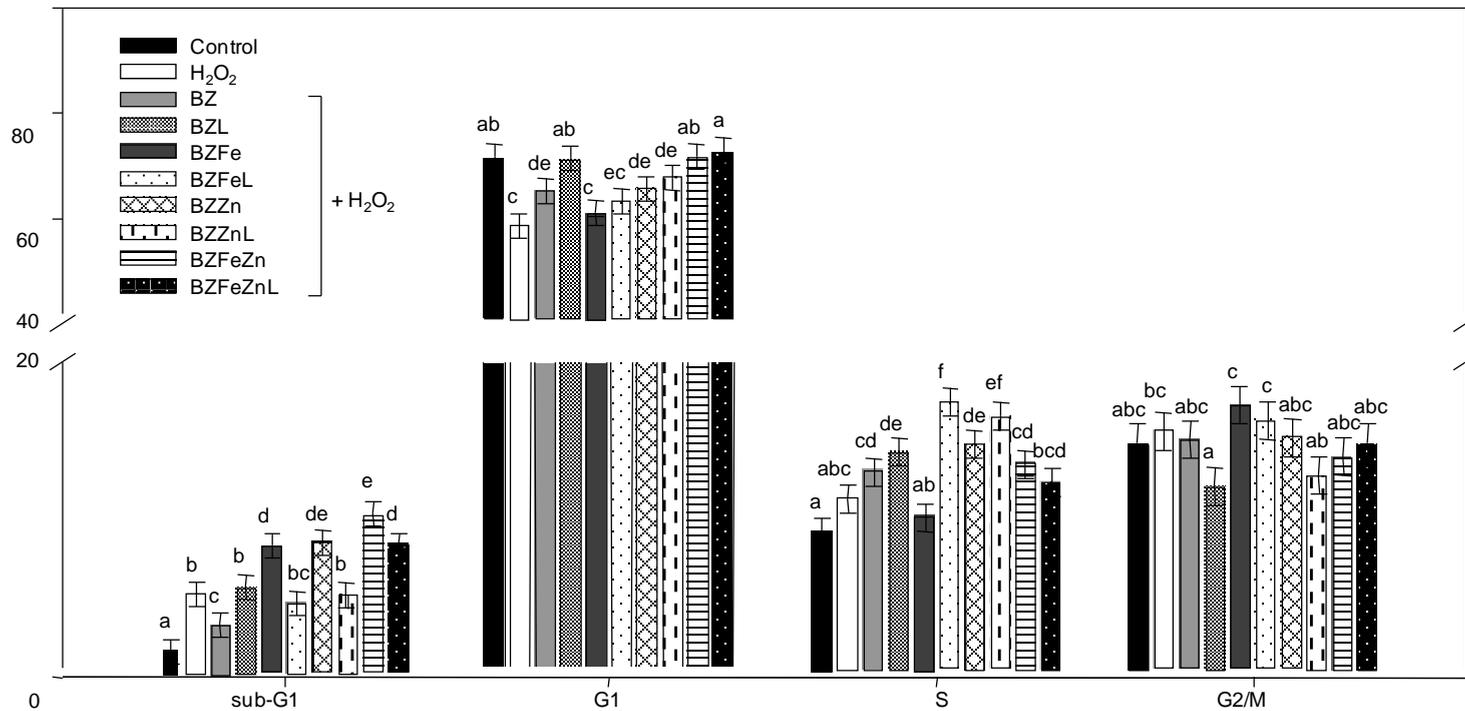
muestra sin suplementación mineral (BZ), mientras que la presencia de leche aumenta dicha actividad enzimática con respecto a las muestras que no la contienen, excepto cuando ambos minerales están presentes conjuntamente (BZFeZn y BZFeZnL). En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Laparra et al., 2008) se observa que la actividad de la GSH-Rd, en cultivos preincubados con disoluciones de CPPs y sometidas a estrés oxidativo con H_2O_2 5 mM 2 h, no se diferencian del control, lo que indica que los CPPs (componentes derivados de la leche para los que se ha descrito actividad antioxidante) preservan la actividad de la GSH-Rd. Estos resultados son acordes con la mayor actividad GSH-Rd en células Caco-2 preincubadas con oligofosfopéptidos de yema de huevo y expuestas a H_2O_2 1 mM durante 6 horas (Katayama et al., 2006). Los resultados obtenidos sugieren que las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas confieren efectos protectores frente al estrés oxidativo mediante el mantenimiento de la funcionalidad de enzimas antioxidantes relacionados con el ciclo del glutatión.

- Ciclo celular y apoptosis

Los efectos perjudiciales derivados de la acumulación intracelular de ROS pueden afectar procesos esenciales de la biología celular tales como la distribución del ciclo celular, además de provocar daños en biomoléculas como ADN, proteínas y lípidos, lo que finalmente desencadena mutagénesis y muerte celular (Hampton & Orrenius, 1997).

La distribución del ciclo celular en las células preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las muestras, y sometidas a un estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , se indica en la figura nº 28.

Figura nº 28. Efectos del tratamiento con H₂O₂ 5 mM /2 h en la progresión del ciclo celular en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).



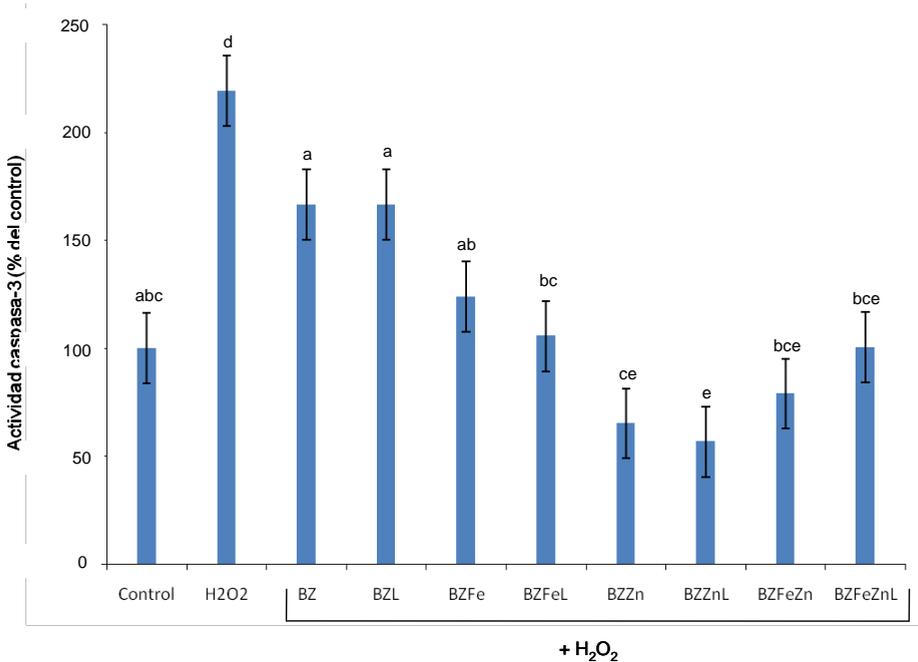
La exposición directa de las células con H_2O_2 provoca un descenso significativo ($p < 0.05$) del 17.6% de la población celular con respecto al control en la fase G_1 . Las células preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las muestras BZL, BZFeZn y BZFeZnL presentan una distribución del ciclo celular en la fase G_1 como el control, mientras que las muestras BZ, BZFe, BZFeL, BZZn y BZZnL presentan menor población celular en dicha fase del ciclo celular. Además, todas las muestras incrementan la población celular en la fase sub- G_1 . Excepto en la muestra BZFe, el descenso en la fase G_1 , se relaciona con un incremento de la población celular en la fase S ($p < 0.05$) respecto al control, mientras que en la fase G_2/M , al comparar con el control, no se observan diferencias entre las muestras.

La proliferación celular en células normales está regulada por puntos de control y restricción entre las fases G_1 a S y G_2 a M, en los cuales se mantiene una correcta síntesis de ADN (Kaufmann & Paules, 1996). No obstante, los peróxidos pueden alterar el punto de restricción G_1 del ciclo celular (Shackelford et al., 2000) y reducir la población celular en la fase G_1 (Elisia & Kitts, 2008). Todo ello podría explicar el descenso en la proporción celular en la fase G_1 unido al incremento de la población celular en fase S como reflejo de la respuesta celular adaptativa frente al estrés oxidativo observado en nuestro estudio. Estos resultados, a su vez, son acordes con el incremento en la actividad GSH-Rd descrita para las células preincubadas con las fracciones bioaccesibles de las muestras, ya que el aumento de la GSH-Rd sería una acción secundaria a la de antioxidantes no enzimáticos como el GSH, que sería consumido en primer término. Por lo tanto, la inducción de la enzima GSH-Rd puede suponer un intento de

compensación frente al estrés oxidativo inducido. Esta observación coincide con la sobre-regulación del gen c-glutamylcisteína sintetasa, el cual sintetiza GSH (Rahman & MacNee, 2000), compuesto para el que se ha descrito la participación en la síntesis de ADN y resistencia frente a apoptosis (Pallardó et al., 2009). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos (ver figura nº 28) tanto la suplementación con leche como con minerales no previene la elevación de la población celular en la fase sub-G₁, la cual representa células hipodiploides y es considerada como un indicador temprano de muerte celular por apoptosis (Elisia & Kitts, 2008). No obstante, no se debe descartar roturas en las hebras de ADN mediadas por H₂O₂, cuando la concentración de éste es superior a 1 mM (Davies, 1999).

Con objeto de estudiar la relación entre el incremento en la población celular en la fase sub-G₁ y la muerte celular por apoptosis, se determina la actividad enzimática caspasa-3, puesto que se trata de uno de los principales enzimas ejecutores en la muerte celular programada (figura nº 29).

Figura n° 29. Efectos del tratamiento con H_2O_2 5 mM /2 h en la actividad caspasa-3 en células Caco-2 preincubadas 24 h con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 4). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



Las células tratadas directamente con H_2O_2 muestran un incremento ($p < 0.05$) en la actividad caspasa-3 con respecto al control. En las células tratadas con las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas se previene la activación de la caspasa-3, lo que apoyaría el efecto citoprotector de las muestras objeto de estudio.

Se observa un efecto positivo en la inhibición de la actividad caspasa-3 del cinc frente al hierro cuando la adición mineral es individual

tanto en presencia como en ausencia de leche (BZZn vs BZFe y BZZnL vs BZFeL).

Al tratar las células con las fracciones bioaccesibles de las muestras, el incremento en la población celular en la fase sub-G₁ no va acompañado de la activación de la enzima caspasa-3, por lo que el incremento en la proporción celular en sub-G₁ mediado por H₂O₂ podría ser debido a daño en el ADN bajo las condiciones experimentales aplicadas en el estudio. Esta observación es acorde con el incremento en la fase sub-G₁ en células HepG2 tratadas con el complejo bisfenantrolina-cumarina-6,7-dioacetatocobre (II), el cual es atribuido a la condensación periférica de la cromatina y a fragmentación de ADN, no acompañada de incremento en la actividad caspasa-9 (activador de la caspasa-3) ni de rotura proteolítica de la polimerasa poli ADP-ribosa (sustrato de la caspasa-3) (Thati et al., 2007).

La menor actividad de la caspasa-3 en las células preincubadas con las muestras suplementadas con hierro y cinc, coincide con estudios previos en los que se muestra la ausencia de activación de ésta enzima al tratar células Caco-2 post-confluentes con soluciones modelo de Zn (0-200 µM) (Zödl et al., 2003) y de Fe (100-3000 µM) (Zödl et al., 2004). Asimismo, se ha indicado que la localización intracelular de las metalotioneínas en células de hepatoma de rata tratadas con Zn y Zn-Fe intervienen en la protección celular del daño al ADN y de la apoptosis (Formigari et al., 2007).

La presencia de leche no modifica la actividad de la caspasa-3. Phelan et al. (2009) han descrito la ausencia de efectos genoprotectores por parte de hidrolizados de caseína frente al daño inducido en ADN por H₂O₂ en células Caco-2. Sin embargo, la preincubación de células Caco-2 con disoluciones modelo de CPPs aislados ha mostrado prevención en el

incremento de la población celular en la fase sub-G₁ tras exposición a H₂O₂ durante 2 h (Laparra et al., 2008).

3. Actividad antiproliferativa de las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas en células de cáncer de colon

Para los siguientes ensayos de actividad antiproliferativa se utilizan células subconfluentes indiferenciadas como modelo de células de cáncer de colon (Bermúdez-Soto et al., 2007a).

El orden seguido en las muestras para la evaluación de la actividad antiproliferativa es el mismo que el anteriormente presentado en la determinación del perfil polifenólico por HPLC antes y después de la digestión gastrointestinal.

a) Fracciones bioaccesibles de BZ, BZFe y BZFeL (células Caco-2)

El efecto antiproliferativo en células Caco-2 subconfluentes tras la preincubación con las fracciones bioaccesibles de las muestras BZ, BZFe y BZFeL a dosis subtóxicas (2%, 5% y 7.5% v/v en medio de cultivo) en exposición repetitiva (4 h/día durante cuatro días) o continua (24 h) se muestra en el cuadro nº 18.

Cuadro n° 18. Actividad antiproliferativa (porcentaje de inhibición) de las fracciones bioaccesibles de BZ, BZFe, BZFeL y del blanco de digestión en células Caco-2.

	Exposición repetitiva			Exposición continua		
	(4 h durante 4 días)			(24 h)		
	Fracciones bioaccesibles ¹			Fracciones bioaccesibles ¹		
	2%	5%	7.5%	2%	5%	7.5%
Blanco digestión	0.1 ± 6.9	1.4 ± 11.0	0.3 ± 6.3	-0.6 ± 12.0	3.4 ± 8.4	3.6 ± 8.0
BZ	18.5 ± 2.9*	31.1 ± 3.9*	27.4 ± 1.6*	33.3 ± 2.8*	20.7 ± 2.1*	53.4 ± 5.7*
BZFe	23.6 ± 3.2*	21.6 ± 8.9	8.8 ± 3.6	33.3 ± 2.8*	7.3 ± 2.1	9.8 ± 7.8
BZFeL	17.0 ± 3.4*	18.3 ± 2.3	13.1 ± 5.3	35.2 ± 1.6*	18.3 ± 2.1*	20.2 ± 5.6*

Los resultados de las fracciones bioaccesibles de las muestras están referidos a los valores obtenidos tras incubar las células con el blanco de digestión.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Valores con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respecto al blanco de digestión (p<0.05).

¹Porcentaje v/v en medio de cultivo.

La viabilidad celular es superior al 90%. Se observa un descenso máximo del 12% en la proliferación celular al comparar el blanco de digestión con respecto a las células control (células no expuestas a la fracción bioaccesible), hecho probablemente debido a la presencia de enzimas digestivos en las fracciones bioaccesibles. Por ello, los valores de inhibición de proliferación celular de las muestras se refieren a aquellos obtenidos al tratar las células con el blanco de digestión.

En general, no se observa una relación dosis-respuesta en la actividad antiproliferativa. La mayor actividad antiproliferativa (53% de inhibición) se detecta en la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v) tras exposición continua (24 h) (cuadro n° 18), la cual contiene ~50 μM (~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de polifenoles totales.

Seeram et al. (2005) indican inhibición de la proliferación celular (entre 30%-100%) en distintas líneas celulares de cáncer de colon (entre ellas las células HT-29) tratadas durante 48 h con punicalagina, ácido elálgico, extracto de granada y zumo de granada, siendo la actividad antiproliferativa mayor en el zumo de granada que en sus compuestos aislados. Del mismo modo, distintos zumos de bayas (50 μg polifenoles/mL zumo) han demostrado actividad antiproliferativa (entre 15%-75%) en células Caco-2 tras 48 h de tratamiento (Boivin et al., 2007). Cabe señalar que en estos estudios no se considera la digestión gastrointestinal *in vitro*. En este contexto, Bermúdez-Soto et al. (2007a) describen la inhibición en la proliferación de células Caco-2 (entre 40% y 70%) tras la exposición repetitiva (2 h diarias durante 4 días) con fracciones bioaccesibles de zumo de *Aronia melanocarpa* al 2% (~85 μM polifenoles totales) y 5% (~220 μM polifenoles totales) v/v en medio de cultivo.

Entre los principales procesos relacionados con la progresión y evolución del cáncer cabe señalar la desregulación del ciclo celular y la inducción de apoptosis. A continuación, en las figuras n° 30 y n° 31, se muestra la progresión del ciclo celular en células Caco-2 tratadas con la fracción bioaccesible de la muestra BZ 7.5% v/v en medio de cultivo (condición con la que se alcanza la mayor actividad antiproliferativa) en exposiciones repetitiva y continua (véase cuadro n° 18).

Figura n° 30. Distribución del ciclo celular en células Caco-2 tratadas con la fracción bioaccesible de la muestra BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) en exposición repetitiva (4 h/día durante 4 días). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3). Superíndices * y ** indican diferencias significativas con el control y el blanco de digestión, respectivamente (p<0.05).

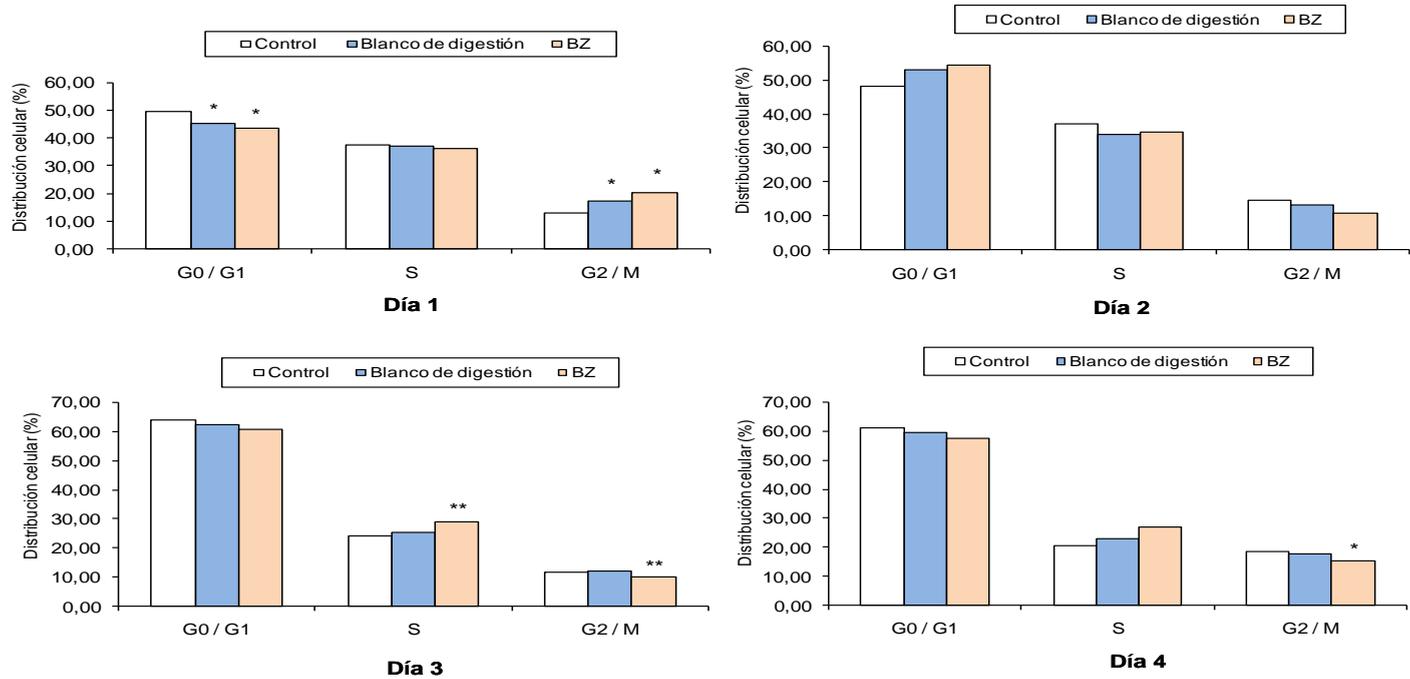
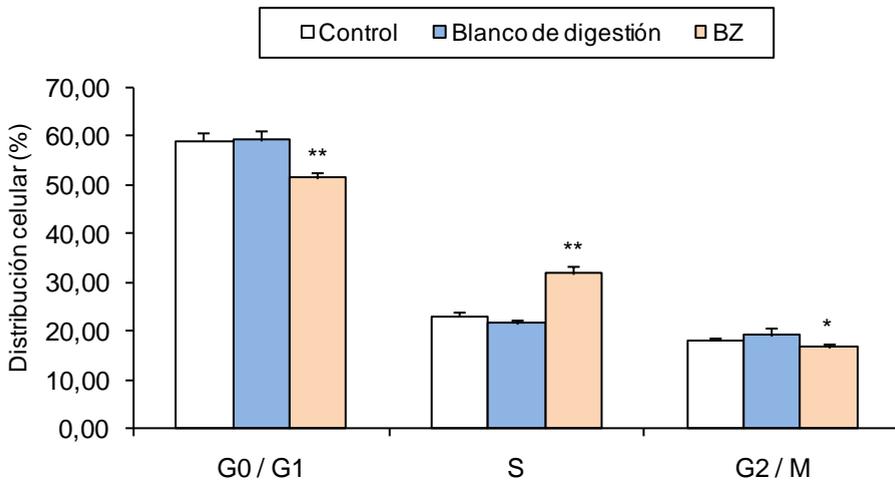


Figura n° 31. Distribución del ciclo celular en células Caco-2 tratadas con la fracción bioaccesible de la muestra BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) en exposición continua (24 h). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3). Superíndices * y ** indican diferencias significativas con el control y el blanco de digestión, respectivamente ($p < 0.05$).

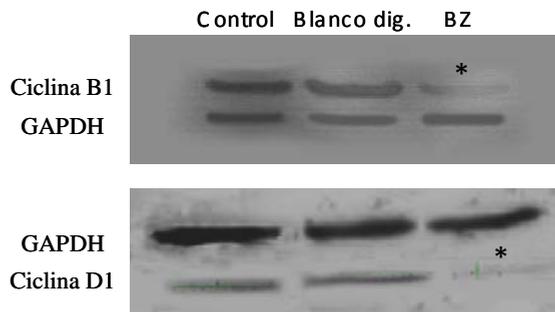


En el día tres de tratamiento se observa un incremento de la proporción celular en la fase S, respecto al blanco de digestión, acompañado de un descenso en la fase G₂/M. Los cambios observados en el ciclo celular, comparados con el blanco de digestión, son más pronunciados tras el tratamiento con la fracción bioaccesible de la muestra BZ con exposición continua (24h) (figura n° 31), mostrando un incremento en la fase S acompañado de un descenso en la fase G₀/G₁. También se observa un descenso en la fase G₂/M relativa a las células control. Los resultados obtenidos, utilizando dosis subtóxicas, sugieren que la combinación

específica de compuestos fitoquímicos en la fracción bioaccesible de la muestra BZ puede modular la proliferación de las células Caco-2 bloqueando la progresión del ciclo celular en la fase S.

Esta modulación del ciclo celular podría ser debida a una respuesta en un punto de restricción del ciclo por daño en el ADN, así como a otros mecanismos. Por ello, para obtener mayor información al respecto, se determina el efecto del tratamiento con la fracción bioaccesible de BZ sobre los niveles de proteína de las ciclinas B₁ y D₁ (ver figura n° 32).

Figura n° 32. Efecto de la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) sobre la expresión de las ciclinas B₁ y D₁ en células Caco-2 tras exposición continua (24 h). Se utiliza la proteína GAPDH como control de carga proteica. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



En general, una expresión incontrolada de las ciclinas o ciclinas dependientes de quinasas puede degenerar en tumorigénesis o arresto en el ciclo celular. En este sentido, la sobreexpresión de la ciclina D₁ se correlaciona con un estadio temprano en la progresión del cáncer y la

metástasis. Durante la progresión del ciclo celular, la ciclina D_1 se expresa a niveles bajos durante la fase S. En el transcurso de la fase S a la G_2 , se incrementa su expresión, que continúa elevada en la siguiente fase G_1 de un nuevo ciclo celular. Por lo tanto, el descenso en la expresión de la ciclina D_1 se correlaciona con un cese en la fase S, ya que el ciclo no puede progresar a la fase G_2 (Hitomi & Stacey, 1999). Por otra parte, la ciclina B_1 es una proteína crítica en la regulación de la mitosis. Su expresión es mínima en G_1 , empieza a aumentar en la fase S y alcanza su máximo en la fase G_2/M . Así pues, un descenso en la expresión de la ciclina B_1 se correlaciona con un cese en las fases S y G_2/M (Visanji et al., 2006). Por lo tanto, la baja expresión de las ciclinas D_1 y B_1 (ver figura nº 32) previene la transición a la fase G_2 . El principal efecto de la incubación de las células Caco-2 con la fracción bioaccesible de BZ es el arresto de la fase S del ciclo celular (figuras nº 30 y nº 31).

Otro posible mecanismo implicado en la actividad antiproliferativa de la fracción bioaccesible de la muestra BZ podría estar mediado por la inducción de apoptosis. Con el objeto de comprobarlo, se lleva a cabo la evaluación morfológica de la apoptosis en células Caco-2 expuestas 24h a con la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v en medio de cultivo). Se determinan posibles cambios en la distribución de la condensación de cromatina mediante la tinción del ADN con la sonda fluorescente Hoechst 33242.

En la figura nº 33 se muestra la determinación morfológica de la apoptosis.

Figura n° 33. Determinación morfológica de la apoptosis utilizando la sonda fluorescente Hoechst 33242 en células Caco-2. Exposición 24 h a la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v en medio de cultivo). Las flechas señalan la condensación de cromatina en el núcleo de una célula apoptótica.

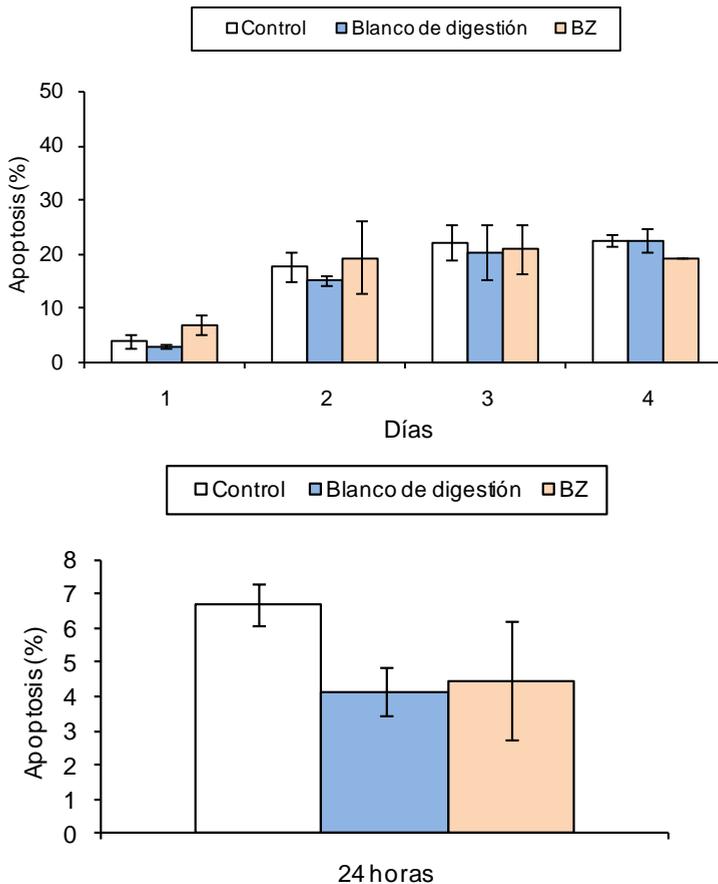


El tratamiento de las células Caco-2 con la fracción bioaccesible de la muestra BZ sigue el mismo patrón que las células control y las tratadas con el blanco de digestión, lo que implica la ausencia de apoptosis en exposición continua (24 h).

Para confirmar los resultados obtenidos, se determina la apoptosis por citometría de flujo por el método FDA-IP, tras el tratamiento de las células Caco-2 con la fracción bioaccesible de BZ en exposición repetitiva y continua. Es recomendable la utilización de distintos métodos para la evaluación y confirmación de la apoptosis (Larrosa et al., 2003).

En la figura n° 34 se muestra la determinación de apoptosis por citometría de flujo.

Figura n° 34. Determinación de apoptosis mediante citometría de flujo (ensayo FDA-IP) en células Caco-2. Exposición a la fracción bioaccesible de la muestra BZ (7.5% v/v en medio de cultivo) en exposición repetitiva (4h/día durante 4 días) y continua (24 h). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3).



Los resultados obtenidos por citometría de flujo, coinciden con el estudio morfológico con la sonda fluorescente Hoechst 33242, confirmando la ausencia de apoptosis en las condiciones de estudio.

b) Fracciones bioaccesibles de BZZn, BZFeZn, BZZnL y BZFeZnL (células Caco-2 y HT-29)

El efecto antiproliferativo en células Caco-2 y HT-29 subconfluentes tras la preincubación en exposición continua (24 h) con las fracciones bioaccesibles de las muestras BZZn, BZFeZn, BZZnL y BZFeZnL a dosis subtóxicas (7.5% v/v en medio de cultivo) se muestra en el cuadro nº 19. Como en el estudio anterior, se utiliza el periodo de exposición continua (24 h) y la concentración de fracción bioaccesible 7.5% v/v en el medio de cultivo. Debido a que es práctica habitual en los ensayos de actividad antiproliferativa de compuestos bioactivos fitoquímicos, la utilización de distintas líneas celulares, en este caso se utilizan las células Caco-2 y HT-29 como modelo *in vitro* de cáncer de colon (Coates et al., 2007)

Cuadro n° 19. Actividad antiproliferativa (porcentaje de inhibición) de las fracciones bioaccesibles de BZZn, BZFeZn, BZZnL, BZFeZnL y del blanco de digestión. Exposición 24 horas.

	Caco-2	HT-29
Blanco digestión	5.6 ± 5.7	-2.4 ± 3.4
BZZn	13.4 ± 7.3	12.9 ± 6.3
BZFeZn	11.0 ± 6.6	18.8 ± 11.1*
BZZnL	35.0 ± 6.7*	28.6 ± 9.2*
BZFeZnL	13.5 ± 6.9	14.2 ± 6.9

Los resultados de las fracciones bioaccesibles de las muestras están referidos a los valores obtenidos tras incubar las células con el blanco de digestión.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Valores con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respecto al blanco de digestión (p<0.05).

La viabilidad celular (determinada mediante azul tripán) en las células Caco-2 y HT-29 expuestas a las fracciones bioaccesibles de las muestras suplementadas con cinc es superior al 95%.

Se observa un descenso del 6% en la proliferación celular cuando se compara el blanco de digestión con respecto a las células control (células no expuestas a las fracciones bioaccesibles). Los valores de inhibición de proliferación celular de las muestras se refieren a aquellos obtenidos al tratar las células con el blanco de digestión.

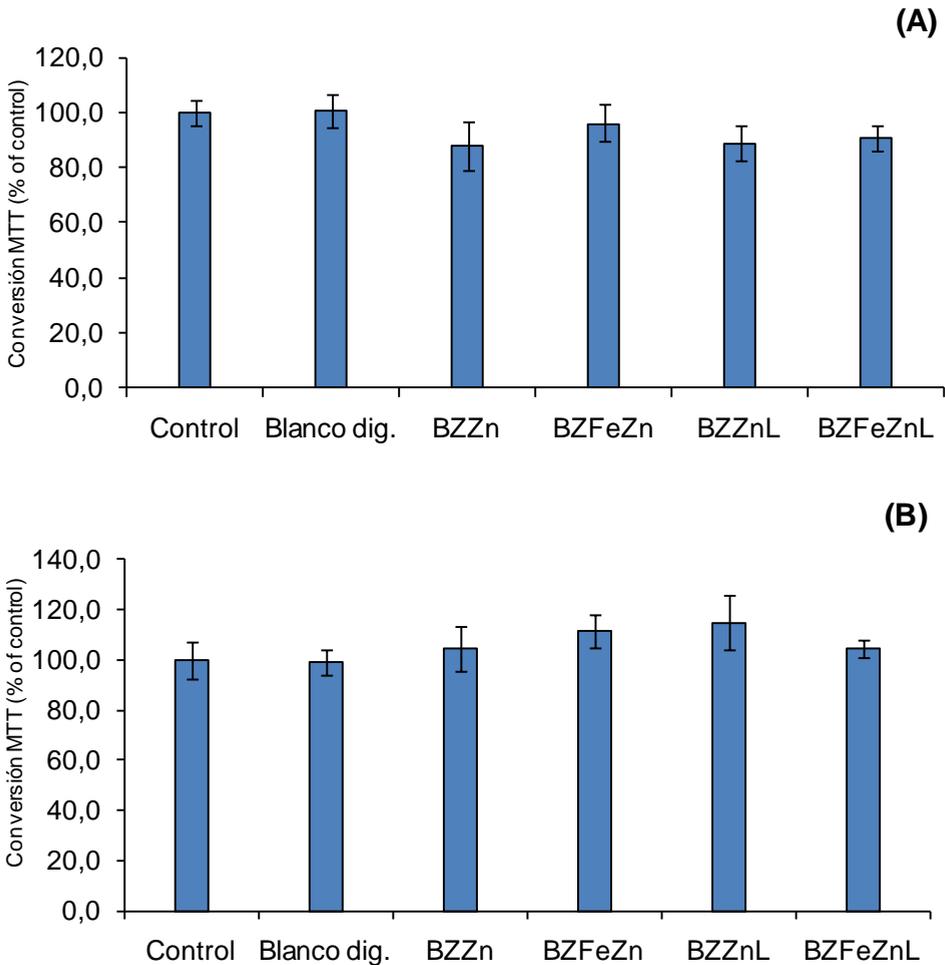
En células Caco-2, la mayor actividad antiproliferativa (p<0.05) corresponde a la fracción bioaccesible de BZZnL (35%), mientras que en

células HT-29, las muestras BZFeZn (19%) y BZZnL (29%) son las que inhiben la proliferación celular de forma significativa ($p < 0.05$) con respecto al blanco de digestión.

La actividad antiproliferativa en muestras suplementadas con cinc (BZZnL) es inferior a la correspondiente a la fracción bioaccesible de la muestra BZ. Al comparar las muestras suplementadas con cinc con las del apartado anterior suplementadas con hierro (véase cuadros nº 18 y 19) se observa que los porcentajes de inhibición son similares para las muestras que no contienen leche (BZFe vs BZZn). En presencia de leche, la actividad antiproliferativa es superior en la muestra con cinc (BZFeL vs BZZnL).

Para comprobar que las células, tras exposición 24 h a las fracciones bioaccesibles de las bebidas suplementadas con cinc, son metabólicamente activas se aplica el test MTT (ver figura nº 35).

Figura n° 35. Conversión del MTT en células Caco-2 (A) y HT-29 (B) expuestas a las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas suplementadas con cinc (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (n = 6).



No se observan diferencias significativas ($p > 0.05$) en las actividades de los enzimas mitocondriales de ambas líneas celulares expuestas a las

fracciones bioaccesibles de las muestras suplementadas con cinc (7.5% v/v en medio de cultivo; ~50 μ M polifenoles totales) durante 24 h, indicando ausencia de citotoxicidad. Dado que la fracción bioaccesible de la muestra BZZnL es la que presenta actividad antiproliferativa sin citotoxicidad en ambas líneas celulares, se selecciona para los ensayos de apoptosis y/o arresto en el ciclo celular.

En las figuras n° 36 y 37, se muestra la evaluación morfológica de apoptosis con la sonda fluorescente Hoechst 33242 tras exposición a la fracción bioaccesible de la muestra BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo; ~50 μ M polifenoles totales) durante 24 h en células Caco-2 y HT-29, respectivamente.

Figura n° 36. Determinación morfológica de la apoptosis en células Caco-2 tratadas con la fracción bioaccesible de BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h utilizando la sonda fluorescente Hoechst 33242. Las flechas señalan la condensación de cromatina en el núcleo de una célula apoptótica. Se utiliza Staurosporina 10 μ M como control positivo de apoptosis.

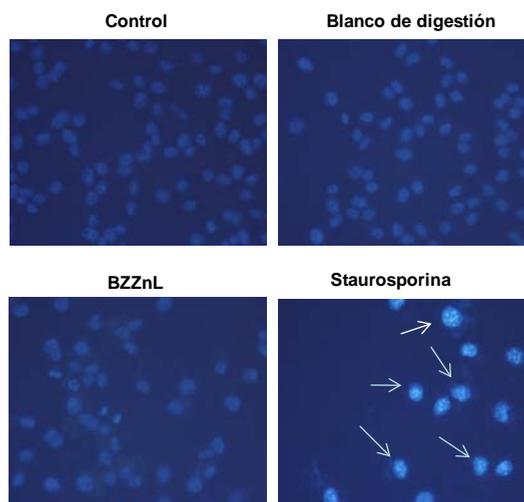
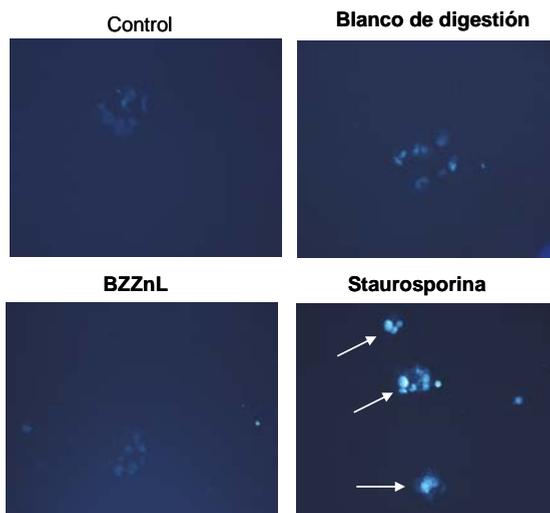


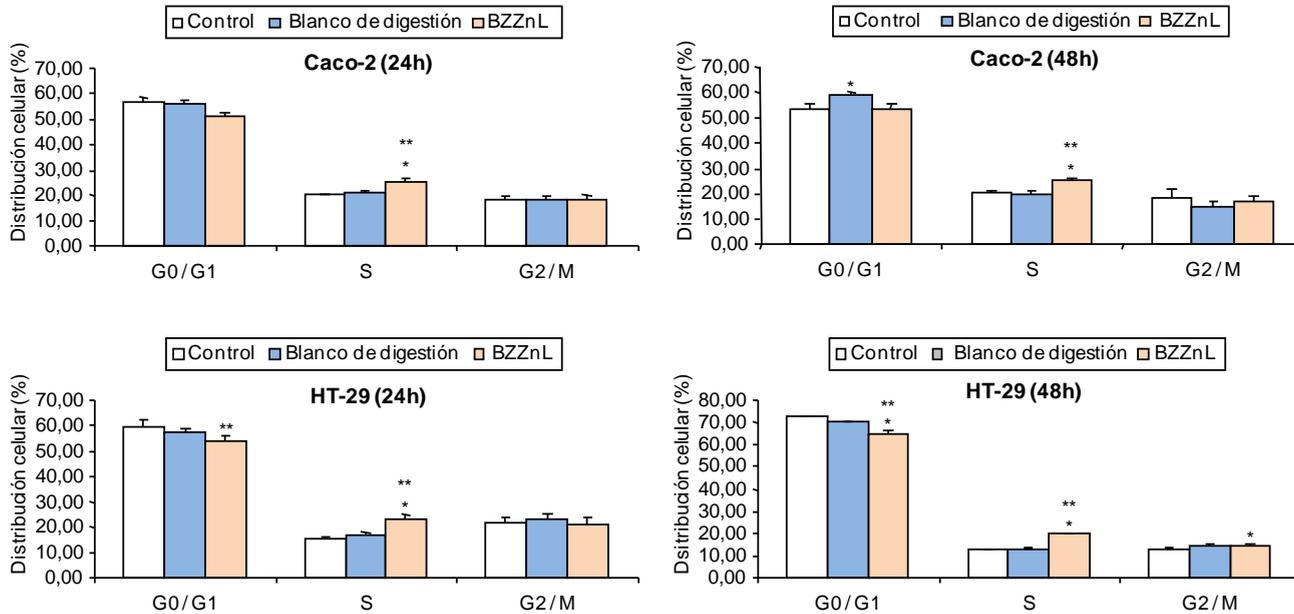
Figura n° 37. Determinación morfológica de la apoptosis en células HT-29 tratadas con la fracción bioaccesible de BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h utilizando la sonda fluorescente Hoechst 33242. Las flechas señalan la condensación de cromatina en el núcleo de una célula apoptótica. Se utiliza Staurosporina 10 μ M como control positivo de apoptosis.



La exposición de las células Caco-2 y HT-29 a la fracción bioaccesible de la muestra BZZnL sigue el mismo patrón que las células control y el blanco de digestión, lo que implica la ausencia de apoptosis en exposición continua (24 h).

En la figura n° 38, se muestra el efecto de la fracción bioaccesible de BZZnL en la modulación de la progresión del ciclo celular en Caco-2 y HT-29.

Figura n° 38. Distribución del ciclo celular en células Caco-2 y HT-29 expuestas a la fracción bioaccesible de la muestra BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo) durante 24 h y 48 h. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3). Superíndices * y ** indican diferencias significativas con el control y el blanco de digestión, respectivamente ($p < 0.05$).

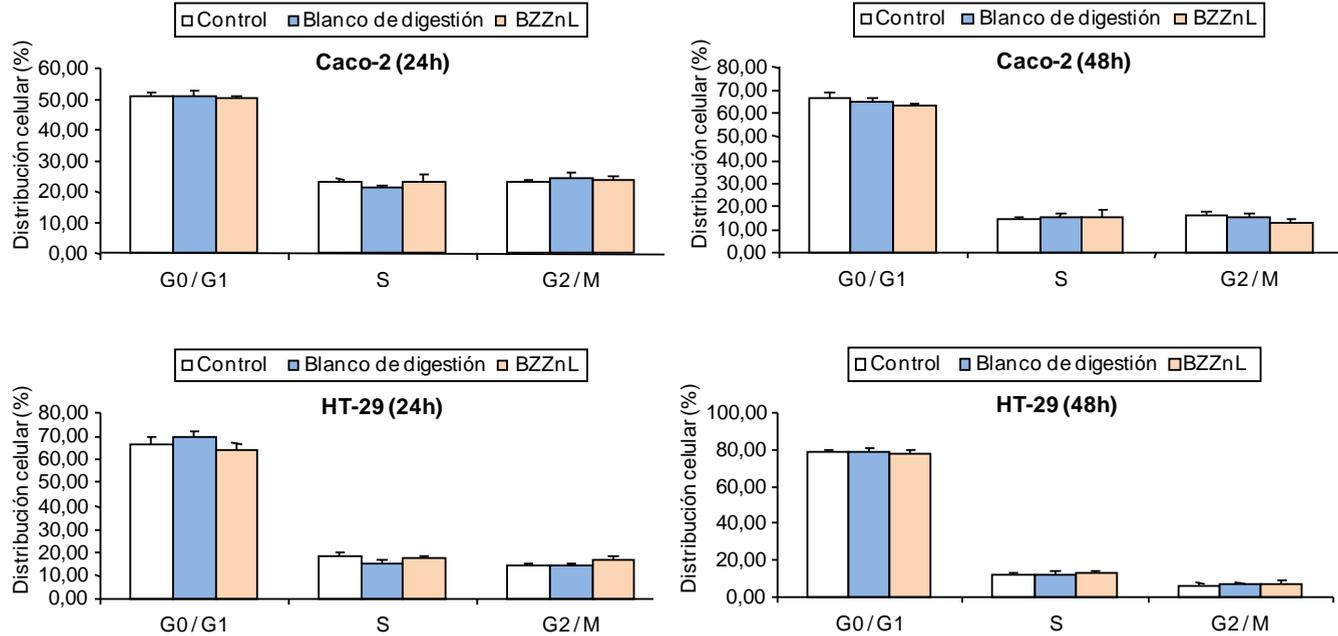


La exposición de las células Caco-2 y HT-29 durante 24 h a la fracción soluble de la muestra BZZnL (7.5% v/v en medio de cultivo; ~50 μ M polifenoles totales) proporciona un incremento significativo ($p < 0.05$) en la proporción celular en la fase S en ambas líneas celulares, acompañado de un descenso ($p < 0.05$) en la fase G_0/G_1 (sólo en células HT-29) y sin diferencias en la fase G_2/M , comparado con el blanco de digestión. Los resultados indican que los compuestos fitoquímicos de la fracción bioaccesible de la muestra BZZnL pueden modular la proliferación de las células Caco-2 y HT-29 bloqueando la progresión del ciclo celular en la fase S. En las células Caco-2, la distribución del ciclo celular es similar cuando se exponen a la fracción bioaccesible de la muestra BZZnL o a BZ.

Con objeto de conocer si un periodo de incubación más largo provoca un mayor arresto en la fase S se efectúan ensayos en ambas líneas celulares con 48 h de exposición (ver figura nº 38), en los que no se observan diferencias entre ambos periodos estudiados.

Compuestos bioactivos fitoquímicos de los alimentos, como los polifenoles, son de interés como fuentes potenciales de compuestos con actividad citostática, ya que presentan *per se* baja toxicidad (Milner, 2002). Si la fracción bioaccesible de BZZnL estuviera ejerciendo un efecto citostático sin efectos citotóxicos, las células deberían recuperar su proliferación normal, al retirar la fracción bioaccesible del medio de cultivo en contacto con las células. Para ello, se determina la distribución del ciclo celular tras 24 h y 48 h (figura nº 39), después de retirar el medio de cultivo.

Figura n° 39. Distribución del ciclo celular en células Caco-2 y HT-29, 24 h y 48 h después de retirar la fracción bioaccesible de BZZnL del medio de cultivo. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3).



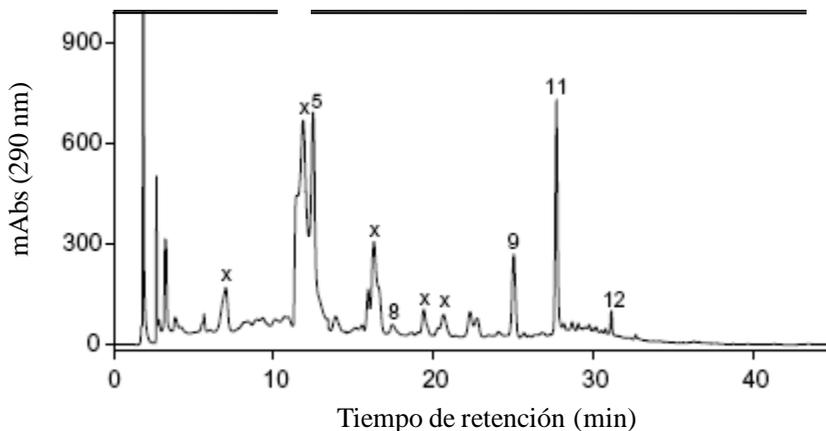
Al no mostrar diferencias la muestra BZZnL con el control, ni con el blanco de digestión, los resultados obtenidos indican que tanto las células Caco-2 como las HT-29 pueden recuperarse y reanudar su ciclo celular tras retirar la fracción bioaccesible de la muestra BZZnL del medio de cultivo en contacto con las células. En este sentido, Bermúdez-Soto et al. (2007a) muestran que las células Caco-2 expuestas, 2 h/día durante 4 días, a la fracción bioaccesible de zumo de *Aronia melanocarpa* (80 μ M polifenoles totales) recuperan su proliferación normal tras cambiar la muestra por el medio de cultivo. Del mismo modo, Morley et al. (2007) indican los mismos resultados de reanudación del ciclo celular en células de cáncer de mama (MDA-MB-435) y de colon (HT-29) después de 1 día de haber retirado del medio de cultivo los compuestos tangeretina y nobiletina, lo que justifica el efecto citostático de ambos polifenoles.

4. Biodisponibilidad y metabolismo en células Caco-2 de los polifenoles mayoritarios en las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas

Para determinar la captación y metabolismo de los polifenoles mayoritarios presentes en las fracciones bioaccesibles de las muestras se utiliza el modelo que combina una digestión gastrointestinal simulada y células Caco-2. Este modelo ha sido previamente utilizado por otros autores para determinar la captación de polifenoles en alimentos sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro*: cebolla y piel de manzana (Boyer et al., 2004 y 2005) y café con leche (Dupas et al., 2006).

Las células Caco-2 se incuban en exposición repetitiva (4 h/día durante 4 días) y continua (24 h y 48 h) con las fracciones bioaccesibles de las muestras BZ, BZFe y BZFeL (7.5% v/v en medio de cultivo) y los polifenoles mayoritarios se determinan mediante HPLC-DAD-MS/MS en el medio de cultivo y en las células. A modo de ejemplo, se muestra el cromatograma del medio de cultivo tras la exposición de las células Caco-2 a la fracción bioaccesible de BZ durante 24 h (figura nº 40).

Figura nº 40. Cromatograma del medio de cultivo que contiene la fracción bioaccesible de BZ (7.5% v/v) tras la exposición de las células Caco-2 durante 24 h. Los nº de pico corresponden a los compuestos polifenólicos identificados en el cuadro nº 15, y que corresponden a: 5 (ácido clorogénico), 8 (hexosil-narirutina), 9 (narirutina), 11 (hesperidina) y 12 (didimina).



Los polifenoles se detectan en el medio de cultivo pero no en las células. Datos previos de captación de polifenoles indican que la exposición

de células Caco-2 durante 48 h a resveratrol o piceatanol (100 μM) muestran concentraciones intracelulares del orden de pg/célula (Larrosa et al., 2003 y 2004). El hecho que nuestras muestras estén digeridas y formen parte de una matriz alimentaria podría explicar la menor captación de polifenoles que cuando se analizan estos compuestos puros diluidos en soluciones tampón.

Se ha indicado que la biodisponibilidad del ácido clorogénico de café con leche sin y con digestión gastrointestinal simulada no supera el 0.25% (Dupas et al., 2006).

En el presente trabajo, factores como la dilución de las fracciones bioaccesibles con el medio de cultivo (contenido de polifenol individual $\leq 8 \mu\text{M}$) e interacciones con otros componentes de las bebidas, podrían justificar la baja o nula captación de los polifenoles en las muestras objeto de estudio.

La mayoría de polifenoles presentes en las fracciones bioaccesibles de las muestras se encuentra en forma glicosilada. Ello implica que la hidrólisis por la glicosidasas de la microflora intestinal debe ser un paso necesario antes de la absorción a nivel intestinal. Etapas adicionales en el proceso de digestión gastrointestinal simulada, como la inclusión de un proceso de fermentación colónica microbiana podrían ayudar a completar y mejorar el proceso de biodisponibilidad cuando se utilizan células de colon.

5. Estudio de intervención en humanos

a) Capacidad antioxidante total (CAT) sérica

Las bebidas a base de zumo de frutas utilizadas en el estudio de intervención presentan los siguientes valores de CAT (expresados en μM de Trolox):

- BZ: 12641.5 ± 568.9 (ORAC) y 6762.2 ± 179.3 (TEAC)
- BZL: 13791.3 ± 589.9 (ORAC) y 6010.1 ± 201.5 (TEAC)
- BZFeL: 10705.1 ± 736.3 (ORAC) y 5695.6 ± 270.4 (TEAC)

Los valores de CAT sérica obtenidos por los métodos ORAC y TEAC tras la intervención con BZ (estudio 1), BZL (estudio 2) y BZFeL (estudio 3) se recogen en el cuadro n° 20.

Cuadro n° 20. Estudio de intervención: capacidad antioxidante total sérica en los estudios 1-3 (BZ, BZL y BZFeL) determinada por los métodos ORAC y TEAC.

Estudio	Basal	3 semanas	6 semanas	9 semanas	12 semanas
<i>ORAC ($\mu\text{M Trolox}$)</i>					
1 (BZ)	18577.87 \pm 733.81 ^{ax}	15926.45 \pm 511.88 ^{bx}			
2 (BZL)	16203.57 \pm 429.68 ^{ay}	14028.42 \pm 414.73 ^{by}			
3 (BZFeL)	14930.84 \pm 551.18 ^{ay}	14687.16 \pm 380.55 ^a	14619.90 \pm 385.46 ^a	15455.29 \pm 446.82 ^a	14419.20 \pm 579.53 ^{ay}
<i>TEAC ($\mu\text{M Trolox}$)</i>					
1 (BZ)	6293.78 \pm 117.36 ^{ax}	5683.00 \pm 106.41 ^{bx}			
2 (BZL)	4851.34 \pm 121.69 ^{ay}	4012.74 \pm 87.05 ^{by}			
3 (BZFeL)	4899.71 \pm 130.00 ^{ay}	4562.65 \pm 123.50 ^{ab}	2498.55 \pm 112.25 ^c	4429.51 \pm 123.16 ^b	4755.24 \pm 202.92 ^{abz}

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 32). Letras diferentes en una línea (a, b, c) o columna (x, y, z) en cada método (ORAC o TEAC) indican diferencias significativas (p<0.05)

Al considerar el inicio y final de cada estudio se observa un descenso significativo ($p < 0.05$) en la CAT sérica (métodos ORAC y TEAC) entre el inicio y el final del periodo de suplementación en los estudios 1 y 2. Sin embargo, en el estudio 3, no se hallan diferencias significativas ($p > 0.05$) en la CAT sérica (métodos ORAC y TEAC) entre el periodo inicial (tiempo 0 semanas) y el final (tiempo 12 semanas), aunque los valores TEAC muestran un descenso significativo ($p < 0.05$) tras 6 semanas de suplementación, que se recuperan gradualmente, alcanzando el valor inicial del estudio tras 12 semanas de suplementación.

Cuando se comparan los 3 estudios efectuados, los valores más altos de CAT sérica (métodos ORAC y TEAC) corresponden al comienzo del estudio 1 (BZ: tiempo 0). Tras el periodo de lavado que precede a los estudios 2 y 3, no se recuperan los niveles basales. Al final del periodo de suplementación (3 semanas para los estudios 1 y 2, y 12 semanas para el estudio 3), se observa un descenso en la CAT sérica al final de los estudios 2 y 3 respecto al estudio 1 (métodos ORAC y TEAC), siendo el descenso en el estudio 3 (método TEAC) menos acusado. No se halla correlación entre los valores obtenidos por los métodos ORAC y TEAC, acorde a los resultados obtenidos por Cao & Prior (1998) quienes atribuyen la ausencia de correlación a diferencias en la metodología y mecanismos de acción.

Estudios (Cao et al., 1998; Van den Berg et al., 2001) similares al presente (2-3 semanas) muestran efectos positivos derivados del consumo de fruta en la CAT plasmática; hay que considerar que en uno de ellos (Cao et al., 1998), la suplementación corresponde a dos dietas ricas en antioxidantes con 10 y 12 piezas de frutas y verduras (cantidad mucho más alta a la utilizada en nuestro estudio), y en el otro (Van den Berg et al.,

2001) la suplementación con un concentrado de frutas y verduras, se realiza en sujetos fumadores con estrés oxidativo endógeno preestablecido.

Los efectos de los antioxidantes de la dieta son más evidentes en sujetos bajo condiciones de estrés oxidativo que en personas sanas con un estatus redox equilibrado en las que la detección de variaciones en el estatus antioxidante es más complejo. Este hecho ha sido puesto de manifiesto en diversos estudios en mujeres sanas que ingieren zumos de frutas (Riso et al., 2005; Burgess & Andrade, 2006; Duthie et al., 2006).

El descenso en la CAT sérica observada tras la ingesta de BZ y BZL (estudios 1 y 2) podría deberse a la presencia de compuestos potencialmente pro-oxidantes en las bebidas analizadas. Los antioxidantes podrían ejercer un efecto pro-oxidante dependiendo de su potencial redox y estado químico (Schwartz, 1996; Halliwell, 2000 y 2007). Se ha descrito que el consumo de un zumo de manzana y grosella negra (1000 mL/día, conteniendo 198.7 mg de ácido ascórbico) disminuye significativamente ($p < 0.05$) la CAT plasmática evaluada por el método TEAC (Young et al., 1999). Además, se indica que el consumo de este zumo induce una acción pro-oxidante mediante el incremento del marcador de oxidación proteica 2-aminoadípico semialdehído (AAS). Con ingestas de zumo superiores (1500 mL/día conteniendo 298.1 mg de ácido ascórbico) los valores TEAC no difieren estadísticamente del control a pesar de un incremento más pronunciado en la oxidación proteica. Acorde con estos resultados, Dragsted et al. (2004) hallan una correlación entre el ascorbato plasmático y el producto de oxidación proteica AAS tras un estudio de intervención (25 días) con ingesta diaria de 600 g de frutas y verduras (150 mg de ácido ascórbico). Por otra parte, se han descrito efectos pro-oxidantes tras el

consumo de un zumo rico en compuestos polifenólicos posiblemente debido a su contenido en azúcares, ya que éstos podrían desempeñar un papel importante en el aumento transitorio en la oxidación proteica mediante mecanismos de glicoxidación y/o glicosilación (García-Alonso et al., 2006). El hecho que las bebidas a base de zumo de frutas utilizadas en el presente estudio proporcionen 270 mg de ácido ascórbico/día durante 3 semanas, podría ser uno de los factores relacionados con el descenso en la capacidad antioxidante junto a la presencia de azúcares.

Se han descrito propiedades antioxidantes *in vitro* para la leche (Lindmark-Mansson & Akesson, 2000; Chen et al., 2003), hecho por el cual cabría esperar un incremento de la CAT sérica tras el consumo de las muestras BZL y BZFeL, aunque los resultados obtenidos (cuadro nº 20) no reflejan este hecho. Kitts (2005) ha mostrado que los CPPs formados a partir de la digestión de la leche muestran actividad antioxidante *in vitro* tanto en sistemas acuosos como en emulsiones lipídicas, pero este hecho probablemente no pueda extrapolarse a la situación *in vivo*. Debe considerarse que en la formulación de las bebidas a base de zumo de frutas utilizadas en el presente estudio, la leche representa sólo un 11% y su contribución a la CAT oscila entre un 6% y un 8%, lo que justificaría que no se detecte un aumento en la capacidad antioxidante en las mujeres que consumen BZL y BZFeL.

Por otra parte, la suplementación con hierro puede catalizar la formación de radicales hidroxilo, alcoxilo y peroxilo. Lachili et al. (2001) observan, en un estudio con mujeres embarazadas, que la suplementación combinada de hierro (100 mg/día) y vitamina C (500 mg/día) durante el último trimestre de embarazo puede ocasionar peroxidación lipídica. Sin

embargo, en un estudio de Proteggente et al. (2000) en que se administra a 20 sujetos sanos 260 mg ácido ascórbico/día, sólo o combinado con 14 mg hierro/día (cantidades muy similares a las de nuestro estudio: 270 mg ácido ascórbico/día y 15 mg hierro/día) durante 6 semanas, no existe evidencia de efecto pro-oxidante ni con la suplementación de ambos compuestos ni con ácido ascórbico sólo. Tampoco, Berger et al. (1997) encuentran efectos pro-oxidantes *in vivo*, al suplementar con vitamina C y hierro. El hecho que el consumo de BZFeL no produce un descenso en la capacidad antioxidante comparado con la suplementación de las muestras BZ y BZL podría atribuirse a los CPPs formados a partir de la digestión de las proteínas de la leche que pueden secuestrar hierro en estado ferroso y reducir las reacciones tipo Fenton, así como eliminar radicales libres (Kitts, 2005; Zunquin et al., 2006).

b) Actividad SOD eritrocitaria

Los valores de actividad enzimática SOD eritrocitaria obtenidos tras la suplementación con las bebidas a base de zumo de frutas BZ, BZL y BZFeL (estudios 1, 2 y 3) se muestran en el cuadro nº 21.

Cuadro n° 21. Estudio de intervención: actividad enzimática SOD eritrocitaria en los estudios 1-3 (BZ, BZL y BZFeL).

Estudio	Basal	3 semanas	6 semanas	9 semanas	12 semanas
<i>SOD (U/g Hb)</i>					
1 (BZ)	1205.56 ± 60.86 ^{ax}	1855.36 ± 77.11 ^{bx}			
2 (BZL)	1666.30 ± 152.41 ^{ay}	1699.05 ± 155.61 ^{by}			
3 (BZFeL)	2172.29 ± 175.74 ^{ay}	1072.62 ± 185.81 ^b	1998.50 ± 134.45 ^a	3054.65 ± 182.00 ^c	2714.26 ± 158.09 ^{cz}

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 32). Letras diferentes en una línea (a, b, c) o columna (x, y, z) indican diferencias significativas (p<0.05).

U: Una unidad de SOD es la que causa un 50% de inhibición del valor de reducción de INT bajo las condiciones de análisis.

Tras 3 semanas de suplementación con BZ y BZL, la actividad SOD eritrocitaria aumenta significativamente ($p < 0.05$), mientras que en las mujeres que toman la muestra BZFeL, disminuye de forma significativa ($p < 0.05$) entre las semanas 0 y 3, aumentando a partir de la semana 6 y alcanzando un valor más elevado al final del estudio con respecto al nivel basal.

Al comparar los tres estudios, en condiciones basales la menor actividad de la SOD corresponde al estudio 1 e incrementa en los estudios 2 y 3. Al final del período de suplementación de las muestras (3 semanas para los estudios 1 y 2, y 12 semanas para el estudio 3) la mayor actividad SOD corresponde al estudio 3. No existe correlación entre la actividad SOD y los valores de CAT sérica determinados tanto por el método ORAC como por el TEAC.

Dado que las voluntarias ingieren BZ, seguida de BZL y finalmente BZFeL, junto a la no recuperación de las condiciones basales del estudio 1, los cambios observados en la actividad SOD (1205.56 vs 2714.26) pueden atribuirse al efecto conjunto de las tres bebidas.

Resultados similares a los descritos en nuestro estudio han sido indicados por Young et al. (1999), quienes indican un incremento en la actividad SOD eritrocitaria tras el consumo, durante una semana, de un zumo de manzana y grosella negra (1000 mL/día), acompañado de un descenso en la CAT plasmática determinada por el método TEAC. Sin embargo, Duthie et al. (2006) no encuentran cambios en la CAT plasmática ni en la actividad de la enzima SOD en un grupo de 20 mujeres sanas que consume zumo de frambuesa (750 mL/día) durante 2 semanas, atribuyendo

estos resultados al uso de dosis nutricionales en lugar de farmacológicas y la ausencia de estrés oxidativo endógeno en las voluntarias sanas.

El incremento en la actividad SOD hallado en nuestro estudio podría considerarse una acción secundaria a la de los antioxidantes presentes en las bebidas a base de zumo de frutas, que intervendrían en primer término. Se ha indicado que la inducción de la enzima SOD (primera línea de defensa antioxidante), la cual cataliza la transformación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, puede suponer un intento de compensación frente al estrés oxidativo inducido (Cheng et al., 2001). En este sentido, existe evidencia que la inducción enzimática *in vivo* (SOD y catalasa) como respuesta a condiciones de estrés oxidativo podría constituir un efecto protector en forma de “tolerancia” frente a un mayor daño oxidativo posterior (Nelson et al., 2006).

B. Estudio de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad mineral de hierro y cinc mediante ensayos *in vitro*.

1. Bioaccesibilidad de hierro y cinc

Se estima la bioaccesibilidad de hierro y cinc en las fracciones obtenidas tras digestión gastrointestinal simulada de seis bebidas a base de zumo de frutas suplementadas con hierro y/o cinc y/o leche desnatada: BZFe, BZZn, BZFeZn, BZFeL, BZZnL y BZFeZnL.

En los cuadros n° 22 y 23, se indican los contenidos totales, bioaccesibles y porcentaje de bioaccesibilidad para hierro y cinc, respectivamente, así como el resultado del tratamiento estadístico.

Cuadro n° 22. Hierro: contenido total, bioaccesible y bioaccesibilidad.

Muestra	Total (mg Fe/100 mL bebida)	Bioaccesible (mg Fe/100 mL bebida)	Bioaccesibilidad (%)
BZFe	3.35 ± 0.19	3.26 ± 0.11	97.4 ± 3.4 ^a
BZFeZn	3.63 ± 0.24	1.93 ± 0.12	53.1 ± 3.3 ^b
BZFeL	2.87 ± 0.04	2.54 ± 0.35	88.3 ± 12.3 ^a
BZFeZnL	2.84 ± 0.003	2.77 ± 0.13	97.5 ± 4.7 ^a

Los valores corresponden a media ± desviación estándar (n = 4)

Valores con letra diferente indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Cuadro n° 23. Cinc: contenido total, bioaccesible y bioaccesibilidad.

Muestra	Total (mg Zn/100 mL bebida)	Bioaccesible (mg Zn/100 mL bebida)	Bioaccesibilidad (%)
BZZn	1.18 ± 0.07	0.80 ± 0.01	68.2 ± 0.9 ^a
BZFeZn	1.02 ± 0.05	0.81 ± 0.06	79.2 ± 5.8 ^b
BZZnL	1.67 ± 0.01	1.15 ± 0.05	68.9 ± 3.0 ^a
BZFeZnL	1.73 ± 0.03	0.83 ± 0.03	48.2 ± 2.8 ^c

Los valores corresponden a media ± desviación estándar (n = 4)

Valores con letra diferente indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Los contenidos de hierro y cinc en las bebidas objeto de estudio son del orden de los indicados por el fabricante (3 mg de hierro y 1.6 mg de cinc por cada 100 mL de bebida).

Las ingestas dietéticas recomendadas para hierro se sitúan entre 8 y 18 mg/día según edad y sexo, y para cinc entre 8 y 11 mg/día (Food & Nutrition Board, 2004). Así pues, una ingesta usual de 250 mL de bebida a base de zumo de frutas contribuye en un 42% para hierro y 36% para cinc al aporte dietético diario recomendado.

Los porcentajes de bioaccesibilidad de hierro (cuadro n° 22) son superiores al 88%, excepto para la muestra BZFeZn (53%), donde se aprecia el efecto negativo del cinc sobre la bioaccesibilidad de hierro. Los porcentajes de bioaccesibilidad de cinc son inferiores a los del hierro (cuadro n° 23). Debe destacarse que la muestra BZFeZn, con menor

bioaccesibilidad de hierro, es la que presenta la mayor bioaccesibilidad de cinc.

- *Hierro*

Es bien conocido el efecto positivo del ácido ascórbico sobre la solubilidad del hierro. En este sentido, Hazell & Jonson (1987) describen un incremento de la dializabilidad de hierro en comidas suplementadas con ácido ascórbico.

En las muestras objeto de estudio (ver cuadro nº 22), la relación molar entre L-ascórbico: Fe es de 5.77: 1, proporción similar (ascorbato: Fe, 5: 1) para la que se ha indicado un incremento en la biodisponibilidad de hierro (Zhu et al., 2006). La acción combinada de los ácidos orgánicos presentes en zumos de frutas favorece la solubilidad del hierro (dializabilidad), acción atribuida al efecto quelante del ácido cítrico, reducción por parte de los antioxidantes (ácido ascórbico) y disminución del pH por los acidulantes (ácido málico), los cuales en conjunto influyen en la forma química del hierro y, por tanto, lo hacen más biodisponible (Hazell & Jonson, 1987). Es conocido que el Fe (II) es más biodisponible que el Fe (III), puesto que el hierro férrico presenta menor solubilidad en el intestino (Martínez et al., 1999).

Los hechos mencionados podrían justificar la alta bioaccesibilidad (>88%) en las muestras BZFe, BZFeL y BZFeZnL. A pesar que la composición en ácidos orgánicos es la misma en todas las bebidas a base de zumo de frutas analizadas, la menor bioaccesibilidad de la muestra BZFeZn podría ser explicada por la interacción hierro-cinc. En soluciones acuosas la presencia de cinc afecta negativamente la absorción de hierro (Ekmekcioglu,

2000; Sandström, 2001). Olivares et al. (2007) indican el efecto inhibitor del cinc sobre la biodisponibilidad de hierro con una relación molar 1: 1 en soluciones acuosas; hecho que podría parcialmente explicar la baja bioaccesibilidad de hierro en BZFeZn, aunque la relación molar hierro-cinc en las bebidas objeto de estudio es 2:1.

El efecto negativo del cinc sobre el hierro parece contrarrestada en la muestra BZFeZnL por la presencia de leche. Los caseinofosfopéptidos (CPPs) formados durante el proceso de digestión gastrointestinal de la caseína conteniendo el *cluster* que posee 3 serinas y 2 glutaminas (SpSpSpEE) (Miquel et al., 2006), presentan constantes de estabilidad superiores para el hierro que para calcio y cinc (Martell & Smith, 1974). Del mismo modo, Gaucheron et al. (1997), han descrito que la unión de ciertos cationes a β -caseína es en el siguiente orden: hierro>cinc>calcio. Así pues, los efectos de los CPPs podrían reducir la interacción negativa del cinc sobre el hierro mostrada en la muestra BZFeZn, beneficiando la solubilidad de dicho mineral sobre la del cinc. Además, estos resultados coinciden con los publicados por Pèrés et al. (1999) que indican que los CPPs, especialmente el β CN (1-25), disminuye la influencia negativa del cinc sobre la absorción de hierro en ratas a diferentes proporciones, incluyendo la 2: 1 presente en las bebidas objeto de estudio.

Al comparar los valores de bioaccesibilidad de hierro con otros estudios llevados a cabo en bebidas a base de zumo de frutas, aplicando métodos de digestión *in vitro* similares al del presente estudio, se obtienen valores más altos. Haro-Vicente et al. (2006) muestran valores de dializabilidad de hierro en un zumo de cítricos (piña y fruta de la pasión) del 28%, mientras que Perales et al. (2007) obtienen valores de solubilidad y

dializabilidad de hierro en zumos de frutas con leche y cereales de 32% y 17%, respectivamente. Una distinta composición de las muestras, junto con el uso de diálisis en lugar de solubilidad para obtener la fracción bioaccesible, podría explicar las diferencias halladas con respecto a nuestro estudio.

- *Cinc*

Como se ha mencionado anteriormente para el hierro, la presencia de ácidos orgánicos en los zumos de frutas puede originar la formación de quelatos solubles de bajo peso molecular con el cinc, favoreciendo de este modo su solubilidad (Lönnerdal, 2000). No obstante, los valores de bioaccesibilidad de cinc son menores a los de hierro.

La presencia de leche (ver cuadro nº 23) no parece mejorar la bioaccesibilidad del cinc. En cambio, sí se observa un efecto negativo de la presencia simultánea de hierro y leche (BZFeZnL).

Durante el proceso de digestión gastrointestinal se producen cambios de pH que oscilan entre 2 – 7,2. Gaucheron et al. (1997) han mostrado que los caseinatos pueden formar complejos con el hierro férrico incluso a valores de pH de 2.5, siendo esta unión constante hasta pH 6.8 (último valor de pH estudiado por dichos autores). En cambio, el descenso en la ionización de los grupos fosfoserina que tiene lugar a pH bajo, disminuye la capacidad de unión de los caseinatos con el calcio y el cinc. Este mismo hecho ha sido constatado por Baomy & Brule (1988) utilizando β -caseína. Mientras el calcio y el cinc pueden unirse a los residuos de fosfoserina a través de enlaces iónicos (los cuales son muy sensibles a los cambios de pH), el hierro puede unirse tanto por enlaces iónicos como

mediante enlaces de coordinación, los cuales no se ven afectados por la fuerza iónica. Por lo tanto, parece razonable indicar que el hierro se une con mayor afinidad a la caseína durante el proceso de digestión.

Los valores de bioaccesibilidad de cinc del presente estudio se corresponden con los indicados por Perales et al. (2006) en zumos de frutas con leche y cereales, con valores comprendidos entre 47% y 52%. No obstante, la presencia de fitatos derivada de los cereales podría explicar los valores ligeramente más bajos con respecto a los aquí expuestos.

2. Captación de hierro en células Caco-2: síntesis de ferritina.

Los resultados del contenido de ferritina intracelular, así como la viabilidad en células expuestas a las fracciones bioaccesibles de las bebidas a base de zumo de frutas se muestran en el cuadro n° 24.

Cuadro n° 24. Biodisponibilidad de hierro: síntesis de ferritina en Caco-2.

Muestras	Fe adicionado a la monocapa celular (μg)	Ferritina (ng/mg proteína celular)	Viabilidad (%) [*]
Blanco	-	2.13 ± 0.45^a	100.0 ± 0.9
BZFe	22.39 ± 0.78^a	17.26 ± 2.32^b	101.0 ± 1.2
BZFeZn	13.53 ± 2.75^b	17.94 ± 4.66^b	99.7 ± 1.5
BZFeL	17.55 ± 2.45^c	53.40 ± 8.95^c	100.1 ± 1.1
BZFeZnL	19.37 ± 0.93^c	49.77 ± 8.56^c	99.3 ± 1.3

^{*} Viabilidad celular determinada con el test MTT [media \pm desviación estándar (n = 9)]

Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$) [media \pm desviación estándar (n = 6)]

Los valores de viabilidad celular en células preincubadas 2 h con las fracciones bioaccesibles de las muestras, indican ausencia de citotoxicidad, ya que los valores son del mismo orden a los obtenidos con el blanco (células control).

El contenido de ferritina en el blanco (células control), 2.13 ± 0.45 ng ferritina/mg proteína, es similar al indicado por Viadel et al. (2007) (3.58 ± 1.26 ng ferritina/mg proteína) en las mismas condiciones.

Debe destacarse que entre las muestras BZFe y BZFeZn no se observan diferencias significativas ($p > 0.05$), hecho que no se corresponde con la bioaccesibilidad de hierro en las mismas muestras, lo que implica que no todo el elemento soluble es captado por la célula. La incorporación de un cultivo celular (células Caco-2) mejora el sistema y permite una mejor aproximación a la situación *in vivo*.

No se observa interacción entre el hierro y el cinc (ver cuadro nº 24). Se ha descrito en soluciones modelo, que el $ZnCl_2$ inhibe la síntesis de ferritina en células Caco-2 con una relación Fe-Zn 2:1, del mismo orden a la de este estudio, y 1:1. Sin embargo, el pre-tratamiento de las células durante 48 h con Zn 50 μM no afecta la captación de hierro en Caco-2 (Glahn et al., 2002). La utilización de soluciones modelo con ausencia de factores que puedan favorecer o disminuir la absorción de hierro podrían explicar las diferencias con nuestro trabajo.

Los polifenoles, mediante el grupo galoilo de su estructura (Brune et al., 1989), pueden influir negativamente en la biodisponibilidad del hierro, debido a la formación de complejos Fe-polifenoles en el lumen gastrointestinal, los cuales hacen al hierro menos disponible para su absorción (Hurrell et al., 1999). Sólo se conoce un estudio con zumos de

frutas en el que se determina la biodisponibilidad de hierro mediante la síntesis de ferritina (Boato et al., 2002) donde se observa que los zumos de frutas de color más oscuro (zumos de uva tinta y ciruela) ejercen un marcado efecto inhibitor en la biodisponibilidad de hierro, debido a su elevado contenido polifenólico que enmascara el efecto beneficioso del ácido ascórbico. Por el contrario, los zumos de frutas de colores más claros, como el zumo de naranja y de uva blanca (presentes en nuestras muestras) no ejercen un efecto inhibitor en la síntesis de ferritina, ya que su contenido en grupos galoilo es menor que en los zumos de color oscuro y, en consecuencia, el ácido ascórbico puede contrarrestar el efecto negativo de los polifenoles. En este estudio, la cantidad de hierro adicionada a los zumos (3.42 mg/100 mL) es muy similar a la de nuestras muestras (3 mg/100 mL). Los contenidos de ferritina en las muestras objeto de estudio oscilan entre 17.26 - 53.40 ng ferritina/mg proteína, valores comprendidos en el intervalo indicado por Boato et al. (2002) (5 – 275 ng ferritina/mg proteína).

Cabe destacar la mayor síntesis de ferritina (del orden de tres veces más) en las muestras que contienen leche en su formulación (BZFeL y BZFeZnL) vs. (BZFe y BZFeZn) (ver cuadro nº 24). Este hecho puede atribuirse al efecto de los CPPs formados durante la digestión gastrointestinal, ya que estudios *in vitro* (Yeung et al., 2002; Argyri et al., 2007) han indicado un aumento de la síntesis de ferritina en células Caco-2 en presencia de CPPs. Asimismo, tal y como se ha comentado anteriormente, las muestras BZFeL y BZFeZnL presentan menor contenido de polifenoles totales tras la digestión gastrointestinal que BZFe y BZFeZn (ver cuadros nº 15 y 16) probablemente debido a la formación de quelatos entre leche y polifenoles. De este modo, las interacciones leche-polifenoles

reducirían el efecto negativo de los polifenoles sobre el hierro quedando éste más disponible con lo que se obtendría una mayor síntesis de ferritina

Después de la digestión gastrointestinal simulada de caseína, se liberan distintos CPPs a partir de α_{s1} , α_{s2} y β -caseína (Miquel et al., 2006), de los cuales, los CPPs derivados de las α_s caseínas tienen tendencia a disminuir la cantidad de hierro biodisponible, mientras que los CPPs derivados de la β -caseína incrementan el hierro biodisponible. En modelo duodenal de rata, se ha observado una menor absorción media de hierro en presencia de CPPs que con β -caseína o β -caseína (1-25), aunque superior a la obtenida con gluconato de hierro (Bouhallab et al., 2002). Previamente, Pérès et al. (1999) indican una mayor biodisponibilidad de hierro unido a β -caseína (1-25) frente al gluconato de hierro utilizando el mismo modelo. Además, se ha descrito, tanto en modelo intestinal de rata como en células Caco-2, un aumento significativo en absorción (al menos 2 veces superior) y captación total (al menos 3 veces superior) de hierro unido a β -caseína (1-25) frente a hierro unido a α_{s1} -caseína (Kibangou et al., 2005).

Así pues, los mecanismos por los cuales los CPPs mejoran la absorción y biodisponibilidad de hierro pueden ser atribuidos al incremento en la solubilidad (permitiendo a los complejos formados resistir a los cambios de pH y fuerza iónica que ocurren en el lumen) y/o a la presencia de un mecanismo de absorción específico que reduzca las interacciones con otros cationes divalentes como calcio y cinc (Amaro & Cámara, 2004; Aït-Oukhtar et al., 1997). Por lo tanto, la suma de estas propiedades podrían explicar el efecto beneficioso de la adición de leche en la captación de

hierro a partir de bebidas a base de zumo de frutas suplementadas con dicho mineral.

Conclusiones

Del estudio de las bebidas a base de zumo de frutas, con o sin leche, y con o sin Fe y/o Zn, se deducen las siguientes conclusiones:

1. *Propiedades antioxidantes durante el almacenamiento en refrigeración y tras una digestión gastrointestinal simulada.*

- En las bebidas analizadas, almacenadas en refrigeración (2-4°C), no disminuyen sus propiedades antioxidantes durante su periodo de vida útil (135 días). No se modifica el contenido de ácido ascórbico y al final del almacenamiento aumenta la capacidad antioxidante total, debido probablemente a reacciones de polimerización de polifenoles y/o formación de compuestos de las etapas avanzadas de la reacción de Maillard.

- La capacidad antioxidante total de las muestras no disminuye tras someterse a una digestión gastrointestinal simulada.

- La presencia de hierro y/o cinc y/o leche disminuye el contenido de polifenoles solubles totales. La digestión gastrointestinal disminuye este contenido, siendo la muestra con hierro y leche (BZFeL) la más afectada. Sin embargo, se observa un efecto positivo del cinc sobre los flavan-3-oles, probablemente debido a la formación de quelatos de mayor solubilidad.

2. *Efecto citoprotector de las fracciones bioaccesibles en células Caco-2*

- La preincubación con las fracciones bioaccesibles de las muestras no previene la acumulación de ROS, el descenso del GSH ni el posible daño al ADN (fase sub-G₁ del ciclo celular), si bien ejerce un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo inducido, mediante el mantenimiento de la integridad mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y metabólica (MTT), la inducción de la enzima GSH-Rd, la respuesta adaptativa del ciclo celular y la prevención de apoptosis caspasa-dependiente. Las muestras con cinc y cinc-leche son las que presentan un mayor efecto citoprotector.

3. *Actividad antiproliferativa de las fracciones bioaccesibles en células de cáncer de colon*

- La proliferación de las células de cáncer de colon es inhibida por las fracciones bioaccesibles de las muestras de zumo (BZ) y zumo con cinc y leche (BZZnL) a través de un efecto citostático, debido al bloqueo en la progresión del ciclo celular en la fase S, acompañado del descenso en la expresión de las ciclinas B₁ y D₁.

4. *Biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles en células Caco-2*

- La captación y metabolismo de polifenoles a partir de las muestras objeto de estudio en estas células no ha podido ser evaluada. La incorporación al proceso de digestión gastrointestinal de una etapa de

fermentación colónica y/o el aumento de la concentración de polifenoles en las fracciones bioaccesibles podría permitir su determinación.

5. *Estudio de intervención en humanos*

- La capacidad antioxidante total en mujeres sanas en edad fértil no mejora tras la ingesta de bebidas a base de zumo de frutas. El bajo estrés oxidativo y la ausencia de cambios drásticos en sus hábitos alimentarios justificarían los resultados obtenidos.

- La actividad de la SOD se induce, hecho que puede ser más efectivo que la acción individual de los antioxidantes presentes en las bebidas, que intervendrían en primer término frente a estrés oxidativo. La acción de esta enzima ejerce un efecto protector en forma de “tolerancia” frente a un mayor daño oxidativo posterior.

6. *Bioaccesibilidad de hierro y cinc*

- La bioaccesibilidad (solubilidad) del hierro en las muestras es próxima al 100%, mientras que para el cinc es del 40-80%. La interacción negativa del cinc sobre la bioaccesibilidad del hierro es contrarrestada en presencia de leche, posiblemente debido a los caseinofosfopéptidos formados durante el proceso de digestión.

7. Biodisponibilidad de hierro en células Caco-2 (síntesis de ferritina)

- La síntesis de ferritina es tres veces superior en las bebidas que contienen leche respecto a las que no la contienen. Probablemente, la presencia de caseinofosfopéptidos mejora la captación celular de hierro.

Conclusión global:

De todas las bebidas estudiadas, las que contienen cinc y cinc-leche (BZZn y BZZnL) presentan efectos beneficiosos frente al estrés oxidativo y modulación de la proliferación de células tumorales, mientras que las muestras con hierro y leche (BZFeL, BZFeZnL) pueden mejorar el estatus nutricional de hierro.

Bibliografía

- Aherne, S. A.; Kerry, J. P.; O'Brien, N. M. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* **2007**, *97*, 321-328.
- Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr. Cancer* **1999**, *34*, 160-166.
- Ait-Oukhatar, N.; Bouhallab, S.; Bureau, F.; Arhan, P.; Maubois, J. L.; Drosdowsky, M. A.; Bougle, D. L. Bioavailability of caseinophosphopeptide bound iron in the young rat. *J. Nutr. Biochem.* **1997**, *8*, 190-194.
- Alexandropoulou, I.; Komaitis, M.; Kapsokefalou, M. Effects of iron, ascorbate, meat and casein on the antioxidant capacity of green tea under conditions of in vitro digestion. *Food Chem.* **2006**, *94*, 359-365.
- Alía, M.; Ramos, S.; Mateos, R.; Bravo, L.; Goya, L. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2005**, *19*, 119-128.
- Álvarez-Hernández, A.; Nichols, G. M.; Glass, J. Caco-2 cell line: a system for studying intestinal transport across cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *1070*, 205-208.
- Amaro, M. A.; Cámara, F. Iron availability: an updated review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2004**, *55*, 597-606.
- AOAC Official Method 967.21. Ascorbic acid in vitamins preparations and juices, 2,6-Dichloroindophenol titrimetric method. In Official Methods of Analysis of AOAC International, **2000**, Horwitz W, 17th edn, Maryland, USA, chapter 45, pp 16.

Bibliografía

- Arango, M. C.; Llanes, L.; Díaz, T.; Faxas, M. E. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev. Cubana Oncol.* **1997**, 13, 126-134.
- Arena, E.; Fallico, B.; Maccarone, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.* **2001**, 74, 423-427.
- Argyri, K.; Miller, D. D.; Glahn, R. P.; Zhu, L.; Kapsokafalou, M. Peptides isolated from in vitro digests of milk enhance iron uptake by Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 10221-10225.
- Argyri, K.; Proestos, C.; Komaitis, M.; Kapsokafalou, M. Phenolic compounds in red wine digested *in vitro* in the presence of iron and other dietary factors. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2005**, 56, 213-222.
- Argyri, K.; Komaitis, M.; Kapsokafalou, M. Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chem.* **2006**, 96, 281-289.
- Arredondo, M.; Orellana, A.; Gárate, M. A.; Núñez, M. T. Intracellular iron regulates iron absorption and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Physiol.* **1997**, 273, G275-G280.
- Arts, M. J. T. J.; Haenen, G. R. M. M.; Wilms, L. C.; Beetstra, S. A. J. N.; Heijnen, C. G. M.; Voss, H.P.; Bast, A. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1184-1187.
- Azenha, M.; Vasconcelos, M. Assessment of the Pb and Cu in vitro availability in wines by means of speciation procedures. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, 38, 899-912.

- Barberá, R.; Farré, R. Bioavailability of trace-elements-review. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* **1992**, 32, 381- 399.
- Barceloux, D. G. Zinc. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1999**, 37, 279-292.
- Barrington, R.; Williamson, G.; Bennett, R. N.; Davis, B. D.; Brodbelt, J. S.; Kroon, P. A. Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal Caco-2/TC7 cell model. *Journal of Functional Foods*, **2009**, 1, 74-87.
- Baomy, J. J.; Brule, G. Effect of pH and ionic strength on the binding of bivalent cations to β -casein. *Le Lait*, **1988**, 68, 409-418.
- Bazzano, L. A.; Serdula, M. K.; Liu, S. Dietary intakes of F&V and risk of cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2002**, 5, 492-499.
- Beard, J. L.; Dawson, H.; Piñero, D. J. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr. Rev.* **1996**, 54, 295-317.
- Berger, T. M.; Polidori, M. C.; Dabbagh, A.; Evans, P. J.; Halliwell, B.; Morrow, J. D.; Roberts, L. J.; Frei, B. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem* **1997**, 272: 15656-60.
- Bermúdez-Soto, M. J.; Larrosa, M.; García-Cantalejo, J. M.; Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A.; García-Conesa, M. T. Up-regulation of tumor supresor carcinoembryonic antigen-related cell adhesión molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *J. Nutr. Biochem.* **2007a**, 18, 259-271.
- Bermúdez-Soto, M. J.; Tomás-Barberán, F. A.; García-Conesa, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in

vitro gastric and pancreatic digestion.

Food Chem. **2007b**, 102, 865-874.

- Bertias, G.; Linardakis, M.; Mamas,

I.; Kafatos, A. Fruit and vegetable

consumption in relation to health and

diet of medical students in Crete, Greece.

Int. J. Vitam. Nutr. Res. **2005**, 75, 107-

117.

- Bestwick, C. S.; Milne, L. Effects of

beta-carotene on antioxidant enzyme

activity, intracellular reactive oxygen and

membrane integrity within post confluent

Caco-2 intestinal cells. *Biochim.*

Biophys. Acta **2000**, 1474, 47-55.

- Boato, F.; Wortley, G. M.; Liu, R. H.;

Glahn, R. P. Red grape juice inhibits iron

availability: application of an *in vitro*

digestion/Caco-2 cell model. *J. Agric.*

Food Chem. **2002**, 50, 6935-6938.

- Böhm, V.; Netzel, M.; Kler, A., Marx,

S.; Weib, M.; Geib, K. R. Antioxidant

capacity of human plasma and serum as

affected by a single dose of a beverage

rich in antioxidants-use of three different

assay systems. *J. Food Agric. Environm.*

2004, 2, 74-78.

- Boivin, D.; Blanchette, M.; Barrette, S.;

Moghrabi, A.; Béliveau, R. Inhibition of

cancer cell proliferation and suppression

of TNF-induced activation of NFkappaB

by edible berry juice. *Anticancer Res.*

2007, 27, 937-948.

- Bouhallab, S. ; Cinga, V. ; Ait-

Oukhatar, N. ; Bureau, F. ; Neuville, D. ;

Arhan, P. ; Maubois, J. L. ; Bougle, D.

Influence of various phosphopeptides of

caseins on iron absorption. *J. Agric.*

Food Chem. **2002**, 50, 7127-7130.

- Boyer, J.; Brown, D.; Liu, R. H. In

vitro digestion and lactase treatment

influence uptake of quercetin and

quercetin glucoside by the Caco-2 cell

monolayer. *Nutrition J.* **2005**, 4, 1-15.

- Boyer, J.; Brown, D.; Liu, R. H. Uptake

of quercetin and quercetin 3-glucoside

from whole onion and apple peel extracts

- by Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7172-7179.
- Brand, W.; van der Wel, P. A. I.; Rein, M. J.; Barron, D.; Williamson, G.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M. C. M. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, 36, 1794-1802.
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, 56, 317-333.
- Brown, R. C.; Klein, A.; Simmons, W. K.; Hurrell, R. F. The influence of jamaican herb teas and other polyphenol-containing beverages on iron absorption in the rat. *Nutr. Res.* **1990**, 10, 343-353.
- Brune, M.; Rossander, L.; Hallberg, L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1989**, 43, 547-558.
- Bub, A.; Watzl, B.; Blockhaus, M.; Briviba, K.; Liegibel, U.; Müller, H.; Pool-Zobel, B. L.; Rechkemmer, G. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J. Nutr. Biochem.* **2003**, 14, 90-98.
- Burgess, J. R.; Andrade, J. E. Antioxidant effects of citrus flavonoid consumption; in Bhimanagouda, S. P., Turner, N. D., Miller, E. G., Brodbelt, J. S. (eds): Potential health benefits of citrus, ed 1. Washington, American Chemical Society, **2006**, pp 161-174.
- Cai, X.; Shen, Y-L.; Zhu, Q.; Jia, P-M.; Yu, Y.; Zhou, L. et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signalling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, **2000**, 14, 262-270.

- Cámara, F.; Amaro, M. A. Nutritional aspect of zinc availability. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2003**, 54, 143-151.
- Cao, G.; Booth, S. L.; Sadowski, J. A.; Prior, R. L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* **1998**, 68:1081-7.
- Cao, G.; Prior, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* **1998**, 44, 1309-1315.
- Cao, G.; Prior, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. In: *Methods in Enzymology*, Abelson JN, Simon MI, **1999**, ed Academic Press, California, vol 299, chapter 5, pp 50-62.
- Carlberg, I.; Mannervik, B. Glutathione reductase. *Meth. Enzymol.* **1985**, 113, 484-90.
- Caussy, D. Case studies of the impact of understanding bioavailability; arsenic. *Ecotox. Environ. Safe.* **2003**, 56, 164-173.
- Chen, J.; Lindmark-Mansson, H.; Gorton, L.; Akesson, B. Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *Int. Dairy J.* **2003**, 13, 927-935.
- Cheng, T. Y.; Zhu, Z.; Masuda, S.; Morcos, N. C. Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, 12, 388-395.
- Coates, E. M.; Popa, G.; Gill, C. I.; McCann, M. J.; McDougall, G. J.; Stewart, D.; Rowland, I. Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *J. Carcinog.* **2007**, 6, 4.
- Collins, A. R. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *Eur. J. Cancer* **2005**, 41, 1923-1930.

- Cremonesi, P.; Acebron, A.; Raja, K. B.; Simpson, R. J. Iron Absorption: Biochemical and Molecular Insights into the Importance of Iron Species for Intestinal Uptake. *Pharmacology and Toxicology*, **2002**, 91, 97-102.
- Crews, H. M.; Burrell, J. A.; McWeeny, D. J. Preliminary enzymolysis studies on trace element extractability from food. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, 34, 997-1004.
- D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanità* **2007**, 43, 348-361.
- Davies, K. J. A. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* **1999**, 48, 41-47.
- Day, A. J.; Williamson, G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J. Nutr.* **2001**, 86, S105-S110.
- Del Caro, A.; Piga, A.; Vacca, V.; Agabbio, M. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chem.* **2004**, 84, 99-105.
- Deprez, S.; Mila, I.; Huneau, J. F.; Tome, D.; Scalbert, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antiox. Redox. Signal.* **2001**, 3, 957-967.
- Díaz, M.; Decker, A. D. Antioxidant mechanisms of caseinphosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 8208-8213.
- Dragovic-Uzelac, V.; Levaj, B.; Mrkic, V.; Bursac, D.; Boras, M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of

maturity and geographical region. *Food Chem.* **2007**, 102, 966-975.

- Dragsted, L. O.; Pedersen, A.; Hermetter, A.; Basu, S.; Hansen, M.; Haren, G. R.; Kall, M.; Breinholt, V.; Castenmiller, J. M.; Stagsted, J.; Jakobsen, J.; Skibsted, L.; Ramussen, S. E.; Loft, S.; Sandstrom, B. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetable on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am J Clin Nutr* **2004**, 79: 1060-72.

- Dupas, C. J.; Marsset-Baglieri, A. C.; Ordonaud, C. S.; Ducept, F. M. G.; Maillard, M.-N. Coffee antioxidant properties: effects of milk addition and processing conditions. *J. Food Sci.* **2006a**, 71, 253-258.

- Dupas, C.; Baglieri, A. M.; Ordonaud, C.; Tomé, D.; Maillard, M.-N. Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix : a

Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006b**, 50, 1053-1060.

- Duthie, G. G.; Gardner, P. T.; Kyle, J. A. M. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, 62, 599-603.

- Duthie, S. J.; Jenkinson, A. M.; Crozier, A.; Mullen, W.; Pirie, L.; Kyle, J.; Yap, L. S.; Christen, P.; Duthie, G. G. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. J. Nutr.* **2006**, 45, 113-122.

- Ekmekcioglu, C. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chem.* **2002**, 76, 225-230.

- Ekmekcioglu, C. Intestinal bioavailability of minerals and trace

- elements from milk and beverages in humans. *Nahrung*, **2000**, 44, 390-397.
- Ekmekcioglu, C.; Strauss-Blasche, G.; Leibetseder, V. J.; Marktl, W. Toxicological and biochemical effects of different beverages on human intestinal cells. *Food Res. Int.* **1999**, 32, 421-427.
- El Hajji, H.; Nkhili, E.; Tomao, V.; Dangles, O. Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Rad. Res.* **2006**, 40, 303-20.
- Elisia, I., Kitts, D. D. Anthocyanins inhibit peroxy radical-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Mol. Cell Biochem.* **2008**, 312, 139-145.
- Englund, G.; Rorsman, F.; Rönnblom, A.; Karlbom, U.; Lazorova, L.; Grasjö, J.; Kindmark, A.; Artursson, P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 29, 269-277.
- Etcheverry, P.; Miller, D. D.; Glahn, R. P. A low-molecular weight factor in human milk whey promotes iron uptake by Caco-2 cells. *J. Nutr.* **2004**, 134, 93-98.
- Etcheverry, P.; Wissler, J.; Wortley, G.; Glahn, R. Caco-2 cell iron uptake from human milk and infant formula. *Nutr. Res.* **2004**, 24, 573-579.
- Evan, G. I.; Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **2001**, 411, 342-348.
- Fairweather-Tait, S. J. Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutr. Res. Rev.* **1996**, 9, 295.
- Fernández de Simón, B.; Hernández, T.; Estrella, I. Phenolic composition of white grapes (Var. Airén). Changes during ripening. *Food Chem.* **1993**, 47, 47-52.

- Fernández-Pachón, M. S.; Villano, D.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci.* **2008**, *48*, 649-671.
- Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **2000**, *408*, 239-247.
- FitzGerald, R. J. Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int. Dairy J.* **1998**, *8*, 451-457.
- FitzGerald, R. J.; Meisel, H. Caseinophosphopeptides (CPPs) as functional ingredients. In: Functional dairy products. Mattila-Sandholm, T.; Saarela, M. Ed CRC, Cambridge, **2003**, pp 187-198.
- Folin, O.; Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophan determinations proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73*, 627-649.
- Food and Nutrition Board. (2004). Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended intakes for individuals, elements. Institute of Medicine of the National Academies. Disponible en <http://www.iom.edu>.
- Formigari, A.; Santon, A.; Irato, P. Efficacy of zinc treatment against iron-induced toxicity in rat hepatoma cell line H4-IIIE-C3. *Liver Int.* **2007**, *27*, 120-127.
- Friedman, M.; Jurgens, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2101-2110.
- Fujii, T.; Ikami, T.; Xu, J. W.; Ikeda, K. Prune extract (*Prunus domestica* L.) suppresses the proliferation and induces the apoptosis of human colon carcinoma Caco-2. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*. **2006**, *52*, 389-391.
- Galijatovic, A.; Otake, Y.; Walle, U. K.; Walle, T. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells- Potential role in carcinogen

- bioactivation. *Pharm. Res.* **2001**, 18, 374-379.
- Gangloff, M. B.; Lai, C.; Van Campen, D. R.; Millar, D. D.; Norvell, W. A.; Glahn, R. P. Ferrous iron uptake but not transfer is down regulated in Caco-2 cells grown in high iron serum-free medium. *J. Nutr.* **1996**, 126, 3118-3127.
- García-Alonso, J.; Ros, G.; Periago, M. J. Antiproliferative and cytoprotective activities of a phenolic-rich juice in HepG2 cells. *Food Res. Int.* **2006a**, 39, 982-991.
- García-Alonso, J.; Ros, G.; Vidal-Guevara, M. L.; Periago, M. J. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutr. Res.* **2006b**, 26, 330-339.
- García-García Saavedra, M. J. Estimación de los valores de referencia para la evaluación del estado nutricional en selenio, cobre y cinc de la población valenciana. Tesis doctoral. Valencia. Universidad de Valencia, **1995**.
- Gardner, P. T.; White, T. A. C.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* **2000**, 68, 471-474.
- Gaucheron, F., Le Graet, Y.; Boyaval, E. ; Piot, M. Binding of cations to casein molecules : importance of physicochemical conditions. *Milchwissenschaft*, **1997**, 52, 322-327.
- Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29, 1106-1114.
- Gil-Izquierdo, A.; Gil, M. I.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1035-1041.

- Gil-Izquierdo, A.; Zafrilla, P.; Tomás-Barberán, F.A. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 155-159.
- Glahn, R. P.; Olivia, A. L.; Yeung, A.; Goldman, M. I.; Millar, D. D. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr.* **1998**, 128, 1555-1561.
- Glahn, R. P.; Wortley, G. M. Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and ZnCl₂: studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 390-395.
- Glazer, A. N. Phycoerythrin fluorescent-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 161-168.
- Gleib, M.; Matuschek, M.; Steiner, C.; Böhm, V.; Persin, C.; Pool-Zabel, B. L. Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicol in Vitro.* **2003**, 17, 723-729.
- Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, L. F. C. J. Fluorescent probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, 65, 45-80.
- Gryfe, R.; Swallow, C.; Bapat, B.; Redston, M.; Gallinger, S.; Couture, J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer* **1997**, 21, 233-300.
- Halleux, C.; Schneider, Y. J. Iron absorption by Caco-2 cells cultivated in serum-free medium as in vitro model of the human intestinal epithelial barrier. *J. Cell Physiol.* **1994**, 158, 17-28.
- Halliwell, B. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49, 1341-1348.

- Halliwell, B. Dietary polyphenols: good, bad or indifferent for your health? *Cardiovascular research*, **2007**, 73: 341-7.
- Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **2006**, 141, 312-322.
- Halliwell, B. The antioxidant paradox. *Lancet* **2000**, 355: 1179-80.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine* (3rd Ed) **1999**, Oxford University Press.
- Halliwell, B.; Murcia, M. A.; Chirico, S.; Aruoma, O. I. Free radicals and antioxidants in food and “in vivo”: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, 35, 7-20.
- Hambidge, M. Human zinc deficiency. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1344S-1349S.
- Hampton, M.B. ; Orrenius, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* **1997**, 414, 552-556.
- Haro-Vicente, J. F.; Martinez-Gracia, C.; Ros, G. Optimization of in vitro measurement of available iron from different fortificants in citric fruit juices. *Food Chem.* **2006**, 98, 639-648.
- Hartmann, R.; Meisel, H. Caseinophosphopeptides and their cell modulating potential. *Biofactors* **2004**, 21, 73-78.
- Hartwell, L. H.; Kastan, M. B. Cell cycle control and cancer. *Science*, **1994**, 266, 1821-1828.
- Haugland, R.P. *Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Leiden, The Netherlands, **1996**.
- Hazell, T.; Johnson, I. T. Effects of food processing and fruit juices on in vitro estimated iron availability from cereals, vegetables and fruits. *J. Sci. Food Agric.* **1987**, 38, 73-82.

- Herbert, V.; Shaw, S.; Jayatilleke, E. Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J. Nutr.* **1996**, 126, 1213S-1220S.
- Hergantner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **2000**, 407, 770-776.
- Hissin, P. J.; Hilf, R. Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* **1976**, 74, 214-226.
- Hitomi, M.; Stacey, D. W. Cellular ras and cyclin D₁ are required during different cell-cycle periods in cycling NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **1999**, 19, 4623-4632.
- Hurrell, R. F.; Lynch, S. R.; Trinidad, P. Y.; Dassenko, S. A.; Cook, J. D. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, 49, 546-552.
- Hurrell, R. F.; Reddy, M.; Cook, J. D. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br. J. Nutr.* **1999**, 81, 289-295.
- Igney, F. H.; Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2, 277-288.
- Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. National Academy Press, 2001.
- Jovaní, M.; Barberá, R.; Farré, R.; Martín de Aguilera, E. Calcium, iron and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3480-3485.
- Kampa, M.; Nifli, A. P.; Notas, G.; Castanas, E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2007**, 159, 79-113.
- Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of methods to determine

- antioxidant capacities. *Food Anal. Methods.* **2009**, 2, 41-60.
- Karakaya, S. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, 44, 453-464.
- Katayama, S.; Ishikawa, S.; Fan, M. Z.; Mine, Y. Oligophosphopeptides derived from egg yolk phosphovitin up-regulate gamma-glutamylcysteine synthetase and antioxidant enzymes against oxidative stress in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 2829-2835.
- Katayama, S.; Xu, X.; Fan, M. Z.; Mine, Y. Antioxidative stress activity of oligophosphopeptides derived from hen egg yolk phosphovitin in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 773-778.
- Kaufmann, S. H.; Hergantner, M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millenium. *Trends Cell Biol.* **2001**, 11, 526-534.
- Kaufmann, W. K.; Paules, R. S. DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.* **1996**, 10, 238-247.
- Kay, C. D.; Holub, B. J. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *Br. J. Nutr.* **2002**, 88, 389-398.
- Kern, M.; Pahlke, G.; Balavenkatraman, K. K.; Böhmer, F. D.; Marko, D. Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 4999-5006.
- Kern, S. M.; Bennett, R. N.; Needs, P. W.; Mellon, F. A.; Kroon, P. A.; García-Conesa, M-T. Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7884-7891.

- Khokhar, S.; Apenten, R. K. O. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative-structure activity relations. *Food Chem.* **2003**, 81, 133-140.
- Kibangou, I. B.; Bouhallab, S.; Henry, G.; Bureau, F.; Allouche, S.; Blais, A.; Guerin, P.; Arhan, P.; Bougle, D. L. Milk proteins and iron absorption: contrasting effects of different caseinophosphopeptides. *Pediatr. Res.* **2005**, 58, 731-734.
- Kim, G. N.; Jang, H. D.; Kim, C. I. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using alcalase. *Food Chem.* **2007**, 104, 1359-1365.
- Kitts, D. D. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends Food Sci. Tech.* **2005**, 16, 549-554.
- Klimczak, I.; Malecka, M.; Szlachta, M.; Gliszczynska-Swiglo, A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, 20, 313-322.
- Ko, C. H.; Li, K.; Ng, P. C.; Fung, K.P.; Li, C.L.; Wong, R. P.; Chui, K. M.; Gu, G. J.; Yung, E.; Wang, C. C.; Fok, T. F. Pro-oxidative effects of tea and polyphenols, epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin, on G6PD-deficient erythrocytes in vitro. *Int. J. Mol. Med.* **2006**, 18, 987-94.
- Kobayashi, S.; Tanabe, S.; Sugiyama, M.; Konishi, Y. Transepithelial transport of hesperetin and hesperidin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1778, 33-41.
- Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.* **1999**, 38, 133-142.
- Lachili, B.; Hininger, I.; Faure, H.; Arnaud, J.; Richard, M. J.; Favier, A.;

- Roussel, A. M. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biol Trace Elem Res* **2001**, 83: 103-10.
- Laparra, J. M.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R. Antioxidant effect of casein phosphopeptides compared with fruit beverages supplemented with skimmed milk against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Res. Int.* **2008**, 41, 773-779.
- Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F. A.; Espín, J. C. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, up-regulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4576-4584.
- Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F. A.; Espín, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, 17, 611-625.
- Larrosa, M.; Tomás-Barberán, F. A.; Espín, J. C. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells. *Eur. J. Nutr.* **2004**, 43, 275-284.
- Lee, H. S. Antioxidative activity of browning reaction products isolated from storage-aged orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 550-552.
- Lee, K.W.; Hur, H.J.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Antiproliferative Effects of Dietary Phenolic Substances and Hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1990-1995.
- Lindmark-Mansson, H.; Akesson, B. Antioxidative factors in milk. *Brit J Nutr* **2000**, 84: S103-S10.
- Linseisen, J.; Rohrmann, S. Biomarkers of dietary intake of flavonoids and

- phenolic acids for studying diet-cancer relationship in humans. *Eur. J. Nutr.* **2008**, 47, 60-68.
- Liu, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanisms of action. *J. Nutr.* **2004**, 134, S3479-S3485.
- Liu, R. H.; Finley, J. Potential cell culture models for antioxidant research. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4311-4314.
- Liyana-Pathirana, C. M.; Shahidi, F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2433-2440.
- Lönnerdal, B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1378-1383.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275.
- Magalhaes, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 613, 1-19.
- Mahan, K. L.; Escott-Stump, S. *Nutrición y dietoterapia de Krause*. 10ª edición. McGraw-Hill. Interamericana S.A, Méjico, **2008**.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727-747.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 230S-242S.
- Manna, C.; Galletti, P.; Cucciolla, V.; Moltedo, O.; Leone, A.; Zappia, V. The

protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **1997**, 127, 286-292.

- MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La alimentación en España, 2000. Secretaría General de Agricultura y Alimentación, Madrid. **2001**.

- MARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 1987-2007, dos décadas del panel de consumo alimentario. En: *Evolución de los hábitos de compra y consumo en España*. pp 1-33, **2008**.

- Martell, A. E.; Smith, R. M. Critical stability constants, vol. 1. New York: Plenum Press. **1974**.

- Martínez, C.; Ros, G.; Periago, M. J.; López, G. Iron bioavailability in food. *Arch. Latinoam. Nutr.* **1999**, 49, 106-112.

- Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr Biochem.* **2005**, 16, 577-586.

- Matsingou, T. C.; Kapsokefalou, M.; Salifoglou, A. In vitro antioxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. *J. Food Sci.* **2000**, 65, 1060-1065.

- McCord, JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Sem Hematol* **1998**, 35: 5-12.

- McGhie, T. K.; Walton, M. C.; Barnett, L. E.; Vather, R.; Martin, H.; Au, J.; Alspach, P. A.; Booth, C. L.; Kruger, M. C. Boysenberry and blackcurrant drinks increased the plasma antioxidant capacity in an elderly population but had little effect on the other markers of

oxidative stress. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, 87, 2519-2527.

- Meisel, H.; FitzGerald, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Design* **2003**, 9, 1289-1295.

- Miller, D. D.; Schricker, B. R.; Rasmussen, B. S.; Van Campen, D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, 34, 2248-2256.

- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem.* **1997**, 60, 331-337.

- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring

the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, 84, 407-412.

- Milner, J. A. Strategies for cancer prevention: the role of the diet. *Brit. J. Nutr.* **2002**, 87, S265-S272.

- Minihane, A. M.; Fox, T. E.; Fairweather-Tait, S. J. A continuous flow in vitro method to predict bioavailability of Fe from foods. En: Schlemmer U. (ed.), *Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability, proceedings*. Part 2. Ettlingen. pp. 175-179.

- Miquel, E.; Gomez, J. A.; Alegria, A.; Barbera, R.; Farre, R.; Recio, I. Identification of casein phosphopeptides after simulated gastrointestinal digestion by tandem mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **2006a**, 222, 48-53.

- Miquel, E.; Alegria, A., Barbera, R., Farré, R. Casein phosphopeptides released by simulated gastrointestinal

digestion of infant formulas and their potential role in mineral binding. *Int. Dairy J.* **2006b**, 16, 992-1000.

- Miquel, E.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R. Speciation analysis of calcium, iron, and zinc in casein phosphopeptide fractions from toddler milk-based formula by anion exchange and reverse-phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry/flame atomic-absorption spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 1082-1088.

- Möller, P.; Vogel, U.; Pedersen, A.; Dragsted, L. O.; Sandstorm, B.; Loft, S. No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidem Biomar* **2003**, 12: 1016-22.

- Morley, K. L.; Ferguson, P. J.; Koropatnick, J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not

apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2007**, 251, 168-178.

- Mronga, T.; Stahnke, T.; Goldbaum, O.; Richter-Landsberg, C. Mitochondrial pathway is involved in hydrogen-peroxide induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *Glia*, **2004**, 46, 446-455.

- Mullen, W.; Marks, S. C.; Crozier, A. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 3148-3157.

- Nagah, A. M.; Seal, C. J. In vitro procedure to predict apparent antioxidant release from wholegrain foods measured using three different analytical methods. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, 85, 1177-1185.

- Narasinga Rao, B. S.; Prabhavathi, T. An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods. *Am. J. Clin. Nutr.* **1978**, 31, 169-175.

- Nelson, S. K.; Bose, S. K.; Grunwald, G. K.; Myhill, P.; McCord, J. M. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 40, 341-347.
- Netzel, M.; Strass, G.; Kaul, C.; Bitsch, I.; Dietrich, H.; Bitsch, R. In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Res. Int.* **2002**, 35, 213-216.
- Nicoli, M. C.; Anese, M.; Parpinel, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.* **1999**, 10, 94-100.
- Olivares, M.; Pizarro, F.; Ruz, M. New insights about iron bioavailability inhibition by zinc. *Nutrition*, **2007**, 23, 292-295.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4619-4626.
- Pallardó, F.V.; Markovic, J.; Garcia, J.L.; Viña, J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med.* **2009**, 30, 77-85.
- Paterson, E.; Gordon, M. H.; Niwat, C.; George, T. W.; Parr, L.; Waroonphan, S.; Lovegrove, J. A. Supplementation with fruit and vegetable soups and beverages increases plasma carotenoid concentrations but does not alter markers of oxidative stress or cardiovascular risk factors. *J. Nutr.* **2006**, 136, 2849-2855.
- Pedersen, C. B.; Kyle, J.; Jenkinson, A. M. E.; Gardner, P. T.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, 54, 405-408.

- Pellegrini, N.; Del Rio, D.; Colombi, B.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Application of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 260-264.
- Perales, S.; Barberá, R.; Lagarda, M. J.; Farré, R. Availability of iron from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability) and uptake and transport by Caco-2 cells. *Food Chem.* **2007**, 102, 1296-1303.
- Perales, S.; Barberá, R.; Lagarda, M. J.; Farré, R. Bioavailability of zinc from infant foods by in vitro methods (solubility, dialyzability and uptake and transport by Caco-2 cells). *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86, 971-978.
- Pèrés, J. M.; Bouhallab, S.; Bureau, F.; Maubois, J. L.; Arhan, P.; Bougle, D. Reduction of iron/zinc interactions using metal bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of β -casein. *Nutr. Res.* **1999**, 19, 1655-1663.
- Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 5036-5040.
- Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A.; García-Viguera, C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins and vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2308-2312.
- Phelan, M.; Aherne-Bruce, S. A.; O'Sullivan, D.; FitzGerald, R. J.; O'Brien, N. M. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *Int. Dairy J.* **2009**, 19, 279-285.

- Philanto, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* **2006**, 16, 1306-1314.
- Piljac-Zegarac, J.; Valek, L.; Martinez, S.; Belscak, A. Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chem.* **2009**, 113, 394-400.
- Pinelo, M.; Manzocco, L.; Núñez, M. J.; Nicoli, M. C. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 1177-1180.
- Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M. D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **1983**, 47, 323-330.
- Pohl, O.; Prusisz, B. Fractionation analysis of manganese and zinc in beers by means two sorbent column system and flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **2007**, 71, 1616-1623.
- Powell, S. R. The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1447S-1454S.
- Primo Yúfera, E. La leche y los productos lácteos. En: Química de los alimentos. Ed Síntesis, Madrid, **1998**, pp 343-364.
- Proteggente, A. R.; Rehman, A.; Halliwell, B.; Rice-Evans, C. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo? *Biochem Bioph Res Comm* **2000**, 277: 535-40.
- Rahman, I.; MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione synthesis in lung inflammation. *Eur Respir J.* **2000**, 16, 534-554.

- Ramos, E.; Romeo, J.; Wörnberg, J.; Marcos, A. ¿Más que alimentos? En *Alimentos Funcionales. Aproximación a una nueva alimentación*. Ed: Dirección General de Salud Pública y Alimentación (Madrid, España). **2006**, pp 32-45.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. & Med.* **1999**, 26, 1231-1237.
- Rice- Evans, C.; Miller, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* **1994**, 234, 279-293.
- Riso, P.; Visioli, F.; Gardana, C.; Grande, S.; Brusamolino, A.; Galvano, F.; Galvano, G.; Porrini, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 941-947.
- Robards, K.; Prentzler, P. D.; Tucker, G. ; Swatsitang, P. ; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**, 66, 401-436.
- Roberfroid, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71, S1660-S1664.
- Roberfroid, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. *Br. J. Nutr.* **2002**, 88, 133S-138S.
- Rosado, J. L. Zinc deficiency and its functional implications. *Salud Pública Mexicana*, **1998**, 40, 181-191.
- Roura, E.; Andrés-Lacueva, C.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urine. *Clin. Chem.* **2006**, 52, 749-752.
- Royo, M. A. Recomendaciones nutricionales y alimentarias para una

dieta saludable. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria*, **2004**, 10, 122-143.

- Ruby, M. V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D. E.; Casteel, S. W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D.; Chappell, W. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology*, **1999**, 33, 3697.

- Ruxton, C. H. S.; Gardner, E. J.; Walker, D. Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2006**, 57, 249-272.

- Sa, G.; Das, T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div.* **2008**, 3, 14.

- Salgueiro, M. J.; Zubillaga, M.; Lysionek, A.; Sarabia, M. I.; Caro, R.; De Paoli, T.; Hager, A.; Weill, R.;

Boccio, J. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr. Res.* **2000**, 20, 737-755.

- Salovaara, S.; Sandberg, A. S.; Andlid, T. Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6233-6238.

- Salucci, M.; Stivala, L. A.; Maiani, G.; Bugianesi, R.; Vannini, V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). *Br. J. Cancer* **2002**, 86, 1645-1651.

- Sandström, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br. J. Nutr.* **2001**, 85, 181S-185S.

- Sandström, K.; Hakansson, L.; Lukinius, A.; Venge, P. A method to study apoptosis in eosinophils by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **2000**, 240, 55-68.

- Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goñi, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* **2007**, 101, 492-501.
- Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Remesy, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, 56, 276-282.
- Schaefer, S.; Baum M.; Eisenbrand, G.; Janzowski, C. Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, 50, 413-417.
- Schlemmer, U. Bioavailability of nutrients. Conceptual aspects of definition and problems of determination. *Br. J. Nutr.* **1995**, 73, 150-151.
- Schricker, B. R.; Millar, D. D.; Stouffer, J. R. Measurement and content of nonheme and total iron in muscle. *J. Food Sci.* **1982**, 47, 740-743.
- Schümann, K.; Elsenhans, B.; Gordon, D.T.; Schlemmer, U. Bioavailability '93: different aspects of 'bioavailability' in perspective. *Br. J. Nutr.* **1994**, 72, 950-952.
- Schwartz, J. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cells growth. *J Nutr* **1996**, 126: 1221S-7S.
- Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Hardy, L.; Heber, D. Total cranberry extract vs. its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumour cell lines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2512-2517.
- Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Henning, S. M.; Niu, Y.; Zhang, Y.; Nair, M. G.; Heber, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced

in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, 16, 360-367.

- Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H. S.; Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 9329-9339.

- Seifried, H. E.; Anderson, D. E.; Fisher, E. I.; Milner, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, 18, 567-579.

- Serafini, M.; Bellocco, R.; Wolk, A.; Ekström, A.M. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, **2002**, 123, 985-991.

- Serra, H.; Mendes, T.; Bronze, M. R.; Simplício, A. L. Prediction of intestinal

absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorgan. Med. Chem.* **2008**, 16, 4009-4018.

- Serra-Majem, L. Risk of inadequate intakes of vitamins A, B1, B6, C, E, folate, iron and calcium in the Spanish population aged 4-18. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2001**, 71, 325-331.

- Shackelford, R. E.; Kaufmann, W. K.; Paules, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 28, 1387-1404.

- Shah, M.; Griffin, I. J.; Lifschitz, C. H.; Abrams, S. A. Effect of orange and apple juices on iron absorption in children. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2003**, 157, 1232-1236.

- Shoji, H.; Oguchi, S.; Shinohara, K.; Shimizu, T.; Yamashiro, Y. Effects of iron-unsaturated human lactoferrin on hydrogen peroxide-induced oxidative

damage in intestinal epithelial cells. *Pediatr. Res.* **2007**, 61, 89-92.

- Singh, R. P.; Dhanalakshmi, S.; Agarwal R. Phytochemicals as cell cycle modulators--a less toxic approach in halting human cancers. *Cell Cycle*, **2002**, 1, 156-161.

- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstin acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, 144-158.

- Skrede, G.; Bryhn Larsen, V.; Aaby, K.; Skivik Jorgensen, A.; Birkeland, S. E. Antioxidative properties of commercial fruit preparations and stability of bilberry and black currant extracts in milk products. *J. Food Sci.* **2004**, 69, 351-356.

- Spencer, J. P. E.; Abd El Mohsen, M. M.; Minihane, A. M.; Mathers, J. C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and

application in nutrition research. *Br. J. Nutr.* **2008**, 99, 12-22.

- Sreenivasulu, K.; Raghu, P.; Ravinder, P.; Nair, K. M. Effect of dietary ligands and food matrices on zinc uptake in Caco-2 cells: Implications in assessing zinc bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 10967-10972.

- Stahl, W.; van den Berg, H. et al. Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.* **2002**, 23, 39-100.

- Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 3268-3295.

- Stevenson, D. E.; Hurst, R. D. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 2900-2916.

- Stryer, L. Bioquímica, 3ª Edición; Editorial Reverté, S.A.; Barcelona, Spain, **1988**.

- Tapia, V.; Arredondo, M.; Núñez, M. T. Regulation of Fe absorption by cultured intestinal epithelia (Caoc-2) cell monolayers with varied Fe status. *Am. J. Physiol.* **1996**, 271, G443-G447.
- Thati, B.; Noble, A.; Creaven, B. S.; Walsh, M.; Kavanagh, K.; Egan, D. A. An in vitro investigation of the induction of apoptosis and modulation of cell cycle events in human cancer cells by bisphenanthroline-coumarin-6,7-dioxacetatocopper (II) complex. *Chem-Biol. Inter.* **2007**, 168, 143-158.
- Tourniaire, F.; Hassan, M.; André, M.; Ghiringhelli, O.; Alquier, C.; Amiot, M.-J. Molecular mechanisms of the naringin low uptake by intestinal Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 957-962.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 44-84.
- Vallejo, F.; Gil-Izquierdo, A.; Pérez-Vicente, A.; García-Viguera, C. In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 135-138.
- Van Acker, S. A. B. E.; Van den Berg, DJ; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 20, 331-342.
- Van Campen, D. R.; Glahn, R. P. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crop. Res.* **1999**, 60, 93-113.
- Van den Berg, R.; Van Vliet, T.; Broekmans, W. M. R.; Cnubben, N. H. P.; Vaes, W. H. J.; Roza, L.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A.; Van den Berg, H. A

- vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *J Nutr* **2001**, 131: 1714-22.
- Versantvoort, C. H. M.; Oomen, A. G.; Van de Kamp, E.; Rompelberg, C. J. M.; Sips, A. J. A. M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing bioaccessibility of micotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, 43, 31-40.
- Viadel, B.; Perales, S.; Barberá, R.; Lagarda, M. J.; Farré, R. Ferritin synthesis by Caco-2 cells as an indicator of iron bioavailability: Application to milk-based infant formulas. *Food Chem.* **2007**, 102, 925-931.
- Virgili, F.; Marino, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 45, 1205-1216.
- Visanji, J. M.; Thompson, D. G.; Padfield, P. J. Induction of G₂/M phase cell-cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B₁ levels. *Cancer Lett.* **2006**, 237, 130-136.
- Walle, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **2004**, 36, 829-837.
- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 701-705.
- Waterhouse, A. L. Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, 957, 21-36.
- Watzke, H. J. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends Food Sci. Tech.* **1998**, 9, 320.
- Webb, G. P. Los minerales En *Complementos nutricionales y alimentos funcionales*. Ed: Acribia (Zaragoza, España). **2007**, pp 115-118.

- Whittaker, P. Iron and zinc interactions in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, 68, 442S-446S.
- Wienk, K. J. H.; Marx, J. J. M.; Beynen, A. C. The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur. J. Nutr.* **1999**, 38, 51-75.
- Wilcox, J. K.; Ash, S. L.; Catignani, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, 44, 275-295.
- Williamson, G.; Holst, B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *Br. J. Nutr.* **2008**, 99, S55-S58.
- Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4026-4037.
- Yeum, K. J.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I.; Aldini, G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 430, 97-103.
- Yeung, A. C.; Glahn, R. P.; Miller, D. D. Effects of iron source on iron availability from casein and casein phosphopeptides. *J. Food Sci.* **2002**, 67, 1271-1275.
- Yi, W.; Fischer, J.; Akoh, C. C. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 8804-8812.
- Yokomizo, A.; Moriwaki, M. Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2006**, 70, 1317-1324.
- Young, J. F.; Nielsen, S. E.; Haraldsdóttir, J.; Daneshvar, B.; Lauridsen, S. T.; Knuthsen, P.; Crozier,

- A.; Sandström, B.; Dragsted, L. O. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, 69, 87-94.
- Zhu, L.; Glahn, R. P.; Yeung, C. K.; Miller, D. D. Iron uptake by Caco-2 cells from NaFeEDTA and FeSO₄: Effects of ascorbic acid, pH, and a Fe(II) chelating agent. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 7924-7928.
- Zödl, B.; Zeiner, M.; Sargazi, M.; Roberts, N. B.; Marktl, W.; Steffan, I.; Ekmekcioglu, C. Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 97, 324-330.
- Zödl, B.; Zeiner, M.; Sargazi, M.; Roberts, N.B.; Steffan, I.; Marktl, W.; Ekmekcioglu, C. Toxicological effects of iron on intestinal cells. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, 22, 143-147.
- Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frasquet, I.; Frigola, A. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chem.* **2007**, 103, 1365-1374.
- Zulueta, A.; Esteve.; Frigola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* **2009**, 114, 310-316.
- Zunquin, G.; Rouleau, V.; Bouhallab, S.; Bureau, F.; Theunynck, D.; Rousselot, P.; Arhan, P.; Bougle, D. Iron and exercise induced alterations in antioxidant status. Protection by dietary milk proteins. *Free Rad Res* **2006**, 40: 535-42.

Anexos

ANEXO I - ABREVIATURAS

- **2,6-DCFI**: 2,6-diclorofenolindofenol
- **AA**: Ácido ascórbico
- **AAPH**: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro
- **ABTS**: Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- **Ac-DEUD-pNA**: acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida
- **AD**: Agua desionizada
- **ANOVA**: Análisis de la varianza
- **ASB**: Albúmina de suero bovino
- **AUC**: Área bajo la curva
- **BD**: Biodisponibilidad
- **CAT**: Capacidad antioxidante total
- **CAT**: Catalasa
- **CDKs**: Quinasas dependientes de ciclinas
- **CN**: Caseína
- **CPPs**: Caseinofosfopéptidos
- **DHR**: Dihidro-rodamina
- **DMEM**: Dulbecco's modified Eagle medium
- **DMSO**: Dimetilsulfóxido
- **DPPH**: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
- **DRI**: Recomendaciones diarias de ingesta
- **EAA**: Espectrofotometría de absorción atómica
- **EDTA**: Ácido etilendiamino tetracético
- **ESI**: Sistema de ionización de electroespray
- **ET**: Transferencia de electrón

- **FDA**: Fluoresceína diacetato
- **FL**: Fluoresceína (3',6' dihidroxiespiro[isobenzofuran1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona
- **FRAP**: Poder antioxidante de reducción del férrico
- **GAE**: Equivalentes del ácido gálico
- **GAPDH**: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada
- **GPx**: Glutación peroxidasa
- **GSH**: Glutación reducido
- **GSH-Rd**: Glutación reductasa
- **GSSG**: Glutación oxidado
- **H₂O₂**: Peróxido de hidrogeno
- **HAT**: Transferencia de radical de hidrógeno
- **Hb**: Hemoglobina
- **HPLC-DAD-MS/MS**: Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fotodiodos acoplado a un espectrómetro de masas
- **IMC**: Índice de masa corporal
- **INT**: Cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio
- **IP**: Yoduro de propidio
- **MEM**: Medio mínimo esencial
- **MTT**: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil tetrazolio
- **NADPH**: Nicotina adenina dinucleótido fosfato
- **O⁻²**: Anión superóxido
- **OH**: Radical hidroxilo
- **OPA**: O-ftalaldehído
- **ORAC**: Capacidad de absorbanza de radicales oxígeno
- **PBS**: Tampón fosfato salino

- **PCA**: Procianidina
- **pNA**: p-nitroanilida
- **PVDF**: Fluoruro de polivinilideno
- **RL**: Radicales libres
- **ROO**: Radical peroxilo
- **ROS**: Especies reactivas de oxígeno
- **SDS-PAGE**: Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
- **SOD**: Superóxido dismutasa
- **TEAC**: Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
- **TRAP**: Captura total de radicales peroxilos
- **Trolox**: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
- **XOD**: Xantina oxidasa
- $\Delta\psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

ANEXO II – INSTRUMENTACIÓN

- Agitador con plataforma universal, IKA KS260. Afora
- Agitador magnético. Magnestir, Lab-Line Instruments Inc
- Agitador de tubos Vortex WhirliMixer. Fison Scientific Equipment
- Balanza (± 0.001 g). AND, HA-180M
- Baño de agua con programador de temperatura y agitación. Modelo SS40-2. Gran Instruments
- Baño de ultrasonidos. Selecta
- Cámara fría. R. Masip- Ingeniero S.A
- Campana de flujo laminar vertical. Modelo PV-100. Telstar
- Centrífuga. Jouan GT 422
- Citómetro de flujo, Coulter, EPICS XL-MCL
- Congelador de -20 °C. Liebre Confort
- Congelador. Modelo UN-6512E. Nuair -85 °C Ultralow Freezer
- Espectrofotómetro de absorción atómica, equipado con corrector de fondo de Deuterio y lámparas de cátodo hueco de hierro y cinc. Modelo 2380. Perkin-Elmer
- Espectrofotómetro UV-Vis termostaticado. Lambda 2. Perkin Elmer
- Horno mufla con programador de temperatura, Heraeus K1253A. Eurotherm
- Homogenizador. Polytron[®] PT 2000. Kinematica AG
- Incubador automático de CO₂. Modelo NH-4500E. Nuair
- Lector de placas VICTOR³ 1420-040. Perkin-Elmer
- Microscopio de fluorescencia Diaphot-TMD. Nikon
- Microscopio invertido CK40. Olympus

- Osmómetro crioscópico. Gonotec. Osmomat 030
- pH-metro GLP21. Crison
- Placa calefactora, Magnetic Stirrer Hotplate SM6. Stuart Scientific
- Rotavapor (sistema de vacío V-800, rotavapor R-200, baño de rotavapor B-490) Büchi, con sistema de refrigeración acoplado F12, Julabo
- Sistema de cromatografía líquida de alta resolución. Consta de un HPLC equipado con bomba binaria (G1312A), un inyector automático (G1313), un degasificador (G1322A) y un detector de diodos en serie (G1315B) controlado por un programa de Agilent Technologies (v. A08.03). A este HPLC se encuentra acoplado el detector de masas que consta de un espectrómetro de masas equipado con una trampa de iones (G2425A) y un sistema de ionización de electrospray (ESI) controlado por otro programa de Agilent Technologies (v. 4.1)
- Sistema Milli-Q plus de tratamiento de agua. Millipore

ANEXO III – MATERIAL

- Cámara de recuento Neubauer. Bad Mergentheim
- Cartuchos para extracción en fase sólida (SPE) C-18 Sep-Pak. Waters
- Columna C₁₈ Mediterranean Sea (250 x 4 mm, tamaño de partícula 5 µm). Teknokroma
- Columna de filtración de vidrio de 2.0 cm de diámetro. Afora
- Cubetas espectrofotométricas desechables semi-micro. Levantina
- Filtros de membrana de 0.2 µm. Millipore
- Filtros de membrana Millex-HV₁₃ de 0.45 µm. Millipore
- Filtros de nylon de 0.45 µm. Whatman
- Filtros de papel plegados, Ø = 12.5 cm. Albet
- Filtros Millex-GV PVDF (baja adhesión de proteínas) de 0.22 µm de tamaño de poro para esterilización de soluciones acuosas. Millipore
- Material de plástico y vidrio de uso común en el laboratorio (matraces aforados, Erlenmeyers, tubos de centrifuga de polipropileno,...)
- Parafilm[®]. American Nacional Can
- Placas blancas de 96 pocillos no estériles. Sero-Well[®] Bibby Sterilin
- Placas de cultivos de 6 y 24 pocillos, Costar[®]. Corning
- Placas negras de 96 pocillos no estériles. Sero-Well[®] Bibby Sterilin
- Placas Petri Ø = 9 cm. Iwaki
- Placas transparentes de 96 pocillos no estériles. Sero-Well[®] Bibby Sterilin
- Rascadores de células. Sarsted
- Tubos de plástico de 1.5 ml. Eppendorf

ANEXO IV – REACTIVOS

- (+) Catequina (Sigma)
- β -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Sigma). Se prepara una disolución 10 mM (7mg/ml tampón fosfato). Almacenar en congelación, durante el ensayo mantener en hielo y oscuridad)
- AAPH (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro), riqueza 95% (Wako). Se disuelve 600 mg de AAPH en 10 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 7.4. (estable 1 semana a 4°C)
- ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), riqueza > 99%. Fluka. Para obtener la disolución de trabajo del radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$, se preparan 25 ml de una disolución de ABTS 7 mM (0.096g ABTS a 25 ml agua desionizada) a la que se le adiciona 0.440 ml de la disolución $K_2S_2O_8$ 140 mM (0.96 g a 25 ml agua desionizada). Se deja reposar 12-16 horas, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, para permitir la generación del radical (estable 2 días a temperatura ambiente). Posteriormente se diluye con etanol hasta que su absorbancia, medida a 734 nm en un espectrofotómetro UV-VIS termostaticado (Perkin-Elmer, Lambda2), sea de 0.700 ± 0.020 a 30 °C
- Acetonitrilo (J. T. Baker)
- Ácido clorhídrico fumante (HCl), 37% p/v; d = 1.19. Merck
- Ácido fórmico (Merck)
- Ácido hidroxicinámico (Sigma)
- Ácido nítrico (HNO_3), 65% p/v; d = 1.40. Merck
- Agua desionizada Milli-Q plus. Millipore
- Agua grado cultivo celular. Agua para irrigación. Braun Medical

- Albúmina de suero bovino fetal, solución 0.2 mg/ml. Sigma
- Aminoácidos no esenciales. Gibco[®]
- Antibióticos (penicilina/estreptomicina). Gibco[®]
- Anticuerpo GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Abcam
- Anticuerpos primarios (ciclina D1 y B1). Sigma
- Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Sigma
- Apigenina (Fluka)
- Azul de metileno, riqueza 99%. Merck
- Azul tripán. Sigma. Disolución de colorante (0.4% p/v en PBS)
- Bicarbonato sódico (NaHCO₃). Merck
- Colorante Hoescht 33242. Sigma
- Diacetato de fluoresceína (FDA). Sigma. Se prepara una solución madre de 5 mg/ml en acetona. A partir de ella, se prepara una solución de trabajo de 5 µg/ml en PBS.
- Dihidro-rodamina 123 (DHR). Sigma
- Dimetilsulfóxido (DMSO). Sigma
- Disolución de 2,6-diclorofenol-indofenol (2,6-DCF_I): se pesan 62.5 mg de sal sódica dihidratada de 2,6-DCF_I (Merck) y 52.5 mg de bicarbonato sódico y se llevan a un volumen final de 250 ml. La disolución se homogeniza, se deja reposar y se filtra
- Disolución de ácido acético-metafosfórico (CH₃COOH-HPO₃): se disuelven 6 g de ácido metafosfórico (Sigma) en 16 ml de ácido acético (Merck). Posteriormente se lleva a un volumen final de 200 ml con agua desionizada (preparación diaria)
- Disolución de carbonato sódico (Panreac) al 2% (p/v) en agua desionizada

-
- Disolución de isopropanol ácido (HCl 0.1 M (Merck) en isopropanol anhidro (Merck))
 - Disolución de o-ftalaldehído (OPA) (Sigma) (1 mg/ml) en metanol absoluto (Merck)
 - Disolución de Tritón (Panreac) 10% (v/v)
 - Disolución Dihidro-rodamina 123 (DHR). Sigma. A partir de una solución 2 mM de DHR en DMSO, se prepara una disolución μM de DHR en PBS, que debe preservarse de la luz para evitar la foto-oxidación
 - Disolución de yoduro de propidio (IP) (Sigma) de 1 mg/ml citrato trisódico, 0.05 mg/ml yoduro de propidio y 1 mg/ml de RNasa A (Ensayo potencial de membrana)
 - Disolución fosfato tamponada (PBS). Gibco[®]
 - Disolución hipotónica de yoduro de propidio. Se pesan 100 mg de Citrato trisódico $5\text{H}_2\text{O}$, 5 mg de Yoduro de propidio (Sigma), 100 mg de RNasa A (Sigma) y se disuelven en 50 ml de agua bidestilada. Se adiciona 0.1 g de Triton X-100 (final 0.1% p/v) y se afora a 100 ml con agua bidestilada. (Ensayo ciclo celular-citoprotección)
 - Disolución patrón de ácido gálico (Sigma) de 10 mg/ml en desionizada. Se pesan 250 mg de ácido gálico y se llevan a 25 ml con agua desionizada (preparación diaria). De esta disolución se toma 1 ml y se lleva a 10 ml con agua desionizada (disolución de trabajo)
 - Disolución patrón de ácido L (+)-ascórbico (Merck) (1mg/ml): 50 mg de AA en 50 ml de ác. metafosfórico-acético (preparación diaria)
 - Disolución tripsina (2.5 g/L) – EDTA (0.2 g/L). Gibco[®]

- Disolución Tris 20 mM + 0.1 % Tritón. Se pesan 60.5 mg de Trizma base (Sigma) y 25 mg de Tritón (Panreac) y se lleva a un volumen final de 25 ml con agua desionizada
- Dulbecco's modified eagle medium (DMEM+GlutaMAXTM-I, Gibco[®], Invitrogen, Carlsbad, USA) suplementado con 4.5 g/L glucosa y piruvato sódico
- Etanol absoluto (EtOH), para análisis. Merck
- Etanol-PBS (4 °C) (70:30, v/v)
- Extracto porcino de sales biliares. Sigma n° 232-369-0
- Folin-Ciocalteu 1 N. Panreac
- Fluoresceína sódica (Fluka). Se prepara una disolución madre de fluoresceína de 440 mg/L en tampón fosfato (75 mM pH 7.4) y posteriormente se diluye 15 veces con tampón fosfato para obtener la disolución de trabajo. (estable 1 semana a 4°C)
- Fungizona. Gibco[®]
- Gel separador SDS-PAGE (10-12%)
- Glutación oxidado (GSSG) (Sigma). Se prepara una disolución 20 mM (12.2 mg/ml tampón fosfato). Almacenar a 4 °C
- Glutación reducido (GSH). Sigma. Se prepara una disolución de 500µg/ml en agua desionizada. A partir de esta disolución se prepara la curva de calibrado
- HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico). Gibco[®]
- Hesperidina (Sigma)
- Hidróxido sódico (NaOH). Panreac
- Kit colorimétrico caspasa-3 (CASP-3-C). Sigma.

Consta de los siguientes reactivos:

- 1) Tampón de reacción: HEPES 20 mM, pH 7.4, EDTA 2 mM; CHAPS (3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) 0,1% y DTT (ditiotreitól) 5 mM. Se prepara pesando 37.2 mg de EDTA; 50 mg de CHAPS; 38.6 mg de DTT; 1 ml HEPES y se afora a 50 ml con agua desionizada
 - 2) Sustrato peptídico acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroamilida (Ac-DEVD-pNA) de la capasa-3: se disuelve el contenido del vial (5 mg) en 0.4 ml de dimetilsulfóxido
 - 3) Tampón de lisis celular: HEPES 50 mM, pH 7.4, CHAPS 5 mM, DTT 5 mM. Se prepara pesando 153.7 mg de CHAPS; 38.6 mg de DTT; 2.5 ml HEPES y se afora a 50 ml con agua desionizada
- Kit de detección ECL plus. GE Healthcare-Amershan
 - Kit Ransod SD125. Laboratorios Randox.
- Consta de los siguientes reactivos:
- 1) Mezcla sustrato (liofilizada): Xantina 0.05 mmol/L y cromógeno (INT) 0.025 mmol/L. Se reconstituye con 20 ml del tampón comercial.
 - 2) Xantín-Oxidasa (liofilizada): se reconstituye añadiendo, 10 ml de agua desionizada al vial. Su concentración es de 80 U/L.
 - 3) Patrón SOD (liofilizado): se reconstituye añadiendo 10 ml de agua desionizada. Las diluciones del patrón para la curva de calibrado se realizan con tampón fosfato.
 - 4) Tampón fosfato 0.01 M pH 7
 - 5) Tampón comercial. Ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico (CAPS) 50 mmol/L / EDTA 0.94 mmol/L
- Kit Spectro Ferritin S-22. Ramco Laboratorios
 - L-glutamina. Gibco®

- Lowry A: 4% p/v Na_2CO_3 (Panreac) en NaOH (Guinama) 0.2 N
- Lowry B: 0.02% p/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Panreac) en tartrato- Na^+K 4 hidrato (Panreac) al 0.04% p/v
- Medio Mínimo Esencial (MEM). Gibco[®], Invitrogen, Carlsbad, USA
- Membranas “Hybond-P” de fluoruro de polivinilideno (PVDF). GE Healthcare-Amersham
- Metanol (MeOH) para HPLC (J. T. Baker)
- Metanol ácido (MeOH/ácido fórmico, 97:3 v/v)
- MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difenil bromuro de tetrazolio). Sigma
- Pancreatina de páncreas porcino, actividad equivalente a 4, según USP. Sigma P-1750
- Pepsina de mucosa de estómago porcino, actividad 890 unidades / mg de proteína. Sigma P-7000
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% (v/v). Sigma
- Persulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), riqueza 99%. Merck
- Piruvato sódico. Gibco[®]
- Reactivo Drabkin diluido. Se prepara una disolución de 500 ml con 0.025 g de KCN 0.77 mM, 0.1 g de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.6 mM y 0.7 g de KH_2PO_4 0.01 M en agua desionizada
- Reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) 50% (v/v) en agua desionizada
- Resina Chelex-100, forma sódica. Sigma
- RNasa A. Sigma. Se prepara una disolución de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS (ensayo ciclo celular-actividad antiproliferativa)
- Solución fijadora metanol-ácido acético (3:1, v/v)

-
- Staurosporina (control positivo de apoptosis). Sigma. Se prepara una disolución staurosporina 10 μ M en DMSO para el ensayo apoptosis Hoechst y 4.6 μ M en DMSO para el ensayo de apoptosis con FDA-IP
 - Suero bovino fetal. Gibco[®]
 - Tampón de lisis. Tampón RIPA (RadioInmunoPrecipitation Assay)
 - Tampón formaldehído-fosfato en relación 1/4 (v/v). Se llevan 5 ml de formaldehído 37-40% (Sigma) a 20 ml con tampón fosfato 0.1 M, pH 8
 - Tampón fosfato 0.1 M – EDTA 5 mM, pH 8. Se prepara tampón fosfato monosódico 0.1 M (Panreac), pesando 7.8 g y se lleva a 500 ml de agua desionizada; tampón fosfato disódico 0.1 M (Merck), pesando 17.91 g y se lleva a 500 ml de agua desionizada; EDTA 5 mM (Sigma), pesando 0.93 g / 500 ml de cada uno de los tampones anteriores. Posteriormente, mezclar vertiendo el tampón monosódico sobre el disódico hasta alcanzar un pH 8
 - Tampón fosfato 75 mM: KH_2PO_4 750 mM y Na_2HPO_4 750 mM (estables varios meses a 4°C) mezclados en proporción 25:75 (v/v) y diluidos con agua desionizada (1:9 v/v), pH 7.4 (estable 1 semana a 4°C)
 - Tampón fosfato 100 mM Na/K pH 7 – 5 mM EDTA
 - Tampón Tris salino/Tween 20 al 0.1 %
 - Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) riqueza 97% (Sigma). Disolución de trabajo μ M (ORAC): se prepara una disolución madre (12.5 mg en 50 ml tampón fosfato) y se diluye 1:49 con tampón fosfato (estable 1 semana a 4°C). Disolución madre 5 mM (TEAC): 31.25 mg en 25 ml de etanol. A partir de esta disolución se preparan los distintos puntos de la curva patrón
 - Yoduro de propidio (IP). Sigma. Preparar una disolución de 100 μ g/ml en PBS (Ensayo ciclo celular y apoptosis-actividad antiproliferativa)

Difusión de resultados

Artículos

- Laparra, J. M., **Cilla, A.**, Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. Evaluation of in vitro cytoprotective effect of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *The FASEB Journal*, 21, A1092, **2007**.
- **Cilla, A.**, Laparra, J. M., Alegría, A., Barberá, R. Farré, R. Antioxidant effect derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry*, **2008**, 106, 1180-1187.
- **Cilla, A.**, Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R. Farré, R. Iron bioavailability in fortified fruit beverages using ferritin synthesis by Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 8699-8703.
- **Cilla, A.**, González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., Barberá, R. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, **2009**, 114, 813-820.
- **Cilla, A.**, De Palma, G., Lagarda, M. J., Barberá, R., Farré, R., Clemente, G., Romero, F. Impact of fruit beverage consumption on the antioxidant status in healthy women. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2009**, 54, 35-42.
- **Cilla, A.**, García-Nebot, M. J., Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R., Farré, R. In vitro bioaccessibility of iron and zinc in fortified fruit beverages. *International Journal of Food Science and Technology*, **2009**, 44, 1088-1092.

- **Cilla, A.**, Lagarda, M. J., Barberá, R., Romero, F. Polyphenolic profile and antiproliferative activity of bioaccessible fractions of zinc-fortified fruit beverages in human colon cancer cell lines. *Nutrición Hospitalaria*, **2009** (aprobado para su publicación).
- **Cilla, A.**, Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R., Clemente, G., Farré, R. Influence of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *Journal of Food Composition and Analysis* (en revisión).
- Laparra, J. M., **Cilla, A.**, Alegría, R., Barberá, R., Farré, R. Bioaccessible fractions of fruit beverages exert a cytoprotective effect against H₂O₂-induced oxidative stress to Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* (en revisión).

Comunicaciones a Congresos

- **Cilla A.**, Perales S., Barberá R., Lagarda MJ., Farré R. “Capacidad antioxidante de zumos y bebidas a base de zumo y leche, estabilidad durante su almacenamiento”. *Comunicación Oral*, presentada en el III Congreso de la Asociación de Dietistas-Nutricionistas (AEDN) y I Congreso Hispano-Luso de Alimentación, Nutrición y Dietética. Madrid, España (19-21 octubre de 2006).
- Laparra, JM., **Cilla, A.**, Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. “Evaluation of *in vitro* cytoprotective effect of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative stress on intestinal epithelia (Caco-2 cells)”. *Póster*, presentado en el congreso Experimental Biology 2007, Washington, USA, 2007.

- **Cilla A.**, Perales S., Barberá R., Lagarda M.J., Farré R. “Capacidad antioxidante en bebidas a base de zumos de fruta: Influencia de la digestión gastrointestinal”. *Póster*, presentado en el IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Tenerife, España , 13 al 15 de junio de 2007.
- **Cilla A.**, González-Sarriás A., Espín J. C., Tomás-Barberán F.A., Barberá R. “Antiproliferative activity of fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion in human cancer Caco-2 cells”. *Póster*, presentado en el XXIVth International Conference on Polyphenols, Salamanca, España , 8 al 11 de julio de 2008.
- **Cilla A.**, Lagarda M.J, Barberá R. “Antiproliferative activity of zinc-fortified fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion in human colon cancer Caco-2 cells”. *Comunicación oral*, presentado en el International PSE Symposium on “Natural Products in Cancer Therapy”, Naples, Italy , 23 al 26 de septiembre de 2008.
- **Cilla A.**, De Palma G., Lagarda M.J, Barberá R., Farré R., Clemente G., Romero F. “Impact of consumption of fruit beverages (with/without milk and/or iron) upon antioxidant status in healthy women”. *Póster*, presentado en el IDF/INRA 1ST International Symposium on Minerals & Dairy Products, Saint-Malo, France , 1 al 3 de octubre de 2008.
- **Cilla A.**, Perales S., Lagarda M.J, Barberá R., Farré R. “Iron bioavailability in fortified fruit beverages using ferritin synthesis by Caco-2 cells”. *Póster*, presentado en el IDF/INRA 1ST International Symposium on Minerals & Dairy Products, Saint-Malo, France , 1 al 3 de octubre de 2008.

- García-Nebot M. J., **Cilla A.**, Lagarda M. J., Alegría A., Barberá R. “Milk or caseinophosphopeptides added to fruit beverage to improve ferritin synthesis?”. *Póster*, presentado en 3rd International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food, Rome, Italy , 1 al 3 de abril de 2009.

- García-Nebot M. J., **Cilla A.**, Perales S., Lagarda M. J., Alegría A., Barberá R. “In vitro bioaccessibility of iron and zinc in fortified fruit beverages”. *Póster*, presentado en 3rd International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food, Rome, Italy , 1 al 3 de abril de 2009.

- **Cilla A.**, Laparra J. M., Alegría, A., Barberá R., Farré R. “Efecto citoprotector de fracciones bioaccesibles de bebidas a base de zumo de frutas frente a estrés oxidativo inducido en células Caco-2”. *Póster*, presentado en el XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición, Sitges, España , 11 al 13 de junio de 2009.

