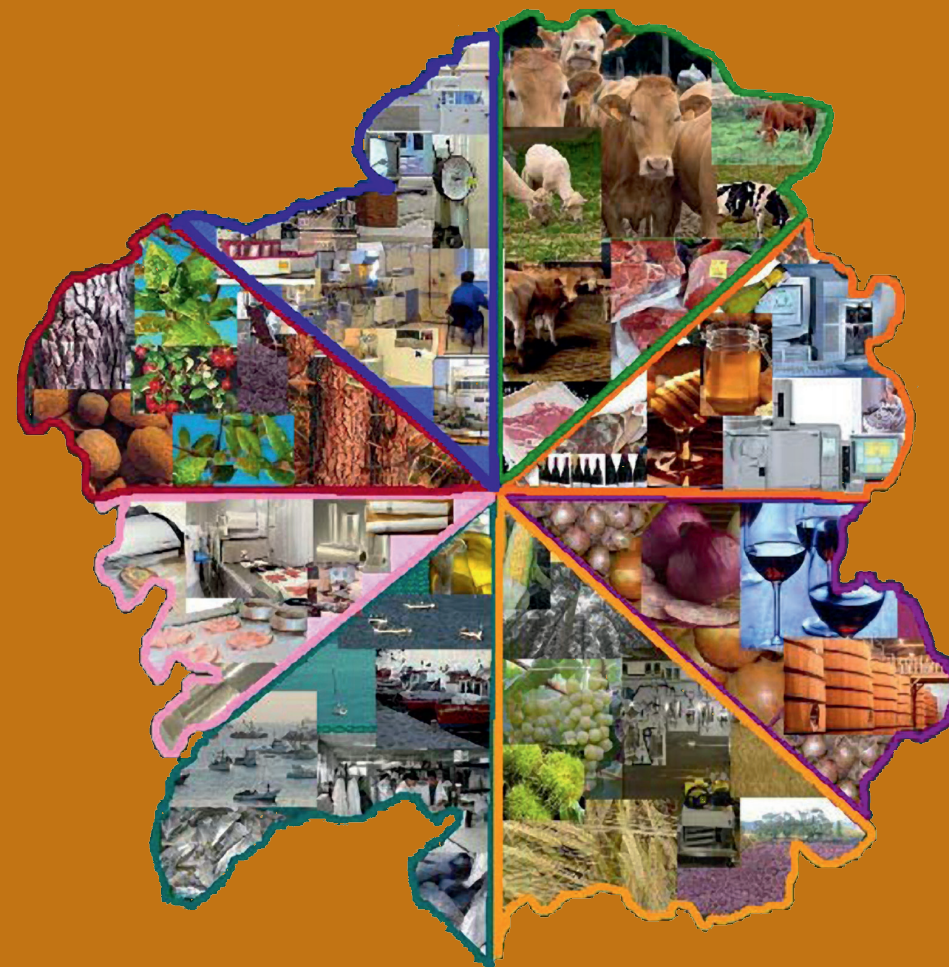


Antioxidantes naturais. Aspectos saudables, toxicolóxicos e aplicacións industriais

EDITORES

Daniel Franco Ruiz
Andrés Moure Varela



XUNTA DE GALICIA





Edita:

Daniel Franco Ruiz e Andrés Moure Varela

Lugar:

Santiago de Compostela

Deseño e Maquetación:

Gráficas Garabal

Ano:

2010

Imprime:

Gráficas Garabal

Depósito Legal:

C 3694-2010

ISBN:

978-84-453-4945-8

Antioxidantes naturais. Aspectos saudables, toxicolóxicos e aplicacións industriais

Editores

**Daniel Franco Ruiz
Andrés Moure Varela**

Xunta de Galicia
Consellería do Medio Rural
Santiago de Compostela
2010



Índice

Presentación do Conselleiro..	11
Presentación .	13
Prólogo	17

BLOQUE I. ASPECTOS SAUDABLES

Poden os antioxidantes naturais alongar a vida?	21
Josep Lluís Torres Simón	
Contribución das bebidas á inxesta de antioxidantes na dieta mediterránea	25
Fulgencio Saura-Calixto	
Actividade antioxidante dos compostos fenólicos do viño	29
M ^a . Carmen García-Parrilla	
Posible efecto protector dos viños tintos fronte ao estrés oxidativo	33
M ^a . Luisa González San José	
Beneficio cardiovascular dalgúns antioxidantes presentes no té	37
Ezequiel Álvarez Castro	
Efectos vasodilatadores do transresveratrol	41
Francisco Orallo Cambeiro (<i>In memoriam</i>)	
Efectos antitumorais de antioxidantes naturais	45
Marta Cascante Serratos	
Cancro prostático: efecto de fitoesteroids (Ps) e polifenoids (Pf) sobre o crecemento canceríxeno e a metastatización	51
María Jesús Núñez-Iglesias, Silvia Novío e Manuel Freire-Garabal Núñez	
Antioxidantes naturais na reprodución humana. Papel do estrés oxidativo na fragmentación do DNA espermático: utilidade do tratamento antioxidante	55
Juan G. Álvarez	
Oxidación lipídica e avaliación de antioxidantes	63
Edwin Frankel	
Antioxidantes naturais en alimentos ricos en ácidos graxos ω-3	83
Isabel Medina	

BLOQUE II. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Avaliación da toxicidade de novos compostos antioxidantes87
Guillermina Font

Acción protectora de antioxidantes fronte á toxicidade de dioxinas e PCBs ..97
César Ordóñez

Micotoxinas, estrés oxidativo e antioxidantes.. 109
Teresa Cabaleiro

Toxicoloxía de metais e antioxidantes naturais: cadmio e melatonina 121
Alejandro Romero

Toxicoloxía de insecticidas organoclorados e radicais libres: metoxicloro e óxido nítrico 129
Ana Caride

Radicais libres e morte celular programada 137
Rafael Balaña Fouce

Neurotoxicidade, estrés oxidativo, enfermidades neurodexenerativas e antioxidantes 151
M^a. Anunciación Lafuente

Radicais libres, estrés oxidativo e carcinoxénese 161
Arturo Hardisson de la Torre

BLOQUE III. APLICACIÓN

Quimiometría e antioxidantes 175
Carlos Herrero

Aspectos legais do uso de antioxidantes en envases de alimentos, novas formulacións de envases activos 179
Víctor Teruel Muñoz

Interese dos antioxidantes na industria de alimentos.. 185
Nick Hedges

Envases activos antioxidantes. Desenvolvemento e perspectivas de uso no envasado de carne fresca 187
Pedro Roncalés Rabinal

Aplicación de antioxidantes para a mellora da seguridade e a calidade sensorial e tecnolóxica da carne e produtos cárnicos 197
José Antonio García Regueiro

Achega á optimización do perfil nutritivo do leite mediante a alimentación do gando: antioxidantes	203
Ismael Martínez Lede	
Antioxidantes e oxidación lipídica de produtos cárnicos	207
Daniel Franco Ruiz	
Extracción de compostos fenólicos da uva relacionados coas características tecnolóxicas e funcionais	219
Celestino Santos-Buelga	
Influencia do nivel de maduración da uva e das técnicas de vinificación sobre a composición en compostos fenólicos do viño	227
Fernando Zamora Marín	
Aplicación da extracción supercrítica ao aproveitamento dos subprodutos de vinificación	233
Miguel Rodríguez Rodríguez	
Recuperación e concentración de antioxidantes dos residuos de alcoholeira	237
Beatriz Díaz Reinoso	



Editores:

Daniel Franco Ruiz.

Dr. Ciencias Químicas. Centro Tecnológico da Carne.

Andrés Moure Varela.

Dr. Ciencias Químicas. Dpto. Enxeñería Química. Universidade de Vigo.

Autores:

Álvarez, E. Facultade de Medicina e Odontoloxía. Universidade de Santiago de Compostela.

Álvarez, J. G. Bioloxía Reprodutiva. University of Harvard.

Balaña, R. Dpto. Toxicoloxía. Universidade de León.

Cabaleiro, T. Dpto. Toxicoloxía. Universidade de Vigo.

Caride, A. Dpto. Toxicoloxía. Universidade de Vigo.

Cascante, M. Facultade de Bioloxía. Universidade de Barcelona.

Díaz-Reinoso, B. Dpto. Enxeñería Química. Universidade de Vigo.

Frankel, E. Dpto. de Ciencia e Tecnoloxía dos Alimentos. Universidade de California.

Font, G. Dpto. de Toxicoloxía. Universidade de Valencia.

Franco, D. Dpto. Producción Animal. Centro Tecnológico da Carne.

Freire-Garabal, M. Facultade de Medicina e Odontoloxía. Universidade de Santiago de Compostela.

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

García-Parrilla, M.C. Facultade de Farmacia. Universidade de Sevilla.

González, M.L. Dpto. Tecnoloxía dos Alimentos. Universidade de Burgos.

Hardisson, A. Dpto. de Toxicoloxía. Universidade da Laguna.

Hedges, N. Unilever. Colworth House, UK.

Herrero, C. Facultade de Ciencias. Universidade de Santiago de Compostela.

Lafuente, M.A. Dpto. Toxicoloxía. Universidade de Vigo.

Martínez, I. Dpto. de I+D de FEIRACO.

Medina, I. Instituto de Investigacións Mariñas-CSIC.

Novío, Silvia. Facultade de Medicina e Odontoloxía. Universidade de Santiago de Compostela.

Núñez-Iglesias, M.^a Jesús. Facultade de Medicina e Odontoloxía. Universidade de Santiago de Compostela.

Ordóñez, C. Dpto. de Toxicoloxía. Universidade de León.

Orallo, F. Facultade de Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela.

Rodríguez, M. Dpto. Enxeñería Química. Universidade de Cádiz.

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

Roncalés, P. Dpto. Producción Animal e Ciencia dos Alimentos. Universidade de Zaragoza.

Santos-Buelga, C. Facultade de Farmacia. Universidade de Salamanca.

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

Teruel, V. Área de Xestión de Riscos Químicos. Subdirección Xeral de Xestión de Riscos Alimentarios.

Torres, J.L. Instituto de Investigacións Químicas e Ambientais. CSIC. Barcelona.

Zamora, F. Facultade de Enoloxía. Universidade Rovira i Virgili.



PRESENTACIÓN DO CONSELLEIRO

Dende que no ano 2006 foi creada a Rede de compostos bioactivos con actividade antioxidante (Antioxgal; <http://www.antioxgal.uvigo.es>), que integra a grupos de universidades e centros públicos de investigación galegos, leváronse a cabo diversas actividades para promover a formación dos membros e divulgar, expandir e consolidar esta área de traballo en Galicia.

Ao longo do ano 2008 celebráronse cinco xornadas e seminarios realizados nos distintos puntos da xeografía galega recollidos no libro *Antioxidantes naturais. Aspectos saudables, toxicolóxicos e aplicacións industriais*. Nestas xornadas, máis de corenta investigadores presentaron aspectos que abrangueron dende os mecanismos fundamentais da oxidación, a obtención de antioxidantes a partir de diversos produtos e subprodutos, aspectos de toxicidade, nocións de lexislación, as implicacións clínicas e as aplicacións alimentarias a produtos cárnicos, de peixe e a envases activos.

Con estas actividades ofreceuse unha oportunidade para reunirse e revisar coñecementos e avances, discutir novas ideas, identificar potenciais áreas de interese no seu campo e promover as sinerxías e colaboracións. Este volume recolle unha selección dos temas tratados nestas reunións pode ser de interese para estudantes, científicos e profesionais dos ámbitos alimentario, clínico, farmacéutico ou cosmético, e ofrece ao mesmo tempo unha visión xeral das actividades de investigación dos grupos da ANTIOXGAL en relación coa de expertos de prestixio internacional.

No nome da Consellería quero expresar o meu agradecemento a todos os responsables da edición e financiamento deste libro, aos relatores que prepararon un resumo das presentacións e aos organizadores e o público das xornadas que fixeron delas un marco de encontro, formación e debate.

Samuel Juárez
Conselleiro do Medio Rural



PRESENTACIÓN

Diversos grupos de investigación de Galicia que viñan traballando dende hai décadas no estudo e nas aplicacións de compostos naturais con actividades biolóxica e antioxidante impulsaron nos últimos cinco anos a creación e expansión da Rede Antioxgal. No marco desta rede tivemos ocasión de establecer vías de colaboración sólidas e duradeiras e dispor dunha infraestrutura que nos permite abordar estudos máis complexos e ambiciosos.

Grazas ao esforzo dos editores, Daniel Franco e Andrés Moure, presentamos agora unha recompilación dalgúns relatorios representativos, tanto de investigadores de prestixio recoñecido coma de investigadores mozos que se están a formar nos grupos da Rede.

Fai agora un ano tivemos que dicir adeus ao profesor Francisco Orallo Cambeiro (1958-2009), un dos científicos máis salientables do panorama galego dos últimos anos. Xa sobresaíu dende as etapas da súa formación, pois recibiu o premio extraordinario de licenciatura (1979-80) e o de doutoramento (1983-84) en Farmacia pola Universidade de Santiago de Compostela. Posteriormente foi galardoado co premio Eloy Díez (1984), co premio da Sociedade Española de Química Terapéutica (1987), cunha mención honorífica da Fundación Dr. Esteve (1992), co premio Dolores Trigo (1993), co premio de Investigación da Xunta de Galicia en Ciencias da Saúde (1996) e co premio nacional de Farmacoloxía (2003). Os seus traballos acadaron relevancia e recoñecemento internacional. É ben patente o impacto e a transcendencia dos seus estudos sobre os efectos cardioprotectores e antidepressivos de diversos compostos naturais, en particular aqueles sobre o resveratrol. Ademais da ampla traxectoria como profesor e investigador sobranceiro, achegounos a súa paixón pola investigación, a súa actividade incansable, a constancia no esforzo e a súa dispoñibilidade e participación desinteresada.

Moi recentemente tivemos que despedir á profesora Mercedes Sonia García Falcón (1969-2010), investigadora polifacética e brillante que obtivo recoñecemento aos seus primeiros traballos co premio Juan Abelló da Real Academia de Farmacia de Madrid (1997) e co premio Dolores Trigo (1997). Comezou a súa formación e seguiu traballando no desenvolvemento e validación de ferramentas analíticas, achegando metodoloxías novidasas e que son un referente internacional. Impulsou e consolidou unha liña de estudos, establecida como unha frutífera colaboración transfronteiriza, sobre a caracterización fenólica en diversos produtos autóctonos. Ela tiña unha capacidade única para comunicar e transmitir o entusiasmo polo seu traballo e unha admirable forza para levalo a cabo con alegría e para dirixilo con sentido do humor.

Os seus alumnos lembran que ensinaba a aprender xogando, que é a mellor forma de aprender.

Aínda que agora Francisco e Mercedes Sonia non están connosco, a súa contribución científica seguirá a estar vixente e a lembranza e o aprecio da súa valía persoal estará presente entre todos os que tivemos a sorte de coñecelos e colaborar con eles.

Herminia Domínguez
en nome da Rede Antioxgal

In memoriam
Francisco Orallo Cambeiro
Mercedes Sonia García Falcón



PRÓLOGO

Nas últimas seis décadas o campo dos antioxidantes experimentou un grande auxilio dentro dunha ampla variedade de áreas multidisciplinares que engloba tanto alimentos coma saúde. Un número crecente de evidencias, de tipo epidemiolóxico e experimental, indican que os antioxidantes presentes en diversos alimentos teñen un papel esencial para a saúde. No libro *Antioxidantes naturais. Aspectos saudables, toxicolóxicos e aplicacións industriais*, os seus editores, os doutores Daniel Franco e Andrés Moure, reúnen os temas tratados nas xornadas e seminarios realizados no marco da Rede Antioxgal. A boa acollida das xornadas reflicte o interese do público xeral e especializado por facer do campo de traballo dos antioxidantes naturais unha ferramenta básica para unha boa saúde e a elaboración dos mellores produtos nas industrias farmacolóxicas e alimentarias.

Este conxunto de traballos expresa a complexidade da natureza dos compostos con propiedades antioxidantes. Tócanse temas relacionados con aqueles fenómenos que afectan os aspectos saudables para o organismo, as súas implicacións en procesos de oxidación e inhibición en sistemas biolóxicos, ponse atención aos aspectos toxicolóxicos destes antioxidantes tanto sobre a súa aplicación directa como a súa acción protectora fronte a xenobióticos e avalíase o potencial destes compostos en aplicacións industriais.

Este libro polo tanto estruturouse nos tres bloques anteriormente mencionados: un primeiro bloque versado en aspectos saudables dos antioxidantes, un segundo bloque onde se desenvolven os principais aspectos toxicolóxicos e un último bloque onde se mostran potenciais aplicacións dos antioxidantes na elaboración de envases, en matrices alimentarias como produtos cárnicos e lácteos; e móstrase a industria do viño como fonte potencial de produtos antioxidantes dende os seus produtos e subprodutos.

Cremos que este conxunto de documentos estará ao servizo de estudantes, científicos e profesionais do sector que busquen incrementar o seu punto de vista delimitado polo seu ámbito diario e aproveitar o coñecemento entregado neste documento por expertos de prestixio internacional.

Sen o esforzo e a colaboración de todos os autores sería imposible ter nas nosas mans este volume que nos ofrece unha visión de conxunto e tamén pormenorizada do campo de aplicación e da obtención dos antioxidantes naturais.

Queremos agradecer a Antonia Vega o seu grande esforzo para a adaptación dos textos á lingua vernácula.

Nesta mesma liña de agradecementos, facer mención á Consellería de Educación e Ordenación Universitaria (Programa de consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas, Rede ANTIOXGAL 2006/06-Fondos FEDER), así coma aos participantes seus.

Por último agradecer á Consellería do Medio Rural, á Universidade de Vigo, CITI (Centro de Investigación Transferencia e Innovación) e ao Centro Tecnolóxico da Carne (CTC) en representación da Rede REAL (Rede de Innovación e Desenvolvemento Tecnolóxico Agroalimentario Norte de Portugal-Galicia, cofinanciada a través do Programa Operativo de Cooperación Transfronteiriza España-Portugal 2007-2013 (POCTEP)-Fondos FEDER) por apoiar esta publicación en beneficio da industria alimentaria.

Daniel Franco e Andrés Moure

BLOQUE I. ASPECTOS SAUDABLES



PODEN OS ANTIOXIDANTES NATURAIS ALONGAR A VIDA?

Josep Lluís Torres Simón

Instituto de Investigacións Químicas e Ambientais. CSIC. Barcelona

A principios do século XX os raios-X empezaron a ser utilizados en medicina para a detección non invasiva de lesións e enseguida se detectou a súa capacidade para danar os tecidos biolóxicos. Máis tarde, no ano 1946 os Estados Unidos botaron dúas bombas atómicas sobre Hiroshima e Nagasaki e os efectos das radiacións ionizantes manifestáronse dramaticamente. Na primeira metade do século XX, os estudos sobre os efectos das radiacións X e gamma suxeriron que os radicais libres, sobre todo o radical hidroxilo, eran os responsables do dano celular (Stein e Weiss, 1948). A partir dese momento os captadores de radicais libres apareceron como a solución ao dano oxidativo relacionado coas radiacións e con calquera proceso biolóxico de deterioración causado polos mesmos radicais. En particular, construíuse unha teoría que explicaba o envellecemento pola acción dos radicais libres (Harman e Aging, 1956) e, en consecuencia, a solución tiña que vir dos antioxidantes captadores de radicais libres. Esta concepción aínda perdura. En efecto, a morte é un proceso irreversible de oxidación, polo tanto, un antioxidante efectivo como tal debería deter o proceso dexenerativo que remata na morte.

Vivimos nun ambiente oxidante

A aparición de oxíxeno (fotosíntese) na biosfera permitiu a evolución de organismos cada vez máis eficaces na utilización da enerxía química dos carbohidratos pero o oxíxeno era, á súa vez, tóxico para a maioría destes organismos. Desde entón vivimos nun ambiente oxidante que é á vez imprescindible e tóxico. Os seres vivos desenvolvemos unha serie de mecanismos de defensa contra a oxidación química e as radiacións. Son mecanismos de detoxificación encimática ou mediante moléculas máis pequenas (que chamamos antioxidantes) que captan as especies tóxicas (xeralmente radicais). Os sistemas de defensa antioxidante manteñen o organismo san nun estado de equilibrio redox. No entanto, os sistemas de defensa poden verse desbordados por axentes externos (p.e. as radiacións ionizantes) ou procesos patolóxicos cuxa relación con axentes externos é quizais menos directa. En tal caso, axentes antioxidantes exógenos deberían axudar o organismo a protexerse ou a vivir por máis tempo.

Lonxevidade e radicais libres

Polo que se refire á lonxevidade, hai que distinguir entre duración da vida (*life-span*) e esperanza de vida (*life-expectancy*). A primeira é o número de anos que viviu o in-

dividuo máis lonxevo dunha especie (no caso do ser humano 122 anos) e a segunda é a media de anos de vida na poboación dun territorio determinado (p.e. 40,9 anos en Mozambique, 78,7 anos en Europa). En ambos os dous casos o balance redox e os radicais libres parecen ter un papel relevante. Parece ser que o número de replicacións de cada célula depende do tamaño dos telómeros (secuencia de bases final dos cromosomas) e que os radicais libres poderían influír nos encimas (telomerasas) de reparación dos telómeros. A influencia dos radicais libres sobre a esperanza de vida parece máis evidente. A lonxevidade, moi por debaixo da duración máxima, depende en gran medida de factores ambientais, moi probablemente relacionados coa produción de radicais libres (contaminación, alimentación deficiente, estrés psicolóxico, enfermidades). Os radicais libres poden danar a célula desde fóra, e sobre todo desde dentro, por unha sobreprodución na mitocondria.

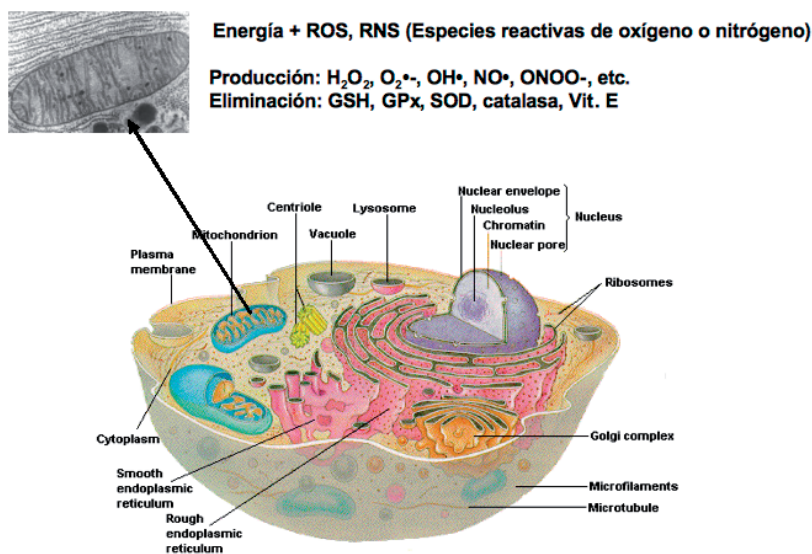


Figura 1. Mecanismo de produción/eliminación de radicais libres na célula eucariota

Na mitocondria, a cadea respiratoria transfire catro electróns ao oxíxeno para dar auga. No proceso prodúcese o anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). O radical superóxido é unha molécula moi importante posto que, aínda que relativamente inocuo *per se*, pode dar lugar a outras moléculas tóxicas ou a mensaxeiros secundarios cruciais para o funcionamento celular. Por unha parte, o superóxido pasa a peróxido de hidróxeno, que en presenza de metais como o ferro divalente pode producir o radical hidroxilo, extremadamente daniño fronte ao ADN e proteínas. Por outra parte, o ión superóxido e o peróxido de hidróxeno forman parte dos mecanismos de sinaliza-

ción molecular involucrados na regulación da mitose (división celular) e a apoptose (morte celular programada). O nivel de superóxido está finamente regulado no organismo e a súa alteración está relacionada coa aparición de enfermidades (varios tipos de cancro, alzheimer, parkinson). Desde o punto de vista do estado redox, estreitamente relacionado coa presenza de aniión superóxido, a célula eucariota pode estar nun estado altamente reducido, en estado de repouso, ou altamente oxidado, en estado de necrose (morte traumática). En estados intermedios, a célula pasa por procesos de oxidación controlada relacionados co seu crecemento e división (Halliwell, 2006). En certa maneira, as enfermidades poden considerarse estados en que os tecidos experimentan un estrés oxidativo excesivo. Este estrés oxidativo pode ser estimulado por axentes externos como a contaminación química e as radiacións, á vez que minimizado por antioxidantes.

Son eficientes os antioxidantes naturais contra o estrés oxidativo?

Enténdese normalmente por antioxidantes naturais certos produtos naturais presentes en vexetais e que con maior ou menor frecuencia inxerimos na dieta. Crese que os efectos beneficiosos dunha dieta rica en froitas e verduras se deben a estes antioxidantes naturais. Entre eles atópanse os polifenois (captadores de radicais libres, p.e. catequinas do té, proantocianidinas da uva) e os carotenos (p.e. licopeno do tomate).

Curiosamente, os polifenois poden tamén ser prooxidantes. Algúns deles (os que presentan un anel de pirogalol, tres hidroxilos fenólicos) poden formar aniión superóxido. Así mesmo as quinonas, produtos de oxidación, poden dar reaccións redox coa formación de NAD^+ . É interesante remarcar que esta actividade antioxidante podería ser, paradoxalmente, a verdadeira actividade antioxidante, porque un certo estímulo oxidante pon en marcha os mecanismos de defensa antioxidante. Sexa como fose, hai quen pensa que ningún destes efectos é significativo no organismo vivo porque os polifenois son metabolizados axiña xa no intestino, e porque a homeostase redox está tan ben regulada que dificilmente pode ser alterada por pequenas doses de compostos moderadamente activos (Halliwell, 2006; Linnane e col., 2007).

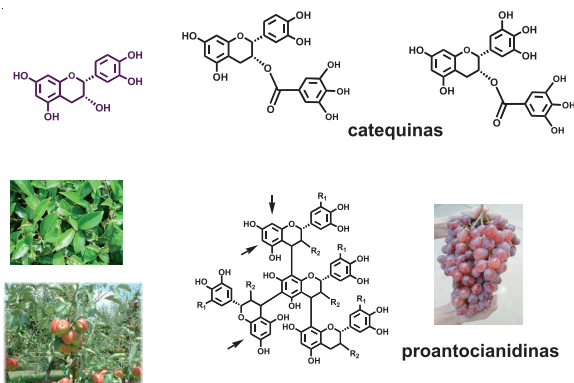


Figura 2. Fontes e estruturas de compostos antioxidantes

Aínda que non hai evidencia de que algunha familia de antioxidantes naturais (p.e. polifenóis) poida facer aumentar a esperanza de vida en humanos, cada vez parece máis claro que un estilo de vida que combine dieta adecuada (con inxestión de froitas e verduras en abundancia), exercicio moderado e ausencia de estrés psicolóxico está relacionado cunha baixa incidencia de enfermidades como o cancro e os trastornos neurodexenerativos. Polo que se refire á dieta, a restrición calórica (diminución dun 20-30% na inxesta de carbohidratos) parece estar relacionada con menor incidencia de cancros e co aumento da duración da vida (Willcox e col., 2006). Como queira, unha dieta rica en verduras e fibra que sexa tamén menos abundante en carbohidratos, a restrición calórica podería explicar en parte o efecto beneficioso dunha dieta rica en vexetais. Ademais, o conxunto dos micronutrientes, non soamente os polifenóis ou os carotenos, podería conferir á dieta os seus efectos beneficiosos. Neste sentido, hai outros compoñentes que poderían desempeñar un papel importante en prevención, análogo de azucres (inositois, iminociclitois) que atrasan a absorción dos carbohidratos.

Os antioxidantes naturais, se son tales antioxidantes e son efectivos no organismo vivo, han de contribuír a aumentar a esperanza de vida. A cuestión está en saber cales son estes antioxidantes naturais e en deseñar unha dieta que conteña as doses efectivas axeitadas.

BIBLIOGRAFÍA

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

CONTRIBUCIÓN DAS BEBIDAS Á INXESTA DE ANTIOXIDANTES NA DIETA MEDITERRÁNEA

Fulgencio Saura-Calixto

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

Numerosos estudos clínicos e epidemiolóxicos realizados nos últimos anos asocian de forma significativa o patrón alimentario definido como “dieta mediterránea” cunha baixa morbilidade e mortalidade por todas as causas, e especialmente por enfermidades cardiovasculares e algúns tipos de cancro. Dado que a inxesta calórica e total de nutrientes desta non explica as diferenzas con outros países do centro e norte de Europa, con alta incidencia nestas enfermidades, os factores preventivos da dieta hai que buscalos en compoñentes específicos tales como os perfís de ácidos graxos, fibra e fitoesteroides e a inxesta de antioxidantes. A hipótese antioxidante indica que as vitaminas e os compostos bioactivos antioxidantes (fotoquímicos) dos alimentos vexetais poden ter un papel significativo na etioloxía de enfermidades crónicas.

Os alimentos vexetais e as bebidas son a principal fonte de antioxidantes na dieta. Os alimentos vexetais son ricos en fibra, esta última xunto cos antioxidantes son dos temas que tanto en investigación como en desenvolvemento de produtos se abordan separadamente. Neste contexto xorde a fibra dietética antioxidante (FA) que combina nun só produto os efectos da fibra e os antioxidantes naturais (Saura Calixto, 1998). As fibras antioxidantes conteñen polo menos un 50% de fibra dietética e unha capacidade antioxidante/secuestrante de radicais libres mínima equivalente a 50-100 mg de vitamina E por gramo de fibra. A FA actúa liberando os seus antioxidantes gradualmente no intestino delgado e no colon producindo un estatus antioxidante e protector de radicais libres na mucosa intestinal. Os ensaios biolóxicos, a experimentación animal e os ensaios clínicos mostran resultados positivos en saúde gastrointestinal e en diversos parámetros de risco cardiovascular.

Moi poucos vexetais son materias primas aptas para este tipo de fibra. Ata a data, obtivéronse a partir dalgúns froitas tropicais, alga *Fucus*, e, especialmente, a partir de subprodutos de vinificación. Os estudos sobre as propiedades e as aplicacións destas fibras centrouse principalmente na fibra antioxidante da uva (FAU), cuxa composición se mostra na Figura 1.

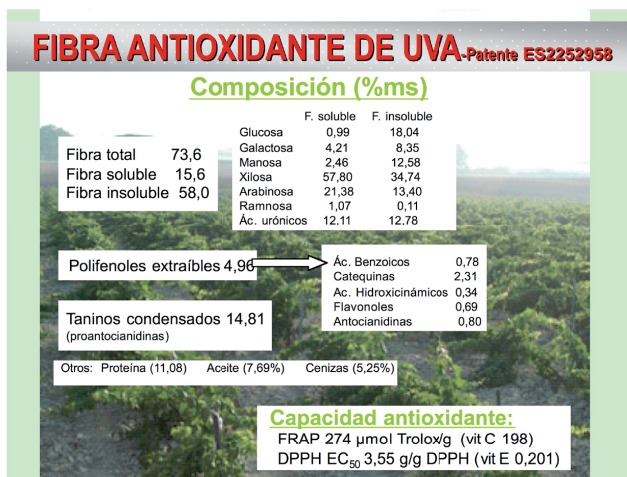


Figura 1. Composición da fibra antioxidante da uva (FAU)

Por outra parte, os antioxidantes principais e maioritarios contidos nos alimentos pódense agrupar en vitaminas (C e E), carotenoides (incluíndo a propia vitamina A), compostos polifenólicos e compostos de Maillard. A capacidade antioxidante (CA) dos alimentos e das dietas é debida ao efecto combinado e sinérxico de todos eles. Os polifenóis son os compostos antioxidantes maioritarios na nosa dieta cunha inxesta estimada en 2000 a 3000 mg fronte aos aproximadamente 150 mg correspondentes a vitaminas C e E e carotenoides

Existe unha documentación ampla sobre a CA *in vitro* e *in vivo* dos compostos alimentarios illados e de alimentos concretos, pero moi escasa sobre dietas de poboacións.

Contribución das bebidas á inxesta de antioxidantes na dieta mediterránea

Na Táboa 1 móstranse os resultados obtidos empregando o método de ABTS para a medida da capacidade antioxidante total realizada para a dieta española, representada como a cantidade de unidades antioxidantes (equivalentes trolox) presentes diariamente no tracto gastrointestinal, e da contribución dos distintos grupos de alimentos a esta (Pulido e col., 2003; Saura Calixto e Goñi, 2006; Saura Calixto e col., 2007).

A contribución de cada alimento á CA da dieta depende da cantidade ingerida e da súa propia CA. Cabe destacar que a maior contribución corresponde ás bebidas (72,6%), en contra da crenza xeral de que os alimentos vexetais, e especialmente as froitas e verduras, son a principal fonte de antioxidantes da dieta. Froitas e verduras

representan un 17,3% do total, froitos secos e legumes un 8,8%, mentres que a contribución de cereais e aceites é moi baixa.

Estes resultados suxiren que para estudar o papel dos antioxidantes na saúde se debería considerar a CA da dieta completa. Estudos en alimentos individuais teñen un valor moi limitado, pois aínda que presenten unha CA alta, a súa contribución á dieta pode ser insignificante. Así, atopámonos que a contribución do aceite de oliva e do té á dieta española representa só o 0,4 e 3% da CATD. Pola contra, o viño achega o 17,4% e, sorprendentemente, o café un 44,6%.

Respecto á contribución de compostos específicos, os compostos polifenólicos son cuantitativamente os principais antioxidantes da dieta. As vitaminas C e E representan tan só ao redor do 10% da capacidade antioxidante total da dieta (CATD), e os carotenoides unha cantidade moito menor. Non obstante, hai que ter en conta que as vitaminas son totalmente biodisponíbles, mentres que a biodisponibilidade de polifenóis e carotenoides é baixa (5-15%).

A CA da dieta noutros países mediterráneos é previsiblemente comparable á de España. Pola contra, debe ser menor en países con altos índices de enfermidades cardiovasculares e cancro, como os do norte e centroeuropeos, con dietas que se caracterizan por un máis alto consumo de cereais e menor de froitas, verduras e viño que en países mediterráneos. Diso concluímos que a CA pode ser un parámetro para considerar en estudos clínicos e epidemiolóxicos e para definir a dieta mediterránea.

		Capacidade Antioxidante
		ABTS ($\pm$ mol equivalente trolox)
Consumo		
Alimentos vexetais		
(g substancia fresca)		
Froitos secos	6,9	176,4
Froitos	265,2	341,5
Verduras e hortalizas	330,7	271,6
Legumes	22,2	134,7
Cereais	221,6	33,4
Bebidas (mL)	504,8	2575,7
Aceites vexetais (mL)		
Oliva	31,3	12,8
Outros	20,8	2,4
TOTAL		3548,6

Táboa 1. Capacidade antioxidante total ingerida (per cápita/día) na dieta española (ano 2000)

Fibra antioxidante da uva (FAU) como prevención de enfermidades crónicas

A inxesta de FAU nun grupo controlado de 34 voluntarios e 10 controis aos que se lles subministróu 7,5 g FAU e placebo respectivamente durante 4 meses mostrou os seguintes efectos beneficiosos:

1. Aumento significativo do tránsito intestinal
2. Diminución significativa do colesterol total (9%), colesterol LDL (9%), presión sistólica (6%) e diastólica (5%). En suxeitos hipercolesterolémicos, descensos aínda máis marcados en colesterol total (14,2%) e colesterol LDL (11,6%), así como en triglicéridos (18,6%)
3. Diminución significativa da porcentaxe de graxa corporal en hipergraxos
4. Posibles efectos de regulación de glucemia

Támén se obtiveron resultados prometedores da FAU en experimentación animal relacionados coa prevención de cancro de colon, encontrándose pendentes de desenvolvemento os ensaios clínicos.

No sector dos alimentos funcionais, os estudos centráronse no desenvolvemento de reestruturados de peixe e de produtos cárnicos enriquecidos con fibras antioxidantes como ingredientes funcionais. A adición de fibra antioxidante de uva en reestruturados de peixe azul inhibe considerablemente a oxidación durante o período de almacenamento a -20°C, (Sánchez-Alonso e col., 2007). Por outra parte, este ingrediente achega as propiedades nutricionais derivadas da presenza de fibra dietética.

En alimentación animal, a suplementación da dieta de polos con fibra antioxidante de uva produce carne con elevada estabilidade oxidativa, igual ou superior á obtida con suplementos de vitamina E (Goñi e col., 2007). Actualmente, encóntranse en desenvolvemento estudos para a obtención de produtos cárnicos (hamburguesas) enriquecidas con esta fibra. Os resultados preliminares indican unha inhibición da oxidación lipídica nestes alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

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

ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO VIÑO

M^a. Carmen García-Parrilla

Dpto. de Bioquímica, Bromatoloxía, Toxicoloxía e Medicina Legal. Facultade de Farmacia. Universidade Sevilla

Nos últimos anos suscitouse gran interese polos antioxidantes dietéticos. Como exemplo podemos comprobar o gran aumento en literatura científica dos últimos anos referida a este tema. Así no ano 1995 existían 6.486 artigos científicos e no ano 2007 uns 21.517, cifras dadas a título orientativo. Este aumento débese fundamentalmente á súa posible relación coa saúde e a prevención da enfermidade. A asociación do binomio do consumo moderado do viño e menor incidencia de enfermidade cardiovascular xurdiu como é ben coñecido co estudo de Renaud e Lorgeil do paradoxo francés publicado en 1992. Como etapa inicial da enfermidade cardiovascular e doutras enfermidades dexenerativas está a oxidación. Así pois, a hipótese de que unha maior inxesta de antioxidante prevén a enfermidade deu pé a numerosos traballos no campo.

En primeiro lugar, débese definir que é un antioxidante. Un antioxidante é unha substancia que evita ou atrasa a oxidación doutra. Halliwell en 1990 definiu os antioxidantes como substancias que estando en baixas concentracións con respecto ás biomoléculas que protexen, preveñen ou reducen o dano que sofren estas debido á oxidación. Así pois nunha acepción do termo, hai que considerar o antioxidante como compoñente do alimento que vai previr a oxidación deste. Existen numerosos aditivos alimentarios que son antioxidantes. Pero a gran literatura científica refírese hoxe día ao efecto que sobre a saúde teñen substancias que están naturalmente presentes en alimentos e que poden previr os procesos oxidativos que os radicais libres desencadean no organismo.

O ácido ascórbico, os tocoferois ou os carotenoides son substancias antioxidantes. Ademais existen substancias que son antioxidantes como os compostos polifenólicos dos que o viño, especialmente o tinto, é boa fonte. Pódense identificar e cuantificar grazas á cromatografía de líquidos con detectores de díodos e masas. É un grupo moi heteroxéneo desde o punto de vista estrutural, poden presentarse de forma monomérica, dimérica ou polimérica e unidos a outras moléculas. Aínda que cada día se coñecen máis, tamén é certo que aínda quedan por dilucidar moitas estruturas.

Para pór en evidencia as propiedades antioxidantes existen unha ampla variedade de métodos *in vitro*. En xeral, o fundamento destes métodos pasa pola xeración dun radical no medio de reacción e en comprobar como desaparece en presenza do

antioxidante. En gran número de casos se realiza unha medida espectrofotométrica. Os resultados refírense a un estándar que adoita ser o trolox, análogo hidrosoluble da vitamina E. Os métodos ABTS e DPPH úsanse con gran frecuencia. Ademais da molécula que se usa como radical, difiren no modo de xerar este. No caso do ABTS a xeración do radical pode ser con peroxidasa de ravo e auga oxixenada; tamén con persulfato potásico. No caso do método DPPH, non é necesario unha etapa previa de xeración do radical, simplemente a disolución do reactivo comercial. Existen ademais diversos matices na realización dos métodos que hai que considerar ao comparar os datos duns autores e outros, dunhas mostras e outras. Para comprobar a reproducibilidade dos métodos pódense observar os datos obtidos por diversos autores con substancias patrón. Se os valores de actividade antioxidante dos compostos fenólicos poden variar nun 35% aplicando o método do DPPH, no caso dos valores descritos para o método do ABTS pódense ter diferenzas dun 70%.

Esta diversidade pon de manifesto que sexa necesario unha estandarización das medidas. Neste sentido en EEUU están usando o método ORAC para recompilar os datos de actividade antioxidante dos alimentos en táboas. O método ORAC baséase na perda de fluorescencia que sofre unha proteína, a ficoeritrina, polo ataque de radicais peroxilo. Despois comezouse a usar fluoresceína como molécula diana xa que é máis económica e os resultados son máis reproducibles.

Estes métodos aplicáronse a viños de diversas denominacións de orixe, ao estudo das diferentes fraccións fenólicas ou dos compostos fenólicos illadamente. Tamén se aplicaron para comprobar o efecto de operacións enolóxicas na actividade antioxidante total do viño.

Os métodos *in vitro* para a determinación das propiedades antioxidantes son un índice, serven para pór de manifesto unha propiedade. Son útiles para establecer unha orde de reactividade e tamén se pode avaliar con eles un posible sinerxismo. Pódense usar para comparar os efectos dun tratamento tecnolóxico dado sobre as propiedades antioxidantes. Pero non hai que perder de vista as diferenzas que existen coa situación que se pode encontrar no organismo. Hai que recoñecer que nestes métodos se empregan radicais estraños, non son os propios do organismo e o seu valor é parcialmente representativo.

Para considerar os efectos antioxidantes que poden ter os compostos fenólicos *in vivo* tras a inxesta de viño hai que ter en conta diversas diferenzas cos ensaios nos que se administra un fármaco, por exemplo. Cando se consome viño estamos proporcionando unha mestura de substancias moi heteroxénea que se encontran a doses relativamente baixas con respecto ás que se poden ensaiar cun medicamento. Por outra parte, o efecto beneficioso esperado debe producirse cando o alimento forma parte dunha dieta variada que, ademais no caso do viño, o alcohol limita aínda

máis a súa inxesta. Por último hai que considerar que as substancias presentes nos alimentos non están como tales en fluídos biolóxicos e ademais as súas concentracións son moi baixas.

Os compostos polifenólicos non absorbidos chegan ao colon onde son atacados pola flora normal que libera gran variedade de compostos fenólicos de baixo peso molecular que conservan a actividade antioxidante. O posible papel da fracción polifenólica polimérica como precursor doutros compostos antioxidantes que orixinalmente non están no alimento é un aspecto interesante para o desenvolvemento de novos produtos derivados do sector vitivinícola. Recentemente publicouse como o consumo de fibra dietética antioxidante da uva como suplemento dietético mellora o perfil lipídico e a hipertensión.

Ademais dos estudos nos que se avalía a biodisponibilidade dos compostos fenólicos medindo a concentración dos seus derivados en fluídos biolóxicos, cabe considerar outra forma de poñer en evidencia os efectos antioxidantes e que consiste en avaliar un biomarcador que puidese ser representativo do efecto anioxidante. Quizais entre estes un dos máis usados nun elevado número de estudos sexa a capacidade antioxidante do plasma. A determinación é sinxela, trátase de someter plasma extraído dun voluntario humano despois de ter consumido viño a un test de actividade antioxidante como os descritos anteriormente (ORAC, FRAP). Aínda que os seus principais defensores argumentan que é unha medida sinxela que pode dar unha idea do efecto antioxidante do conxunto de compostos ingeridos sobre un fluído biolóxico, é certo que hai diversas substancias como o glutatión ou o ácido úrico que tamén reaccionan. En estudos de intervención púxose de manifesto que tras a inxesta de 300 mL de viño tinto a capacidade antioxidante do plasma aumenta entre un 16 a un 22,8% determinada co método ORAC. No caso de estudos de intervención a medio prazo de varias semanas non se observaron diferenzas significativas na capacidade antioxidante do plasma tras o consumo de viños brancos ou viños tintos.

No entanto, existen outros biomarcadores como a actividade das encimas antioxidantes ou os grupos tiol das proteínas que se modifican tras a inxesta repetida do viño. Neste sentido pódese dicir que o consumo repetido de viño modifica a actividade das encimas endóxeas que constitúen parte do noso sistema antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

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



POSIBLE EFECTO PROTECTOR DOS VIÑOS TINTOS FRONTE AO ESTRÉS OXIDATIVO

M^a. Luisa González San José

Dpto. de Biotecnoloxía e Ciencia dos Alimentos. Universidade de Burgos

Nas últimas dúas décadas proliferaron os estudos enfocados á avaliación da actividade antioxidante dos constituíntes alimentarios, así como daqueles que asocian esta actividade antioxidante cos efectos positivos para a saúde, derivados da inxesta de determinados alimentos. A base xeral de todos eles é que os antioxidantes son necesarios e beneficiosos para evitar o estrés oxidativo que pode desencadear diferentes alteracións fisiolóxicas ou fisiopatolóxicas como o cancro, enfermidades cardiovasculares, disfuncións cerebrais, declive do sistema inmune, cataratas, envellecemento, etc. Así, faise fincapé en desenvolver hábitos alimenticios saudables, entre os que se encontra o consumo de alimentos que acheguen antioxidantes.

O denominado paradoxo francés, observación da existencia de certa asociación do consumo de viño, especialmente do tinto, cunha menor incidencia de enfermidades cardiovasculares, mutaxénicas e neurodexenerativas, foi o principio de múltiples estudos que postularon que o consumo moderado de viño pode ter ou ten un efecto beneficioso para a saúde. Un dos piares destas afirmacións é o alto contido de compostos con actividade antioxidante presentes nos viños tintos, entre os que destacan os compostos fenólicos, e especialmente os flavonoideos (antocianos, flavanóis, entre outros) e os estilbenos (o resveratrol e os seus derivados).

Hoxe en día é ben sabido que a adecuada avaliación das propiedades antioxidantes dun alimento non se pode facer por un único método e polo tanto téndese a facer avaliacións múltiples que definan o perfil antioxidante do alimento. En xeral, a capacidade antioxidante avalíase por métodos que valoran a capacidade para transferir electróns (SET) ou ceder hidróxenos (HAT), a capacidade para quelar metais e/ou para atrapar radicais libres, a capacidade de reacción de substancias de natureza diversa, etc. Por outra parte, a actividade antioxidante pode ser avaliada por un amplo número de métodos que constitúen unha aproximación *in vitro* da capacidade dun determinado alimento ou composto de protexer un sistema biolóxico da excesiva oxidación provocada por especies reactivas, nitroxenadas ou oxixénicas. Esta actividade avalíase principalmente por métodos “scavenger” e de biomarcadores.

Na maioría dos traballos publicados nos que se avaliaron as propiedades antioxidantes dos viños descríbese o uso de un a catro métodos, o que é insuficiente para definir adecuadamente o perfil antioxidante real do viño. Ademais, rara vez os métodos aplicados son os mesmos ou se aplicaron en condicións estandarizadas, polo que se fai moi difícil comparar datos, que ás veces incluso son contraditorios. Re-

centemente, o noso grupo de traballo propuxo un perfil que engloba datos de nove métodos, abranguendo cinco químicos, dous “scavenger” e tres biomarcadores, froito de traballos de optimización de diversas metodoloxías xa descritas como adecuadas para determinar a actividade antioxidante dos viños, e da busca doutras que permitiran achegarse aos posibles efectos saudables a través de métodos biolóxicos ou de protección a biomoléculas. Os métodos seleccionados, agrupados por tipo de información, foron os seguintes: relativos á capacidade antioxidante: ABTS; DPPH; DMPD; ORAC; FRAP e PT; relativos á actividade scavenger: HRSA ou actividade scavenger do radical hidroxilo e SRSA ou actividade scavenger do radical superóxido; e relativos a biomarcadores de estrés oxidativo: inhibición do dano oxidativo ao ADN por electroforese en xel de agarosa e avaliación do dano a bases nitroxenadas e inhibición da peroxidación lipídica nun sistema microsomal.

A maioría dos traballos publicados, como xa se dixo, asocian principalmente o potencial antioxidante dos viños á súa composición fenólica. Hoxe en día a composición fenólica dos viños foi amplamente estudada e sábese que son numerosos os factores que a afectan e modifican. Por iso, definir adecuadamente o perfil antioxidante dos viños implica analizar un número amplo deles, e que nas mostras analizadas encerren variabilidade debida ao maior número de actores posibles. Son moi poucos os estudos levados a cabo cun amplo número de viños, e no seu caso que inclúen a heteroxeneidade propia deste tipo de produtos, o que fai que aínda existan grandes lagoas respecto ao verdadeiro poder antioxidante dos viños en xeral, ou dalgún tipo deles en particular.

O noso grupo de investigación leva varios anos recompilando datos de viños tintos e distintas variedades, procedencias xeográficas, idades, tipos de elaboracións e crianzas, e estudouse o efecto dalgúns destes parámetros sobre o perfil antioxidante dos viños tintos. Ademais avaliouuse a asociación entre a composición fenólica e o potencial antioxidante dos viños e planificouse o estudo a dous niveis, un global, derivado da comparación da dotación fenólica global dos viños e das súas propiedades antioxidantes, e outro pormenorizado, enfocado esencialmente na fracción antociánica, no que se comparou o potencial antioxidante dos viños e o da súa fracción antociánica, illada por cromatografía en columna.

Resumindo os resultados obtidos durante estes anos son destacables varios feitos:

- 1º.- Os viños tintos, en xeral, teñen un potencial antioxidante elevado, conxunto dunha serie de mecanismos de protección: HAT, SET, captura de metais e radicais, protección de biomoléculas, etc.
- 2º.- Non se detectan grandes diferenzas en canto ao potencial antioxidante dos diversos viños tintos estudados, xa que presentan balances globais similares

(figuras 1 e 2), nos que descensos na súa capacidade protectora por un determinado mecanismo, por exemplo SET ou HAT, vense compensados por aumentos noutra como o potencial “scavenger” ou a protección a biomoléculas.

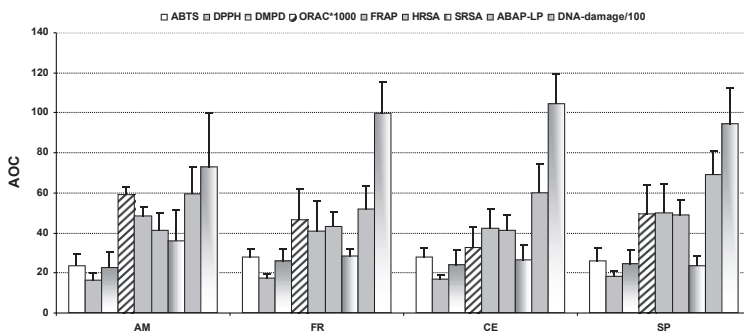


Figura 1. Perfil antioxidante dos viños tintos criados en barricas de distintos rebles

3º.- Aínda que a resposta á pregunta se resulta saudable un consumo moderado de viño segue sendo sumamente complexa, os resultados apuntan a que o perfil antioxidante do viño tinto presenta propiedades potencialmente beneficiosas para a saúde, especialmente debido a que os fenois maioritarios nestes viños son os antocianos, que ademais de presentar un elevado potencial antioxidante son os fenois que mostraron maior biodispoñibilidade en traballos doutros grupos.

É claro que o potencial beneficio debe ser comprobado *in vivo* e sempre considerando que cada individuo ten respostas diversas, antes de chegar a unha conclusión final definitiva.

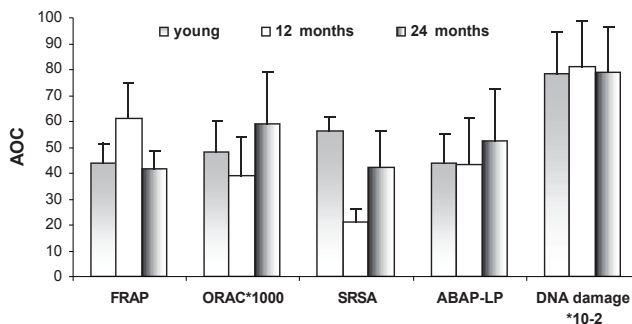


Figura 2. Valores das propiedades antioxidantes indicadas de viños tintos de distintas idades



BENEFICIO CARDIOVASCULAR DALGÚNS ANTIOXIDANTES PRESENTES NO TÉ

Ezequiel Álvarez Castro

Facultade de Medicina e Odontoloxía. Universidade de Santiago de Compostela

O té (*Camellia sinensis*) é unha das bebidas máis populares e consumidas en todo o mundo. Constitúe por iso unha importante fonte nutricional de polifenois, fundamentalmente flavonoides do tipo flavanol ou catequina. Segundo o grao de fermentación do té nas súas tres formas de verde, oolong e negro, a composición polifenólica pasa do predominio en catequinas a formas poliméricas destas moléculas do tipo de teflavinas e terubixinas.

Nos últimos anos leváronse a cabo unha serie de estudos epidemiolóxicos sobre o posible beneficio cardiovascular do consumo de té. Neste sentido, malia algúns datos discrepantes, a análise global indica unha relación positiva entre o consumo da bebida e a saúde cardiovascular, medida esta como unha diminución do risco de infarto de miocardio e da mortalidade cardiovascular.

Os estudos sobre as causas deste beneficio suxiren que os polifenois son os principais responsables do efecto e que este se debe á suma dunha serie de accións sobre o sistema cardiovascular que inclúen: defensa antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa, antitrombótica, vasorrelaxante e antiateroxénica.

O efecto antioxidante quizais sexa o máis relevante e, desde logo, o máis estudado. As catequinas do té demostraron actividade antioxidante fronte a diversos radicais libres como os anións superóxido, o oxíxeno singulete ou o peroxinitrito. A relevancia deste efecto reside no feito de que os radicais mencionados ou os seus derivados foron relacionados co desenvolvemento das enfermidades vasculares máis importantes e frecuentes. Isto é, hipertensión, aterosclerose e vasculopatía diabética. Aínda se descoñece o modo preciso en que os antioxidantes poden interferir no desenvolvemento destas enfermidades e por iso non se puideron elaborar estratexias terapéuticas neste sentido, pero avanzar neste coñecemento é promotor de importantes beneficios, debido á alta morbilidade e mortalidade por causas cardiovasculares na nosa sociedade.

O potencial antioxidante dos polifenois do té parece estar en relación directa coa presenza do grupo galoil na súa estrutura. Isto converte a epigallocatequina-galato (EGCG) e a teflavina-digalato nos compoñentes do té máis potentes. Debido a isto e a súa abundancia relativa na planta e a súa infusión, a EGCG é con diferenza a molécula máis estudada.

Este composto presenta unha marcada actividade secuestradora de aniões superóxido xerados tanto de forma química como encimática ou por células como os macrófagos. En contraposición, tamén se suxeriu a posibilidade de que este composto en solución xere de forma espontánea peróxido de hidróxeno. Esta cuestión parece contradicir o efecto antioxidante da EGCG, aínda que para algúns autores supón outra estratexia para combater a acción oxidativa, xa que a exposición repetida ao estrés oxidativo induce resistencia celular a altas concentracións de radicais libres de oxíxeno.

Ademais da acción directa sobre os radicais libres, os flavanois do té presentan outras accións que contribúen ao efecto antioxidante global. Entre elas, cóntanse a capacidade para quelar ións metálicos, a inhibición de encimas xeradoras de radicais libres e a indución da expresión de encimas degradadoras destes. Esta pléiade de accións pode configurar un contorno no que se bloquea a formación de radicais tanto de forma química, por secuestrar os ións metálicos necesarios para as reaccións que os producen, como de forma encimática, ao inhibir especificamente as principais proteínas responsables da produción radicalaria. Exemplo disto é a inhibición por parte dos compoñentes do té, da xantina oxidasa, a lipooxigenasa ou a ciclooxigenasa. O aumento dos niveis proteicos daqueles outros encimas capaces de degradar ou metabolizar radicais de oxíxeno, sumado á acción directa das catequinas sobre estes que describimos anteriormente, acaban de conformar un panel defensivo fronte á oxidación que, actuando a diferentes niveis, vai limitar enormemente a acción e os efectos dos radicais que se poidan producir.

O control do equilibrio de redución-oxidación (redox) no interior das células pode constituír outra importante baza dos axentes antioxidantes, xa que existen unha serie de factores de transcrición, cuxa actividade se ve influenciada pola situación redox. Os factores de transcrición son moléculas intracelulares que regulan a expresión dunha serie de xenes, consecuentemente existe unha serie de xenes que se coñece que son sensibles ao equilibrio oxidativo na célula. En base a isto explícase o efecto indutor (aumento da expresión) das catequinas sobre determinados encimas antioxidantes. Así, os niveis de superóxido dismutasa, catalasa ou hemo-oxigenasa-1 poden ser modificados a través deste mecanismo.

Existen outros xenes afectados por este tipo de regulación que son de gran importancia no sistema cardiovascular, xa que participan no desenvolvemento da aterosclerose, unha das enfermidades vasculares de maior morbilidade na nosa sociedade. Entran dentro desta categoría xenes para determinadas moléculas de adhesión endotelial- molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) e E-selectina. Todas elas participan na unión de células brancas á superficie do endotelio vascular e a súa conseguinte extravasación ao tecido, onde participan na captación de lipoproteínas modificadas e inician

procesos inflamatorios que, de forma crónica, contribúen á retroalimentación deste ciclo. Esta situación é o que se coñece como ateroséne, ou fase inicial da enfermidade aterosclerótica. Outros xenes afectados polo equilibrio redox son determinadas citocinas proinflamatorias ou quimiotácticas do tipo da interleucina-8 ou a proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), moléculas que participan no proceso ateroséne, exacerbando a resposta inflamatoria e contribuíndo ao reclutamento de monocitos cara ao tecido vascular, respectivamente. Factores de crecemento como o factor de crecemento endotelial vascular (VEGF) ou o factor de crecemento epidermal (EGF), proteínas cuxa expresión tamén é sensible ao equilibrio redox, participan na fase proliferativa da aterosclerose, cando se conforma e crece a placa de ateroma e comeza a obstruír o fluxo sanguíneo a través do vaso. Polo tanto, a influencia no equilibrio redox da célula por parte das catequizas pode modificar os niveis de expresión de determinados xenes de importancia no desenvolvemento da enfermidade aterosclerótica. Finalmente, a inhibición da oxidación de lipoproteínas é outro mecanismo antioxidante de relevancia xa que tamén pode frear o proceso ateroséne. As lipoproteínas captadas do torrente sanguíneo cara ao vaso son oxidadas e modificadas de forma que se converten en partículas fagocitables polos macrófagos, que a forza de acumulalas no seu interior se transforman nas chamadas células espumosas, que darán orixe á placa de ateroma. As catequinas son efectivos inhibidores da oxidación de lipoproteínas de baixa densidade *in vitro*: lipoproteínas illadas do organismo e logo tratadas, aínda que esta actividade, por circunstancias diversas, non sempre se confirma en experimentos *ex vivo*, lipoproteínas que reciben o tratamento dentro do organismo e logo son illadas para sometelas ao experimento oxidativo. Para explicar esta discrepancia propuxéronse varias hipóteses. En primeiro lugar, a alta concentración de catequinas empregada *in vitro* inicialmente pensábase que non se podía alcanzar *in vivo*, pero máis recentemente demostrouse que estes flavanóis se poden acumular no organismo a concentracións comparables ás empregadas *in vitro*. Ademais, a capacidade antioxidante destas moléculas mantense no plasma. Polo que parece, deben terse en conta para a comparación entre resultados *in vitro* e *ex vivo* as variacións inter-individuais na biodisponibilidade dos polifenóis do té, cuestión que fundamentalmente se relaciona con diferenzas na microflora intestinal e en polimorfismos xenéticos de encimas implicados no metabolismo dos polifenóis.

Á parte do efecto antioxidante, os flavonoides do té demostraron unha serie de accións que tamén contribúen ao beneficio cardiovascular. Neste sentido, os efectos antiinflamatorios, antiproliferativo, antitrombótico, vasorrelaxante e antiateroséne son accións que suman contra o desenvolvemento da enfermidade vascular e axudan a explicar os efectos epidemiolóxicos observados.

En resumo, os polifenois presentes no té presentan unha serie de propiedades demostradas experimentalmente que poderían explicar os efectos beneficiosos sobre a saúde cardiovascular observados nos estudos epidemiolóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Khan, N, Mukhtar, H. (2007). *Life Sci.*, 81(7), 519-533.

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

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

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

EFFECTOS VASODILADORES DO TRANSRESVERATROL

Francisco Orallo Cambeiro (†)

Dpto. de Farmacoloxía. Facultade de Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela

A baixa incidencia de cardiopatía isquémica e outras enfermidades cardiovasculares na poboación do sur de Francia, a pesar de ter unha dieta rica en graxas saturadas e uns factores de risco similares aos doutros países industrializados (escaso exercicio, elevado consumo de tabaco, etc.), foi atribuída ao maior consumo continuado e moderado de viño (especialmente de viño tinto) pola dita poboación, fenómeno que se denomina o paradoxo francés (Leger e col. 1979). Como os efectos beneficiosos e protectores do viño son totalmente independentes do seu contido en alcohol, ao longo destes últimos anos leváronse a cabo intensas investigacións para identificar os principios activos responsables. A pesar de que os ditos principios activos aínda non se coñecen, posiblemente debido á complexa mestura de substancias presentes no viño con efectos opostos sobre o sistema cardiovascular, existen varias moléculas candidatas, entre as que se atopan o trans-resveratrol ou (*E*)-resveratrol (3,4',5- trihidroxi-*trans*-estilbeno; *t*-RESV) (Orallo, 2002; Orallo e col., 2006) e outros compostos polifenólicos.

Con todos estes antecedentes, estudamos por primeira vez o potencial da actividade vasodilatadora do *t*-RESV na aorta de rata mediante estudos funcionais e os mecanismos polos que a dita actividade se produce, co obxecto de intentar dilucidar se o *t*-RESV pode estar implicado nos efectos protectores do consumo moderado e prolongado do viño fronte á incidencia de diversas patoloxías cardiovasculares e de intentar explicar o fenómeno do paradoxo francés antes mencionado. O *t*-RESV (1-10 μ M) non tivo efecto sobre as contraccións inducidas pola (-)-noradrenalina (NA) e por altas concentracións de KCl extracelular en aneis da aorta de rata desprovistos de endotelio. No entanto relaxou, dunha forma dependente da concentración, a resposta contráctil producida pola NA (1 μ M, $CI_{50} = 3,4 \pm 0,32 \mu$ M, $n = 5$) ou por elevadas concentracións de KCl (60 mM, $CI_{50} = 9,6 \pm 0,87 \mu$ M, $n = 5$) en aneis intactos da aorta de rata (Orallo, 2002). Os correspondentes valores das CI_{50} presentaron diferenzas significativas ($P < 0,01$). Os efectos vasodilatadores do *t*-RESV foron completamente inhibidos pola N-nitro-L-arxina (L-NOARG, 0,1 mM) e polo azul de metileno (10 μ M) pero non se viron afectados pola atropina (10 μ M) e a yohimbina (1 μ M). O efecto inhibitorio producido pola L-NOARG foi antagonizado pola L-arxina (0,1mM) pero non pola D-arxina (Orallo, 2002). O *t*-RESV (1-100 μ M) non modificou a actividade enzimática da sintetasa constitutiva de óxido nítrico (NO^*) en homoxeneizados da aorta de rata. Ademais, o *t*-RESV (1-100 μ M) non mostrou propiedades inactivadoras, neutralizadoras ou “varredoras” (*scavenger*) de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) nin inhibidoras da xantina oxidasa porque non alterou a redución do azul de nitrotetra-

zolio (NBT) nin a oxidación da xantina a ácido úrico utilizando o sistema hipoxantina/xantina oxidasa (HX-XO) (Orallo, 2002).

O *t*-RESV (1-10 μM) inhibiu a actividade encimática da nicotinamida adenina dinucleótido/nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADH/NADPH ou NAD(P)H] oxidasa vascular en homoxeneizados de aorta de rata, é dicir, o sinal de quimioluminiscencia específica emitido pola reacción entre a lucifenina e os $\text{O}_2^{\cdot-}$ xerados a partir do oxíxeno e do NADH (o substrato preferido pola NADH/NADPH oxidasa na aorta de rata). O valor da CI_{50} foi de $4,81 \pm 0,37 \mu\text{M}$, $n = 5$ (Orallo, 2002).

Todos os resultados anteriores demostran que:

O efecto vasorrelaxante característico dependente do endotelio do *t*-RESV na aorta da rata parece ser debido a un incremento da actividade da vía da L-arginina- NO^* -guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMP cíclico, GMP_c), posiblemente a través da inhibición da actividade da NADH/NADPH oxidasa vascular, subseguinte diminución da biosíntese celular basal de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e, por conseguinte, da inactivación do NO^* polos ditos radicais (Figuras 1a e 1c).

A estimulación da sintetasa constitutiva de NO^* presente nas células endoteliais (de forma directa ou mediada pola activación dos adrenoceptores α_2 e dos receptores muscarínicos endoteliais) non parece estar implicada nos efectos vasculares do *t*-RESV (Figura 1a). Por outro lado, os ditos efectos tampouco se deben a propiedades neutralizadoras de $\text{O}_2^{\cdot-}$ nin a unha inhibición da actividade encimática da xantina oxidasa (Figuras 1b e 1c).

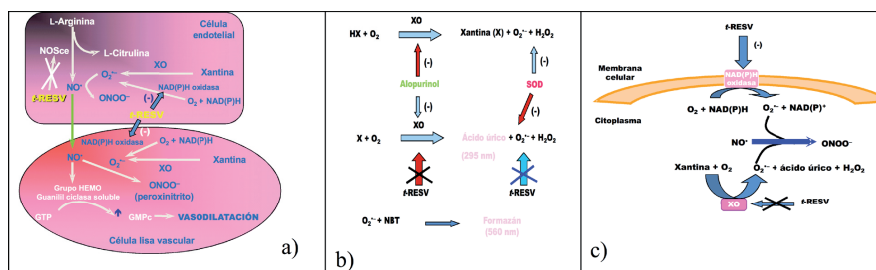


Figura 1. a) Representación esquemática da ruta da L-arginina- NO^* - GMP_c ; b) Reaccións producidas no sistema HX-XO; c) Figura da biosíntese de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en células vasculares a través da activación da NAD(P)H oxidasa e da XO

Xa que a actividade da ruta L-arginina- NO^* - GMP_c parece ser defectuosa (baixa) e estar alterada (diminución da síntese de NO^* /incremento da produción de $\text{O}_2^{\cdot-}$) en patoloxías do sistema cardiovascular como a hipertensión e a aterosclerose (Orallo, 2002; Orallo e col., 2006), basicamente debido a unha actividade incrementada da NADH/NADPH

oxidasa, se o *t*-RESV exhibise un comportamento similar nos vasos sanguíneos humanos, os nosos resultados permitirían suxerir que este composto polifenólico natural podería desempeñar un papel importante nos efectos cardioprotectores producidos a longo prazo polo consumo diario de moderadas cantidades de viño.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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



EFFECTOS ANTITUMORAIS DE ANTIOXIDANTES NATURAIS

Marta Cascante Serratosa

Dpto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular. Instituto de Biomedicina. Universidade de Barcelona (IBUB)

O cancro é o resultado da progresiva acumulación de alteracións xenéticas e epixenéticas que levan a unha proliferación acelerada, desordenada e descontrolada de células dun tecido que invaden e desprazan, localmente e a distancia, outros tecidos sans do organismo. Para que un tumor adquira malignidade debe adquirir unha serie de características entre as que se destacan, entre outras, a capacidade de crecemento independente dos factores de crecemento, a capacidade invasiva e a capacidade de evadir a apoptose.

A aparición dun cancro non se debe a un único factor senón á combinación de varios factores que se engloban de maneira xeral en dous grupos: a herdanza xenética e o ambiente. A primeira conexión entre o cancro e a xenética propúxose a principios do século XX, e esta idea serviu como unha das bases da súa investigación (Klung, 2000).

A incidencia do cancro está determinada por factores etiolóxicos, como a inestabilidade xenómica, os factores dietéticos, a inestabilidade en secuencias microsátélites ou as alteracións epixenéticas, e pola susceptibilidade individual (Kamangar e col., 2006; Newcomb e col., 2007). Actualmente os tipos de cancro con maior mortalidade son o cancro de pulmón, seguido do cancro colorrectal e en terceiro lugar o cancro de mama (Terstriepe e Grothey, 2006).

O metabolismo enerxético da célula tumoral atraeu a atención dos bioquímicos desde hai máis de 80 anos. Xa na primeira metade do século pasado, Otto Warburg describiu que as células malignas eran capaces de fermentar a glicosa consumida ata lactato aínda na presenza de oxíxeno (Warburg e col., 1924). Dada a ineficiencia enerxética deste proceso en comparación coa respiración mitocondrial, o consumo de glicosa nas células tumorais encóntrase incrementado con respecto ás súas células veciñas, feito diferencial que foi utilizado para a detección de neoplasias mediante a técnica de PET (Gambhir, 2002).

Os mecanismos moleculares que fan posible esta alta capacidade glicolítica foron amplamente estudados nos últimos anos (Gatenby e Gillies, 2004; Matoba e col., 2006). Debido ao seu crecemento descontrolado, moitos tumores sólidos deben progresar baixo condicións de hipoxia. Nesas condicións xoga un papel moi importante o factor de transcrición inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Este factor, fai aumentar a expresión de varios encimas glicolíticos (Dang e Semenza, 1999; Rimpí e Nilsson, 2007). Á parte da activación oncoxénica de HIF-1, outros mecanismos

que eventualmente provocan a activación da glicólise foron descritos. Certamente, o metabolismo mitocondrial garda unha estreita relación coa progresión do tumor, non só a nivel enerxético, senón debido á xeración de especies reactivas de oxíxeno (ROS).

Durante o metabolismo aerobio xéranse pequenas cantidades de ROS como radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidróxeno (H_2O_2), indispensables en moitos procesos.

A produción de ROS por parte da mitocondria pode ser entendida como unha espada de dobre fío. Por unha parte, foi descrito un aumento no estrés oxidativo nas células tumorais (Pelicano e col., 2004), debido seguramente a un mal funcionamento da maquinaria mitocondria, que podería provocar un aumento na taxa de mutaxénese e así inducir malignidade (Pelicano e col., 2004; Wallace, 2005). Por outra parte, dado que a xeración de ROS pode desencadear o proceso apoptótico, este mecanismo foi proposto para o tratamento do cancro (Engel e Evens, 2006; Mates e Sánchez-Jiménez, 2000).

O incremento da formación de compostos de oxíxeno altamente reactivos (ROS: Reactive Oxygen Species) como por exemplo H_2O_2 ou radicais libres derivados do oxíxeno como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), describiuse, ademais de no cancro, nun gran número de enfermidades que van desde os procesos inflamatorios e alteracións do sistema inmunolóxico ata infartos de miocardio (Mates e Sánchez-Jiménez, 2000).

Os radicais libres xéranse *in vivo* como subprodutos do metabolismo normal. Tamén se producen cando un organismo está exposto á radiación ionizante, a drogas con propiedades oxidantes ou xenobióticos que poden formar *in situ* metabolitos que son radicais libres. Os radicais libres afectan practicamente todos os aspectos da bioloxía celular xa que poden reaccionar e modificar un gran número de moléculas que constitúen o material estrutural, metabólico e xenético da célula.

Algúns dos efectos prexudiciais ben coñecidos dunha xeración excesiva de ROS nos sistemas biolóxicos son a peroxidación dos lípidos da membrana, a oxidación dos ácidos nucleicos e azucres e a oxidación de grupos sulfidrido das proteínas.

Ademais aos radicais libres formados a partir do oxíxeno atribúeselles a capacidade de iniciar e promover a carcinoxénese.

A propia célula ten mecanismos de protección para defenderse dos radicais libres pero o incremento de radicais libres que se produce en situacións de enfermidade, inxestión de xenobióticos e outras situacións de estrés ambiental como exceso de radiacións etc. poden sobreesaturar os sistemas de defensa celulares e poden produ-

cirse danos irreparables na célula que conduzan á súa morte ou á perda do control de proliferación e a súa conversión en célula tumoral.

Os sistemas de desintoxicación que ten a propia célula para desintoxicarse dos ROS son de carácter encimático e non encimático e constitúen o que se denomina “os sistemas antioxidantes de defensa”.

Os principais sistemas de defensa son os seguintes sistemas encimáticos:

1) Superóxido dismutasa; 2) Catalasa; 3) Glutación peroxidasa; e 4) Os sistemas encimáticos de rexeneración do glutatión.

Algúns sistemas encimáticos como a superóxido dismutasa e a catalasa actúan especificamente contra ROS mentres que outros sistemas encimáticos reducen grupos tiol.

Os antioxidantes non encimáticos son menos específicos e poden actuar sobre outros radicais orgánicos e inorgánicos. Os antioxidantes poden ser clasificados como solubles en auga ou ben liposolubles dependendo se actúan primariamente na fase acuosa ou na membrana.

Os antioxidantes hidrofílicos inclúen por exemplo o ácido ascórbico (vitamina C) e os antioxidantes liposolubles inclúen ubiquinois, retinoides, carotenoides e tocoferois (como por exemplo a vitamina E). Algunhas proteínas plasmáticas e o glutatión (GSH) son exemplos de antioxidantes endóxenos mentres que o ácido ascórbico, os carotenoides, os retinoides, os flavonoides e os tocoferois constitúen exemplos de antioxidantes provenientes da dieta. Estes antioxidantes posúen a capacidade de secuestrar e anular varios radicais provenientes do oxíxeno, carbono, anel fenólico etc., así como outros tipos de ROS.

Actualmente, o interese da comunidade científica cara á correcta alimentación foi en aumento debido á relación directa deste factor etiolóxico coa saúde da poboación. Un gran número de estudos apoian a idea de que unha dieta rica en froitas e verduras ten un efecto preventivo sobre o cancro e outras enfermidades debido ao seu alto contido en substancias antioxidantes tales como o ácido ascórbico e os carotenoides. No entanto, non hai que esquecer que a froita e os vexetais tamén conteñen unha gran diversidade de flavonoides e compostos fenólicos que poden actuar tamén como antioxidantes. Os flavonoides poden funcionar como: 1) quelantes de metais e axentes redutores, 2) antioxidantes secuestradores de ROS, 3) inhibidores da formación de radicais derivados de oxíxeno, 4) protectores da degradación do ácido ascórbico.

Os polifenois naturais presentes na uva e no té convertéronse en substancias moi apreciadas pola súa acción antioxidante e atópanse presentes en moitos suplemen-

tos nutricionais recomendados para previr o envellecemento e o cancro. Así mesmo, a fibra dietética tamén é apreciada como fonte de prevención do cancro colorrectal, debido ás súas propiedades reguladoras do intestino (Kim, 2000).

Os efectos beneficiosos dos antioxidantes naturais, presentes en froitas e verduras, como preventivos do estrés oxidativo que deriva no dano celular e na carcinoxénese foron extensamente estudados. Así, demostrouse que distintos antioxidantes que mimetizan a acción dos sistemas encimáticos de defensa celulares son capaces de inhibir a tumoroxénese inducida por distintos axentes carcinoxénicos.

Un dos grupos de antioxidantes naturais sobre o que máis estudos se realizaron nos últimos anos é o dos flavonoides. Así como o efecto preventivo da aparición de tumores dos antioxidantes naturais presentes na dieta está amplamente recoñecido, o efecto dos antioxidantes sobre o tumor xa formado foi obxecto de controversia.

É ben sabido que existen principalmente dous camiños a través dos cales se produce a morte celular: A necrose e a apoptose. Na necrose tipicamente leva consigo que a célula se inche, se produza a consecuente lise celular e resposta inflamatoria. A morte por necrose tradúcese na liberación de material intracelular que desencadea a resposta inflamatoria. En cambio, a apoptose considérase unha morte celular programada xa que a célula perde volume, os núcleos condénsanse e en xeral, aínda que non sempre, prodúcese a fragmentación do DNA. A apoptose leva consigo a liberación de moi pouco material intracelular co que non se produce resposta inflamatoria. Os corpos apoptóticos producidos son eliminados polos macrófagos. Na célula existen mecanismos de vixilancia e control de maneira que cando se detecta alteración irreversible no material xenético deberían activarse os mecanismos que conducen á apoptose.

A apoptose e o cancro considéranse fenómenos opostos xa que na célula tumoral, a pesar de ter anomalías a nivel xenético, a apoptose non se produce espontaneamente como debería de ocorrer. Os antioxidantes naturais como os flavonoides poden actuar como unha arma de dobre fío xa que moitos deles a altas concentracións pode actuar como prooxidantes (Decker, 1997). Así, a concentracións moderadas, poden actuar como sequestradores de ROS, diminuíndo a elevada concentración que presenta a célula tumoral e interferindo así na súa proliferación. No entanto, a altas concentracións poden actuar como produtores de ROS inducendo a apoptose celular.

Os radicais libres, e en particular as ROS, propuxéronse como un mediador común para a apoptose. Por outro lado, a pesar da extensa evidencia a favor de que as ROS xoguen un papel crucial na apoptose, existen tamén datos indicativos de que as ROS non son esenciais.

Polo que se refire á gran familia de antioxidantes constituída polos flavonoides, describíronse diversos compostos capaces de inducir apoptose en distintas liñas celulares (para unha revisión ver Middleton e col., 2000).

Os mecanismos a través dos cales os antioxidantes actúan inhibindo a proliferación tumoral e favorecendo a regresión do tumor van sendo pouco a pouco elucidados. Ademais describiuse que o efecto dos antioxidantes naturais presentes na dieta é selectivo para as células tumorais, o cal representa un dos seus maiores atractivos a nivel farmacolóxico.

Entre a gran cantidade de antioxidantes naturais que existen, no noso laboratorio centrámonos no estudo de polifenóis bioactivos derivados de subprodutos vinícolas. Os ditos produtos obtivéronse a partir dun fraccionamento de extractos primarios de bagazos de uva mediante a técnica de HPLC. As diversas fraccións extraídas están formadas por monómeros e polímeros de catequinas e flavanóis.

Os estudos que se levaron a cabo demostraron que fraccións dos extractos de uva con alto grao de galoización posúen propiedades antitumorais e poderían ser utilizados na prevención e o tratamento do cancro (Lizarraga e col., 2007). Ademais, actualmente, tamén estamos realizando estudos que indican que a fibra dietética combinada con antixodantes presentes na uva podería ser efectiva na prevención e o tratamento do cancro de colon.

Agradecementos

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

BIBLIOGRAFÍA

- Dang, C.V. e Semenza, G.L. (1999). *Trends Biochem Sci.*, 24, 68-72.
- Decker, E.A. (1997). *Nutr. Rev.*, 55(11 Pt 1), 396-398.
- Engel, R.H. e Evens, A.M. (2006). *Front. Biosci.*, 11, 300-312.
- Gatenby, R.A. e Gillies, R.J. (2004). *Nat Rev Cancer.*, 4, 891-899.
- Gambhir, S.S. (2002). *Nat. Rev. Cancer.*, 2, 683-693.
- Kamangar, F., Dores, G.M. e Anderson, W.F. (2006). *J. Clin. Oncol.*, 24, 2137-2150.
- Kim, Y.I. (2000). *Gastroenterology*, 118, 1235-57.
- Lizarraga D., Lozano C., Briedé J., e col. (2007). *FEBS Journal*, 274 (18), 4802-4811.
- Mates, J.M. e Sánchez-Jiménez, F.M. (2000). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 32, 157-170.
- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., e col. (2006). *Science*, 312, 1650-1653.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. e Theoharides, T.C. (2000). *Pharmacol. Rev.*, 52, 673-751.
- Newcomb, P.A., Baron, J., Cotterchio, M. e col. (2007). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 16, 2331-2343.

- Rimpi, S. e Nilsson, J.A. (2007). *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 305-310.
- Pelicano, H., Carney, D. e Huang, P. (2004). *Drug Resist. Updat.*, 7, 97-110.
- Terstiep, S. e Grothey, A. (2006). *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 6, 921-930.
- Wallace, D.C. (2005). *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.*, 70, 363-374.
- Warburg, O., Posener, K. e Negelein, E. (1924). *Biochem. Z.*, 152, 309-344.

CANCRO PROSTÁTICO: EFECTO DE FITOESTEROIS (PS) E POLIFENOIS (PF) SOBRE O CRECEMENTO CANCERÍXENO E A METASTATIZACIÓN

María Jesús Núñez-Iglesias, Silvia Novío e Manuel Freire-Garabal Núñez
Dpto. de Farmacoloxía. Facultad de Medicina e Odontoloxía. Universidade de Santiago de Compostela

Unha das liñas de traballo do noso grupo de investigación versa sobre o efecto de diferentes compostos e factores biolóxicos no crecemento tumoral e metastatización, empregando para iso diversos modelos de cancro. Actualmente, o noso traballo centrouse no estudo do cancro de próstata (CaP). Esta enfermidade é a neoplasia maligna invasora máis común (Jermal e col., 2005) nos países occidentais. Malia unha maior vixilancia e detección precoz, o CaP segue ocupando o segundo lugar como causa de morte relacionada co cancro. Polo tanto, son necesarias novas actitudes terapéuticas coas que abordalo.

O tratamento do CaP metastásico é un importante desafío para médicos debido ao seu comportamento refractario e á súa resistencia a quimioterapias convencionais. Estudos previos demostraron que substancias antioxidantes naturais tales como o resveratrol ou a xenisteína poden inhibir a iniciación, promoción e progresión da tumorixénese. Á hora de determinar efectos beneficiosos de compoñentes naturais sobre o CaP, dous aspectos claves relacionados co devandito proceso deben ser tidos en conta: anxioxénese e metástase.

Anxioxénese

A anxioxénese é un proceso esencial implicado no desenvolvemento e progresión do cancro prostático (Guo e col., 2007). O factor de crecemento do endotelio vascular (VEGF) é un regulador esencial do proceso anxioxénico durante a carcinoxénese prostática. Nos nosos estudos investigamos posibles mecanismos antianxioxénicos de diversas moléculas, principalmente fitosteróis (PS) e polifenóis (PF) de orixe natural, sobre a expresión de VEGF en cultivos celulares e *in vivo*.

Células cancerixenas prostáticas humanas andróxeno insensibles PC-3 e PC3-M son cultivadas baixo condicións *in vitro* e durante diferentes períodos de experimentación, baixo a influencia de PS e PF incorporados ao medio de cultivo en diferentes concentracións. Extráese o sobrenadante e mídense as concentracións de VEGF mediante a técnica de ELISA. Por outra parte, e tras despegar as células das cuncas pequenas con tripsina, a expresión xénica de VEGF determínase por RT-PCR.

O efecto destas substancias tamén é estudado nun modelo anxioxénico *in vitro* con células endoteliais aórticas bovinas (BAEC), seguindo os procedementos previamente descritos (Mantell e col., 2000). A anxioxénese cuantifícase mediante un sistema de análise de imaxe computarizada. As células con crecemento elongado son representadas dixitalmente, e a área ocupada por estas é determinada expresándose como unha porcentaxe da área total.

Por outra parte, tamén se realizan ensaios de apoptose con kits comerciais. Os núcleos celulares examínanse mediante microscopía de fluorescencia tras efectuar unha tinguidura con laranxa de acridina. A integridade do ADN extraído das células cultivadas sobre discos cubertos con xelatina determínase en presenza destes compostos utilizados na técnica de ELISA.

Para os estudos *in vivo* (Mantell e col., 2000) realízanse dous implantes subcutáneos na rexión dorsal de ratos espidos BALB/c nu/nu femia, de 6 semanas, baixo anestesia con halotano. Transcorridos 6 días, en cada rato realízase, baixo anestesia con fluotano, un implante subcutáneo de células PC3 en cada flanco. O crecemento tumoral monitorízase semanalmente. Despois de 8 semanas, os ratos son sacrificados e os tumores extraídos. Finalmente, realízase tinguidura histoquímica de seccións tumorais obtidas por crioconxelación e determínase a densidade microvascular.

Estudos de metastatización

A proteína quinasa activada por mitóxeno (MAP) p38 regula a activación da metaloproteínase da matriz tipo 2 (MMP-2) e a invasión celular. Algunhas substancias que bloquean o crecemento prostático tamén impiden a activación da MAP quinasa p38 mediada polo factor de crecemento transformante beta (TGFbeta) (Xu e Bergan, 2006). Recentemente, identificáronse a proteína quinasa 2 activada por MAP quinasas (MAPKAPK2) e a proteína de choque térmico 27-kDa (HSP27) como reguladores derivados da acción da p38MAPK.

O noso grupo de traballo desenvolveu ensaios *in vitro* empregando células PC3 e PC3-M para determinar os efectos de novas substancias sobre a *cascada* metastásica derivada da activación de MMP-2 polo TGF-beta, analizando a expresión da quinasa de adhesión focal (FAK), a p38MAPK e a HSP27 mediante western blot e zimografía.

Ademais, estudamos o efecto de diferentes PS e PF en ensaios de invasión celular, segundo protocolos previamente descritos (Huang e col., 2005; Liu e col., 2002; Xu e Bergan, 2006). Brevemente, 24 horas despois da sementeira, as células PC3 e PC3-M son transfectadas cun vector de expresión xunto ao vector β -galactosidasa (pCMV- β -gal), para permitir a detección das células transfectadas. Ao día seguinte, as células son disociadas, colocándose a suspensión celular no compartimento

superior dunha cámara de Boyden de 48 cuncas pequenas, e permitíndose que as células migren durante un período de 10 horas a través de membranas Nuclepore (diámetro de poro 8 μm). Previo procesamento das membranas e tinguída Diff-Quick (Dade Behring AG, Dudingen, Switzerland) realízase a contaxe de células invasoras e non invasoras empregándose coordenadas de campo predeterminadas.

En resumo, mediante os procedementos anteriormente sinalados, nós temos información preliminar pero fidedigna sobre propiedades terapéuticas de moléculas PS e PF achegadas por outros membros da rede ANTIOXGAL sobre o cancro prostático. Os nosos resultados sentan unha base férrea para a realización de futuros ensaios clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Guo, Y., Wang, S., Hoot, D.R., y col. (2007). *J. Nutr. Biochem.* 18, 408-417.
- Huang, X., Chen, S., Xu, L., y col. (2005). *Cancer Res.*, 65, 3470-3478.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., e col. (2005). *Cancer J. Clin.*, 55, 10-30.
- Liu, Y., Jovanovic, B., Pins, M., e col. (2002). *Oncogene*, 21, 8272-8281.
- Mantell, D.J., Owens, P.E., Bundred, N.J., e col. (2000). *Circ. Res.*, 87, 214-220.
- Xu, L., Bergan, R.C. (2006). *Mol. Pharmacol.*, 70, 869-877.



ANTIOXIDANTES NATURAIS NA REPRODUCCIÓN HUMANA. PAPEL DO ESTRÉS OXIDATIVO NA FRAGMENTACIÓN DO DNA ESPERMÁTICO: UTILIDADE DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE

Juan G. Álvarez

Bioloxía Reprodutiva. Harvard Medical School. Boston, MA (EEUU)

Introdución

A integridade do xenoma paterno é de vital importancia no inicio e mantemento dun embarazo a termo tanto *in vivo* como *in vitro*. En xeral, espermatozoides co DNA danado poden fecundar ovocitos en metafase II coa mesma eficacia que espermatozoides con DNA intacto (Aitken e col., 1998). No entanto, a presenza no embrión de certas modificacións a nivel de nucleótidos e/ou fragmentación nas cadeas do DNA procedentes do complemento xenómico paterno (que non fosen reparadas polo ovocito despois da fecundación) é incompatible cun desenvolvemento embrionario e fetal normal.

Estímase que un 25% das causas de infertilidade masculina son de orixe idiopática. A etioloxía dalgunhas destas causas podería estar relacionada con dano do DNA nos espermatozoides. Non entanto, este dano podería ser reparado polo ovocito despois da fecundación. Isto vai depender sobre todo (i) da calidade citoplasmática e xenómica do ovocito; e (ii) do grao de dano nas cadeas do DNA do espermatozoide que fecundase ao ovocito. Dado que a capacidade do ovocito de reparar este tipo de dano diminúe coa idade e que, ao mesmo tempo, o nivel de fragmentación do DNA nos espermatozoides aumenta, iso podería explicar, polo menos en parte, a diminución significativa na taxa de embarazo que se observa en parellas de idade avanzada. Este tipo de dano nas cadeas do DNA podería encontrarse en embrións cun complemento cromosómico normal. É dicir, a presenza de dano do DNA non reparado por encima dun limiar crítico en embrións xerados tanto *in vivo* como *in vitro* podería explicar o paro no desenvolvemento embrionario que se produce tras a implantación de embrións cun cariotipo normal. Estudos recentes suxiren que este tipo de dano se expresa a partir do día 3 de desenvolvemento embrionario e foi caracterizado como *late paternal effects* (Tesarik e col., 2004).

Cabería puntualizar que o dano do DNA que se puidese encontrar no embrión non ten porque estar exclusivamente relacionado co dano do DNA no espermatozoide que fecundase o ovocito. Este dano podería provir tamén do ovocito ou de ambos os dous. No entanto, dado que (i) a análise de fragmentación do DNA en gametos é destrutiva; (ii) este dano podería variar dun ovocito a outro; e (iii) o número de ovocitos

é limitado, isto non nos permitiu estudar ata agora a presenza desta patoloxía nos ovocitos. En cambio, o uso de tests que permitan o estudo do grao de fragmentación do DNA (especialmente cando se trata de dano do DNA de cadea dobre) en blastómeras de embrións obtidas para DGP, podería aplicarse ao estudo da integridade da cromatina embrionaria. O uso combinado de PCR, de sondas cromosómicas e de tests de fragmentación do DNA permitiríanos estudar de forma simultánea a presenza de enfermidades monoxénicas, aneuploidías e o grao de fragmentación do DNA no embrión, permitíndonos así seleccionar os embrións de mellor calidade xenómica.

Mecanismos de fragmentación do DNA espermático

Como se produce a fragmentación do DNA nos espermatozoides? O dano do DNA nos espermatozoides pode afectar tanto o DNA mitocondrial como o nuclear, e pode ser inducido por cinco mecanismos principais: (i) apoptose durante o proceso de espermatoxénese; (ii) roturas do DNA ou “nicks” producidos durante o remodelado da cromatina que ten lugar durante o proceso de espermióxénese; (iii) fragmentación do DNA a nivel post-testicular inducida por ROS e caspasas/endonucleasas durante o paso dos espermatozoides a través do epidídimo; (iv) fragmentación do DNA inducida por caspasas e endonucleasas espermáticas; e (v) fragmentación do DNA inducida por radio e quimioterapia. Destes cinco mecanismos, quizais no que xoga un papel máis importante sexa a fragmentación do DNA a nivel post-testicular durante o transporte dos espermatozoides a través do epidídimo. Isto vén avalado por estudos previos que demostran que a fragmentación do DNA é máis alta en espermatozoides do epidídimo (Steele e col., 1999) e exaculados (Greco e col., 2005; Ollero e col., 2001) que en espermatozoides testiculares (Greco e col., 2005).

1. Indución de apoptose durante o proceso de espermatoxénese. Durante o proceso de espermatoxénese ten lugar un *screening* celular importante que resulta na indución de apoptose nun 50-60% das células xerminais que entran na meiose I. Estas células *earmarked* con marcadores apoptóticos tipo *Fas* deberían ser fagocitadas e eliminadas pola célula de Sertoli, á cal se encontran asociadas (Billig e col., 1996; Pentikainen e col., 1999; Sakkas e col., 1999). No entanto, isto non sempre va ocorrer e unha porcentaxe variable destas células xerminais entran no proceso de remodelado celular da espermióxénese (que é o que determina a morfoloxía espermática), aparecendo posteriormente no exaculado. En relación a este proceso de *screening* fallido, os resultados dun estudo recente suxiren que existe unha disociación entre a calidade xenómica da célula xerminal e o remodelado espermático que ten lugar durante a espermióxénese (Burrello e col., 2004). É dicir, unha célula xerminal pode ter o núcleo “pulverizado” por apoptose ou ser aneuploide e non obstante o espermatozoide resultante ter unha morfoloxía normal. De aí que cando se microinfecte un espermatozoide de morfoloxía normal, isto non nos garanta que o xenoma sexa

normal. O que si se constatou é que cando existe oligospermia, a probabilidade de que un espermatozoide con morfoloxía normal sexa aneuploide é moito maior que se existe normozoospermia (Burrello e col., 2004). Isto probablemente estea relacionado cun bloqueo madurativo parcial asociado a alteracións meióticas. Por último, o feito de que unha porcentaxe variable de espermatozoides no exaculado expresan marcadores apoptóticos do tipo de *Fas*, *fosfatidilserina*, *Bcl-X_L*, *p53* (Sakkas e col., 2002) podería utilizarse para seleccionar espermatozoides non apoptóticos en mostras de seme. Un método desenvolvido recentemente nesta dirección é o utilizado para separar espermatozoides apoptóticos de espermatozoides non-apoptóticos mediante o uso das columnas de ANnexin-conjugated MicroBeads (ANMB Microbead Kit, Miltenyi Biotec, Germany). O principio no que están baseadas estas columnas é que os espermatozoides apoptóticos expresan *fosfatidilserina* na hemifaca externa da membrana e se unen á anexina V. Ao aplicar un campo magnético ás columnas, os espermatozoides unidos á anexina V conxugada coas micropartículas magnéticas serían retidos na columna, mentres que os non-apoptóticos pasarían a través desta (Grunewald e col., 2001). Outro método, quizais máis específico, sería a selección de espermatozoides apoptóticos por técnicas de inmunoabsorción fase sólida mediante o uso de anticorpos *anti-Fas* adheridos a placas de Petri.

2. Roturas do DNA durante o proceso de espermióxénese. Alteracións no proceso de remodelado da cromatina espermática durante a espermióxénese poderían resultar na fragmentación do DNA. McPherson e Longo postularon que a presenza de roturas no DNA podería ser indicativa de maduración incompleta durante a espermióxénese. Para que se produza o empaquetamento da cromatina do espermatozoide é necesaria a actividade de nucleasas endóxeas que corten e ligen o DNA durante a súa protaminación. Estes cortes proporcionarían unha liberación de estrés torsional axudando así ao empaquetamento da cromatina durante o desprazamento das histonas polas protaminas (McPherson e Longo, 1992, 1993a, b). Alteracións no control deste proceso poderían resultar en roturas do DNA non reparadas. Estas alteracións produciríanse antes da espermiación.

3. Fragmentación do DNA a nivel post-testicular. Estudos recentes demostran que espermatozoides inmaturos que producen niveis elevados de ROS poden inducir dano do DNA en espermatozoides maduros. Este dano produciríase despois da espermiación durante a comigración de espermatozoides maduros e inmaturos desde os túbulos seminíferos ao epidídimo (Ollero e col., 2001). Dado que os espermatozoides se encontran en íntimo contacto no epidídimo, e que a vida media dos ROS é da orde de nano a microsegundos, isto facilitaría que os ROS induzan fragmentación do DNA a nivel do epidídimo, xa sexa actuando directamente sobre o DNA ou ben indirectamente mediante a activación de endonucleasas e caspasas espermáticas. Isto é consistente co feito de que a co-centrifugación de espermatozoides inmaturos (que producen niveis elevados de ROS) con espermatozoides maduros resulta na

indución de fragmentación do DNA nestes últimos, xa que nestas condicións estes espermatozoides tamén se encontrarían en íntimo contacto (Twigg e col., 1998). Isto tamén é consistente co feito de que a exposición *in vitro* de espermatozoides maduros a ROS resulta en dano significativo do DNA (Aitken e col., 1998; Lopes e col., 1998). Por outra parte, o mesmo epidídimo podería tamén xogar un papel activo á hora de inducir fragmentación do DNA nos espermatozoides ao seu paso por este, xa sexa producido por radicais libres como o anión superóxido (Britan e col., 2006), o radical hidroxilo ou o óxido nítrico, ou ben mediante a activación de caspasas e endonucleasas espermáticas por axentes tóxicos ou por factores epididimarios. No primeiro caso, este tipo de dano podería previr-se mediante o uso de axentes antioxidantes, mentres que no segundo caso este tratamento carecería de eficacia. Isto vén avalado polos resultados recentemente publicados por Greco e col. (2005), onde o uso de antioxidantes produciu unha redución significativa nos niveis de fragmentación do DNA.

Probablemente, os espermatozoides que expresen un maior dano do DNA sexan aqueles que adquiren un menor grao de *crosslinking* de pontes disulfuro na cromatina espermática durante a súa maduración no epidídimo. Neste sentido, estudos recentes demostraron que, en xeral, o grao de fragmentación do DNA en espermatozoides exaculados é máis alto que en espermatozoides testiculares (Greco e col., 2005; Steele e col., 1999), e que en espermatozoides do corpo e cabeza do epidídimo (que é onde se completa o proceso de *crosslinking*) e que a indución de fragmentación do DNA nos espermatozoides ao seu paso polo epidídimo podería estar relacionada coa calidade xenómica do espermatozoide. É dicir, ademais do mecanismo de *screening* da célula de Sertoli, ao que faciamos referencia antes, existiría outro mecanismo de *screening* a nivel do epidídimo dirixido para eliminar espermatozoides xenomicamente defectuosos (Suganuma e col., 2005).

O dano potencial do DNA que os espermatozoides poden experimentar ao seu paso polo epidídimo ten unha gran transcendencia clínica, xa que en casos de niveis elevados de fragmentación do DNA en seme e fallo en dous ou máis ciclos de FIV/ICSI, podería recorrerse á microinxección de espermatozoides testiculares obtidos mediante a técnica de TESA ou TESE (preferiblemente TESA, dado que é menos invasiva e gozaría dunha maior aceptación por parte do paciente e do xinecólogo). Isto vén avalado polos resultados obtidos nun estudo publicado por Greco e col. (2005), onde a microinxección de espermatozoides testiculares en pacientes cun nivel de fragmentación do DNA en seme > 15%, medido polo test TUNEL, resultou nunha taxa de embarazo do 44,4%, mentres que con espermatozoides exaculados a taxa de embarazo evolutivo foi do 0%.

Cabe destacar que a fragmentación do DNA inducida polo radical hidroxilo resulta na formación de 8-OH-guanina e 8-OH-2'-deoxiguanosina nun primeiro estadio,

seguido da fragmentación do DNA de cadea sinxela ou de cadea dobre (Cui e col., 2000). Mentres que o dano do DNA do primeiro tipo puidese ser reparado polo ovocito, a fecundación dun ovocito por un espermatozoide con fragmentación do DNA da cadea dobre extensiva é practicamente irreversible e incompatible co desenvolvemento dun embarazo a termo. Dado que valores de fragmentación do DNA en espermatozoides exaculados > 20%, medidos por TUNEL (Sergerie e col., 2005), ou > 30%, medidos polo test SCSA (Evenson e col., 1999), están asociados a taxas de embarazo < 5%; a hipótese que se veu postulando ata agora é que aínda que un 20% e 30% dos espermatozoides teñen roturas nas cadeas do DNA, o resto dos espermatozoides poderían ter modificacións nas bases do DNA do tipo de 8-OH-guanina e 8-OH-2'-deoxiguanosina. Polo tanto, a probabilidade de que un espermatozoide con DNA normal fecunde o ovocito sería moito máis baixa que a esperada cun valor de fragmentación do DNA do 20% ou 30%, respectivamente. É dicir, ademais da fragmentación do DNA medible do 20% e 30%, o 80% e 70% restante dos espermatozoides, terían outro tipo de dano que non miden os test habituais de fragmentación do DNA e que, de non ser reparado, non sería compatible co desenvolvemento dun embarazo a termo. Este concepto foi designado como o “efecto iceberg” (Evenson e col., 1999). No entanto, na actualidade barállase outra hipótese alternativa: dado que nalgúns estudos se encontra unha correlación entre un valor patolóxico de fragmentación do DNA e as baixas taxas de embarazo en técnicas de reprodución asistida e noutros non se encontra esta correlación, incluso en parellas cun perfil de factor feminino moi similar e sen factor masculino xenético (FISH en seme e meiose normal), o máis probable é que esta aparente discrepancia estea relacionada co tipo de dano do DNA: é dicir, se o dano do DNA espermático é reparable ou non polo ovocito. Dous pacientes puideran ter un mesmo valor de fragmentación do DNA, e.g., 40%, e no entanto nun caso, o dano ser reparable e no outro, non. Polo tanto, estaríamos falando de subpoboacións de varóns con diferentes tipos de dano do DNA, máis que de valores absolutos de fragmentación do DNA (Álvarez e col., 2004).

4. Activación de caspasas e endonucleasas espermáticas. A activación de caspasas e endonucleasas en espermatozoides diferenciados por factores fisicoquímicos pode inducir tamén fragmentación do DNA espermático. Estudos previos indican que a exposición de espermatozoides de rato *in vitro* a 40°C resulta nun aumento significativo no grao de fragmentación do DNA (Sailer e col., 1997). Máis recentemente, Banks e col. demostraron a indución de fragmentación do DNA en espermatozoides de rato *in vivo* tras ter sido expostos os testículos a unha temperatura de 42°C (Banks e col., 2005). Dado que a fragmentación do DNA se encontrou en espermatozoides illados do epidídimo unha hora despois do estímulo. Os autores concluíron que o dano observado tería que terse producido nos espermatozoides ao seu paso por epidídimo e que podería ser causado por radicais libres ou por activación de caspasas e endonucleasas espermáticas.

Tratamento da fragmentación do DNA espermático

Baseado no exposto anteriormente derivase que o tratamento do estrés oxidativo epididimario con antioxidantes podería ser de gran utilidade á hora de reducir, polo menos en parte, o dano do DNA espermático e mellorar as taxas de embarazo en parellas de infertilidade. De feito, estudos previos (Greco e col., 2005) indican que o tratamento con vitaminas E e C reduce de forma significativa a fragmentación do DNA espermático. No entanto, estudos recentes indican que o uso a longo prazo deste tipo de antioxidantes pode danar a cromatina espermática (Menezo e col., 2007), quizais debido a que se altera o equilibrio de óxido-redución nas células do epitelo epididimario onde a produción de radicais libres é utilizada para a oxidación das pontes disulfuro das protaminas da cromatina espermática (Britan e col., 2006). Por outra parte, axentes antioxidantes tipo diclofenaco non parecen interferir con este equilibrio de óxido-redución e producen resultados satisfactorios a longo prazo. O mecanismo polo cal o diclofenaco prevén a fragmentación do DNA espermático é independente do seu efecto anti-inflamatorio. No entanto, en casos de procesos inflamatorios/infecciosos no epidídimo, o efecto anti-inflamatorio do diclofenaco podería contribuír a reducir o estrés oxidativo, xa que se demostrou que factores pro-inflamatorios poden magnificar de forma considerable a produción de radicais libres por parte de espermatozoides inmaturos (Saleh e col., 2002). Estudos previos indican que o diclofenaco actúa como antioxidante a través dun dobre mecanismo: (i) quelante de metais pesados que catalizan a reacción de Haber-Weiss entre o anión superóxido e o peróxido de hidróxeno; e (ii) actuando directamente como *scavenger* do radical hidroxilo (Aruoma e Halliwell, 1988). A dose inicial de diclofenaco habitualmente utilizada é de 50 mg cada 12 horas durante polo menos 4 semanas. Tamén se adoita combinar cun antibiótico tipo doxiciclina (100 mg cada 12 horas durante dúas semanas) para tratar unha posible infección subclínica a nivel do epidídimo causada sobre todo por *Ureaplasma* e *Chlamydia trachomatis* (Gallegos e col., 2007). Unha vez que se levase a cabo este tratamento inicial, recoméndase continuar o tratamento de diclofenaco cada dúas semanas para previr a fragmentación do DNA espermático que se poida producir a nivel post-testicular. A razón pola cal se establece un período de tratamento de dúas semanas está relacionada co tempo de tránsito dos espermatozoides polo epidídimo, que é aproximadamente dunha semana.

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

Táboa 1. Efecto do diclofenaco nos niveis de fragmentación do DNA espermático

¹valores representan a media ± a desviación estándar

Conclusións

O estrés oxidativo no epidídimo xoga un papel moi importante na fisiopatoloxía da infertilidade masculina. Os radicais libres, e en particular o radical hidroxilo, inducen dano do DNA tipo 8-OHdG e fragmentación do DNA da cadea sinxela e cadea dobre, ademais da peroxidación de fosfolípidos de membrana (Álvarez e Storey, 1995). Este dano post-testicular pode ou ben previr, polo menos en parte, mediante tratamento farmacolóxico con antioxidantes ou ben mediante o uso de espermatozoides testiculares en combinación con técnicas de reprodución asistida (TESA-ICSI). Ademais, a selección de espermatozoides mediante columnas de Annexin V ou o uso de Confocal Light Absorption Scattering Spectroscopy (CLASS) vainos permitir nun futuro próximo poder seleccionar espermatozoides con baixos niveis de fragmentación do DNA ou incluso coa cromatina intacta, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

OXIDACIÓN LIPÍDICA E AVALIACIÓN DE ANTIOXIDANTES

Edwin Frankel

Universidade de California. Davis. EEUU

Oxidación producida polos radicais libres

A oxidación de aceites comestibles é un problema importante para a industria alimentaria debido ao considerable aumento no uso de graxa e aceites polinsaturados que proceden de vexetais e peixes, feito este unido ao abandono do uso de antioxidantes sintéticos e ao enriquecemento dalgúns alimentos con ferro. A oxidación dos lípidos provoca a aparición de aromas e olores rancios en alimentos, e isto leva consigo unha diminución na calidade nutricional e por conseguinte problemas de seguridade alimentaria debido á formación de produtos secundarios despois do procesado e tamén cociñado.

A oxidación dos lípidos acontece mediante un mecanismo en cadea iniciado por radicais libres e no que se poden encontrar os seguintes procesos: iniciación, propagación e terminación. Estas etapas constan a miúdo de complexas cadeas de reaccións (Figura 1).

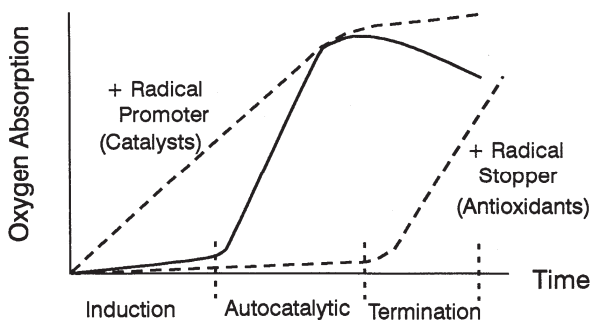
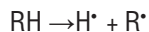


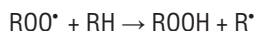
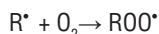
Figura 1. Cinéticas de oxidación

1. Iniciación. En presenza de iniciadores, os lípidos insaturados (RH) perden un átomo de hidróxeno, dando lugar a un radical libre.



2. Propagación. O radical alquilo dos lípidos insaturados reacciona moi axiña co oxíxeno molecular para formar radicais peroxilo. Esta etapa sempre é moito máis rápida ($k=10^{7-9}$) que a seguinte reacción de transferencia de hidróxeno cos lípidos

insaturados para dar lugar á formación de hidroperóxidos (ROOH) que son produtos primarios das reaccións de oxidación. Debido a que esta etapa é lenta, e polo tanto limitante o secuestro de H dos lípidos insaturados, realízase de forma selectiva dende os enlaces hidróxeno máis débiles.



3. Terminación. En presenza de altas concentracións de radicais alquilo e peroxilo interactúan con outros para dar lugar a produtos non radicalarios, que se coñece como reaccións de terminación.



Oxidación vía radicais libres do oleato. O mecanismo clásico que describe a oxidación do metal oleato leva consigo a captura dun átomo de H dos carbonos alílicos 8 e 11, o que dá lugar a tres radicais carbón alílicos deslocalizados (Figura 2). De acordo a este mecanismo, o oxíxeno ataca os carbonos terminais deses produtos intermedios dando lugar a unha mestura de catro hidroperóxidos alílicos que conteñen grupos OOH nos carbonos 8, 9, 10, e 11:

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

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

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

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

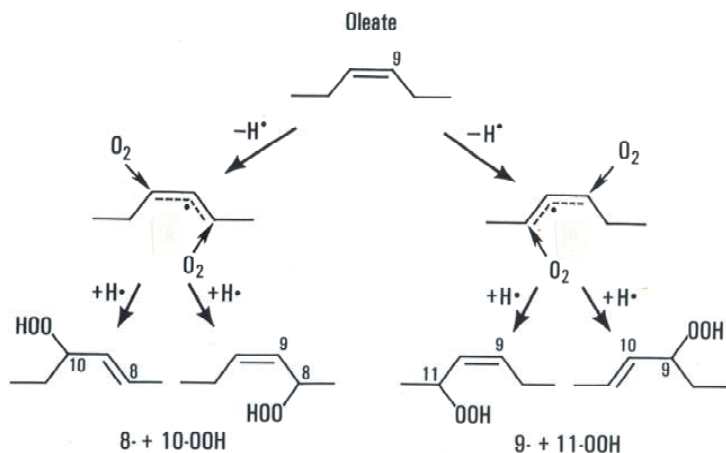


Figura 2. Oxidación radicalaria do oleato

Oxidación vía radicais libres do linoleato. O linoleato é aproximadamente 50 veces máis reactivo que o oleato, debido a que posúe un grupo activo metileno di-alílico no carbono 11 entre dous dobres enlaces que poden perder un átomo de H moi doadamente. O secuestro do átomo de H na posición 11 do carbono do linoleato dá lugar a un radical pentadienilo híbrido que reacciona co oxíxeno nas posicións finais do carbono 9 e 13 dando lugar a unha mestura de dous dienos conxugados (9 e 13 hidroperóxidos) (Figura 3). A gran reactividade do linoleato é debida á formación do radical intermedio pentadienilo que é máis efectivamente estabilizado por resonancia e os dienos hidroperóxidos producidos son así mesmo estabilizados por conxugación. Os isómeros conxugados fórmanse en concentracións equimolares para diferentes niveis de oxidación. Estudos estereoquímicos mostraron que a formación da mestura de 4 dienos conxugados hidroperóxidos *cis*, *trans* e *trans*, *trans*.

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

9-hydroperoxy-*trans*-10, *trans*-12-octadecadienoate (*trans*, *trans*-9-OOH)

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

13-hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-11-octadecadienoate (*trans*, *trans*-13-OOH)

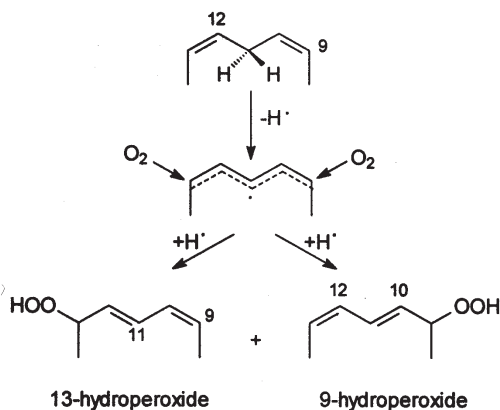


Figura 3. Oxidación radicalaria do linoleato

Inicialmente e a baixas temperaturas os isómeros *cis*, *trans*-OOH son os maioritarios. A proporción de *trans*, *trans*-OOH aumenta co incremento da temperatura.

Oxidación vía radicais libres do linolenato. O metilo linolenato teñen dous grupos metilo dialílicos e reacciona co oxíxeno dúas veces máis rápido que o linoleato. Linolenato é aproximadamente dúas veces máis reactivo que o linoleato. De xeito análogo ao mecanismo presentado para o linoleato, no caso do linolenato fórmanse dous radicais pentadienilo por secuestro de átomos de H dos carbonos 11 e 14 situados entre os dienos 1,4 entre o carbono 9 e 13 nun lado e no carbono 12 e 16 do outro lado da molécula (Figura 4). A reacción do oxíxeno cos carbonos terminais de cada un dos radicais pentadienilo dá lugar a una mestura de catro radicais peroxilo que dá lugar aos correspondentes dienos conxugado 9-, 12-, 13- e 16-hidroperóxidos contendo un terceiro dobre enlace *cis* illado.

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

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

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

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



Os ácidos graxos de cadea longa Omega 3 máis importante encontrados en aceites de peixe, algas e produtos mariños son o cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanoico (EPA), e o cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico (DHA). De acordo ao mesmo mecanismo establecido para o linolenato, o EPA dá lugar á formación de 8 hidroperóxidos 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 14-, 15- e 18, mentres o DHA dá lugar a dez 4-, 7-, 8-, 10-, 11-, 13-, 14-, 16-, 17- e 20. A oxidabilidade de cada PUFA duplícase por cada grupo metilo dialílico. Polo tanto a oxidabilidade do EPA é aproximadamente catro veces maior que o DHA e 5 veces maior que o do linoleico (Figura 5). Utilizando esta regra pódese calcular a oxidabilidade de aceites vexetais dende o 9-10%-10 para aceite de oliva e palma, ata valores do 46-73%-73 para aceites de colza, algodón, soia e xirasol (Figura 6).

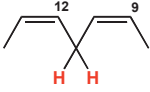
Fatty acids	Relative rates		PUFA
18:1 n9	1		Oxidizability = 2 X active CH ₂ 
18:2 n6	50	1	
18:3 n3	100	2	
18:4 n3,20:4 n6		3	
20:5 n3 (EPA)		4	
22:6 n3 (DHA)		5	

Figura 5. Potencial de oxidación calculado para ácidos graxos insaturados

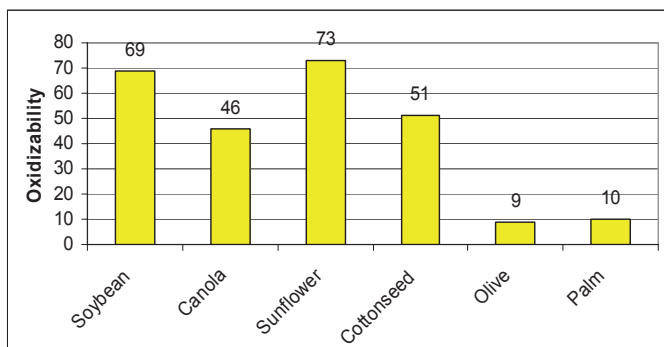


Figura 6. Potencial de oxidación de aceites vexetais: (% 18:2 x 1) + (% 18:3 x 2)

O correspondente potencial de oxidación dos aceites de peixe varía entre 110 ata 262% para diferentes aceites de peixe e algas (Figura 7).

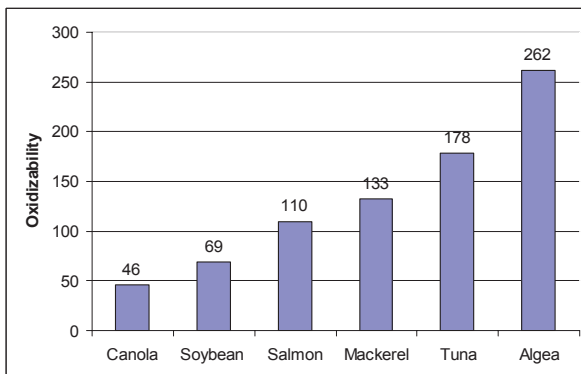


Figura 7. Potencial de oxidación de ácidos graxos poliinsaturados n-3: $(18:2 \times 1) + (18:3 \times 2) + (20:4 \times 3) + (20:5 \times 4) + (22:6 \times 5)$

Descomposición dos produtos de oxidación

Un grande número de compostos foron identificados como produtos de oxidación de hidroperóxidos do linoleato, incluíndo dímeros, polímeros, produtos secundarios (epoxi-hidroperóxidos) e volátiles (aldehídos, hidrocarburos, cetonas, esterres, etc.) como produtores de olores e sabores (Figura 8.).

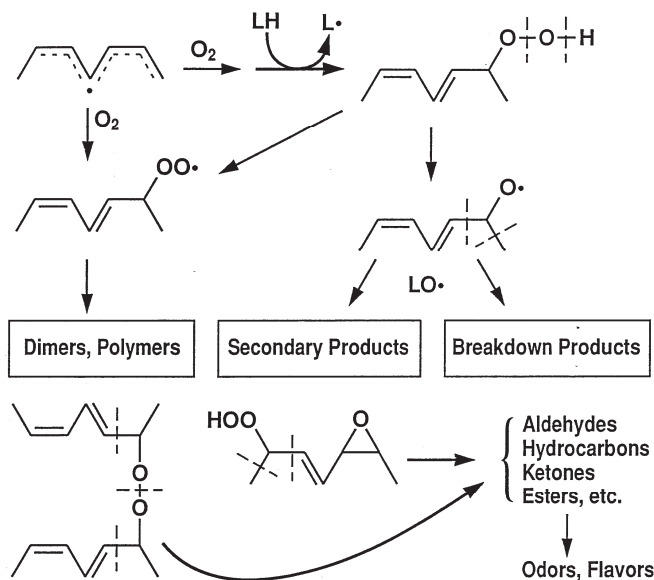


Figura 8. Produtos de descomposición de hidroperóxidos do linoleato

A descomposición por ruptura na posición beta dá lugar ao 2,4-decadienol a partir do hidroperóxido de 9-linoleato e pentano fronte ao hexanal proveniente do hidroperóxido 13-linoleato (Figura 9).

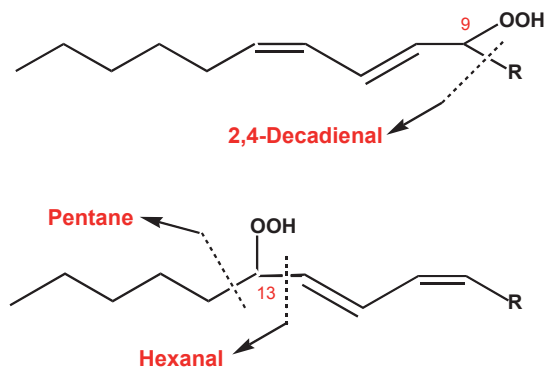


Figura 9. Principais volátiles provenientes da descomposición de hidroperóxidos do linoleato

A descomposición dá lugar a 2, 4, 7-decatrienal a partir do 9-linolenato hidroperóxido, 2,4-heptadienal a partir do 12-linolenato hidroperóxido, 2- ou 3-hexenal a partir de 13-linolenato hidroperóxido, e propanal a partir de 16-linolenato hidroperóxido (Figura 10).

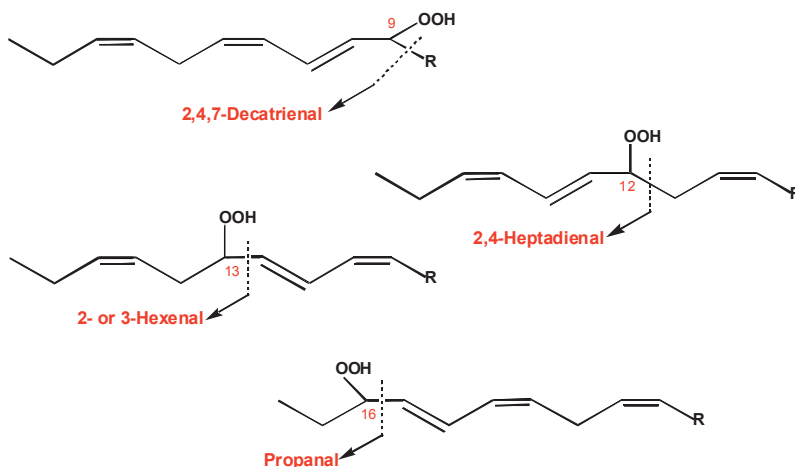
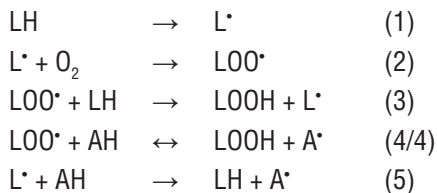


Figura 10. Principais volátiles provenientes da descomposición de hidroperóxidos do linolenato

Antioxidantes

1. Mecanismos. Os antioxidantes inhiben as reaccións de iniciación e propagación que se producen durante os fenómenos de oxidación. Para ser efectivos nesta interrupción do proceso oxidativo os antioxidantes dan lugar a un radical estable A que reacciona lentamente cos lípidos LH (3) e rapidamente cos radicais peróxilo $\text{LOO}^\bullet$ (4). A reacción (5) é desprezable a presión atmosférica, pero pode chegar a ser importante en condicións de baixa presión de oxíxeno e elevada temperatura. O radical antioxidante $\text{A}^\bullet$ podería reaccionar de novo con radicais peróxilo para dar lugar a peróxidos estables LOOA mediante a reacción (6) ou dimerizarse con outro radical antioxidante para obter A-A de acordo á reacción (7).





2. Métodos antioxidantes. As publicacións relacionadas cos antioxidantes publicadas dende os últimos anos ata a actualidade son caóticas e confusas. Unha mostraxe dos traballos publicados sobre antioxidantes na revista *J. Agric. Food Chem.* no ano 2003 revelou a seguinte multiplicidade de métodos e terminoloxía usada polos diferentes autores.

- No título: “Antioxidante”
- Total: 101 publicacións: métodos por publicación
 - 1 método: 35
 - 2 métodos: 25
 - 3 métodos: 9
 - 4 ou máis: 11
- Sen medida de antioxidantes (contido en fenois totais): 14
- Terminoloxía usada: Propiedades antioxidantes, potencial antioxidante, capacidade antioxidante, actividade captación de radicais libres, actividade bloqueadora de cadeas, actividade antiradicalaria, capacidade quelante, equivalentes trolox, capacidade equivalente vitamina C, capacidade captadora ou secuestrantes de radicais do oxíxeno.

O número de publicacións que usan os seguintes métodos preséntanse a continuación:

- 35: DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, absorbancia a 517 nanómetros
- 20: TEAC: capacidade antioxidante en equivalentes trolox (ABTS.+ :2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-SO₃Na), absorbancia a 734 nanómetros
- 15: Oxidación do ácido linoleico ou oxidación do metil linoleato: Absorbancia a 234 nanómetros para dienos conxugados
- 7: ORAC: (oxíxeno radical absorbancia capacidade), AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) diHCl induced oxidation, b-phycoerythrin fluorescence loss
- 10: Outros métodos diferentes.

Algunhas limitacións na avaliación de métodos antiradicalarios son:

- Non existencia dun substrato biolóxico ou alimentario “diana” para protexer
- Uso inapropiado de substratos (ácido linoleico, metilo linoleato, β-phycoerythrin)
- Non específico e unidimensional: non adecuados para antioxidantes multifuncionais

- Uso de radicais artificiais e iniciadores azo que actúan de diferente forma aos metais
- Non datos de composición
- Interferencias doutros radicais e pigmentos de plantas
- Non existe información sobre os mecanismos (Táboa 1).

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

Inhibition of LDL oxidation (Our work 1996-1997)

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

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

Táboa 1. Variacións significativas na actividade antioxidante indicados por diferentes autores utilizando diferentes métodos.

Actividade interfacial no seo do fluído e emulsións

Estudos con antioxidantes fenólicos de orixe sintética mostraron que eran máis efectivos cando todas as posicións orto estaban substituídas ou cando un ou dous son substituídos por butilos terciarios (Figura 11). En estudos de fenómenos de interfaces, comparamos a actividade de antioxidantes lipofílico (alfa-tocoferol e ascorbilo de palmitato) cos seus hidrofílicos análogos (Trolox e ác. ascórbico) (Figura 12).

a. Antioxidantes sintéticos e naturais

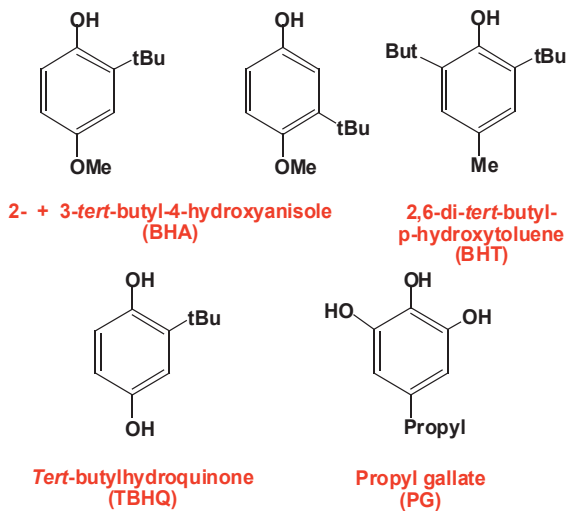


Figura 11. Antioxidantes sintéticos

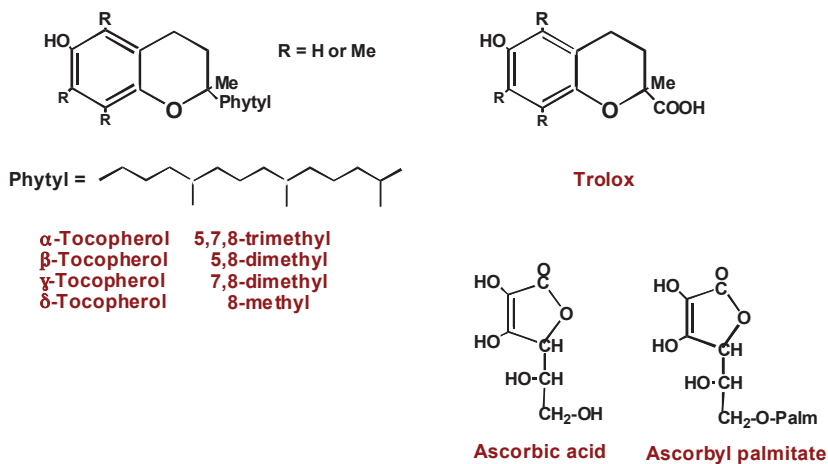


Figura 12. Antioxidantes naturais e derivados

b. Fenómenos interfaciais. O efecto de diferentes substratos lídicos ten un impacto significativo na actividade dos diferentes antioxidantes de acordo co seu carácter

lipofílico ou hidrofílico. Polo tanto alfa- T é un antioxidante lipofílico que se comporta de xeito diferente en varios substratos lipídicos debido ao seu ácido carboxílico análogo ao trolox, o cal é hidrofílico. No seo dunha disolución formada por ácido linoleico, metilo linoleato e triglicéridos de aceite de millo, o trolox é mellor antioxidante que alfa-tocoferol, pero a tendencia oposta obsérvase nunha emulsión aceite-auga do linoleato de metilo e aceite de millo, onde o trolox foi menos efectivo que o alfa-tocoferol. Non obstante en emulsións de ácido linoleico tivo mellor comportamento que o alfa-tocoferol. O ácido linoleico constitúe un substrato único debido á súa tendencia a formar micelas (Figura 13)

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

Táboa 2. Actividade antioxidante de alfa-tocoferol e trolox en diferentes substratos lipídicos.

α -Tocoferol e trolox mostran complexas propiedades interfaciais entre as interfases aceite-aire e aceite-auga que afectan significativamente as súas actividades relativas en diferentes sistemas lipídicos (Táboa 2). No seo do aceite o trolox (hidrofílico) protexe mellor se está situado entre a interfase aire-aceite (Figura 13). Na emulsión o tocoferol (lipofílico) protexe mellor se está situado na interfase auga-aceite. Dada a súa tendencia a formar micelas, o ácido linoleico non é un lípido apropiado para testar antioxidantes debido a que o comportamento neste substrato é significativamente diferente do de alimentos que están compostos principalmente por triglicéridos.

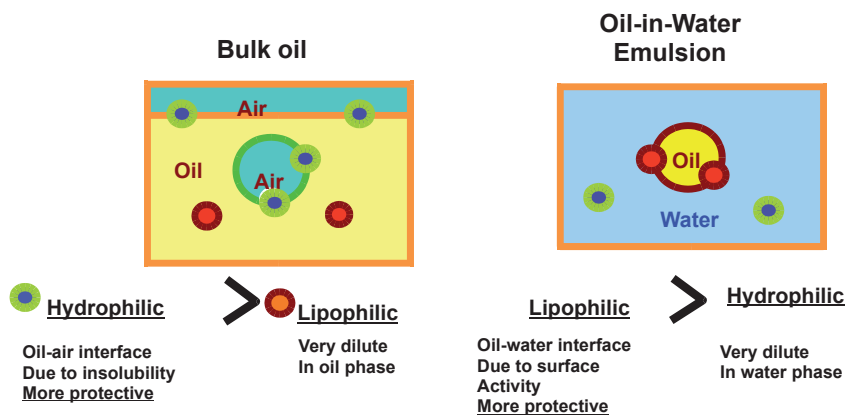


Figura 13. Esquema do paradoxo polar

c. Flavonoides. Os flavonoides son uns dos compostos con maior actividade antioxidante presentes nas plantas. A súa estrutura básica consiste nun núcleo flavón con 2 aneis bencénicos (A e B), xunto cun oxíxeno contido nun anel pirano (C) (Figura 14). As diferentes substitucións no anel C definen as diferentes clases de flavonoides, entre os que se inclúen os flavan-3-ol, flavonóis, antocianidinas e procianidinas que inclúen oligómeros do flavan-3-ol. Outros flavonoides presentes en froitas conteñen un gran e diverso número de glicósidos, provenientes da glucosilación na posición 3 e 7. Nos flavonoides cóñécense multitude de mecanismos antioxidantes:

- Secuestradores de radicais $\text{ROO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$, $^1\text{O}_2$
- Inactivadores de ións metálicos
- Complexadores de proteínas: encimas, ApoB do LDL, Metal binding sites of proteins
- Sinexismo: reduce antioxidantes oxidados (ácido ascórbico)
- Efectos de particionamento: localization at oxidation sites

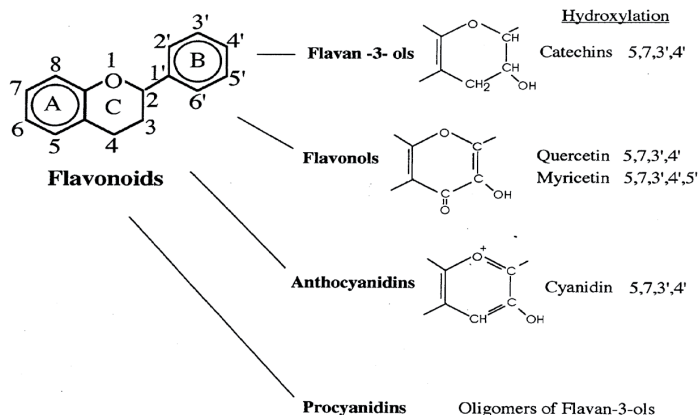


Figura 14. Estrutura química dos flavonoides

d. Antioxidantes do romeu. A actividade antioxidante dos extractos comerciais de romeu está directamente relacionada co seu contido en dous diterpenos fenólicos: ácido carnosico e carnosol, os cales tamén se encontran na salvia. O ácido carnosico ten unha estrutura que consta de tres a seis aneis incluíndo un anel fenólico dihídrico e un ácido carboxílico libre (Figura 15).

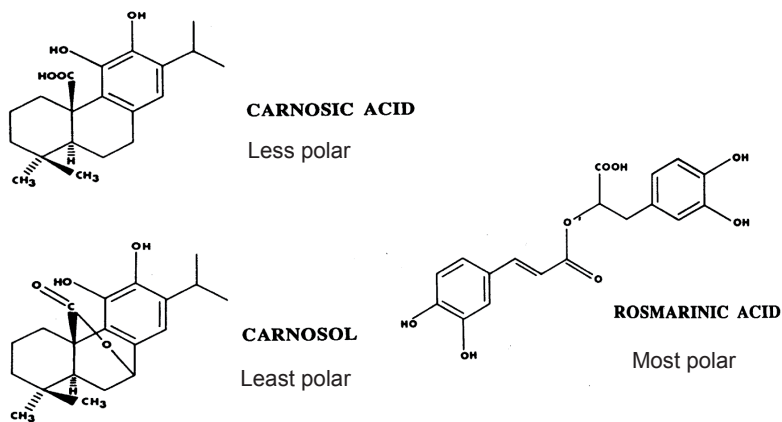


Figura 15. Estruturas dos compostos antioxidantes do romeu

O carnosol é un derivado do ácido carnosico que contén un anel de lactona. Nunha disolución de aceite (bulk) de aceite de millo, o extracto de romeu, o ácido carnosico, o ácido rosmarinico e o α -tocoferol foron significativamente máis activos que

o carnosol. Pola contra, en emulsións aceite-auga de aceite de millo, o carnosol foi significativamente máis activo que no aceite, mentres o extracto de romeu e o ácido carnósico foron menos activos e o ácido rosmarinico mostrou unha actividade prooxidante (Figura 16). Os compostos polares hidrofílicos do romeu foron menos activos en emulsións debido á súa tendencia a dividirse na fase acuosa, polo que protexen menos que no seo do aceite.

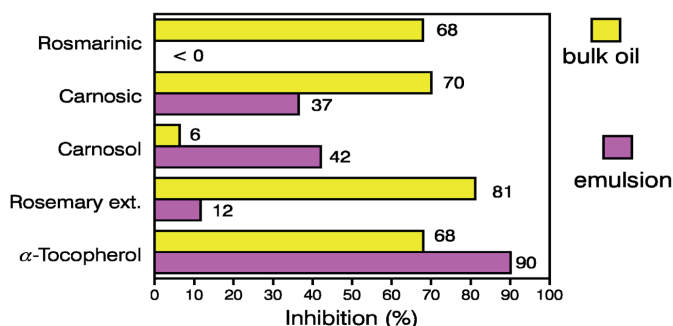


Figura 16. Inhibición da formación de hidroperóxidos

e. Catequinas do té verde. Os extractos de té verde compóñense dunha complexa mestura de galatos de catequina, que inclúen (+)-catequina (+)-galocatequina (-)-epicatequina (-)-epicatequina galato (-)-epigalo-catequina, e epigalocatequina galato (Figura 17). As catequinas do té móstra diferentes comportamentos en canto á actividade antioxidante en diferentes sistemas lipídicos. En aceite de millo oxidado a 50° C, a epigalocatequina, epigalocatequina galato e epicatequina galato foron mellores antioxidantes que epicatequina e catequina. Non obstante na correspondente emulsión auga-aceite de millo, as catequinas do té foron prooxidantes, así como propil galato e ácido gálico. Pola contra, en liposomas de lecitina epigalocatequina galato foi o mellor antioxidante, seguido pola epicatequina, epigalo-catequina epicatequina galto e catequina.

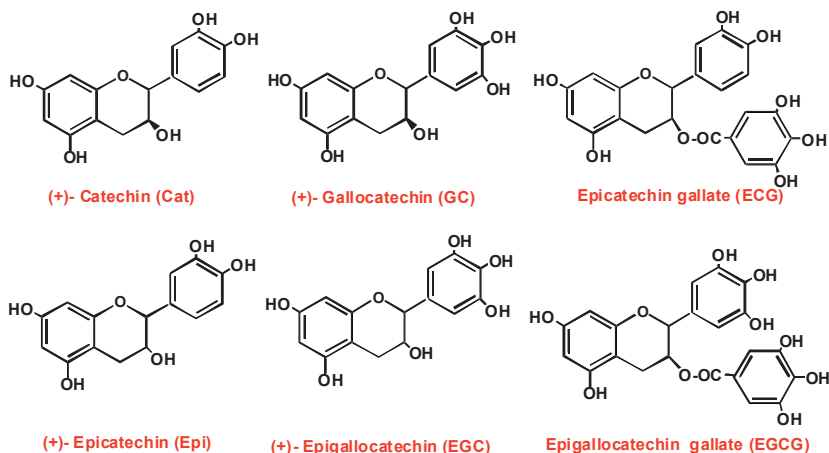


Figura 17. Estrutura das catequinas do té verde

- Triglicéridos de aceite de millo (50°C): EGC = EGCG = ECG > EC > Cat
- Emulsión aceite de millo-auga (50°C): EC, Cat e catequinas do té: prooxidantes
- Liposoma de lecitina de soia (50°C): EGCG = ECG > Cat = EC; EGC: prooxidante
- Liposoma de lecitina de soia (37°C + acetato de cobre): EC = Cat > ECG; EGCG, EGC: prooxidante

O té verde mostrou actividade antioxidante en liposomas de lecitina de soia oxidada a 37° C en presenza do catalizador de cobre. Observouse unha maior inhibición do hexanal que a formación de hidroperóxidos, o que suxire que as catequinas do té verde poderían actuar de forma efectiva inhibindo a formación de radicais alquilo, que se forman como precursores de aldehidos.

4. Avaliación de antioxidantes naturais. Aínda que os antioxidantes naturais presentes en extractos de plantas son xeralmente multifuncionais, un amplo abano de métodos unidimensionais desenvóléronse para avaliar a súa actividade, entre os que se inclúen DPPH, TRAP, TEAC, ORAC, FRAP (Táboa 9.19, Lipid Oxidation, 2nd edition, páx. 250). Desenvóléronse varios protocolos para medir a actividade antioxidante medida pola capacidade de captación de radicais libres. Estes métodos usan unha ampla variedade de sistemas xeradores de radicais libres e métodos de indución da oxidación, así como medida do punto final da oxidación. A validez destes métodos pode ser cuestionable, debido a que non teñen en conta a complexidade das accións antioxidantes. Debemos de realizarnos diferentes preguntas para dar validez a eses métodos:

- Cal é o verdadeiro impacto de oxidación nos alimentos?
 - Problema: a metodoloxía é cuestionable
 - Uso de metodoloxía non específica
- Cales son os efectos reais dos antioxidantes?
 - Necesítase información química específica:
 - Que substratos son inhibidos?
- Varios ensaios específicos son necesarios
 - Oxidación de lípidos, proteínas e as súas interaccións con outros produtos
- Accesibilidade de substratos para oxidantes e antioxidantes
 - Oxidación e antioxidación interfacial

Non existe unha sinxela aproximación para determinar a actividade antioxidante en alimentos complexos.

5. Ensaio recomendado. A efectividade dos antioxidantes depende en boa medida do tipo de test no que se proben, do estado físico dos substratos lipídicos, das condicións de oxidación, do substrato oxidable, localización dos antioxidantes, método empregado para avaliar a oxidación e dun estado da oxidación. A metodoloxía para avaliar os antioxidantes naturais debe ser coidadosamente interpretada de acordo ao sistema, á metodoloxía analítica usada para determinar a extensión e o punto final da oxidación. Para avaliar a capacidade antioxidante de cada composto deberíase realizar baixo diferentes condicións de oxidación, usando varios métodos que midan diferentes produtos de oxidación que están relacionados coa calidade do alimento ou con reaccións biolóxicas críticas. Os ensaios deberían considerar os seguintes parámetros:

1. Substratos: usar substratos relevantes de alimentos e sistemas biolóxicos, entre os que se inclúen triglicéridos e fosfolípidos en disolución, en emulsións ou en sistemas liposómicos. Os ácidos graxos libres deberían evitarse porque forman micelas nas cales os antioxidantes teñen un comportamento diferente aos triglicéridos
2. Condicións: ensaios baixo diferentes condicións de oxidación, incluíndo diferentes temperaturas (por debaixo de 60°C), catalizadores ou superficies de exposición.
3. Análise: a medida de niveis de oxidación relativamente baixos (por debaixo do 1%) e a inclusión tanto de produtos iniciais (hidroperóxidos, peróxidos, dienos conxugados) como secundarios (carbonilos, compostos volátiles).

4. Concentracións: comparar antioxidantes coa mesma concentración molar de compostos activos, relacionándoo coa estrutura. Con extractos crus de plantas sen purificar o contido total de fenólicos e datos de composición son necesarios para comparar as mostras.
5. Cálculos: cuantificación sobre a base do período de indución, porcentaxe de inhibición ou de velocidades de formación ou descomposición de hidroperóxidos, I_{50} (concentración de antioxidante necesaria para chegar a un 50% de inhibición), T_{50} (tempo para alcanzar o 50% de inhibición).

BIBLIOGRAFÍA

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



ANTIOXIDANTES NATURAIS NOS ALIMENTOS RICOS EN ÁCIDOS GRAXOS ω -3

Isabel Medina

Instituto de Investigacións Mariñas-CSIC

O músculo de peixe e os alimentos enriquecidos en aceites de peixe son unha excelente fonte de ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e o seu consumo relacionouse coa prevención de risco cardiovascular e outras enfermidades. A elevada concentración de ácidos graxos poliinsaturados confire a estes alimentos un notable valor nutricional pero simultaneamente fainos extremadamente susceptibles a sufrir o ataque do oxíxeno molecular e a oxidarse dando lugar á formación de volátiles de baixo peso molecular, responsables da detección organoléptica da rancidez. A oxidación lipídica é unha complexa reacción que transcorre mediante a xeración de radicais libres lipídicos e que provoca unha serie de efectos indeseables no alimento como a formación de aromas anómalos, modificacións na textura, ou perdas de vitaminas e oxidación de pigmentos. Existe un interese claro por parte da industria dedicada á conservación e transformación dos produtos pesqueiros en prolongar a súa vida útil mediante o uso de métodos e condicións idóneas de almacenamento. Tales métodos deben fomentar a aceptabilidade do produto sen supoñer un elevado custo ao industrial.

Un dos procedementos máis eficaces na prevención da oxidación dos alimentos graxos é a utilización de antioxidantes. Trátase de substancias que son capaces de inhibir ou retardar o desenvolvemento da oxidación ben porque actúan impedindo que esta se inicie ou ben impedindo que esta se propague. Contribúen a aumentar a vida útil do alimento sen ocasionar unha deterioración nutritiva ou sensorial, e o seu emprego en combinación con outros métodos de preservación reduce os custos de conservación. Aínda que o emprego de antioxidantes alimentarios sintéticos está permitido, as normativas internacionais tenden a restrinxir o seu emprego, e, en concreto, a UE prohíbe a súa utilización en alimentos infantís e aceites envasados. Actualmente os intereses da industria alimentaria e dos consumidores exigen a utilización de ingredientes ou aditivos naturais en substitución dos denominados sintéticos e existe unha necesidade clara de busca, recoñecemento e aplicación de antioxidantes extraídos de fontes naturais. Isto manifestouse nos últimos anos, no crecente interese na obtención e purificación de antioxidantes de orixe natural que está dando lugar a numerosos traballos de investigación, patentes e proxectos de investigación. Entre os principais antioxidantes naturais poden citarse os extractos polifenólicos procedentes de vexetais e froitas, os extractos de plantas como o té, especialmente ricos en catequinas, de especies como o romeu caracterizados pola presenza dos derivados do ácido carnosólico, e de sementes de diversos froitos.

Este traballo presenta a aplicación de dúas familias de compostos de orixe natural, os ácidos hidroxycinámicos e os polifenóis procedentes das uvas, na inhibición da rancidez de alimentos enriquecidos en aceites de peixe e de alimentos que teñen como base o músculo de peixe. A investigación presenta os mecanismos que explican a efectividade destes compostos en función dos seus parámetros estruturais e propiedades fisicoquímicas e da interacción destes compostos co propio músculo, tecido ou aceite.

Os resultados obtidos mostraron unha significativa eficacia antioxidante dos ácidos hidroxycinámicos. De maneira particular, o ácido cafeico presentou a maior efectividade antioxidante, inhibindo a oxidación de aceites e músculo de peixe. A súa elevada eficacia relacionouse coa súa capacidade de doar electróns e coa habilidade para reducir o radical α -tocoferilo rexenerando α -tocoferol no músculo a través dun ciclo redox no que participa o ácido ascórbico. Entre as procianidinas extraídas do bagazo da uva, o grao de polimerización (número de residuos fenólicos) e o grao de galoización (grupos galato) mostraron unha relación directa coa capacidade redutora, é dicir a capacidade de ceder electróns. No entanto, os estudos sobre a eficacia antioxidante no músculo de peixe mostraron a existencia dun óptimo de polimerización a partir do cal non se conseguía unha maior inhibición da rancidez oxidativa. Un elevado número de residuos fenólicos pode inducir elevadas interaccións repulsivas que reducen a eficacia da quelatación. Pola contra, un aumento no grao de galoización mellorou a eficacia das procianidinas no músculo e emulsións de aceites de peixe. Os estudos realizados en aceites de peixe puxeron de manifesto a importancia da polaridade na actividade inhibidora da oxidación.

Os resultados obtidos nesta investigación evidenciaron que a incorporación do antioxidante nos puntos activos onde ocorre a oxidación é un factor crucial na eficacia deste. A distribución eficaz do antioxidante así como a súa interacción co α -tocoferol presente nas membranas son factores clave na inhibición da oxidación dos alimentos cun elevado contido en ácidos graxos poliinsaturados ω -3. A posibilidade de incorporar compostos de orixe natural para estabilizar produtos enriquecidos en aceites de peixe ou produtos elaborados a base de peixe permite o deseño de alimentos funcionais que conteñan lípidos ω -3, así como compostos antioxidantes.

BLOQUE II. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS



AVALIACIÓN DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Guilhermina Font

Área de Toxicoloxía. Universidade de Valencia

A avaliación da toxicidade de novos antioxidantes, posibles nutrientes ou non, pódese enfocar desde dous aspectos distintos: a posible utilización como aditivos alimentarios, ou ben a súa utilización como complementos alimentarios en alimentos enriquecidos e os denominados “alimentos funcionais”.

Antes de que o uso dun aditivo sexa aceptado para a alimentación, debe ser sometido a unha adecuada avaliación toxicolóxica. Unha vez que a necesidade tecnolóxica e a valoración para o consumo dos aditivos se estableceron, necesítase coñecer as implicacións sanitarias da utilización destes.

Como aditivos, a avaliación da toxicidade formúlase de xeito clásico, é dicir, tratando de descubrir os efectos adversos de pequenas concentracións, mentres que no caso dos nutrientes ou suplementos dietéticos a avaliación de riscos está asociada aos niveis máximos de inxesta.

A metodoloxía de avaliación do risco xorde en EEUU nas décadas dos 70 e 80 do século pasado, e consta de varias etapas como son: a identificación do perigo por avaliación da toxicidade e a relación da dose e a resposta, que xunto á avaliación da exposición permitirá a caracterización do risco e a partir desta información poderase levar a cabo a toma decisións, establecendo niveis tolerables ou aceptables dunha substancia. Na UE esta metodoloxía incorpórase coa Directiva 93/67/CEE sobre avaliación de risco de novas substancias, na súa dobre vertente de avaliación toxicolóxica (saúde humana) e de avaliación ecolóxica (especies salvaxes e ecosistema).

A continuación preséntanse as definicións dalgúns termos comunmente usados na avaliación de riscos:

-Perigo: é a posibilidade de que unha substancia, mestura de substancias ou procesos que involucran substancias baixo certas condicións de produción, uso ou disposición causen efectos adversos nos organismos ou no ambiente, polas súas propiedades inherentes e de acordo co grao de exposición.

-Exposición: a concentración, cantidade ou intensidade dun determinado axente que incide nunha poboación, organismo, órgano, tecido ou célula diana, usualmente expresada en termos cuantitativos de concentración da substancia, duración e frecuencia (para axentes químicos e microbiolóxicos) ou de intensidade (para axentes físicos como a radiación). O termo tamén se pode aplicar a unha situación na cal

unha substancia pode incidir, por calquera vía de absorción, nunha poboación, organismo, órgano, tecido ou célula diana.

-Risco: É a probabilidade de que ocorra un dano por un determinado tóxico; depende das características do tóxico e da exposición.

-Relacións entre dose-resposta e dose-efecto: En toxicoloxía establécese unha distinción entre as curvas de dose (ou concentración)-resposta e de dose (ou concentración)-efecto.

A curva de dose-resposta pode ser definida como a expresión gráfica da relación entre a dose e a proporción de individuos que experimentan un efecto do todo ou nada e é esencialmente a representación da probabilidade ou a proporción dunha poboación que presenta un efecto fronte a unha dose. Os exemplos típicos de tales efectos totais ou nulos son a mortalidade ou a incidencia do cancro.

En cambio, a curva de dose-efecto é a expresión gráfica da relación entre a dose e a magnitude do cambio biolóxico producido, medido en unidades apropiadas. Aplícase a cambios que se poden medir e que dan unha resposta gradual ao aumentar a dose dun xenobiótico.

-Caracterización do risco: é a cuantificación do risco despois de considerar a exposición e a relación dose-resposta (efecto). Defínese como a avaliación, con ou sen modelo matemático, da probabilidade e natureza dos efectos da exposición a unha substancia, a partir da cuantificación das relacións dose-efecto e dose-resposta para a poboación e os compoñentes ambientais que poden estar expostos e da medición dos niveis de exposición potenciais da poboación, os organismos e o ambiente en risco.

Avaliación de riscos

Este proceso é un intento científico de identificar e estimar os riscos reais, e resulta da consideración dos compoñentes mencionados anteriormente: o perigo, a relación dose-resposta (efecto) e a caracterización do risco. Pódese definir da seguinte maneira: é a identificación e cuantificación do risco resultante do uso ou presenza dun axente químico ou físico; toma en conta tanto os posibles efectos daniños nas persoas ou as poboacións que usan o dito axente na cantidade e da maneira recomendada, como as vías posibles de exposición. A cuantificación require, idealmente, o establecemento das relacións dose-efecto e dose-resposta nos individuos e poboacións obxectivo.

Se despois dunha avaliación de riscos chégase á conclusión de que aínda existe un risco inherente importante que non se pode reducir máis, pásase ao manexo do

risco, onde a decisión de proceder ou non depende dunha combinación de factores económicos, sociais e políticos.

O proceso completo de avaliación toxicolóxica de riscos consta de tres fases: avaliación de riscos, xestión de riscos e comunicación de riscos.

Metodoloxías para a avaliación da toxicidade

A avaliación da toxicidade faise de acordo con metodoloxías estandarizadas, propostas por comités de expertos internacionais [OMS, 1958; OMS, 1987; OCDE, 2003 (www.oecd.org/document), European Chemicals Bureau, 2004. (<http://ecb.jrc.it/testing-methods>)]. As tres categorías principais de información empregadas polas axencias internacionais para a avaliación e regulación son os estudos epidemiolóxicos, as exposicións clínicas controladas e os estudos con animais. Os estudos das relacións estrutura-actividade úsanse como soporte ás tres categorías citadas e só ocasionalmente se utilizan como fonte primaria de información.

Os ensaios de toxicidade en animais apóianse en dous principios fundamentais:

- Os efectos que o tóxico produce en animais de experimentación son extrapolables a humanos. Sobre a base do “peso corporal”, os humanos son xeralmente máis vulnerables que os animais de experimentación (por un factor corrector de 10). Tendo en conta estas diferenzas cuantitativas pódense calcular doses relativamente seguras en humanos utilizando factores apropiados.

- A exposición de animais de experimentación a doses altas de axentes tóxicos é un método válido para descubrir posibles riscos en humanos. Este principio baséase nas curvas dose-resposta. O deseño de modelos experimentais require un pequeno número de animais en comparación co tamaño da poboación exposta ao risco. Para obter resultados estatisticamente válidos en grupos pequenos de animais é necesario administrar doses relativamente altas, de maneira que o efecto apareza cunha frecuencia tal que sexa suficiente para ser detectado.

O deseño experimental é un aspecto clave nos estudos de avaliación da toxicidade. A continuación coméntanse algúns dos aspectos que se van considerar.

1. *Propiedades fisicoquímicas da substancia que se vai estudar.* Esta información é imprescindible antes de iniciar calquera estudo toxicolóxico. Permite definir as condicións de manipulación e almacenamento da dita substancia, os modelos experimentais (vía ou modo de administración), explicar a aparición dalgúns fenómenos tóxicos e comprobar que a substancia estudada teña sempre as mesmas características.
2. *Elección das especies.* A pesar das similitudes dalgunhas especies co home, a extrapolación é sempre difícil. En xeral, rato, rata, cobaia, coello, can e mono

son as especies máis utilizadas. A elección dunha determinada especie depende de varios factores: tipo de efecto toxicolóxico que se vai estudar, dispoñibilidade nun determinado momento, facilidade de manipulación do animal, condicións de manutención, farmacocinética e biodispoñibilidade do produto ensaiado.

Así, por exemplo, para os estudos de administración por vía oral, cutánea ou por inhalación prefírense os roedores e especialmente a rata. Para os estudos de toxicidade cutánea utilízanse o coello ou o porco. Para os estudos de toxicidade crónica en especies non roedoras úsanse cans ou primates. Para os estudos de carcinoxénese utilízanse usualmente o rato e a rata, etc.

3. *Elección dos grupos.* En xeral, utilízanse tres grupos tratados e un control. Estes grupos fórmanse ao azar a partir de lotes de animais da mesma orixe, de idade e peso comparable e xeralmente de ambos os dous sexos. Nos estudos de longa duración e de carcinoxénese acostúmase a utilizar dous grupos control: un control negativo ao que non se lle administra nada ou só o vehículo de administración do tóxico, e un control positivo que recibe unha substancia de referencia.
4. *Elección da vía de administración.* No campo da seguridade dos alimentos normalmente utilízase a vía oral. O produto pode administrarse mediante unha sonda esofáxica ou estomacal (estudos curtos) ou mesturando o tóxico coa comida ou bebida (estudos de longa duración).
5. *Elección das doses.* Sempre é moi difícil. Varía en función do estudo que se vai realizar. En estudos de toxicidade aguda úsanse doses elevadas que produzan intoxicacións claras nos animais. En estudos de toxicidade crónica adóitase empregar unha gama de doses que van desde doses baixas, que corresponden á utilización normal no home, ata doses elevadas que producen efectos tóxicos na especie escollida.
6. *Duración do tratamento.* É moi variable, dependendo do tipo de estudo que se vai realizar. Xeralmente os estudos realízanse de forma secuencial: comezan por experimentos curtos (días-semanas), logo de 3-6 meses e, en casos especiais, podemos ter estudos de 12 meses a 2 anos, e incluso máis nos roedores.
7. *Análise estatística dos datos.* En cada ensaio os resultados obtidos sométense a unha análise estatística para determinar se a distribución das respostas nos grupos tratados difire das obtidas no grupo control. Existen numerosos métodos estatísticos para a análise de resultados.

Tipos de estudos da toxicidade

Na avaliación toxicolóxica utilízanse ensaios *in vivo* e *in vitro*. Para aprobar a utilización dos aditivos nos alimentos existen dos organismos encargados de realizar a avaliación toxicolóxica e a elaboración de normas de identidade e pureza, así como a determinación da súa inocuidade baseándose nos estudos realizados en animais de

experimentación, con diversas doses e períodos prolongados, estes organismos son o Comité de Expertos de aditivos dos alimentos, da FAO/OMS (JECFA) e o Comité Científico dos Alimentos (SCF) da UE.

Todos os aditivos que aparecen na “lista positiva” foron previamente avaliados pola JECFA e polo CCAH. Cando os comités consideran insuficiente a información dispoñible poden establecer ou non unha inxesta diaria admisible (IDA) provisional, e eventualmente recomendar os novos experimentos necesarios.

Desde unha perspectiva sanitaria os aditivos alimentarios presentan un problema derivado do seu potencial acción tóxica e será polo tanto necesario realizar unha serie de ensaios toxicolóxicos para demostrar a súa inocuidade, como son ensaios de toxicidade aguda, de dose repetidas a curto e longo prazo, así como unha serie de ensaios especiais como estudos da función reprodutora, carcinóxene, mutaxénese, etc.

Ensaio da toxicidade aguda

Estes estudos identifican os compostos extremadamente tóxicos e proporcionan información sobre a DL_{50} ou CL_{50} , natureza dos efectos tóxicos e relación dose-resposta, riscos por exposición a doses elevadas do tóxico (accidente, intento de suicidio, etc.) e as diferenzas entre especie e sexo. Cando se ensaian varias especies en ambos os dous sexos obtense información que pode ser útil para predicir se a toxicidade é mediada pola actividade hormonal ou para establecer se unha especie debe ser investigada máis exhaustivamente. Ademais, permiten ofrecer recomendacións sobre como levar a cabo os estudos toxicolóxicos de máis longa duración.

Úsanse grupos homoxéneos de animais (rato, rata, coello) que reciben doses crecentes do tóxico. A vía de administración é, fundamentalmente, oral. Os animais obsérvanse durante 14 días. Aos animais que morren durante o estudo ou son sacrificados ao final fáiselles necropsia. Durante o ensaio anótanse os síntomas de intoxicación, mortalidade, lesións dos órganos, e toda a información clasifícase por dose e sexo. Por unha fórmula matemática calcúlase a dose que provoca a morte do 50% dos animais.

Aínda que estes ensaios achegan información valiosa, teñen varias limitacións. Así, por exemplo, non indican os posibles efectos que aparecerían despois dunha administración reiterada do tóxico. Por outra parte, a DL_{50} é unha variable aleatoria que se pode calcular por métodos estatísticos, sen necesidade de utilizar un número excesivo de animais.

Dos ensaios de toxicidade aguda obteñense os índices de toxicidade aguda, o máis empregado é a DE_{50} (dose efectiva 50) que expresa a cantidade da substancia, en

mg/Kg, que en determinadas condicións experimentais (moi precisas) produce efectos no 50% dunha especie animal determinada. Cando o efecto buscado é a morte fábase de DL_{50} (dose letal media). Outros índices de toxicidade aguda son a CE_{50} , CL_{50} , ou CI_{50} (concentración inhibidora).

A DE_{50} e DL_{50} calcúlanse mediante métodos gráficos ou matemáticos (estadísticos) a partir das curvas dose-resposta. De forma similar poden obterse os valores de DE_1 , DE_{99} , DE_{90} , etc. Hai que destacar o feito de que os valores de toxicidade refírense exclusivamente á vía de entrada (oral, dérmica ou respiratoria) e á especie para a que se determinaron.

Aínda que nos últimos tempos se puxeron en entredito a validez e utilidade da DL_{50} , este parámetro foi clasicamente utilizado como criterio de toxicidade para os efectos comparativos entre distintos tóxicos. De feito, a DL_{50} é un criterio utilizado pola UE para a clasificación e etiquetaxe de produtos químicos como moi tóxicos, tóxicos ou perigosos.

Ensaio da toxicidade de doses repetidas de curta duración ou subcrónicos

Proporcionan información sobre: efectos tóxicos principais e relacións dose-resposta, órganos diana implicados, reversibilidade ou irreversibilidade dos efectos precisando se son acumulativos ou retardados, as doses para os estudos de máis longo prazo, que é un dos principais obxectivos destes ensaios.

En xeral, consisten na administración regular ou frecuente de varias doses ou concentracións da substancia estudada. Usualmente inclúense tres niveis de doses: unha dose alta que produza toxicidade, unha dose baixa que non produza toxicidade e unha dose intermedia que permita calcular a relación dose-resposta. As especies animais utilizadas son ratas, ratos (roedores) e can, mono (non roedores). A duración do estudo é de 14 días a 3 meses. Durante o estudo os animais sométense a observación clínica (estado xeral, comportamento, etc.) e faise unha avaliación do crecemento ponderal, consumo de auga e alimentos. Tómanse mostras periodicamente para realizar exames hematolóxicos e bioquímicos en sangue, oríños e feces. Aos animais que morren ou son sacrificados ao final realízase a necropsia. Por análise dos resultados obtidos deberíanse establecer os valores de nivel máis baixo estudado con efecto observable e os niveis sen efectos observable.

Ensaio da toxicidade de doses repetidas de longa duración ou de toxicidade crónica

Estes estudos tratan de detectar os efectos tóxicos que requiren un longo tempo de latencia ou que son acumulativos. Por iso son os únicos experimentos que permiten evidenciar determinadas afeccións cardíacas ou renais nos animais estudados, de

aparición a miúdo ligada á idade. Proporcionan información sobre o tipo e natureza dos efectos tóxicos (funcións danadas, órganos diana), dose sen efecto tóxico (dose limiar), dose con efectos tóxicos, tempo de aparición dos efectos tóxicos (en función da dose ou da concentración), reversibilidade eventual dos efectos observados.

Nestes ensaios adminístrase o tóxico de maneira reiterada a grupos de mamíferos (roedores ou non roedores) en doses variables. En xeral, utilízanse 3 grupos tratados e 1 control (20-35/grupo/sexo, en roedores e 4-10/grupo/sexo, en non roedores). As doses elíxense en función dos resultados obtidos nos experimentos de curta duración e xeralmente utilízase a vía oral.

O conxunto dos resultados sométese a un exhaustivo estudo estatístico e deberíase determinar o parámetro denominado NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) ou “dose sen efecto” que poderíamos definir como a dose máxima diaria (expresada en mg/Kg/día) que non produce efectos observables no animal considerado LOEL e LOAEL (Lowest Observed Effect Level e Lowest Observed Adverse Effect Level) que se expresa tamén en mg/kg/día e é a dose máis baixa capaz de producir efectos adversos.

O parámetro que se debe utilizar para fixar a dose diaria admisible (DDA) ou inxesta diaria admisible (IDA), dos límites de tolerancia das substancias nos alimentos e na auga de bebida ou os valores límite de exposición é o NOAEL.

De igual maneira que nos índices de toxicidade aguda os valores obtidos dependen da especie e as condicións experimentais utilizadas no estudo, así como da vía de entrada do tóxico. Evidentemente para cada “efecto” considerado teremos uns valores de NOAEL, LOAEL, etc. Normalmente considérase unha exposición crónica de 3 meses a 2 anos.

O NOAEL é sen ningunha dúbida o parámetro toxicolóxico máis importante xa que sobre el se apoia o cálculo dos límites tolerables de exposición e as concentracións máximas permisibles. É por iso que convén facer algunhas consideracións sobre o concepto e o cálculo deste.

É importante facer unha observación sobre o cálculo do NOAEL. O NOAEL debe ser, por definición, unha das doses experimentais probadas. É dicir, que a diferenza da DL_{50} , aquí non se debe facer unha extrapolación a partir dunha serie de datos. O NOAEL/LOAEL debe ser unha das doses usadas no estudo. Na práctica determínase utilizando unha serie de concentracións decrecentes e elíxese aquela que “non produce efectos adversos observables”. Ás veces por moito que se diminúa a dose sempre obtemos un efecto adverso sendo imposible establecer un NOAEL. Neses casos a dose máis baixa que produce un efecto adverso tómase como LOAEL. Polo tanto, o valor do NOAEL ou LOAEL é un valor observado que depende do protocolo

e do deseño da investigación. Entre os factores “estudo-dependentes” que poden influír na magnitude do valor observado podemos citar a especie, o sexo, a idade, o tamaño do grupo, a sensibilidade dos métodos utilizados para medir a resposta e a selección dos niveis de dose, xa que con frecuencia están moi espazadas, de maneira que o valor observado do NOAEL pode ser, nalgúns casos, considerablemente menor que o verdadeiro “nivel de efecto non adverso”.

Límites tolerables de exposición

O límite tolerable de exposición representa a dose (expresada en mg/Kg/día) dun produto que pode ingresar no organismo diariamente, durante toda a vida, sen que resulte prexudicial para a saúde. Despois de considerar todos os estudos toxicolóxicos dispoñibles sobre unha substancia, elíxese o NOAEL característico máis baixo. Dáselle a primeira prioridade aos estudos realizados en seres humanos; os efectuados con animais xeralmente serven para complementalos. No entanto, a maioría das análises baséanse en estudos de mamíferos non humanos. Tamén se dá por sentado que calquera efecto tóxico polo xeral é independente da ruta de exposición.

Cando é posible, considéranse estudos toxicocinéticos relativos á substancia, o que podería ser significativo na selección dos conxuntos de datos claves usados para estimar o NOAEL. Por exemplo, a selección dun NOAEL apropiado para animais pódese basear nas semellanzas entre a toxicocinética humana e animal. Cando non é posible decidir cal das especies ten características máis pertinentes para o ser humano, elíxense os resultados das máis sensibles á substancia.

Logo, úsase o NOAEL para determinar a dose de referencia (RfD) mediante o uso de factores de incertidume (FI) que reflicten a confianza xeral nos diversos conxuntos de datos. Nalgúns casos, úsanse factores de modificación (FM), baseados no criterio científico. En toxicoloxía alimentaria o criterio básico de límite tolerable de exposición denomínase a dose diaria admisible (DDA) ou ADI (Acceptable Daily Intake): A DDA é utilizada pola OMS para os pesticidas e aditivos. Defínese como “a dose dun produto que pode ser ingerido diariamente por un individuo durante toda a súa vida sen risco apreciable para a súa saúde”. Exprésase en mg/Kg/día.

A DDA fíxase a partir de ensaios experimentais con animais sobre a toxicidade aguda e crónica (investigando eventuais efectos mutáxenos, teratóxenos e canceríxenos). Considérase o efecto máis sensible na especie animal máis sensible. Determinase a cantidade máxima que a dita especie animal pode ingerir diariamente, durante o tempo da experiencia, sen efecto nocivo, NOAEL crónico. Para extrapolar o home (que se considera a especie máis sensible e vulnerable) divídese a dose establecida para o animal por 10, e para incluír as variacións individuais e os casos especiais (embarazadas, nenos, anciáns, etc.) divídese de novo por 10. En definitiva e, de

forma xeral, a DDA é a centésima parte do NOAEL (expresada en mg/Kg de peso e día). Úsase polo tanto un factor de seguridade ou incerteza para englobar diferenzas inter e intraespecíficas.

En caso de non existir datos concluíntes sobre os estudos de toxicidade pódense usar factores máis altos. Así, por exemplo, o LOAEL úsase cando non existe un valor de NOAEL, aínda que en tal caso úsase un factor de seguridade adicional ao facer os cálculos ($\times 10$). Hai que ter en conta que a DDA asome un consumo durante toda a vida, polo que para o cálculo hai que usar o NOAEL “crónico”. Se, por exemplo, o NOAEL se obtivo nun estudo subcrónico (90 días) hai que aplicar outro factor adicional de 10 ($\times 10$).

A EPA introduciu un quinto factor de incerteza UFD cando se trata con bases de datos incompletas, como non dispoñer de datos de dous estudos de doses repetidas en mamíferos, un multixeneracional e dous de toxicidade do desenvolvemento. Se os cinco estudos están feitos hai bastante confianza de que polo menos nun se obtivo o NOAEL máis baixo posible.

A aplicación matematicamente queda: $DDA = LOAEL \text{ ou } NOAEL / UF_s$

O uso de todos podería chegar a 100.000 e isto é pouco realista e se teñen en conta factores de modificación, por exemplo se un estudo se realizou con moitos animais, isto diminúe a incerteza.

Concentracións máximas permisibles

A concentración máxima permisible (CMP) é a concentración máxima dun tóxico (expresada en mg/Kg ou mg/L) que se permite nun medio determinado (alimento, auga). A partir dos valores da DDA (ou calquera dos outros parámetros equivalentes) pódense establecer as Concentracións Máximas Permisibles (CMP) nun alimento ou bebida, que se expresan como mg/Kg do produto fresco ou por litro do produto líquido. Estes valores calcúlanse a partir da DDA tendo en conta o peso medio dunha persoa, a cantidade media inxerida por día e a contribución dese produto ao total da dieta.

Para o cálculo das concentracións máximas permisibles é necesario coñecer o consumo diario do alimento en cuestión ou da bebida considerada. Estes datos pódense obter das enquisas de consumo que se realizan nos diferentes países. Os límites tolerables de exposición e as concentracións máximas permisibles son os valores de referencia que constitúen a ferramenta básica para a avaliación do risco.

Conclusións

Os valores de inxestas diarias admisibles (IDAs) usáronse durante máis de 40 anos, establecidas por comités científicos e demostraron ser útiles para previr efectos tóxicos, coas únicas excepcións dos nenos menores de doce anos ou persoas alérxicas.

As avaliacións da inxesta proporcionan unha sobreestimación da inxesta real ou que combinado coas IDAs, establecidas coas marxes de seguridade, aseguran unha boa protección dos consumidores.

O establecemento das IDAs co refinamento das tecnoloxías continuará proporcionando parámetros que se van utilizar no século XXI.

BIBLIOGRAFÍA

Beck, B.D., Calabrese, E.J., Slayton, T.M., Rudel, R. (2008). En: Principles and Methods of Toxicology, Fifth Ed (Ed) Hayes AW, CRC Press, New York.

Benford, D. (2000). International Life Sciences Institute (ILSI series), Bruxelas.

FAO/WHO. (2006). Report issued (Internet) on 13 January

Fernández-Pachón, M. S., García, M.D., Morales, M.L., Troncoso, A.M. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Reppeto, M., Madrid, 453-452.

Lipscomb, J.C., Ohanian, E.V. (2007). Informa Healthcare, New York.

Pla, A., Hernández, A., Gil, F. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Reppeto, M., Díaz de Santos, Madrid, 77-94.

PNUMA/IPCS. (1999). Evaluación de riesgos humanos.

Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Repetto, M., Díaz de Santos, Madrid, 95-121.

Ruiz, M.J., Font, G. (2007). En: Micotoxinas en Alimentos. (Ed) Soriano del Castillo, J. M., Díaz de Santos, 15-27.

Vilanova E. (2006). En: Toxicología Alimentaria (Ed) Camean, A., Repetto, M., Díaz de Santos, Madrid, 123-140.

ACCIÓN PROTECTORA DE ANTIOXIDANTES FRONTE Á TOXICIDADE DE DIOXINAS E PCBs

César Ordóñez Pascia

Dpto. Ciencias Biomédicas. Facultade de Veterinaria. Universidade de León

Co nome DLCs agrúpanse compostos de tipo dioxinas, furanos e PCBs caracterizados todos eles por ser de tipo organoclorado e organobromado e tendo un alto número de conxéneres cada uns destes grupos.

A historia dos efectos contaminantes destes compostos remóntase a finais dos anos 40, cando traballadores das fábricas de herbicidas clorados de Monsanto empezaron a desenvolver eccemas na pel, dores nas pernas e articulacións, debilidade, irritabilidade, nerviosismo e perda da libido.

Con posterioridade o exército de Estados Unidos utilizou cantidades masivas de herbicidas defoliantes (axente laranxa) sobre as selvas de Vietnam. Os estudos epidemiolóxicos posteriores estableceron a causalidade entre os niveis de dioxinas que contaminaban as formulacións e determinadas patoloxías (Dwyer e Flesch-Janys, 1995).

A emisión de dioxinas máis coñecida produciuse en Meda ao norte de Seveso (Italia) en 1976. A planta industrial de ICMESA da empresa Hoffman-A Roche liberou accidentalmente unha nube tóxica que contiña 500 g de DLCs. O vento do sueste produciu numerosas vítimas entre os animais domésticos e obrigou a evacuación de máis de 700 persoas. Os gases emitidos produciron vítimas mortais, así como a aparición de casos de embriotoxicidade que se traduciron en malformacións conxénitas (Pesatori e col., 2003).

Recentemente producíronse alertas alimentarias por contaminación de dioxinas en distintos países. En febreiro de 1999 aparece en Bélxica un episodio relacionado, de novo, coa contaminación de alimentos destinados ao consumo humano. Nesta ocasión a orixe encontrábase na contaminación de pensos destinados ao cebado de polos que contiñan residuos de PCBs e PCDD/Fs que excedían en máis de 250 veces os niveis de tolerancia.

As denuncias recentes de alimentos de procedencia animal (polos, porcos, salmóns) contaminados con dioxinas, como consecuencia da utilización de pensos que conteñen graxas de orixe industrial contaminadas con estas substancias, reavivaron a polémica sobre a toxicidade e o risco de exposición a estes compostos, así como o da seguridade química dos nosos alimentos.

Estrutura química e propiedades físico químicas

O núcleo central das dioxinas é a dibenzo-*para*-dioxina. Os derivados clorados deste núcleo (conxéneres) denomínanse xenericamente dibenzodioxinas policloradas (PCDDs), e entre elas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) é a molécula de referencia do grupo. Xunto ás dioxinas propiamente ditas, existen outros grupos de substancias quimicamente relacionadas que están asociadas ás primeiras desde un aspecto toxicolóxico. Os dibenzofuranos policlorados (PCDFs) e os bifenilos poliha-loxenados, tanto nas súas versións cloradas (PCB) ou bromadas (PBB) presentan características estruturais e toxicolóxicas moi parecidas, polo que serán considera-dos de forma semellante ao longo deste capítulo.

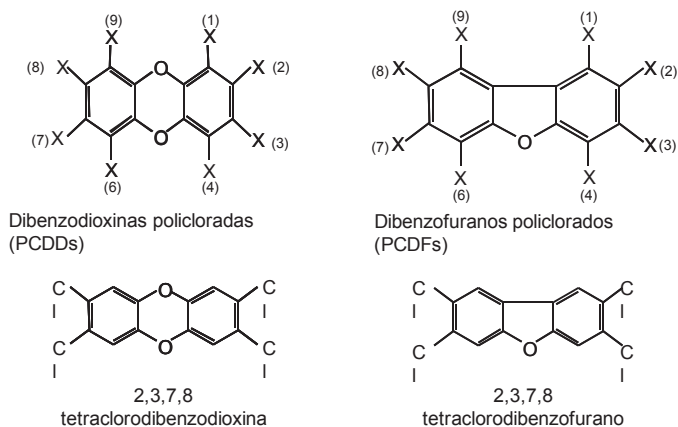


Figura 1. Estrutura química xeral dos compostos dioxínicos (DLCs), dioxinas policloradas (PCDDs) e furanos policlorados (PCDFs). Como exemplo a figura presenta as estruturas dos derivados tetraclorados máis representativos de cada serie

Entre as súas características físico químicas máis relevantes destacan a súa elevada liposolubilidade e a súa gran estabilidade química e térmica.

Os PCBs con comportamento tipo dioxina (Figura 2) conteñen entre catro e seis átomos de cloro substituídos en posicións *para*- e *meta*- (PCB non-*orto* ou PCBs coplanares). Aínda que estrutural e toxicoloxicamente difiren destes, os conxéneres mono-*orto* substituídos adoitan incluírse dentro deste grupo.

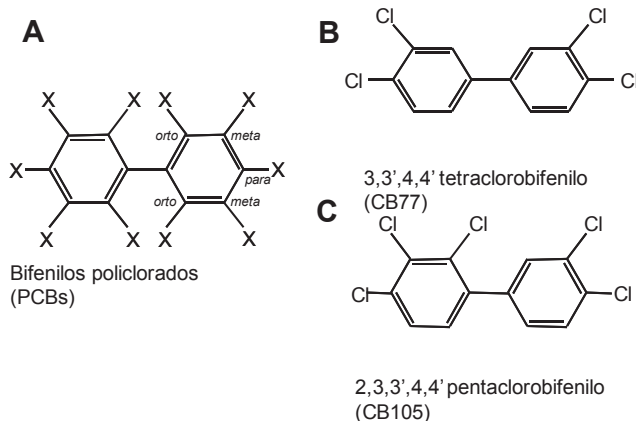


Figura 2. Estrutura química xeral dos bifenilos policlorados (A), así como dos exemplos de PCBs coplanares con estrutura non-*orto* (B) e mono-*orto* substituídas (C). X adoita ser un átomo de cloro, aínda que pode ser Br no caso dos bifenilos polibromados (PBBs)

Os conceptos de I-TEF e I-TEQ

A cuantificación de PCDD/Fs precisa dun tratamento especial coa fin de ter en conta o grao e orde de cloración entre os diferentes conxéneres. A finalidade é obter o potencial toxicolóxico destes compostos cando se encontran nunha mestura. En mostras reais os DLCs non se encontran por separado, senón como unha mestura de conxéneres con diferente toxicidade. Con este fin introduciuse en 1988 o factor de equivalencia tóxica (I-TEF) que está baseado en dous supostos: (1) todos os compostos clorados en posición 2,3,7,8 teñen o mesmo mecanismo de acción (en termos cualitativos), aínda que o seu potencial tóxico pode variar dun a outro, e (2) a resposta tóxica dunha mestura destas substancias é o resultado da suma do comportamento de cada unha delas por separado. Baseados nestes dous principios pódese asignar un valor de I-TEF a cada composto independentemente. Xa que o composto máis tóxico é o 2,3,7,8-TCDD, asignóuselle o valor arbitrario de 1, sendo o resto fraccións deste (Táboa 1).

Xunto co concepto de I-TEF introduciuse o termo de cantidade de equivalencia tóxica (I-TEQ) que resulta de multiplicar a concentración de cada un dos conxéneres polo seu correspondente I-TEF e sumalos todos nunha mestura. Desta maneira, a toxicidade real dunha mestura de PCDD/Fs exprésase como a suma dos I-TEQs dos seus 17 conxéneres, obtendo un valor indicativo. Recentemente a OMS propuxo un novo concepto de I-TEQ que inclúe os factores de equivalencia para PCBs coplanares (Van den Berg e col., 1998).

PCDFs	I-TEF	PCDDs	I-TEF
2,3,7,8-TCDF	0,1	2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	1,2,3,7,8-PeCDD	0,5
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5		
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		0,01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,01	OCDD	0,001
Os prefixos T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta e O = octa indican o grao de cloración dos conxéneres.			

Táboa 1. Factores de equivalencia tóxica (I-TEF) dos 17 conxéneres PCDDs e PCDFs

Fontes de formación e exposición a DLCs

Salvo os PCBs, os PCDD/Fs son subprodutos non intencionados da combustión incompleta da materia orgánica, xa sexa de fontes naturais (incendios forestais) ou antropoxénicas (incineración de lixos) (Tuppurainen e col., 2003).

Os procesos industriais (fabricación de papel ou de produtos químicos) e biolóxicos tamén contribúen en menor contía á súa liberación ao ambiente. No entanto, debido á resistencia dos PCBs a elevadas temperaturas utilizouse masivamente desde os anos 30 na fabricación de transformadores, capacitadores e fluídos hidráulicos, ata a súa prohibición en 1977. A pesar da súa prohibición, a exposición a PCBs aínda existe, debido á súa elevada persistencia no aire, solos e sedimentos acuosos. Ademais aínda forman parte de vellos dispositivos eléctricos, luces fluorescentes e electrodomésticos antigos que aínda seguen en uso.

A fonte máis importante de liberación de DLCs ao medio é a incineración de residuos sólidos (lixo municipal sólido, medicamentos e refugallos médicos, residuos perigosos, etc.), a queima de combustibles fósiles (carbón e derivados do petróleo), así como os incendios accidentais incontrolados (incendios forestais, erupcións volcánicas, etc.).

A elevada persistencia ambiental das dioxinas pode incrementarse ao permanecer ligadas a substratos orgánicos ou inorgánicos que serven como reservorios. Os DLCs son compostos estables e moi resistentes á maioría dos procesos de degradación ambiental. Os procesos de transformación dos DLCs comprenden a fotoxidación atmosférica mediada por radicais libres, a fotólise no aire, solo e auga e a biodegradación polos microorganismos do solo.

Toxicocinética

A absorción prodúcese ao longo do tracto gastrointestinal. A velocidade de absorción depende do grao de cloración destes. Desta maneira os derivados hepta- e octo-substituídos son absorbidos máis lentamente que os que teñen un menor grao de cloración. Debido á súa alta liposolubilidade prodúcese unha rápida redistribución orgánica, unidos a proteínas plasmáticas, concentrándose finalmente en tecidos graxos: tecido adiposo > SNC > fígado > graxa subcutánea. Unha vez acumulados nos depósitos graxos a súa biodispoñibilidade orgánica acostuma ser moi baixa.

Todos estes compostos son moi estables e sofren unha metabolización continua pero moi lenta. O aclaramento destes compostos depende do conxénere, de modo que o grao de cloración favorece a súa acumulación no organismo. A eliminación pode ser urinaria ou biliar, de maneira que pode aumentar a súa biodispoñibilidade orgánica ao sufrir sucesivos ciclos enterohepáticos.

Mecanismo de acción

A semellanza dos efectos tóxicos causados polos PCDD/Fs e PCBs coplanares sustentan a hipótese de que estas substancias teñen un mecanismo de acción común. A unión e activación do receptor citosólico AhR (receptor hidrocarburo de arilo ou receptor de dioxina) por estes compostos, e a indución de xenes nucleares específicos de resposta a dioxinas, é a hipótese actual de traballo (Figura 3). O receptor AhR é un factor de transcrición que actúa unha vez que se uniu un ligando ao seu centro activo funcionando como un sensor biolóxico de sinais externos e internos (Bock, 1994).



Os DLCs e outras substancias semellantes únense reversiblemente ao receptor AhR que ten que ser previamente estabilizado no citoplasma por unha proteína de 90 kDa (HSP 90) e pola chaperona XAP2. Este complexo estabilizado desprázase cara ao núcleo celular coa axuda dunha importina onde o AhR queda libre uníndose a un translocador nuclear (ARNT). O heterodímero AhR/ARNT identifica certas rexións do ADN cromosómico denominadas Elementos de Resposta a Dioxinas (ERDs), e induce a transcrición dos xenes situados corrente abaixo, entre eles diferentes isoencimas CYP1A1 con actividades hidrocarburo aromático hidroxilasa (AHH) e etoxiresorufina O-desetilasa (EROD) (Figura 4).

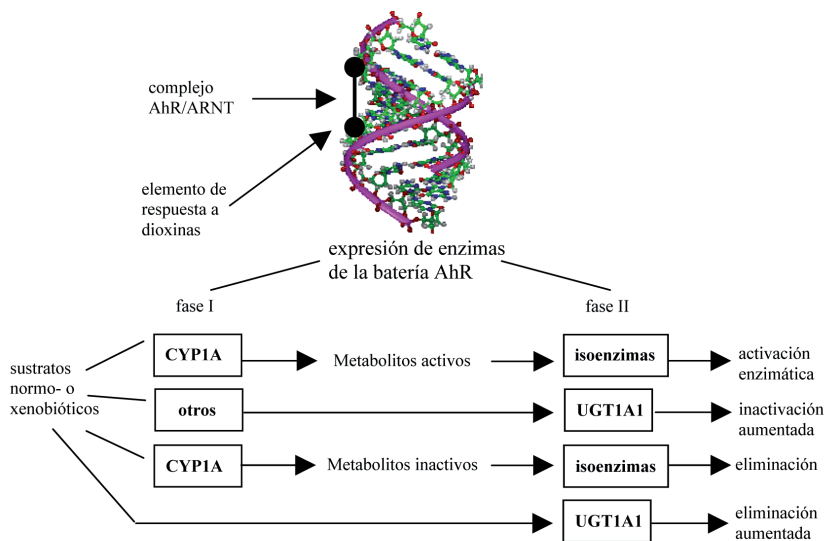


Figura 4. Posibles consecuencias da expresión dos xenes ligados aos elementos de resposta a dioxinas (ERDs), relacionados co metabolismo de xenobióticos

O receptor AhR está presente nos tecidos de multitude de especies animais cun elevado grao de conservación filoxenética (Hahn, 2002) e é estruturalmente semellante aos receptores citosólicos para esteroides. No entanto, ningunha hormona ten capacidade de unirse a este receptor, nin reciprocamente, os derivados clorados teñen afinidade polos receptores esteroides. A unión dos PCDDs ao receptor AhR non garante unha resposta biolóxica. Deste modo, os hidrocarburos aromáticos policíclicos, flavonas substituídas e cumarinas poden unirse ao receptor AhR, pero non producen os seus efectos tóxicos e son axiña metabolizados.

Toxicidade

Mentres que os PCDD/Fs se encontran entre os compostos de orixe antropoxénica máis tóxicos a dose única, non ocorre así cos PCB.

1. EFECTOS DÉRMICOS Cloracné Hiperqueratose Hiperpigmentación Elastose	4. EFECTOS SISTÉMICOS Fibrose hepática suave Incremento das transaminasas séricas Hipercolestereolemia Hipertrigliceridemia Apetito reducido e perda de peso Problemas dixestivos Dor en músculos e articulacións Glándulas linfáticas inchadas Problemas cardíacos Problemas do tracto urinario Dificultades respiratorias Problemas pancreáticos
2. EFECTOS NEUROLÓXICOS Alteracións sexuais Dores de cabeza Neuropatías Alteracións visuais Diminución dos sentidos do oído e do olfacto	
3. EFECTOS PSICOLÓXICOS Alteración do soño Depresión Enerxías reducidas Arranques de mal humor	

Táboa 2. Signos e síntomas da exposición a elevadas concentracións de TCDD en humanos

En animais de experimentación, a morte prodúcese despois dunha progresiva perda de peso acompañada por unha redución drástica do consumo de alimento. Os efectos somáticos son moi semellantes en todas as especies estudadas, independentemente da súa susceptibilidade e inclúen neuropatía periférica, fatiga, depresión, cambios da personalidade, adelgazamento, hepatite, hepatolia, *porfiria cutánea tarda* e erupcións cutáneas acneiformes (Mukerjee, 1998). Os efectos agudos da intoxicación son unha consecuencia da interacción das dioxinas co receptor AhR. Ratos transxénicos nos que se anulou o xene codificante do receptor AhR (ratos AhR⁻) son 10 veces menos susceptibles á administración de TCDD ($DL_{50} = 2000 \pm g/kg$ de peso corporal), non presentando ningún dos síntomas de intoxicación descritos con anterioridade (González e Fernández-Salguero, 1998).

Non entanto, son os efectos a longo prazo, os que resultan máis perigosos e difíciles de controlar (Hays e Aylward, 2003). Entre os efectos máis relevantes inclúense: cloracné, inmunotoxicidade, hepatotoxicidade, carcinoxenicidade e efectos embriotóxicos e da reprodución e indución do estrés oxidativo.

Dioxinas, PCBs e furanos estrés oxidativo e antioxidantes

O estrés oxidativo pode definirse como unha alteración no sistema antioxidante, o cal non é capaz de contrarrestar adecuadamente os radicais libres e as especies reactivas do oxíxeno (ROS) e deter as reaccións en cadea de peroxidación lipídica

Entre os principais mecanismos de toxicidade das dioxinas e os seus bioisoésteres está o estrés oxidativo que pode ser a causa do dano tisular producido pola exposición a estes compostos. Distintos estudos demostraron que tras a administración de doses agudas de TCDD a animais de experimentación indúcese ROS, probablemente a través da interacción co receptor AhR (Bagchi e Stohs, 1993; Alsharif e col., 1994b), peroxidación lipídica (Stohs e col., 1983, 1990; Mohammadpour e col., 1988) e dano no ADN (Wahba e col., 1988; Stohs e col., 1990) e decrece a fluidez da membrana e o glutatión hepático, ademais de noutros tecidos (Stohs e col., 1990). Estudos posteriores demostraron incrementos significativos na produción de anión superóxido en fígado aumentando tamén a peroxidación lipídica, ademais de supresións significativas nos niveis de glutatión e de alfa-tocoferol (Slezak e col. 1999) tras a exposición a estes compostos.

Efecto protector dos antioxidantes fronte a dioxinas

Para evitar a acción dos radicais libres, as células dos mamíferos posúen sistemas de defensa antioxidante tanto de natureza encimática como non encimática.

Se consideramos o dano oxidativo como unha posible consecuencia da exposición ás DLCs, a incorporación na dieta de axentes antioxidantes deberían exercer un efecto protector, existen estudos que demostran o efecto beneficioso dos antioxidantes fronte á toxicidade das dioxinas.

En ensaios realizados con animais de experimentación púidose observar como aqueles animais pretratados con Butil Hidroxil Anisol (BHA), coñecido antioxidante de orixe sintética, resistían doses letais de TCDD, debéndose este efecto protector non só ao seu efecto antioxidante (Stohs e col., 1984; Hassan e col., M.Q. 1987).

Outros antioxidantes como a vitamina A e E non obstante exercen unha protección limitada contra a toxicidade destes xenobióticos (Alsharif e Hassoun, 2004).

Conclusións, evolución e riscos futuros

Diminuír a exposición a residuos de DLCs na dieta como resultado da restrición das fontes de liberación ambiental é o obxectivo prioritario das administracións europeas. A drástica redución nos últimos 30 anos é unha consecuencia do descenso substancial na exposición aos ditos compostos (estímase que entre un 90-95% desde finais dos anos 60 e comezos dos 70). Xa que as cargas corporais diminuíron significativamente neste período, as previsións para os próximos anos non terán o impacto das décadas anteriores. Estimacións feitas ata o ano 2030 suxiren que incluso unha redución de 10 veces nos valores actuais de exposición (unha diminiu-

ción pouco posible baseándose co coñecemento actual das fontes de contaminación por DLCs en alimentos) afectaría só marxinalmente a os niveis séricos destes compostos.

Un estudo comparativo da evolución da carga ambiental e corporal de DLCs nos últimos 70 anos demostrou que ambos os dous parámetros diminuíron drasticamente nos últimos 30 anos e que tal caída continuará nun futuro próximo sen ningunha necesidade adicional de medidas reguladoras (Aylward e Hays, 2002). Desde os anos 70, as emisións de dioxinas desde fontes cuantificables –vertedoiros, incineradores e combustión de gasolinas con chumbo– diminuíron drasticamente e así seguirá no futuro próximo. Os datos toxicocinéticos para o TCDD indican que a inxestión desta dioxina diminuíu en máis dun 95% desde os niveis anteriores a 1972 e que a inxesta para todos os demais conxéneres diminuíu polo menos en 10 veces neste mesmo período. Reflexo da diminución na exposición e inxesta de TCDD as cargas corporais de TCDD diminuíron nun 90% entre 1970 e 2000, e se os niveis de exposición contiñan diminuindo á mesma velocidade que en 2000, as cargas corporais caerán nun 50 % das actuais en 2010. Para o resto dos conxéneres a carga corporal diminuirá algo máis lentamente debido a que as vidas medias dalgúns deles son superiores ás do TCDD.

Só mediante o cumprimento estrito das medidas reguladoras establecidas polas administracións, e o control periódico das fontes potenciais de liberación ao medio e das rutas de entrada na dieta humana, poderase garantir a seguridade dos alimentos, ameazada por estes contaminantes insidiosos pola súa persistencia e a súa toxicidade.

BIBLIOGRAFÍA

- Alsharif, N.Z., Schlueter, W.J., Stohs S.J. (1994). *Arch. Environ. Contam Toxicol*, 26, 392-397.
- Alsharif, N.Z., Hassoun, E.A. (2004). *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol*, 95, 131-138
- Bock, K.W. (1994). *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 125, 1-42.
- Dwyer, J.H. Flesch-Janys, D. (1995). *Am J Public. Health*, 85, 476-478
- González, F.J., Fernández-Salguero, P. (1998). *Drug. Metab. Dis*, 26, 1194-1198.
- Hahn, M.E. (2002). *Chem. Biol. Interact*, 141, 131-160.
- Hays, S.M., Aylward, L.L. (2003). *Regul. Toxicol. Pharmacol*, 37, 202-217.
- Hassan, M.Q. Mohammadpour, H. Hermansky, S.J. e col. (1987). *Gen. Pharmacol*, 18, 547-550
- Mohammadpour, H., Murray, W.S., Stohs, S.J. (1988). *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 17, 645-650.
- Mukerjee, D. (1998). *J. Air Waste Manag. Assoc*, 48, 157-165.
- Pesatori, A.C., Consonni, D., Bachetti, S. e col. (2003) *Ind. Health*, 41, 127-138.
- Taylor, P.H., Lenoir, D. (2001). *Sci. Total. Environ*, 269, 1-24.
- Stohs, S.J., Hassan, M.Q., Murray, W.J. (1984). *Xenobiotica*, 14, 533-537.
- Stohs, J.S. (1990). *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 79-90

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

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

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



MICOTOXINAS, ESTRÉS OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Teresa Cabaleiro

Laboratorio de Toxicoloxía. Facultade de Ciencias. Universidade de Vigo

Micotoxinas: aspectos xerais

As micotoxinas [do grego *mykes* (fungos) e *toksicon* (veleno)] son metabolitos secundarios sintetizados por fungos ao final da fase de crecemento sobre diversos alimentos, fundamentalmente cereais e froitas, baixo determinadas condicións. Os principais xéneros produtores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Alternaria* (Bennett e Keller, 1997). Entre as micotoxinas máis comúns, distribuídas por todo o mundo, encóntranse as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas. Constitúen un risco importante en seguridade alimentaria, xa que a súa presenza en niveis superiores aos tolerables representa unha ameaza para a inocuidade dos alimentos e ademais reducen o valor nutritivo destes.

As necesidades xerais para o crecemento fúngico inclúen: un substrato facilmente utilizable, carbohidratos (proporcionados polo amidón ou a celulosa); humidade elevada no alimento (10-18%) e no ambiente (polo menos do 70%); xeralmente condicións aerobias; adecuada temperatura (varía co fungo, aínda que adoitan estar nun rango entre 12°C a 25°C); pH alcalino; etc.

A contaminación de alimentos por micotoxinas e o transporte destas a través da cadea alimenticia teñen que ser controlados con precaución, xa que a baixas concentracións poden inducir alerxias, erupcións cutáneas, neurotoxicidade e outros trastornos. A inxesta de micotoxinas pode levar consigo efectos agudos, crónicos a longo prazo, efectos teratoxénicos, carcinoxénicos (principalmente en fígado e ril), estroxénicos ou inmunosupresores en animais e en humanos, sendo normalmente os animais os que sofren máis os seus efectos tóxicos debido á inxesta de alimentos de menor calidade. O consumo de pensos preparados con ingredientes como as sementes oleaxinosas de cacahuete, algodón, coco ou grans de millo contaminados con micotoxinas non só provocan micotoxicose nos animais, senón que crean tamén problemas de residuos de micotoxinas en produtos animais destinados ao consumo humano, tales como o leite, a carne e os ovos.

O estrés oxidativo acontece nas células como consecuencia dos procesos fisiolóxicos normais e interaccións co medio natural, e os sistemas de defensa antioxidante xogan un papel na protección contra o dano oxidativo. O mecanismo de acción das micotoxinas está mediado pola produción de radicais libres e especies reactivas de oxíxeno (ROS). As micotoxinas desenvolven os seus efectos biolóxicos a través da

súa unión aos fosfolípidos que conforman a membrana celular. Esta unión activa as encimas fosfolipasas que degradan os lípidos da membrana dando lugar a ácidos graxos poliinsaturados, que son un substrato para a peroxidación lipídica e xeración de ROS, o que finalmente conduce á aparición de efectos citotóxicos. Os antioxidantes iniben as reaccións de radicais libres mediante a captación ou *scavenging* de radicais e a formación dun radical antioxidante máis estable.

As micotoxinas alteran a membrana celular mediante peroxidación lipídica, e as substancias antioxidantes posúen propiedades protectoras fronte á toxicidade destes xenobióticos. É importante destacar o papel da dieta, xa que achega antioxidantes implicados nos procesos de detoxificación e reducen a toxicidade e o dano ocasionado por radicais libres producidos por micotoxinas. Ademais, as reaccións implicadas na detoxificación están conducidas por encimas que requiren cofactores, coencimas e outras moléculas, proporcionadas a través da dieta.

O estrés oxidativo como mecanismo de acción tóxica na toxicodinamia das micotoxinas

a. Ocratoxinas

As ocratoxinas -toxina máis estudada e representativa na ocratoxina (OTA)- son sintetizadas por fungos dos xéneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Kuiper-Goodman e Scott, 1989). A exposición no home provén da inxesta de produtos vexetais contaminados, tales como cereais, pan, cervexa, café, especias, froitas, zume de uva, viño e derivados do porco. A dita exposición está confirmada pola detección de OTA en plasma e ouriños en concentracións nanomolares (Scott, 2005).

O órgano diana das ocratoxinas é o ril. A ocratoxina A é nefrotóxica, sendo un factor determinante no desenvolvemento da nefropatía endémica dos Balcáns. Así mesmo, esta micotoxina é citotóxica, xa que inibe a síntese de proteínas por competición co aminoácido fenilalanina e induce apoptose. Está clasificada como carcinóxeno do grupo 2B ("posible carcinóxeno humano") pola Axencia Internacional de Investigación sobre o Cancro (IARC, 1993), sendo o dano oxidativo ao DNA o seu mecanismo de carcinoxenicidade. O estrés oxidativo pode ser debido a un descenso do sistema de defensa antioxidante ou ben por un aumento na produción de ROS, e evidenciouse que a OTA aumenta os niveis de ROS, malondialdehído (MDA) e a expresión da encima hemooxigenasa 1 (HO-1) (Baudrimont e col., 1997; Rahimtula e col., 1988), e, por outro lado, descende os niveis de glutatión reducido (GSH) e tocoferol (Schaaf e col., 2002; Gautier e col., 2001). A xeración de ROS está mediada pola formación dun complexo OTA-Fe³⁺ (Omar e Rahimtula, 1993). A OTA facilita a redución de Fe³⁺ a Fe²⁺ pola NADPH-citocromo p450 redutasa (Omar e col., 1991), e o Fe²⁺ en presenza de O₂ proporciona as especies activas que inician a peroxidación

lipídica. Ademais, a inhibición do mecanismo de defensa antioxidante celular contribúe á carcinoxenicidade da OTA en ril (Fig. 1). A OTA diminúe a expresión xenes regulados polo factor de transcripción Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), que está implicado na defensa antioxidante e a detoxificación, o cal reduce a capacidade de resposta ao estrés oxidativo, e en consecuencia as células do ril son máis vulnerables á toxicidade inducida por OTA, favorecendo o desenvolvemento de tumor (Marin-Kuan e col., 2006).

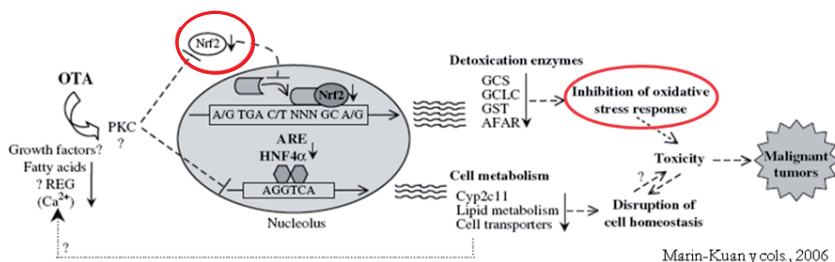


Figura 1. Figura do mecanismo de carcinoxenicidade da ocratoxina A (adaptado de Marin e col., 2006)

b. Aflatoxinas

As aflatoxinas son micotoxinas sintetizadas polas especies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O representante máis tóxico é a aflatoxina B1 (AFB1). As aflatoxinas poden contaminar alimentos como cereais, sementes oleaxinosas, especias, froitos secos, leite, etc. O órgano diana é o fígado, sendo hepatocarcinóxena (Shen e col., 1996). A correlación positiva entre o consumo de alimentos contaminados con AFB1 e o incremento da incidencia do cancro de fígado nalgunhas poboacións de Asia e África levou á clasificación da AFB1 como carcinógeno do grupo 1 (“carcinógeno para o ser humano”) pola Axencia Internacional de Investigación sobre o Cancro (IARC, 2002).

O seu principal mecanismo de acción implica a formación de aductos entre o ADN e o metabolito carcinógeno da AFB1, o AFB-8,9-epóxido (McGlynn e col., 2003) (Fig. 2). A AFB1 metabolízase por oxixenases do sistema citocromo p-450 hepático ao intermediario AFB1-8,9-epóxido, o cal ataca residuos de guanina no ADN de dobre cadea, causando roturas na febra de ADN e mutacións puntuais do tipo transversión G:C a T:A, o que leva consigo a substitución de serina no residuo 249 de p53 (proteína implicada no control do ciclo celular) no carcinoma hepatocelular.

Figura 2. Formación de aductos entre o AFB1-8,9-epóxido e o ADN (McGlynn e col., 2003)

Ademais, evidenciouse que a AFB1 induce a formación de 8-hidroxidiguanina (8-OHdG) (Shen e col., 1995), que está considerado marcador do dano oxidativo ao ADN, indicando o papel importante de ROS na citotoxicidade deste hepatocarcinóxeno.

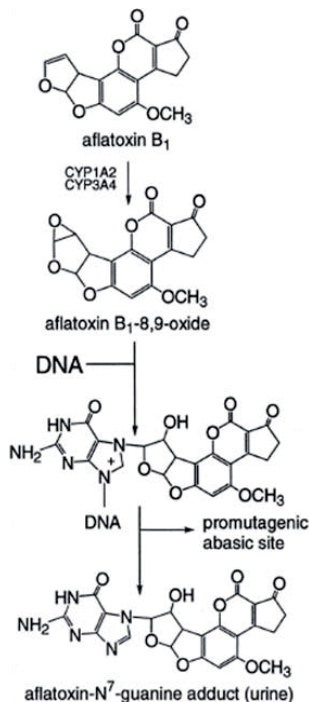
c. Zearalenona

A zearalenona é sintetizada por fungos do xénero *Fusarium sp.* Contamina principalmente o millo, outros cereais e derivados (cervexa). A súa citotoxicidade maniféstase pola inhibición da proliferación celular e a síntese de proteínas. Ademais, é xenotóxica e carcinoxénica en animais de experimentación, hepatotóxica e inmunotóxica. Así mesmo, é estroxénica, activa o receptor de estróxenos, o que está asociado con desordes reprodutivas en animais. Ademais, altera o metabolismo dos fosfolípidos da membrana e libera altas cantidades de ácidos graxos insaturados, o que conduce á formación de peróxidos lipídicos.

Evidenciouse que esta micotoxina induce estrés oxidativo no ril e fígado, xa que aumenta os niveis de MDA e diminúe os de glutatión reducido (GSH) (Hassen e col., 2007). Ademais, diferentes toxinas de *Fusarium sp.* son capaces de danar o ADN (fragmentación e metilación do ADN) e inducir citotoxicidade (inhibición da proliferación celular e a síntese de proteínas) (Kouadio e col., 2007). Todo iso apunta ao dano oxidativo como posible vía implicada na toxicidade da zearalenona. Por outro lado, a zearalenona induce a expresión de Hsp 70 (Galvano e col., 2002), o que constitúe un mecanismo de defensa celular importante, xa que o Hsp 70 posúe efectos citoprotectores.

d. Fumonisin

A fumonisin B1 (FB1) é o representante máis tóxico dentro do grupo das fumonisin, sendo sintetizada polo fungo *F. verticillioides*, que contamina millo e outros cereais. Ademais dunha exposición dietética, tamén hai que ter en conta a exposición aérea en humanos a cepas produtoras de FB1, debido a que *F. verticillioides* pode crecer en edificios con humidade. A FB1 induce estrés oxidativo e a perda de mecanismos protectores. Entre os efectos tóxicos máis sobresaíntes destas mico-



toxinas encóntranse a neurotoxicidade, inmunotoxicidade e hepatotoxicidade. Concretamente, na neurotoxicidade inducida por FB1 está implicado o estrés oxidativo e a apoptose (Stockmann-Juvala e col., 2004). Así, a FB1 aumenta peroxidación lipídica e a produción de ROS, diminúe os niveis de GSH e a actividade superóxido dismutasa (SOD), reduce a viabilidade celular e induce apoptose. A fumonisina FB1 é inmunotóxica, xa que incrementa a permeabilidade de membrana en linfocitos, o que as fai máis susceptibles á oxidación (Yin e col., 1998). Por outro lado, existe unha relación entre as fumonisinas e o aumento da incidencia de cancro de fígado en humanos (Sun e col., 2007).

e. Tricotecenos

Os tricotecenos son micotoxinas producidas por *Fusarium sp.*, que se caracterizan pola presenza dun núcleo 12,13-epoxitricoteceno na súa molécula. Detectáronse catro tricotecenos como contaminantes naturais en alimentos, principalmente trigo e derivados (fariña, pan e cereais para o almorzo), millo, avea, cebada, centeo e arroz: toxina T-2, nivalenol, desoxinivalenol e diacetoxiscirpenol, sendo os máis importantes a toxina T-2 e o desoxinivalenol.

e.1. Desoxinivalenol.- O desoxinivalenol (DON) é o tricoteceno que se detecta con maior frecuencia. É producido por *F. graminearum* e *F. culmorum*, patóxenos vexetais que causan o brote de golpe branco do trigo. O DON é hepatotóxico e causa desordes gastrointestinais. Recibe o seu nome común, vomitoxina, polos vómitos que normalmente acompañan a intoxicación por tricotecenos. Ademais, é un factor determinante da Aleukia Tóxica Alimentaria (ATA), debida ao consumo de trigo almacenado ao aire libre infectado con *Fusarium*. A dita enfermidade cursa coa aparición de puntos na pel, anxina necrótica, leucopenia e múltiples hemorraxias. En relación á xeración de estrés oxidativo, o DON aumenta peroxidación lipídica (Kouadio e col., 2005) e diminúe os niveis de GSH e a actividade SOD e catalasa (Rizzo e col., 1994).

e.2. Toxina T-2.- A toxina T-2 é o tricoteceno máis tóxico. Está sintetizado por *Fusarium sp.*, e é un contaminante natural en cereais, sementes e vexetais. A toxina T-2 é hepatotóxica, e o seu mecanismo de hepatotoxicidade está baseado na indución de peroxidación lipídica por xeración de radicais libres, alterando a estrutura das membranas celulares (Rizzo e col., 1994). Ademais, a toxina T-2 pode unirse ao grupo-SH do glutatión, reducindo os seus niveis, e altera actividade encimas antioxidantes (Suneja e col., 1989).

Antioxidantes e toxicidade de micotoxinas

As propiedades protectoras dos antioxidantes son probablemente debidas á súa capacidade de captar radicais libres actuando como *scavengers*, de reducir a xeración de ROS e diminuír a peroxidación lipídica, protexendo así as membranas celulares

do dano inducido por micotoxinas. Demostrouse a capacidade que presentan algunhas substancias naturais con propiedades antioxidantes na prevención dos efectos oxidativos inducidos polas micotoxinas (Zourgui e col., 2008; Costa e col., 2007a; Guerra e col., 2005).

a. Carotenoides

Os carotenoides (carotenos e xantofilas) son un grupo de antioxidantes lipídicos baseados nun esqueleto carbonado isoprenoide, con propiedades antimutaxénicas e anticarcinoxénicas. Están presentes naturalmente nalgúns alimentos, como cenorias, tomates encarnados, manteiga, queixo, aceite de palma, salmón vermello, pemento e grans de millo. Son scavengers de radicais libres, preveñen a peroxidación lipídica, e son precursores da vitamina A (retinol), que tamén ten propiedades antioxidantes. Os carotenoides diminúen o dano no DNA de hepatocitos inducido por AFB1 en ratas debido a que transforman a AFB1 nun metabolito menos tóxico, a AFM1, reducindo o desenvolvemento de cancro de fígado inducido por AFB1 (Gradelet e col., 1998). Ademais, o carotenoide licopeno, un pigmento encarnado presente principalmente no tomate, reduce o estrés oxidativo inducido pola toxina T-2 (Leal e col., 1999), observándose un descenso dos niveis de MDA e un incremento do contido de GSH.

b. Vitaminas A, C e E

Atribuíronse accións protectoras ás vitaminas A (retinol), C (ascorbato) e E (alfatocoferol) fronte á exposición a micotoxinas. Estas vitaminas poden actuar como scavenger do radical superóxido, peróxido de hidróxeno, radical peroxilo, ácido hipocloroso e oxíxeno de singlete.

b.1. Protección fronte á toxicidade de ocratoxinas. As vitaminas A, C e E reducen os aductos entre OTA e ADN no ril e fígado de rato (Grosse e col., 1997) preveñen a redución da viabilidade celular e descenden a produción de ROS (Baldi e col., 2004). Ademais, en ratos expostos a esta micotoxina evidenciouse que a vitamina C reduce as alteracións tanto en cromosomas mitóticos e meióticos como na morfoloxía da cabeza de espermatozoides (Bose e Sinha, 1994). Por outro lado, suplementos de vitamina E administrada a polos contrarrestan parcialmente a formación de peróxidos lipídicos debido á exposición a OTA (Hoehler e Marquardt, 1996).

b.2. Protección fronte á toxicidade de aflatoxinas. As vitaminas C e A son efectivas en reducir a unión AFB1-DNA e o dano ao ADN inducido pola dita micotoxina (Yu e col., 1994). O diferente estatus de vitamina A está fortemente relacionado coa hepatocarcinoxenicidade da AFB1 en ratas (Webster e col., 1996). De feito, observouse un incremento do dano do DNA inducido por AFB1 durante unha deficiencia de vitamina A, mentres que o dano foi revertido con suplementos de vitamina A. Ademais, a

administración de vitamina E inhibe a peroxidación lipídica no fígado inducida por AFB1 (Cassand e col., 1993).

b.3. Protección fronte á toxicidade da zearalenona. As vitaminas A, C e E reducen os aductos co ADN e o dano oxidativo ao ADN no ril e fígado de rato expostos a zearalenona (Grosse e col., 1997). A vitamina E é capaz de previr a xenotoxicidade inducida pola zearalenona, actuando como análogo estrutural desta micotoxina ou como antioxidante (Ouanes e col., 2003). O pretratamento con vitamina E reduce o dano oxidativo inducido por zearalenona en hepatocitos (Hassen e col., 2007). A especificidade da protección atribúeselle á similitude estrutural da vitamina E e zearalenona (Ghédira-Chékir e col., 1998).

b.4. Protección fronte á toxicidade de tricotecnos. As vitaminas E e C presentan actividade antioxidante e protexen o bazo e o cerebro contra o dano inducido pola toxina T-2 e DON nas membranas celulares, feito observado na rata (Rizzo e col., 1994). Por outro lado, evidenciouse en polos que a administración de suplementos de vitamina E contrarresta parcialmente a formación de peróxidos lipídicos debido á exposición á toxina T-2 (Hoehler e Marquardt, 1996).

c. Catequinas

As catequinas son compostos fenólicos presentes nas follas de té verde, chocolate e algunhas plantas. Posúen propiedades anticancerixenas e antioxidantes, xa que teñen capacidade para quelar Fe^{+3} e Cu^{+2} (Kuo e col., 1998). As catequinas poden mostrar un carácter lipofílico parcial e penetrar no interior das membranas, onde o principal iniciador acuoso da oxidación lipídica, o radical hidroxilo, é atrapado facilmente e é accesible para radicais peroxilo iniciadores da cadea. As catequinas preveñen a citotoxicidade inducida por OTA, xa que reducen a produción de ROS inducida pola dita micotoxina (Costa e col., 2007a). Ademais, estes compostos fenólicos inducen a actividade da glutatión S-transferasa citosólica, que estimula a formación do conxugado AFB1/glutatión, evitando que a dita aflatoxina se una ao ADN (Aboobaker e col., 1994).

d. Cianidín-3-glucopiranosido (C-3G)

O cianidín-3-glucopiranosido (C-3-G) é un polifenol, concretamente un antociano, presente en laranxas, silva, amorodos, arandos e outras froitas e vexetais, é o responsable da súa pigmentación. Posúe un gran poder antioxidante debido á presenza na súa estrutura química de varios grupos hidroxilos fenólicos. Demostrouse que o tratamento con C-3-G ten efectos citoprotectores fronte ao dano celular inducido por AFB1 e OTA, xa que inhibe a citotoxicidade, reduce a produción de ROS e contrarresta a inhibición da síntese de ADN e proteínas e a apoptose causadas por ambas as dúas micotoxinas (Guerra e col., 2005).

e. Melatonina

A melatonina é unha indolamina con actividade antiproliferativa e potencialmente anticarcinóxénica (García-Navarro e col., 2007), considerada un *scavenger* de radicais libres e antioxidante. Protexe fronte ao dano oxidativo causado por micotoxinas, feito demostrado pola inhibición da produción microsomal de H_2O_2 inducida por AFB1 no fígado (Awney e col., 2002), a redución da peroxidación lipídica inducida por OTA (Fig. 3) e a restauración dos niveis das actividades glutatión peroxidasa, catalasa e superóxido dismutasa no fígado e soro de rata alterados tras a exposición a OTA (Soyöz e col., 2004). Ademais, tamén reduce a apoptose causada por AFB1 no fígado (El-Gibaly e col., 2003).

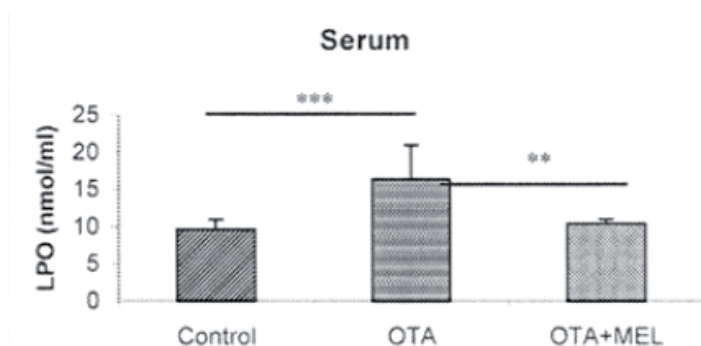


Figura 3. A melatonina (MEL) reduce a peroxidación lipídica (LPO) inducida por ocratoxina A (OTA). (Adaptado de El-Gibaly e col., 2003)

f. N-acetil-serotonina

A N-acetil-serotonina é un precursor da melatonina que protexe fronte ao dano oxidativo. De feito, reduce a peroxidación lipídica inducida por ascorbato- Fe^{2+} en microsomas e mitocondrias de testículo (Gavazza e Catalá, 2004) e de fígado de rata (Leaden e Catalá, 2007). Gesing e Karbownik-Lewinska (2008) observaron que a administración de N-acetil-serotonina diminúe a peroxidación lipídica (MDA) inducida por AFB1 no cerebro, fígado e pulmón.

g. Romeu

O ácido carnósico é un composto polifenólico presente no romeu (*Rosmarinus officinalis*), con capacidade como *scavenger* de radicais libres e de redución dos niveis de ROS. O pretratamento con ácido carnósico ten un efecto citoprotector, xa que reduce a morte celular inducida pola exposición a AFB1 (Costa e col., 2007b) e inhibe a formación de aductos de ADN con AFB1 (Offord e col., 1997).

h. Ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico é un composto fenólico natural presente na salvia, albahaca e menta. Renzulli e col. (2004) demostraron o seu efecto citoprotector fronte á OTA e AFB1, ademais de atenuar a produción de ROS, a inhibición da síntese de ADN e proteínas e a apoptose, nunha liña celular de hepatoma humano.

i. Café

O café posúe compostos con capacidade antioxidante, como os diterpenos cafestol e kahweol, e o ácido cafeico. Estes compostos protexen fronte á unión de AFB1 e ADN (Cavin e col., 2001). No entanto, a cafeína potencia a xenotoxicidade de AFB1.

j. Cactos

O extracto de cactos é efectivo na protección fronte ao dano oxidativo causado pola zearalenona. De feito, observouse que a administración de extracto de cactos reverte o incremento de peroxidación lipídica inducida por zearalenona no fígado e ril (Zourgui e col., 2008).

k. Viño tinto

O viño tinto contén unha serie de compostos que lle confiren un efecto protector fronte á nefrotoxicidade por OTA, mediante a limitación do dano oxidativo. Os ditos compostos son o resveratrol, o ácido cafeico, as catequinas e a quercetina. A ocratoxina A aumenta os niveis de peróxidos lipídicos no ril e descende a actividade SOD e a ratio GSH/GSSG. Se se administra con viño tinto, a OTA é menos nefrotóxica, redúcese o dano oxidativo, restaurando os niveis de GSH e preservando a ratio GSH/GSSG (Bertelli e col., 2005).

l. Pementa

A pementa negra contén un alcaloide, a piperina, que é un axente protector fronte aos efectos carcinoxénicos da AFB1, xa que reduce a actividade das monooxixenases do citocromo p-450 e contrarresta a toxicidade de AFB1 (Reen e col., 1997).

m. Aspartamo

Compostos prometedores na prevención dos efectos tóxicos da OTA son os análogos estruturais e/ou compostos cunha alta afinidade de unión por proteínas plasmáticas, entre eles o aspartamo, un edulcorante. Os efectos protectores do aspartamo sobre a nefrotoxicidade inducida por OTA poderían estar baseados na unión competitiva a proteínas plasmáticas, transporte ou distribución a tecidos ou a eliminación da toxina nos ouriños (Creppy e col., 1998). Ademais, o aspartamo reduce o incremen-

to dos niveis de MDA (peroxidación lipídica) e contrarresta a inhibición da síntese proteica inducidos pola exposición a OTA (Baudrimont e col., 1997), prevendo os seus efectos tóxicos, incluíndo a xenotoxicidade.

n. Glucomananos

Os glucomananos son polisacáridos presentes na parede celular de lévedos. Cando se administran nunha dieta contaminada, como estes produtos non son dixeridos, a micotoxina adsorbida é excretada a través das feces. A exposición combinada de glucomananos e alimentos con toxina T-2 restaura a concentración de GSH e reduce a peroxidación lipídica inducidas pola micotoxina (Dvorska e col., 2007).

o. Herbas medicinais e extractos de plantas

Hai algunhas plantas que conteñen compostos con efectos beneficiosos para a protección fronte á toxicidade inducida por micotoxinas. Actúan como antioxidantes, scavengers de radicais libres e inhibindo a peroxidación lipídica. Entre elas podemos destacar:

- *Cassia senna*: A administración dun extracto de etanol dun concentrado de *C. senna* inhibe o efecto mutaxénico da AFB1 (al-Dakan e col., 1995).
- Noz de anacardo: O extracto de noz de anacardo é efectivo en reducir o hepatocarcinoma inducido por AFB1 (Premalatha e Sachdanandam, 1999).
- Follas de pementa: A administración de extracto de metanol de follas de pementa diminúe o efecto xenotóxico de AFB1 (Hashim e col., 1994).
- A administración dun extracto do froito de *Schisandra chinensis* proporciona unha acción hepatoprotectora contra AFB1 pola estimulación do sistema hepático antioxidante e de detoxificación (Ip e col., 1996).

Finalmente, é importante ter en conta que nalgúns casos os posibles axentes protectores tamén son unha vía potencial de intoxicación. Este é o caso do café, té, uvas e herbas medicinais. De feito, débese ter precaución na promoción da acción antimicotóxica das substancias discutidas anteriormente, xa que algunhas delas poden ser carcinoxénicas e/ou ter propiedades tóxicas a doses concretas e en determinadas circunstancias.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboobaker, V.S., Balgi, A.D., Bhattacharya, R.K., (1994). *In Vivo*, 8, 1095-1098.
- al-Dakan, A.A., al-Tuffail, M., Hannan, M.A., (1995). *Pharmacol Toxicol*, 77, 288-292.
- Awney, H.A., Attih, A.M., Habib, S.L., e col. (2002). *Toxicology*, 172, 143-148.
- Baldi, A., Losio, M.N., Cheli, F., e col. (2004). *Br. J. Nutr*, 91, 507-512.
- Baudrimont, I., Ahouandjivo, R., Creppy, E.E. (1997). *Chem. Biol. Interact*, 104, 29-40.

- Bennett, J.W., Keller, N.P. (1997). En: Fungal Biotechnology (Ed. T. Anke). *Chapman & Hall, Weinheim*, 265-273.
- Bertelli, A.A., Migliori, M., Filippi, C. (2005). *J. Agric. Food Chem*, 53, 6924-6929.
- Bose, S., Sinha, S.P. (1994). *Food Chem. Toxicol*, 32, 533-537.
- Cassand, P., Decoudou, S., Lévêque F. (1993). *Mutat. Res*, 319, 309-316.
- Cavin, C., Mace, K., Offord, E.A. (2001). *Food Chem. Toxicol*, 39, 549-556.
- Costa, S., Utan, A., Cervellati, R., e col. (2007a). *Food Chem. Toxicol*, 45, 1910-1917.
- Costa, S., Utan, A., Speroni, E., e col. (2007b). *J. Appl. Toxicol*, 27, 152-159.
- Creppy, E.E., Baudrimont, I., Anne-Marie (1998). *Toxicol. Sci. 23Suppl*, 2, 165-172.
- Dvorska, J.E., Pappas, A.C., Karadas, F., e col. (2007). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 582-587.
- El-Gibaly, I., Meki, A.M., Abdel-Ghaffar, S.K. (2003). *Int. J. Pharm*, 260, 5-22.
- Galvano, F., Russo, A., Cardile, V., e col. (2002). *Food Chem. Toxicol*, 40, 25-31.
- García-Navarro, A., González-Puga, C., Escames, G., e col. (2007). *J. Pineal Res.*, 43, 195-205.
- Gautier, J.C., Holzhauser, D., Markovic, J., e col. (2001). *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 1089-1098.
- Gavazza, M.B., Català, A. (2004). *J. Pineal Res.*, 37, 153-160.
- Gesing, A., Karbownik-Lewinska, M. (2008). *Cell Biochem. Funct.*, 26, 314-319.
- Ghédira-Chékir, L., Maaroufi, K., Zakhama, A., e col. (1998). *Chem. Biol. Interact*, 113, 15-25.
- Gradelet, S., Le Bon, A.M., Bergès, R., e col. (1998). *Carcinogenesis*, 19, 403-411.
- Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., e col. (1997). *Cancer Lett*, 114, 225-229.
- Guerra, M.C., Galvano, F., Bonsi, L., e col. (2005). *Br. J. Nutr.*, 94, 211-220.
- Hashim, S., Aboobaker, V.S., Madhubala, R. e col. (1994). *Nutr. Cancer*, 21, 169-175.
- Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A.A., e col. (2007). *Toxicology*, 232, 294-302.
- Hoehler, D., Marquardt, R.R. (1996). *Poult Sci*, 75, 1508-1515.
- IARC, (1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 489.
- IARC, (2002). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 82. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 171.
- Ip, S.P., Mak, D.H., Li, P.C., e col. (1996). *Toxicol*, 78, 413-416.
- Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., e col. (2005) *Toxicology*, 213, 56-65.
- Kouadio, J.H., Dano, S.D., Moukha, S. e col. (2007). *Toxicon.*, 49, 306-317.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. (1989). *Environ. Sci*, 2, 179-248.
- Kuo, S.M., Leavitt, P.S., Lin, C.P. (1998). *Biol. Trace Elem. Res.*, 62, 135-153.
- Leaden, P.J., Catalá, A. (2007). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77, 29-35.
- Leal, M., Shimada, A., Ruíz, F., e col. (1999). *Toxicol. Lett.*, 109, 1-10.
- Marin-Kuan, M., Nestler, S., Verguet, C., e col. (2006). *Toxicol. Sci.*, 89, 120-34.
- McGlynn, K.A., Hunter, K., LeVoyer, T., e col. (2003). *Cancer Res.*, 63, 4594-4601.
- Offord, E.A., Macé, K., Avanti, O., e col. (1997). *Cancer Lett.*, 114, 275-281.
- Omar, R.F., Rahimtula, A.D., Bartsch, H. (1991). *J. Biochem. Toxicol*, 6, 203-209.

- Omar, R.F., Rahimtula, A.D. (1993). *Biochem. Pharmacol.* 46, 2073-2081.
- Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., e col. (2003). *Mutat. Res.*, 538, 63-70.
- Premalatha, B., Sachdanandam, P. (1999). *J. Ethnopharmacol.* 66, 131-139.
- Rahimtula, A.D., Béréziat, J.C., Bussacchini-Griot, V., e col. (1998). *Biochem. Pharmacol.* 37, 4469-4477.
- Reen, R.K., Wiebel, F.J., Singh, J. (1997). *J. Ethnopharmacol.* 58, 165-173.
- Renzulli, C., Galvano, F., Pierdomenico, L., e col. (2004). *J. Appl. Toxicol.* 24, 289-296.
- Rizzo, A.F., Atroshi, F., Ahotupa, M., e col. (1994). *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 41, 81-90.
- Schaaf, G.J., Nijmeijer, S.M., Maas, R.F., e col. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, 1588, 149-158.
- Scott, P.M. (2005). *Food Addit. Contam. 22 Suppl.* 1, 99-107.
- Shen, H.M., Ong, C.N., Lee, B.L. e col. (1995). *Carcinogenesis*, 16, 419-422.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Shen, Y., e col. (1996). *Free Radic. Biol. Med.*, 21, 139-146.
- Soyöz, M., Özçelik, N., Kiliç, I., e col. (2004). *Cell Biol. Toxicol.* 20, 213-219.
- Stockmann-Juvala, H., Mikkola, J., Naarala, J., e col. (2004). *Free Radic. Res.*, 38, 933-942.
- Sun, G., Wang, S., Hu, X., e col. (2007). *Food Addit. Contam.*, 24, 181-185.
- Suneja, S.K., Wagle, D.S., Ram, G.C. (1989). *Toxicon.*, 27, 995-1001.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K. (1996). *In Vivo*, 10, 113-118.
- Yin, J.J., Smith, M.J., Eppley, R.M., e col. (1998). *Biochim. Biophys. Acta*, 1371, 134-142.
- Yu, M.W., Zhang, Y.J., Blaner, W.S., e col. (1994). *Cancer*, 73, 596-604.
- Zourgui, L., Golli, E.E., Bouaziz, C., e col. (2004). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1817-1824.

TOXICOLOXÍA DE METAIS E ANTIOXIDANTES NATURAIS: CADMIO E MELATONINA

Alejandro Romero Martínez

Dpto. de Farmacoloxía e Terapéutica. Facultade de Medicina. Instituto de Investigación Teófilo Hernando. Universidade Autónoma de Madrid

Introdución

O cadmio (Cd) foi descuberto en 1817 polo químico alemán Friedrich Stromeyer nas incrustacións dos fornos de zinc. Aínda que tamén pode estar asociado a outros metais como o chumbo ou o cobre (Zubera-Cosano, 1993), ou formando compostos inorgánicos solubles na auga como cloruros, sulfuros e acetatos (Reilly, 1991). Trátase dun elemento non esencial para os seres vivos e está considerado como un dos 126 contaminantes principais pola Axencia de Protección Ambiental dos Estados Unidos (Waisberg e col., 2003). Presenta unha longa semivida no home; entre 10 e 30 anos (Satarug e col., 2004), aínda que outros autores o estiman entre 15 e 20 anos (Jin e col., 1998).

Presenza do cadmio no ambiente

O cadmio é un dos maiores axentes tóxicos asociado á contaminación ambiental e industrial, pois reúne catro das características máis temidas dun tóxico: a) efectos adversos para o home e o medio, b) bioacumulación, c) persistencia no medio e d) dispersión (Ramirez, 2002).

O cadmio obtense como subproduto do tratamento metalúrxico do zinc e do chumbo, a partir de sulfuro de cadmio; no proceso hai formación de óxido de cadmio, composto moi tóxico. Ademais de contaminar o ambiente desde a súa fundición e refinación, contamina tamén polos súas múltiples aplicacións industriais. Os principais usos e aplicacións do cadmio ou os seus compostos son: como pigmento en pinturas, esmaltes, plásticos, textiles, vidros, tintas de impresión, caucho, lacas, na produción de pilas de cadmio-níquel, como estabilizador de termoplásticos (PVC), como “endurecedor” de rodas e lamias de automóbil (Zubera-Cosano, 1993).

Exposición ao cadmio a través da dieta

As principais fontes de exposición ao cadmio para o home son atmosferas profesionais concretas, a dieta, a auga de bebida e o tabaco (Repetto e López-Artíguez, 1995; Llobet e col., 1998; Chan e col., 2000). Ademais, presenta unha longa semivida no home, principalmente debido á súa baixa ratio de excreción e á súa acumulación no organismo.

A absorción oral do cadmio a través da inxesta alimentaria foi estimada nun 5% en humanos (I.P.C.S., 1992), cunha variabilidade interindividual dun 20-30% (Satarug e col., 2004), determinada por distintos factores como é a inxesta de fibra, a cal inhibe a absorción intestinal do metal (Berglund e col., 1994).

Segundo o Internacional Programme on Chemical Safety, da Organización Mundial da Saúde, a inxesta media do cadmio é inferior á inxesta semanal provisional tolerable (PTWI) (Galal-Gorchev, 1993), sendo a PTWI $1\mu\text{g Cd/Kg}$ peso/día (C.A.C., 2003). No entanto, segundo Nasreddine e Parent-Massin (2002), os europeos estamos expostos a concentracións de cadmio superiores á PTWI.

A auga de bebida tamén pode constituír unha fonte de exposición ao cadmio. Aínda que a concentración media é inferior a $1\mu\text{g Cd/L}$, en fogares con tubaxes de cobre pode chegar a $2\mu\text{g Cd/L}$ no caso de tubaxes galvanizadas (Sharret e col., 1982).

Aspectos moleculares da toxicoloxía do cadmio

O cadmio induce a formación de especies reactivas de oxíxeno (ROS) (Filipič e col., 2006). Ademais, induce a produción de radicais hidroxilo (O'Brien e Salacinski, 1998), aniões superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidróxeno (Stohs e col., 2001) e induce peroxidación lipídica (El-Maraghy e col., 2001). As ROS son continuamente xerados durante o metabolismo do oxíxeno. Posteriormente son transformados en radicais hidroxilo, altamente reactivos, que atacan o ADN, producindo a rotura das febras e alterando as bases, o que leva consigo a aparición de mutacións e o desenvolvemento de tumores (Waalkes, 2002).

O mecanismo polo cal o cadmio inicia a formación de ROS pode deberse fundamentalmente a que este metal provoca un descenso intracelular do contido de glutatión e reduce a actividade dos encimas antioxidantes, superóxido dismutasa, peroxidasa e catalasa, permitindo a acumulación de ROS e un incremento do estrés oxidativo intracelular en células expostas ao cadmio (Waisberg e col., 2003).

Tamén se observou que o cadmio induce peroxidación lipídica en diversas rexións cerebrais (Méndez-Armenta e col., 2003). De feito, relacionouse a toxicidade neuroendocrina deste metal co estrés oxidativo (Poliandri e col., 2006; López e col., 2006), situación na que existe unha alteración no balance de axentes oxidantes e antioxidantes nas células (López e col., 2006). Por outro lado, o aumento de especies reactivas de oxíxeno pode levar consigo diversas perturbacións fisiolóxicas: maior permeabilidade da barreira hematoencefálica, alteracións na transmisión sináptica, etc. (Evans, 1995). Ademais, a nivel cerebral, o estrés oxidativo é o responsable de numerosas enfermidades dexenerativas como a esclerosis lateral amiotrófica (Hirano, 1991) e alzheimer (Sinet e Ceballos-Picot, 1992).

Neurotoxicoloxía do cadmio

O cadmio, ao igual que outros metais pesados, como o chumbo e o mercurio, presenta unha elevada neurotoxicidade (Pohl e col., 2006). Atravesa a barreira hematoencefálica (Murphy, 1997) e pode acumularse nas distintas rexións cerebrais (Lafuente e col., 2003; Ong e col., 2006). Tamén se pode depositar no plexo coroideo que constitúe a barreira hematoencefálica (Manton e col., 1984). Este feito leva consigo alteracións morfolóxicas na súa estrutura, o que permite que os metais e outros xenobióticos neurotóxicos se difundan cara ao cerebro (Zheng, 2001). Concretamente, o cadmio unido a metalotioneína (formando un complexo cadmio-metalotioneína) fíxase no plexo coroideo (Zheng, 2001) e destrúe a ultraestrutura do plexo (Zheng, 2001). Segundo diversos autores (Wong e Klaassen, 1982; Choudhuri e col., 1996) algunhas patoloxías neurolóxicas poderían ser debidas a un aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica ao cadmio.

A neurotoxicidade asociada á exposición ao cadmio podería ser debida ao efecto global dunha serie de pequenas perturbacións no metabolismo cerebral e do estrés oxidativo en particular, xa que este metal parece intensificar a peroxidación lipídica a través da inhibición da superóxido dismutasa e outros encimas relacionados (Gutiérrez-Reyes e col., 1998).

Os efectos tóxicos do cadmio no SNC inclúen alteracións na síntese e/ou metabolismo das aminas bióxenas e dos aminoácidos neurotransmisores. Así se observou en diversas rexións cerebrais, baixo heteroxéneas condicións experimentais (*in vivo* e *in vitro*, diversas doses do metal, diferentes vías de administración do tóxico), en diversas especies animais e de distintas idades (Williams e col., 1978; Arito e col., 1981; Nation e col., 1989; Das e col., 1993; Lafuente e Esquifino 1999; Lafuente e col., 2001; 2002; 2003; 2004; 2005a e b).

Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi caracterizada por primeira vez despois de procesar cromatograficamente miles de glándulas pineais de orixe bovina (Lerner e col., 1958). Denominouse co termo melatonina debido aos seus efectos sobre a pigmentación da pel de ras e pola súa relación química coa serotonina (5-hidroxitriptamina) (Lerner e col., 1960). Actualmente sábese que esta indolamina é o principal produto secretado pola glándula pineal en mamíferos, incluíndo o home.

Benot e col. (1998 e 1999) evidenciaron na rata e no home que tanto os niveis en sangue de melatonina como a capacidade antioxidante total dese fluído corren paralelos. Desta maneira, o incremento fisiolóxico nocturno dos niveis de melatonina acompáñase dun concorrente ascenso na capacidade do fluído para neutralizar os radicais libres. O forte paralelismo entre a concentración sanguínea de melatonina e

a súa capacidade antioxidante foi tamén confirmado por Albarran e col. (2001) nas aves.

Cardinali e col. (2001) consideraron a importancia das concentracións subcelulares de melatonina. Cabe destacar que como substancia lipofílica atravesa facilmente as membranas celulares, e que baixo condicións fisiolóxicas e farmacolóxicas pode ser moito máis elevada a concentración intracelular da hormona que os seus niveis circulantes.

Hai dúas décadas cuantificouse por radioinmunoensaio a concentración hipotalámica de melatonina en rata, obtendo valores de 1-4 pg/mg de tecido (Catala e col., 1987). Posteriormente, ao utilizar técnicas cromatográficas, observouse que a concentración nocturna de melatonina nesta mesma rexión cerebral era superior: 10 pg/mg de tecido (Cardinali e col., 2001). Destes datos despréndese que os niveis de melatonina nos tecidos poidan estar dentro dun elevado rango nanomolar, asumindo unha distribución homoxénea de melatonina en varios compartimentos subcelulares. Estes valores poderían ser substancialmente máis elevados se a melatonina se distribúe de forma distinta dentro dos compartimentos subcelulares. De feito, os niveis máis elevados encontráronse no núcleo celular e na mitocondria, nun rango micromolar (Cardinali e col., 2001).

Funcións da melatonina e o seu posible papel protector fronte á toxicidade dos xenobióticos

A melatonina presenta a capacidade de paliar, polo menos en parte, o dano molecular e celular orixinado polo estrés oxidativo (Reiter, 1998). Entre os diversos mecanismos de actuación, neste sentido, destacan os seguintes (**Figura 1**):

1. É un potente “scavenger” (axente neutralizante) de radicais libres (Tan e col., 2002), como son as ROS e do nitróxeno (RNS) e os radicais peroxilo ($LOO^{\bullet}$).
2. Actúa como un antioxidante indirecto:
 - a. Inducindo encimas antioxidantes (Reiter e col., 2000; Rodríguez e col., 2004).
 - b. Estimulando a síntese de glutatión (Urata e col., 1999).
 - c. Incrementando a actividade doutros antioxidantes (Gitto e col., 2001).
 - d. Protexendo as encimas antioxidantes do dano oxidativo (Mayo e col., 2003), aumentando a eficiencia da cadea de transporte electrónico mitocondrial, reducindo así a fuga de electróns e a xeración de radicais libres (Acuña-Castroviejo e col., 2002).

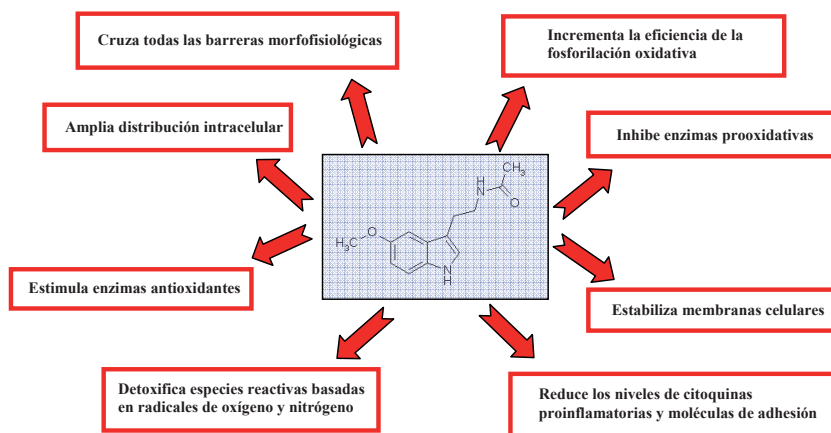


Figura 1. Nesta figura resúmense os diversos mecanismos a través dos cales a melatonina protexe as células do dano oxidativo (Reiter, 2003)

Algunhas destas accións son mediadas vía receptor, mentres que outras non o son. En primeiro lugar habería que citar a súa actividade endocrina, tanto autocrina como paracrina, e a súa función de “scavenger” (axente neutralizante) directo de radicais libres (Tan e col., 2003). Máis concretamente, esta hormona é capaz de reducir a peroxidación lipídica inducida por cadmio en diversos órganos, ao administrarse intraperitonealmente a doses farmacolóxicas (Karbownik e col., 2001). Ademais das súas propiedades antioxidantes, a melatonina tamén pode formar complexos *in vitro* con cadmio e outros metais (Limson e col., 1998). Nesta mesma liña, a melatonina reverte as alteracións que induce o cadmio na expresión xénica de encimas implicados na peroxidación lipídica e no estrés oxidativo (óxido nítrico sintasa 1 e 2 e hemo oxigenasa-1) no eixe hipotalámico-hipofisario (Poliandri e col., 2006).

O efecto protector da melatonina fronte á neurotoxicidade do cadmio que se observa a nivel de neurotransmisores podería ser debido, polo menos, en parte, a que a neurohormona diminúe a retención do metal no organismo (Chweliatiuk e col., 2006) e reduce o estrés oxidativo inducido polo cadmio (Poliandri e col., 2006). Ademais, os efectos protectores da melatonina fronte ao dano oxidativo inducido por metais foron evidenciados principalmente en estudos *in vitro* (Karbownik e col., 2001; Parmar e col., 2002; Ortega-Gutiérrez e col., 2002, Daniel e cols., 2004; Eybl e col., 2006), polo que os efectos tóxicos do cadmio que escapan á protección da melatonina, poderían ser debidos a outros factores que existen *in vivo* e que non se dan nos experimentos *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

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

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



TOXICOLOXÍA DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS E RADICAIS LIBRES: METOXICLORO E ÓXIDO NÍTRICO

Ana Caride

Laboratorio de Toxicoloxía. Facultade de Ciencias. Universidade de Vigo

Oxido nítrico

O óxido nítrico é un mensaxeiro biolóxico cunha vida media duns poucos segundos debido ao seu carácter gasoso. Foi descuberto en 1987 nas células endoteliais e denominouse inicialmente factor relaxante derivado do endotelio, xa que inducía a relaxación da musculatura lisa precontraída farmacologicamente, implicando a súa importancia no sistema cardiovascular e na maioría dos demais sistemas biolóxicos. Por este motivo foi elixida como molécula do ano en 1992 pola revista *Science* e mereceu que se lle outorgase o premio Nobel en Medicina e Fisioloxía en 1998 aos investigadores pioneiros deste descubrimento (Ferid Murad, Robert Furchgott e Louis Ignarro).

O óxido nítrico, a temperatura ambiente e presión atmosférica, é un gas que posúe un electrón desapareado, polo que se comporta como un radical libre e en consecuencia é moi reactivo. Debido a isto ten unha vida media de segundos. Unha vez liberado, exerce os seus efectos e descomponse para producir dous metabolitos estables, os radicais nitrito e nitrato. É sintetizado a partir de L-arginina mediante unha reacción encimática catalizada polo óxido nítrico sintasa (NOS), encima que contén catro cofactores: FAD, FMN, tetrahidrobiopterina e hemo. Ata o momento foron identificadas tres isoformas de NOS, que fan referencia ao tecido no que se purificaron inicialmente: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). A isoforma endotelial do óxido nítrico sintasa atópase nas células endoteliais vasculares, onde, activada por estimulación colinérxica, promove a relaxación da musculatura lisa. A nNOS atópase principalmente no cerebro e, ao igual que a eNOS, é calcio-dependente. Estas dúas isoformas median a produción de óxido nítrico a concentración fisiolóxica, para actuar como sinalizador molecular. A expresión da isoforma inducible de NOS é sintetizada en diferentes tipos de células, tales como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso e endotelio, e é calcio-independente. Esta isoforma cataliza a síntese de gran cantidade de óxido nítrico, que pode ser tóxico en determinadas circunstancias.

O óxido nítrico participa nunha gran variedade de importantes funcións biolóxicas. Ata o momento existen máis de 30.000 publicacións que versan sobre o papel biolóxico deste composto. É importante destacar que é un neurotransmisor que posúe propiedades diferentes aos dous neurotransmisores clásicos debido á súa natureza gasosa: non se acumula en vesículas sinápticas; non require de receptores de mem-

brana para exercer a súa acción, xa que penetra na célula diana por difusión lipídica; e non é metabolizado por encimas específicos, senón que é degradado espontaneamente por oxidación ou ben por compostos tales como o anión superóxido ou a oxihemoglobina. A nivel do sistema nervioso central desempeña funcións tan importantes como a regulación da liberación doutros neurotransmisores [glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), dopamina, acetilcolina, norepinefrina e adrenalina, entre outros], a regulación do fluxo vascular, e intervén nos mecanismos de defensa cerebral e en procesos de aprendizaxe e memoria. O óxido nítrico atópase ademais presente no sistema nervioso periférico, participando na transmisión sensorial. Ademais, está involucrado noutras funcións fisiolóxicas, moi diversas entre si, como a inhibición da agregación e a adhesión plaquetaria, a citotoxicidade producida por macrófagos, a relaxación intestinal non colinérxica, a regulación da secreción hormonal e o control do apetito.

É importante ter en conta que o óxido nítrico pode presentar capacidade antioxidante ou prooxidante. Por unha parte, algunhas das especies reactivas do nitróxeno derivadas do óxido nítrico poden reaccionar con proteínas, ADN e ácidos graxos poliinsaturados. Entre estes compostos cabe destacar o peroxinitrito pola súa capacidade oxidante, sintetizado cando se encontran simultaneamente no medio óxido nítrico e o anión superóxido. Por outra parte, o óxido nítrico potencialmente inhibe a peroxidación lipídica inducida por especies reactivas do oxíxeno e do nitróxeno, posto que reacciona con radicais lipídicos dando lugar a produtos non radicais do tipo nitrosolípidos. Tamén se demostrou que modula o efecto prooxidante do ferro e de metais de transición en estado iónico ao reaccionar con eles. Este efecto antioxidante ou prooxidante depende da concentración de cada especie e do microambiente biolóxico no que é liberado o óxido nítrico.

O seu principal composto diana é a guanilato ciclasa soluble (GCs) que desencadea a produción de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Este último aparece como composto mediador de moitas das accións fisiolóxicas do óxido nítrico, ao estar implicado na transdución de sinais vía unha kinasa. Outra das moléculas diana do óxido nítrico é a citocromo oxidasa, xa que ao competir co oxíxeno pola unión a esta molécula na cadea de transporte electrónico modula a respiración mitocondrial. Por outra parte, forma o complexo GSNO ao unirse a glutatión oxidado, que orixina posteriormente glutatión reducido (GSH) con gran actividade antioxidante. Ademais, as tres formas redox do óxido nítrico reaccionan con oxíxeno, dióxido de carbono, peróxido de hidróxeno, anión superóxido e metais de transición en estado iónico, dando lugar a especies reactivas do nitróxeno, entre os cales cabe destacar o peróxinitrito pola súa capacidade oxidante.

Insecticidas organoclorados: metoxicloro

Os insecticidas organoclorados son compostos aril, carbocíclicos ou heterocíclicos de peso molecular entre 291 e 545 dalton, que actúan como insecticidas de inxestión e de contacto. Estes compostos pódense clasificar segundo a súa estrutura molecular en:

- Derivados de hidrocarburos alicíclicos, como o hexaclorociclohexano ou o lindano.
- Derivados de hidrocarburos ciclodiénicos, tales como o aldrín, endrín, dieldrín, clordano, endosulfán e heptacloro.
- Derivados de hidrocarburos terpénicos, entre os que destacan o toxafeno e a clordecona.
- Derivados de hidrocarburos aromáticos. Neste grupo encontraríanse o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e o metoxicloro, no cal nos centramos a continuación.

O nome químico do metoxicloro é o 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-metoxifenil) etano. Sintetizouse coa finalidade de substituír o DDT, posto que presenta menor toxicidade e curta persistencia nos sistemas biolóxicos. O metoxicloro é eficaz contra unha ampla variedade de insectos como moscas, mosquitos e cascudas. É un praguicida amplamente utilizado en cultivos agrícolas, en silos de almacenamento de cereais, en xardinería e en animais domésticos.

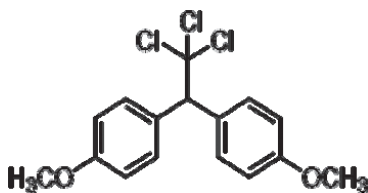


Figura 1. Estrutura química do metoxicloro

As vías máis frecuentes de exposición ao insecticida son a inhalatoria, a dérmica e a inxesta alimentaria. A súa presenza foi evidenciada no 1,2% das mostras de alimentos analizadas en EEUU, o cal representa un consumo diario de 0,1 a 0,8 μg de metoxicloro neste país (Gunderson, 1988). Ademais, encontráronse residuos deste praguicida en mostras biolóxicas, concretamente en tecido adiposo e sangue de mulleres do sur de España (Botella e col., 2004).

Este xenobiótico exerce a súa principal acción tóxica sobre o sistema nervioso ao interferir no fluxo de ións a través das membranas das células nerviosas, prolongando o tempo de apertura das canles de sodio. A intoxicación aguda por metoxicloro ca-

racterízase por tremores, convulsións e outros signos neurolóxicos de estimulación. En canto á exposición crónica, o sistema reprodutor é a principal diana deste praguicida. Presenta actividade estroxénica e induce diversos efectos sobre o sistema reprodutor. Concretamente, observáronse cambios histopatolóxicos nos órganos do sistema reprodutor e glándulas accesorias e alteracións dos niveis das hormonas sexuais (Borgeest e col., 2002). Así mesmo, este praguicida é un depresor do sistema nervioso central, observándose alteracións diversas na concentración de neurotransmisores nas distintas rexións cerebrais (Lafuente e col., 2007).

Metoxicloro, estrés oxidativo e óxido nítrico

O estrés oxidativo foi amplamente estudado como mecanismo de toxicidade dos pesticidas entre os que se encontra o metoxicloro (Koner e col., 1998; Kale e col., 1999; McCormack e col., 2005). Neste sentido, diversos grupos de investigación evidenciaron alteracións do sistema reprodutor a través dun aumento do estrés oxidativo inducido pola exposición a este último pesticida. Máis concretamente, o tratamento con este xenobiótico implica un descenso da actividade das encimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión redutasa e glutatión peroxidasa, así como un aumento dos niveis de peroxidación lipídica en testículo (Latchoumycandane e Mathur, 2002), epidídimo e esperma de rata (Latchoumycandane e col., 2002). Algúns destes efectos poden observarse nas figuras 2 e 3 que se presentan a continuación.

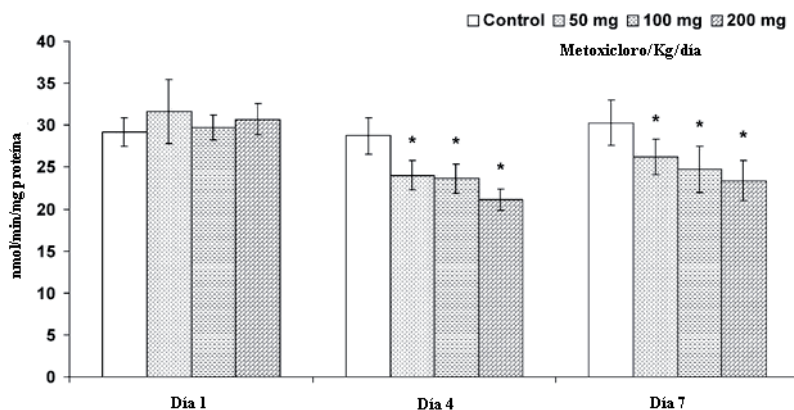


Figura 2. Efecto do metoxicloro sobre a actividade da encima superóxido dismutasa en testículo de rata adulta (adaptado de Latchoumycandane e Mathur, 2002)

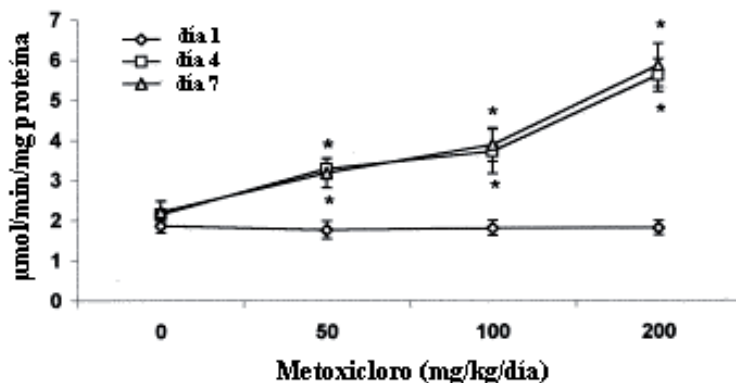


Figura 3. Efecto do metoxicloro sobre a peroxidación lipídica en epidídimo de rato adulta (adaptado de Latchoumycandane e col., 2002)

Estes mesmos efectos foron observados no ovario de rato por Gupta e col. (2006). Neste último estudo avalíouse, ademais, a produción de nitrotirosina, un marcador da produción de especies reactivas do oxíxeno, mediante inmunohistoquímica en ovario de animais tratados co praguicida.

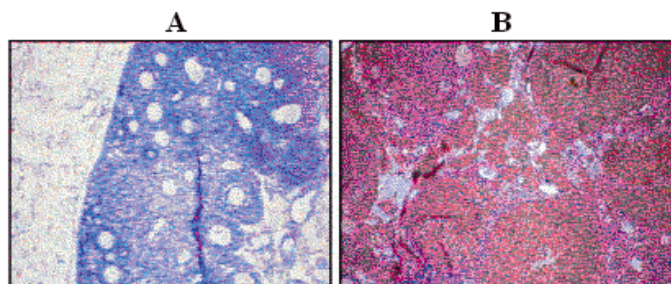


Figura 4. Efecto do metoxicloro sobre a produción de nitrotirosina en ovario de rato control (panel A) e exposto a metoxicloro (panel B). Pódese observar unha tinguadura positiva para nitrotirosina (cor vermella) nos animais tratados (adaptado de Gupta e col., 2006)

No sistema nervioso central, ao igual que ocorre no sistema reprodutor, o metoxicloro induce efectos tóxicos a través dos mecanismos nos que está implicado o estrés oxidativo. De feito, Schuh e col. (2005) evidenciaron, tanto *in vitro* como *in vivo*, que a exposición a este xenobiótico inhibe a respiración mitocondrial no cerebro da

rata (Figura 5), resultando nun incremento da produción de especies reactivas do oxíxeno.

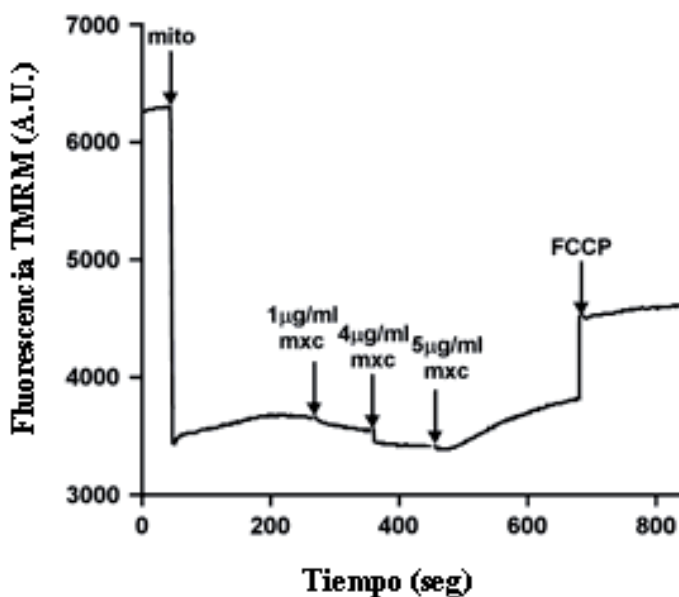


Figura 5. Representación gráfica dos cambios no potencial de membrana mitocondrial, medido a través da fluorescencia do tetrametil rodamina metil éster (TMRM), en mostras de cerebro de rata tras sucesivas adicións de metoxicloro (mx) (adaptado de Schuh e col., 2005)

Recentemente foi estudado o papel do óxido nítrico na inmunotoxicidade do metoxicloro. Neste sentido, Kim e col. (2005) demostraron que este praguicida altera a función inmune a través dun aumento da expresión xénica de iNOS e da produción de óxido nítrico en macrófago de rato. Este incremento da síntese de óxido nítrico levaría consigo unha sobreprodución de especies reactivas do nitróxeno, tales como peroxinitrito, relacionado coa patoxénese de numerosas enfermidades (Chirino e col., 2006).

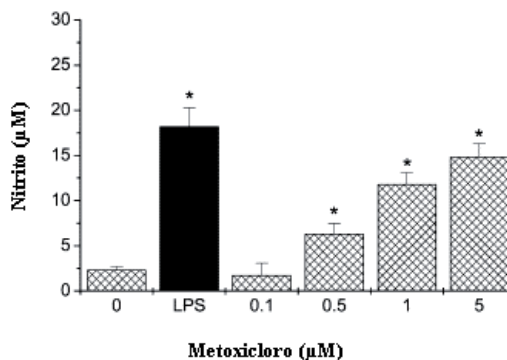


Figura 6. Efecto do metoxiclolo sobre a produción de óxido nítrico en macrófago de rato. Os niveis de produción de óxido nítrico determináanse mediante a medida da acumulación de nitrito no medio do cultivo (adaptado de Kim e col., 2005)

Por outra parte, tras o tratamento con este mesmo tóxico observáronse diversas alteracións da secreción episódica de prolactina a través de cambios na síntese de óxido nítrico no eixe hipotálamo-hipofisario (Lafuente e col., 2006).

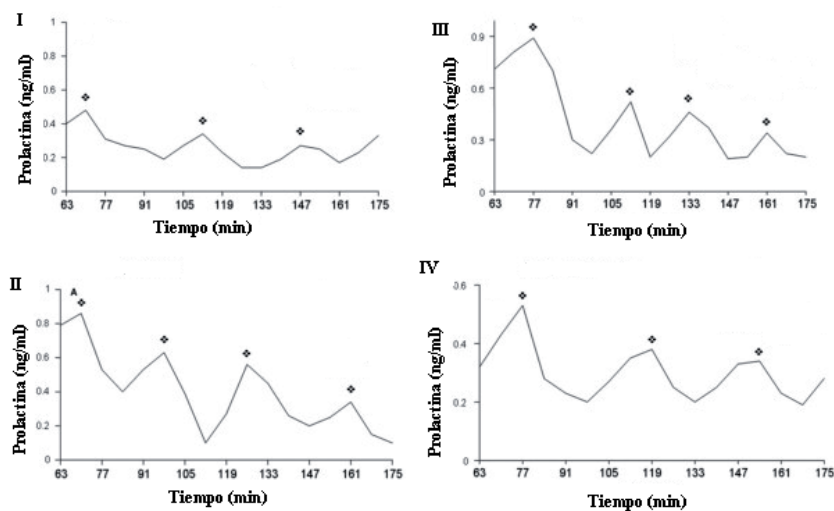


Figura 7. Patrón episódico de prolactina. Os asteriscos indican os pulsos de prolactina durante o período estudado. Móstrase o patrón de prolactina en ratas control (panel I); en animais tratados con N^ω-nitro-L-arxinina metil éster (L-NAME), un bloqueante da síntese de óxido nítrico (panel II); en ratas expostas a metoxiclolo (panel III); e en animais tratados con metoxiclolo e L-NAME (panel IV) (adaptado de Lafuente e col., 2006)

BIBLIOGRAFÍA

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

RADICAIS LIBRES E MORTE CELULAR PROGRAMADA

Rafael Balaña Fouce

Dpto. Ciencias Biomédicas. Facultade de Veterinaria. Universidade de León

A apoptose é unha forma de morte celular programada (PCD do inglés “*programmed cell death*”) propia dos organismos pluricelulares. Trátase dun dos principais tipos de PCD e comprende unha serie de procesos bioquímicos que inducen cambios morfolóxicos específicos nas células anteriores á súa morte. Estes cambios morfolóxicos inclúen a vacuolización, cambios na membrana celular como a perda da asimetría e do acoplamento, colapso celular, fragmentación nuclear, condensación da cromatina e fragmentación do ADN xenómico. Durante a apoptose, as células desempeñan un papel activo e controlado da súa propia morte (polo que se falou de suicidio celular), mentres que na necrose a morte celular é un proceso descontrolado que conduce á lise das células e á indución dunha resposta inflamatoria.

A investigación en apoptose experimentou un substancial desenvolvemento durante a década dos noventa. Ademais da súa importancia como fenómeno biolóxico, establecéronse relacións entre procesos apoptóticos defectuosos e unha gran variedade de enfermidades que non tiveran explicación sen o coñecemento do dito proceso. A importancia deste campo de investigación foi recoñecida o 7 de outubro de 2002 co Premio Nobel de Medicina concedido polas investigacións sobre crecemento e apoptose no nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (Metzstein e col., 1998). O premio compartírono os Doutores H. Robert Horvitz do Instituto de Tecnoloxía de Massachusetts (EEUU), Sydney Brenner do Instituto de Ciencias Moleculares Berkeley, CA (EEUU) e John E. Sulston, Instituto Wellcome Trust Sanger en Cambridge (GB).

Dada a novidade deste campo de investigación, moitos dos termos que se utilizan proceden da literatura anglosaxona, o que os fai, frecuentemente, ilexibles para o lector non acostumado. Por esta razón recompilamos un amplo glosario de termos ao final do capítulo.

A apoptose como proceso fisiolóxico. A apoptose prodúcese durante o desenvolvemento normal dos organismos pluricelulares e continúa durante toda a súa vida adulta (Lockshin e Zakeri, 2007). A combinación da apoptose e a proliferación celular é a encargada de dar forma a tecidos e órganos no desenvolvemento embrionario (Penaloza e col., 2008). A diferenza da necrose, que é unha forma traumática de morte celular resultante dunha lesión celular aguda, a apoptose confire vantaxes ao organismo durante o seu ciclo vital. Por exemplo, a diferenciación dos dedos e os pés dun embrión humano en desenvolvemento prodúcese grazas a que as células

dos espazos interdixitais sofren un proceso de apoptose; como resultado aparecen dedos separados. Calcúlase que entre $50\text{-}70 \times 10^9$ células morren cada día nun humano adulto medio debido á apoptose. Isto equivale á proliferación e posterior destrución dunha masa celular igual ao peso do corpo dun individuo nun ano.

A apoptose é tamén unha parte importante da regulación do sistema inmunolóxico. Os linfocitos T son células do sistema inmunolóxico responsables da destrución de células infectadas ou danadas no corpo (Everett e McFadden, 1999). Os linfocitos T maduran no timo pero, antes de que poidan entrar no torrente sanguíneo, son postas a proba para asegurarse de que son eficaces contra antíxenos estraños e para evitar que reaccionen fronte a células sas. Calquera linfocito T inefectivo ou auto-reactivo elimínase a través da indución da apoptose (Brenner e col., 2008).

As alteracións da regulación da apoptose relacionáronse con procesos patolóxicos. O cancro é unha enfermidade que a miúdo se caracteriza por unha inhibición do proceso apoptótico. As células cancerosas adoitan ter certo tipo de mutacións que lles permiten eludir os sinais celulares de regulación do seu crecemento e proliferación. En circunstancias normais, as células danadas sométense naturalmente á apoptose, a diferenza das células cancerosas, cuxas mutacións poden ter ocorrido nos lugares que controlan este proceso. Nestes casos non hai control da proliferación celular e, en consecuencia, a enfermidade pode progresar a un tumor. Entender como se regula a apoptose en procesos tumorais é de gran interese no desenvolvemento dos tratamentos contra esta enfermidade (Engelmann e Bauer, 2000; Pietsch e col., 2008).

Hai outras enfermidades relacionadas cunha exacerbación do proceso apoptótico. Por exemplo, as enfermidades neurodexenerativas como o párkinson ou o alzheimer son procesos morbosos onde un exceso de apoptose está relacionado coa perda progresiva de neuronas (Nunomura e col., 2007).

A apoptose tamén é importante para o desenvolvemento normal da placenta. No trofoblasto as células da placenta invaden o contorno uterino co fin de remodelar os vasos sanguíneos maternos e axudar a establecer e manter a xestación (Dash e col., 2005). Para lograr este obxectivo é necesario un control estrito sobre a proliferación celular e a apoptose. Nalgúns casos este proceso pode verse comprometido e un exceso de apoptose das células de trofoblasto pode estar implicado en certas complicacións da xestación como a preeclampsia (Allaire e col., 2000).

A apoptose desempeña un papel importante na progresión de moitas enfermidades autoinmunes. Por exemplo, na artrite reumatoide unha excesiva proliferación de células sinoviais pode ser debida en parte á resistencia destas células aos estímulos apoptóticos. Noutros casos, a falta de regulación da apoptose dos linfocitos T pode

orixinar células auto-reactivas que ao entrar na circulación sanguínea contribúen á aparición de enfermidades autoinmunes (Ortona e col., 2008).

O proceso da apoptose. Tras a recepción de sinais específicos que inducen ás células a someterse á apoptose, vanse producir unha serie de cambios morfolóxicos programados. Unha familia de proteínas coñecidas como caspasas (do inglés “*cysteine-aspartic acid proteases*”) actívanse normalmente nas primeiras etapas da apoptose (Chowdhury e col., 2008). Estas proteasas encárganse de romper compoñentes celulares necesarios para a función normal da célula incluíndo proteínas estruturais do citoesqueleto, proteínas nucleares e encimas de reparación do ADN. As caspasas tamén poden activar outras encimas degradativas, como certas endonucleasas, que desintegran o ADN xenómico en pequenos fragmentos (Chen e Wang, 2002).

As células apoptóticas cambian a súa morfoloxía durante o proceso, empezando por unha diminución no seu volume, como consecuencia da destrución das láminas e os filamentos de actina do citoesqueleto. A ruptura da cromatina no núcleo conduce a miúdo á condensación nuclear (cariorrese) que en moitos casos dá lugar a que os núcleos apoptóticos adquiren forma de “ferradura”. Por último, a célula fragmentase en pequenos corpos apoptóticos que facilitan a súa eliminación polos macrófagos sen inducir un proceso inflamatorio (Jin e El-Deiry, 2005). Estas células fagocíticas son as responsables da limpeza das células apoptóticas dos tecidos dunha forma limpa e ordenada, evitando moitos dos problemas relacionados coa morte celular necrótica. Co fin de promover a súa fagocitose, as células apoptóticas xeran cambios na membrana plasmática que desencadean a resposta dos macrófagos. Un deses cambios é a translocación de fosfatidilserina (PS) desde a cara interior da membrana plasmática ao exterior (Kagan e col., 2000).

Os estímulos que inducen a unha célula a entrar en apoptose poden ser extrínsecos, relacionados coa unión de ligandos indutores de morte a receptores de membrana (Zimmermann e col., 2001). Estes ligandos poden ser factores solubles ou poden estar expresados na superficie das células como os linfocitos T citotóxicos. Estes últimos prodúcense cando as células T recoñecen células danadas ou infectadas con virus e poñen en marcha a apoptose co fin de evitar que se convertan en neoplásicas (cancro) ou que favorezan a propagación da infección. Noutros casos a apoptose pode iniciarse seguindo sinais intrínsecos que se producen como consecuencia dunha situación de estrés. As alteracións da fisioloxía celular que conducen á apoptose xorden en resposta da exposición a radiacións, tóxicos, privación de factores de crecemento ou estrés oxidativo causado por radicais libres. En xeral, os sinais intrínsecos inician a apoptose por un proceso mediado pola mitocondria (Schultz e Harrington, 2003).

A proteína p53: arresto celular ou apoptose. A proteína p53 é un importante factor de transcripción dos organismos pluricelulares que participa activamente na regulación do ciclo celular e actúa, por conseguinte, como supresor tumoral na prevención do cancro (Kern e col., 1991). A proteína p53 pode restrinxir o crecemento celular inducendo a senescencia, parando o ciclo celular (nas fases G₁ e G₂) ou inducendo a apoptose. Os mecanismos bioquímicos utilizados por p53 para desencadear estes procesos só se entenden parcialmente e son obxecto de constante estudo. Entre os factores que interveñen na activación de p53 inclúense os niveis de expresión da proteína, o tipo de sinal de estrés, o tipo de células e o contexto celular no momento do estrés (Haupt e col., 2003).

En condicións normais p53 é unha proteína de curta duración. O inhibidor Mdm2 da p53 (Hdm2 nos seres humanos) é o responsable da conservación de p53 neste estado. Mdm2 inhibe a actividade transcricional de p53 e, o que é máis importante, promove a súa degradación polo proteosoma (Chen e col., 1995). No entanto, a actividade transcricional de p53 pode alterarse drasticamente cando as células están expostas a diferentes tipos de estrés, como a produción de radicais libres, o dano ao ADN, a expresión inoportuna de oncoxenes, a hipoxia e o esgotamento de nucleótidos, entre outros. A activación de p53 supón a estabilización da proteína e o incremento da súa unión ao ADN e, por conseguinte, a súa actividade transcricional. A participación da proteína p53 nas diferentes rutas apoptóticas é un dos obxectivos que se comentarán nas diferentes seccións do presente capítulo.

A ruta extrínseca. Papel dos receptores de morte. Os receptores de morte (DR do inglés “*death receptor*”) son proteínas da superficie celular que transmiten os sinais externos de morte ao unírselles ligandos específicos, tales como Fas, TNF- α e TRAIL. Desempeñan un papel importante na apoptose e poden activar a *cascada* de caspasas en cuestión de segundos. A indución da apoptose a través deste mecanismo é polo tanto moi rápida (Schütze e col., 2008).

Descríbóronse seis DRs: FasR, TNFR1, DR3, TRAIL-R1 (ou DR4) TRAIL-R2 (ou DR5) e DR6. Estes receptores están compostos por tres cadeas polipéptidicas idénticas, teñen elementos de sinalización e unión comúns, así como características individuais únicas. Cada un dos seis DRs ten un dominio de morte (DD do inglés “*death domain*”) intracelular que funciona como un módulo de unión proteína-proteína que recruta diversas moléculas de sinalización citosólica que conforman as rutas apoptóticas (Fig. 1).

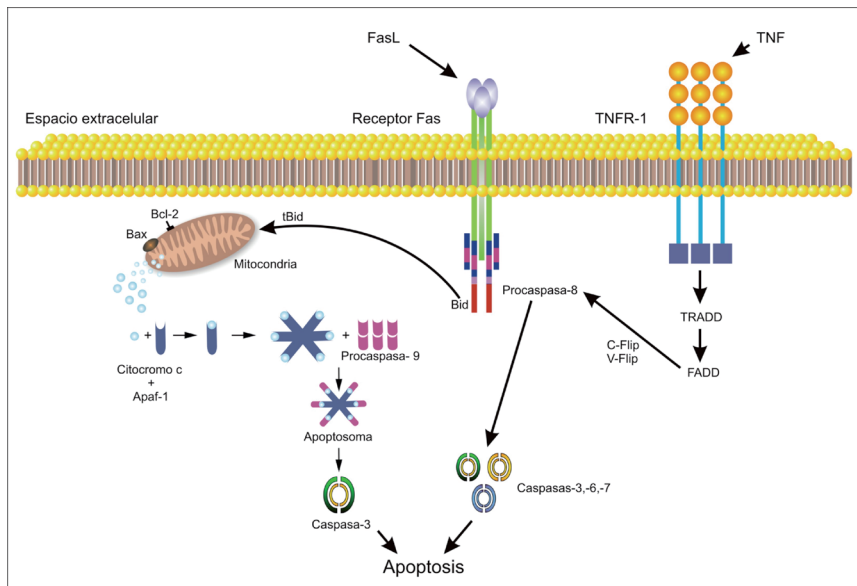


Figura 1. Figura das rutas de regulación e control da apoptose

Aínda que hai diferenzas nas vías de sinalización activadas polos distintos DR, é posible deseñar un esquema xeral deste proceso. A unión dos ligandos de morte aos seus DR promove o seu agrupamento a gran escala na superficie celular. Este agrupamento de receptores é importante porque axuda a completar a sinalización da apoptose. En ausencia da dita agrupación, algunhas células como os linfocitos T son capaces de desencadear a apoptose, pero na maioría dos casos a amplificación da vía de sinalización é necesaria para activar unha resposta apoptótica completa.

Despois da unión do ligando prodúcese un cambio conformacional nos DD intracelulares dos receptores que permite o recrutamento de varias proteínas apoptóticas citosólicas ao receptor. Este complexo de proteínas denomínase DISC (do inglés “*Death-Inducing Signalling Complex*”). O paso final deste proceso é o recrutamento da pro-caspasa 8 por DISC que promove o seu autoprocésamento e como consecuencia a iniciación da apoptose (Peter e Krammer, 2003).

Sinalización ligada ao receptor TNF- α . As células T activadas e os macrófagos producen o Factor de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) como resposta á infección. Mediante a activación do seu receptor, TNFR1, TNF- α pode inducir varios efectos (Chen e Goeddel, 2002). TNF- α pode inducir por si só a apoptose, pero a diferenza do ligando Fas, TNF- α pode promover en certo tipo de células a activación de NF- κ B

e AP-1, que son factores de transcripción primarios involucrados na proliferación e supervivencia celular.

A unión de TNF- α ao seu receptor provoca a súa trimerización e a consecuente agrupación dos seus DD. Isto permite a unión dunha molécula adaptadora chamada TRADD (do inglés "*Tumor necrosis factor Receptor-1-Associated Death Domain protein*") a través das interaccións entre os DD (Shakibaei e col., 2005). TRADD tamén pode asociarse con FADD (do inglés "*Fas-Associated Death Domain*"), o que conduce á indución da apoptose a través do recrutamento e activación da pro-caspasa 8.

Sinalización por Fas (CD95). O ligando Fas (chamado tamén CD95L) activa a apoptose de forma similar á do receptor de TNF- α . A unión de Fas ao seu receptor (FasR) provoca a súa trimerización ou establecemento intracelular do seu correspondente DISC e a activación da *cascada* de caspasas (Schütze e col., 2008). No entanto, a sinalización mediada por FasR é lixeiramente máis sinxela que a de TNFR1. A proteína adaptadora FADD pode ser recrutada directamente polo DD sen que sexa necesaria a presenza de TRADD. FADD servirá para recrutar moléculas de pro-caspasa 8 ao complexo de sinalización Fas por interaccións homotípicas entre os dominios efectores de morte de cada proteína (Scaffidi e col., 1998).

A indución da apoptose por TRAIL. A indución da apoptose por TRAIL (do inglés "*TNF-Related Apoptose-Inducing Ligand*") é similar á de Fas ao unirse ao seu receptor (Bedi, 2002). A unión de TRAIL aos seus receptores DR4 ou DR5 desencadea axiña a apoptose na maioría das células estudadas. Ademais, describíronse receptores reclamo que poden competir pola unión de TRAIL a DR4 e DR5. Estes reclamos chámanse DcR1 e DcR2, e son capaces de competir con DR4 ou DR5 para a unión do seu ligando, no entanto a unión a estes receptores non desencadea a apoptose. Por un lado, DcR1 carece de DD, mentres que DcR2 ten truncado un fragmento de 4 a 6 aminoácidos no DD necesarios para o recrutamento de proteínas adaptadoras (Ashkenazi e Dixit, 1999).

A ruta intrínseca. Papel da mitocondria na apoptose. A mitocondria é o lugar onde se realiza o metabolismo oxidativo dos eucariotas, proporcionando ATP a través da fosforilación oxidativa e o citocromo c. A función mitocondrial parece ser crítica na execución do programa da morte dalgunhas células, e a activación destes orgánulos celulares é un elemento crucial para a coordinación e integración da apoptose (Smith e col., 2008). A mitocondria contén moitas proteínas pro-apoptóticas tales como o Factor Indutor da Apoptose (AIF do inglés "*Apoptose Inducing Factor*"), Smac (do inglés "*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*")/DIABRO e o citocromo c. Estes factores son liberados ao citoplasma a través dos denominados poros de permeabilidade transitoria (poros PT) que se forman na membrana externa. Os poros PT fórmanse pola acción de certos membros pro-apoptóticos da familia

de proteínas Bcl-2, que á súa vez son activados por factores tales como o estrés, os radicais libres de oxíxeno (ROS) e nitróxeno ou a privación de factores de crecemento (Orrenius, 2007). A mitocondria participa tamén amplificando a sinalización apoptótica dos receptores de morte mediante a activación da proteína Bid (un membro pro-apoptótico da familia Bcl-2) mediada pola caspasa 8.

O papel das proteínas Bcl-2. As proteínas da familia Bcl-2 participan de distintas maneiras na ruta intrínseca da apoptose. Algúns dos seus membros (Bcl-2 e Bcl-XL) son proteínas anti-apoptóticas, mentres que outros (como Bad, Bax ou Bid) son, pola contra, proteínas pro-apoptóticas (Youle e Strasser, 2008). A sensibilidade das células aos estímulos apoptóticos intrínsecos vai depender do balance na expresión dos membros desta familia. Cando hai un exceso de proteínas pro-apoptóticas as células son máis sensibles a experimentar apoptose, pola contra, cando existe un exceso de proteínas anti-apoptóticas as células son máis resistentes a sufrir este proceso (Adams e Cory, 2001).

A familia Bcl-2 comprende tanto a proteínas anti-apoptóticas (pro-supervivencia) como pro-apoptóticas (pro-morte). Os membros da familia clasifícanse sobre a base da súa semellanza estrutural cos dominios de homoloxía (BH) a Bcl-2 (BH₁, BH₂, BH₃ e BH₄) e un dominio de transmembrana. Os membros con función anti-apoptótica son Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1, conteñen os catro dominios BH conservados. Ademais dos dominios externos, os membros desta familia conteñen dominios transmembrana que serven para a súa suxeición á membrana externa da mitocondria. Os membros pro-apoptóticos da familia Bcl-2 conteñen tres dominios BH (BH₁, BH₂ e BH₃) pero carecen do dominio BH₄; entre estas proteínas destacaremos Bak, Bax e Bok. A pesar de que todos os membros da familia Bcl-2 conteñen un dominio BH₃, este parece ser especialmente importante nas proteínas con función pro-apoptótica. A sobreexpresión de Bak promove a morte por apoptose en contraposición de Bcl-2 expresado en condicións salvaxes. O dominio BH₃ é suficiente, aínda que non necesario, para a liberación de citocromo c e a activación das caspasas. O terceiro grupo de proteínas Bcl-2 son aquelas que teñen soamente en común o dominio BH₃, e que se comportan como proteínas pro-apoptóticas: Bad, Bid, Bik, Bim, Blk e Hrk. Bad e Bid carecen de dominio transmembrana, e polo tanto están dispersas no citoplasma. Estas dúas proteínas parecen exercer a súa acción pro-apoptótica formando heterodímeros con Bcl-2 e Bcl-XL (Wong e Puthalakath, 2008).

Os membros da familia Bcl-2 asociados coa membrana externa da mitocondria non só teñen actividade ligada ao receptor mediada polos seus dominios BH, senón que tamén poden afectar a integridade da mitocondria alterando o tráfico de ATP, o potencial da membrana ($\Delta\Psi$) e configurando poros PT polos que o citocromo c se vai liberar ao citoplasma. A liberación do citocromo c ao citosol vai acompañada

dunha disipación do $\Delta\Psi$ mitocondrial que se atribúe á apertura dos poros PT, cuxa composición bioquímica é aínda descoñecida.

En función da composición en dominios BH as proteínas da familia Bcl-2 homodimerizarán ou heterodimerizarán, dando lugar á súa función pro- ou anti-apoptótica, respectivamente. As proteínas pro-apoptóticas da familia Bcl-2 teñen localización citoplasmática e actúan como sensores de estrés e/ou dano celular. Tras un sinal de estrés, estas proteínas realózanse na superficie da mitocondria onde interaccionan cos seus homólogos anti-apoptóticos alterando a súa función inhibitoria e orixinando a formación de poros PT (Murphy e col., 2000). A liberación de citocromo c da mitocondria é un proceso particularmente importante na indución da apoptose, xa que conduce á formación do apoptosoma, un complexo de proteasas moi activo nas fases finais de execución da apoptose (Ow e col., 2008).

Bid unha unión entre as rutas extrínseca e intrínseca. A proteína pro-apoptótica Bid distínguese doutras por conectar a activación dos DR da ruta extrínseca coa activación dos procesos asociados cos trastornos mitocondriais da ruta intrínseca. A activación de Bid supón o seu procesamento citoplasmático pola caspasa-8 para expor un novo N-terminal de residuos de glicina que se somete á miristoilación post-traducional (Belka e col., 2000). A proteína Bid miristoilada trasládase á mitocondria, insírese na membrana e activa Bax e Bak para iniciar a ruta intrínseca que conduce á formación do apoptosoma. O xene *BID* é regulado post-transcricionalmente por p53 como resposta á radiación- γ a través de elementos reactivos no primeiro intrón do xene humano ou no promotor do xene do rato. A quimiosensibilidade celular aos compostos xenotóxicos adriamicina e 5-fluorouracilo parece depender da presenza de p53 e Bid inalterados. Mutantes nulos en Bid son resistentes aos efectos destes fármacos.

A fase de execución: caspasas e apoptose. As caspasas son unha familia de proteínas encargadas da execución final da apoptose. As caspasas pertencen a un grupo de encimas coñecidas como cisteín-proteasas que existen dentro da célula como zimó xenos inactivos. A hidrólise destes zimó xenos orixina as formas encimaticamente activas que participan nas fases finais da apoptose (Budihandjo e col., 1999).

A indución da apoptose a través dos DR provoca a activación de caspasas iniciadoras 8 e 10 na fase extrínseca. Pola súa parte, a activación das caspasas 9 e 2 responde aos cambios no $\Delta\Psi$ mitocondrial na ruta intrínseca. A activación das caspasas iniciadoras produce o procesamento das caspasas executoras 3, 6 e 7, que son as responsables da destrución das proteínas do citoesqueleto e orixinan os cambios morfolóxicos típicos observados nas células apoptóticas.

A proteína p53 estimula a activación da *cascada* de caspasas por mecanismos dependentes e independentes de transcripción. Como resposta á irradiación- γ de extractos de células S100 (libres de núcleos) a p53 pode activar por si soa a caspasa-8. No entanto, a morte mediada polo composto xenotóxico etopósido en fibroblastos procedentes de ratos deficientes en caspasa-8 non se ve afectada. Polo tanto, a caspasa-8 pode contribuír, aínda que non sempre é esencial, a inducir a morte por apoptose en células co ADN danado. Ademais, a proteína p53 estimula a caspasa-6 ao interaccionar cun elemento de resposta no terceiro intrón do seu xene codificante (MacLachlan e El-Deiry, 2002). A caspasa-6 destrúe a proteína da lámina nuclear A e varios factores de transcripción (Galande e col., 2001). Ademais, a caspasa-6 xoga un papel importante na morte neuronal inducida por p53 e é a principal proteína implicada na destrución da proteína precursora amiloide (LeBlanc e col., 1999).

O apoptosoma. Ademais da activación dos DR, existen outros mecanismos moleculares para activar a *cascada* de caspasas. Por exemplo, ao engadir granzima B a linfocitos-T citotóxicos, actívanse as caspasas 3, 7, 8 e 10. As mitocondrias son tamén reguladores principais da *cascada* de caspasas e da apoptose. A liberación do citocromo c das mitocondrias pode conducir á activación da caspasa 9 e logo da caspasa 3. Este proceso está mediado pola formación do apoptosoma, un complexo proteínico composto por citocromo c, Apaf-1 e pro-caspasa 9 (D'Amelio e col., 2008). A unión desta última facilita o seu autoprosesamento, dando lugar á forma activa de caspasa-9, que é unha caspasa iniciadora capaz de activar caspasas executoras tales como a caspasa 3 (Fig. 1).

A proteína Apaf-1 (do inglés "*Apoptose protease-activating factor-1*") é un regulador clave da vía apoptótica mitocondrial, sendo o elemento central do apoptosoma. A proteína p53 induce á liberación de citocromo c da mitocondria mediante a indución de xenes diana que codifican proteínas cun único dominio BH₃. É importante destacar que p53 induce tamén a expresión do xene codificante *APAF-1* a través dun elemento de resposta dentro do seu promotor (Schuler e Green, 2001).

Caspasas e a destrución da cromatina. Unha das características da apoptose é a degradación do ADN cromosómico en unidades nucleosomais. As caspasas xogan un papel importante neste proceso mediante a activación de endonucleasas que dixiren o ADN en secuencias concretas, intervindo ademais na inhibición de encimas de reparación do ADN e a destrución de proteínas estruturais do núcleo.

En primeiro lugar, a fragmentación do ADN en unidades nucleosomais é producida por unha endonucleasa coñecida como CAD (do inglés "*Caspase Activated DNase*"). CAD existe normalmente como un complexo inactivado pola proteína ICAD (do inglés "*Inhibitor of CAD*"). Durante a apoptose, ICAD é dixerido pola caspasa 3 liberando CAD activo que produce a rápida fragmentación do ADN nuclear. En

segundo lugar, prodúcese unha inactivación de encimas de reparación do ADN (Nagata, 2000). A encima poli (ADP-ribosa)-polimerasa- que é unha importante encima de reparación- foi unha das primeiras proteínas identificadas como substrato da caspasa 3 (Chiarugi e Moskowitz, 2002). Por último, as caspasas executoras van dixerir as proteínas da envoltura nuclear, como a lámina A, que manteñen a forma do núcleo e interveñen nas interaccións entre a cromatina e a membrana nuclear. A degradación da lámina A pola caspasa 6 orixina a condensación da cromatina e a fragmentación do núcleo (Utz e Anderson, 2000).

Recoñecemento e eliminación das células apoptóticas. Despois de todos os procesos descritos con anterioridade vanse producir unha serie de cambios na membrana plasmática que conducen á exposición da PS desde a cara interna da membrana plasmática ao exterior da célula. Dos lípidos que compoñen a membrana plasmática, unicamente a PS se encontra na súa cara interna, non estando en contacto cos compoñentes do sangue. Ademais, vanse producir cambios internos que afectan a morfoloxía do núcleo e a desintegración do ADN xenómico por CAD en fragmentos de 180 a 200 kbp (escaleiras de ADN) que se separarán nos corpos e/ou vesículas apoptóticas. As vesículas apoptóticas son eliminadas por fagocitose, polo que para ser recoñecidas polos macrófagos non é suficiente con que invertan a posición da PS, senón que deben existir outro tipo de receptores expresados especificamente para o seu recoñecemento. O anticoagulante Anexina V unido a unha tinguidura fluorescente únese á PS traslocada ao exterior da célula apoptótica permitindo unha fácil detección mediante técnicas de citometría de fluxo e/ou microscopía de fluorescencia (Blankenberg, 2008). Os corpos apoptóticos son axiña eliminados por macrófagos ou células dendríticas antes de que poidan necrotizar e comezar un proceso inflamatorio; desta xeito evítanse procesos autoreactivos e autoimunes.

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

Glosario de termos por orde alfabética

Anexina V: Proteínas que se unen a fosfolípidos en presenza do calcio. Cando se establece a apoptose, a fosfatidil serina traslácase á cara externa da membrana plasmática quedando exposta ao medio externo. Este movemento da fosfatidil serina é un indicador de apoptose temperá. A anexina V únese forte e especificamente á fosfatidil serina e serve como indicador de apoptose por métodos de microscopía e/ou citometría de fluxo.

Apaf-1: Factor activador de proteasas apoptóticas-1. Apaf-1 é unha proteína adaptadora asociada á ruta intrínseca da apoptose que se une á pro-caspasa 9 a través do dominio de activación e recrutamento,

orixinando a activación da caspasa 9 en presenza de citocromo c e ATP conducindo á *cascada* de proteasas apoptóticas.

AIF: Factor indutor da apoptose. Flavoproteína mitocondrial con homoloxía coas oxidoredutasas bacterianas. Pode inducir cambios morfolóxicos apoptóticos no núcleo por unha ruta independente das caspasas.

Bad: Membro pro-apoptótico da familia de proteínas Bcl-2. Bad comparte identidade con Bcl-2 unicamente no dominio BH₃ e forma heterodímeros con Bcl-2 e Bcl-XL previndo a acción anti-apoptótica destas e promovendo a apoptose.

Familia de proteínas Bcl-2: Os membros desta familia teñen tanto propiedades pro- como anti-apoptóticas. Todos os membros teñen polo menos un dos catro motivos de homoloxía con Bcl-2 ou dominios BH (BH₁, a BH₄), que interveñen na interacción entre proteínas. Os membros con propiedades anti-apoptóticas inclúen: Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1. Pola súa parte os membros con propiedades pro-apoptóticas inclúe a: Bax, Bak e Bok e comparten tres dominios BH (BH1, BH2, BH3). Unha subfamilia adicional cun único dominio BH₃ en común son as proteínas pro-apoptóticas: Bik, Hrk, Bim, Blk, Bad, e Bid. O dominio BH3 é o que confire propiedades pro-apoptóticas ao unirse e antagonizar coas proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL.

CAD: ADNasa activada por caspasas. Endonucleasa endóxena que fragmenta o ADN celular e que se utiliza como marcador da apoptose.

Caspasas 1-14: Cisteín proteasas activadas por aspartato. As caspasas existen como zimógenos inactivos e teñen que ser activadas de forma progresiva formando unha *cascada*. Despois da súa activación, as súas dianas son o ADN e o citoesqueleto da célula, intervindo de maneira decisiva na formación dos corpos ou vesículas apoptóticas.

Citocromo c: Proteína mitocondrial asociada normalmente á fosforilación oxidativa. Durante a ruta intrínseca da apoptose o citocromo c libérase ao citoplasma a través dos poros PT, onde se une a Apaf-1 inducendo o autoprocésamento da pro-caspasa 9 no apoptosoma. A liberación do citocromo c ao citoplasma está regulada polos membros da familia de proteínas pro- e anti-apoptóticas Bcl-2.

DD: Dominio de morte. Fragmento intracelular dos DR, que é crítico nos procesos de sinalización da ruta extrínseca da apoptose.

DISC: Complexo de sinalización indutor de morte. É un complexo de proteínas que incorpora aos DD citosólicos dos DR (por exemplo de FasR), unha proteína adaptadora (por exemplo FADD) e a caspasa 8 na ruta apoptótica extrínseca.

DR: Receptores de morte. Membros da superfamilia de receptores do TNF. Interven na sinalización da ruta extrínseca da apoptose.

FADD: Proteína adaptadora asociada ao DD Fas. FADD é unha molécula esencial no recrutamento da pro-caspasa 8 durante a indución da apoptose polo ligando Fas.

Fas: (Chamado tamén CD95 e Apo-1) Ligando de Fas, proteína homotrimérica pertencente á familia de TNF.

FasR: Receptor do ligando Fas da superficie celular membro da superfamilia de receptores TNF. O DD citoplasmático de Fas asóciase con FADD que actúa como adaptador no recrutamento da pro-caspasa 8 que se autoprocésará para iniciar a ruta extrínseca da apoptose.

Granzima B: Serín proteasa presente nos gránulos das células NK (natural killers) e dos linfocitos T citotóxicos. Granzima B pertence a unha familia de 11 serín proteasas que degradan proteínas inducido

PCD pola activación de diferentes *cascadas* de caspasas. A granzima B promove a liberación do citocromo c da mitocondria

ICAD: Inhibidor da endonucleasa CAD. Ten a función dunha chaperona activada por caspasas durante a súa síntese. Permanece acomplexada a CAD inhibindo a súa actividade endonucleasa. As caspasas activadas durante a apoptose degradan ICAD liberando a endonucleasa no núcleo e permitindo a degradación do ADN xenómico en fragmentos de 180 a 200 kpb.

p53: Supresor proteico nuclear do cancro humano que actúa como regulador crítico na supervivencia e proliferación celular. Esta fosfoproteína nuclear de 393 amino ácidos regula a expresión dos xenes codificantes DR na indución da apoptose. Estes inclúen Fas e o TNF relacionado coa indución de apoptose ligada a DR5. Nalgúns tipos de tumores (como no cancro de mama) pode establecerse unha relación entre o funcionamento anormal de p53 e un pronóstico adverso.

PoroPT: Poro de permeabilidade transitoria da mitocondria: poro reversible da membrana interna mitocondrial inducido por Ca^{2+} que permite a liberación de compoñentes mitocondriais presentes no espazo intermembranoso.

PS: Fosfatidil serina. Lípido situado na cara interna da membrana plasmática que se externaliza durante a apoptose e serve como criterio diagnóstico.

Smac/DIABRO: Activador secundario de caspasas derivado da mitocondria humana. O equivalente murino, DIABRO é un inhibidor directo da apoptose por unión a proteínas con baixo punto isoeléctrico. Tras a liberación das mitocondrias, elimina o efecto inhibitorio de moitos inhibidores de proteínas apoptóticas.

TNF: Familia de ligandos do factor de necrose tumoral. Foron identificados polo menos 16 membros. A maioría dos membros sintetízanse como precursores transmembrana de tipo II. Os seus dominios extracelulares poden ser escindidos por metaloproteínas formando citoquinas solubles. Tanto as formas solubles como as de membrana únense aos receptores da familia de receptores TNF.

TNFR1: Membro da superfamilia de receptores do TNF que posúe un DD. Outros membros desta superfamilia: FasR, DR3, TRAIL1, TRAIL2 e DR6. Cada un destes receptores pode iniciar directamente a apoptose.

TRADD: Dominio de morte asociado ao receptor de TNF. Únese TFR1, pero a diferenza do DD asociado a Fas, o TRADD non leva un dominio efector de morte, e o seu DD é responsable da apoptose mediada. Actúa como unha plataforma adaptadora no recrutamento de varias moléculas de sinalización para a activación do receptor.

TRAIL: TNF relacionado co ligando indutor de apoptose (tamén chamado Apo-2), é un tipo de proteína transmembrana de tipo II que pertence á superfamilia do TNF, que inducen a apoptose nunha ampla gama de células transformadas pero non en células normais. Descríbíronse dous DR (TRAILR1/DR4 e TRAILR2/DR5) e outros dous receptores non indutores de morte (TRAILR3/DcR1 e TRAILR4/DcR2). Participan de maneira crucial na supresión da metástase tumoral e inhiben a activación dos linfocitos T, progresión do ciclo celular, e produción de citoquinas en células T autoreactivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.M., Cory, S. (2001). *Trends in Biochem. Sc.*, 26, 61-66.
- Allaire, A.D., Ballenger, K.A., Wells, S.R., e col. (2000). *Obstet. and Gynecol.*, 96, 271-276.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1999). *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 255-60.
- Bedi, A. (2002). *Cancer Biol. Ther.*, 1, 638-639.

- Belka, C., Rudner, J., Wesselborg, S., e col. (2000). *Oncogene*, 19, 1181-1190.
- Blankenberg, F.G. (2008). *J. Nucl. Med.*, 49, 81S-95S.
- Brenner, D., Krammer, P.H., Arnold, R. (2008). *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, 66, 52-64.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., e col. (1999). *Ann. Rev. of Cell Develop. Biol.*, 15, 269-290.
- Chen, G., Goeddel, D.V. (2002). *Science*, 296, 1634-1635.
- Chen, J., Lin, J., Levine, A.J. (1995). *Mol. Med.*, 1, 142-152.
- Chen, M., Wang, J. (2002). *Apoptosis*, 7, 313-319 (2002).
- Chiarugi, A., Moskowitz, M.A. (2002). *Science*, 297, 259-263.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K. (2008). *Comp. Biochem. and Physiol. B*, 151, 10-27.
- D'Amelio, M., Tino, E., Cecconi, F. (2008). *Pharma. Res.*, 25, 740-751.
- Dash, P.R., Whitley, G.S., Ayling, L.J., e col. (2005). *Cell. Signall.*, 17, 571-580.
- Engelmann, I., Bauer, G. (2000). *Anticancer Res.*, 20, 2297-2306.
- Everett, H., McFadden, G. (1999). *Trends Microbiol.*, 7, 160-165.
- Galante, S., Dickinson, L.A., Mian, I.S., e col. (2001). *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5591-5604.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., e col., (2003). *J. Cell Sc.*, 116, 4077-4085.
- Jin, Z., El-Deiry, W.S. (2005). *Cancer Biol. Ther.*, 4, 139-163.
- Kagan, V.E., Fabisiak, J.P., Shvedova, A.A., e col. (2000). *FEBS Lett.*, 477, 1-7.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., e col. (1991). *Science*, 252, 1708-1711.
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., e col. (1999). *J. Biol. Chem.*, 274, 23426-23436.
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z. (2007). *J. Cell. Mol. Med.*, 11, 1214-1224.
- MacLachlan, T.K., El-Deiry, W.S. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 9492-9497.
- Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., Horvitz, H.R. (1998). *Trends Genet.*, 14, 410-416.
- Murphy, K.M., Ranganathan, V., Farnsworth, M.L., e col. (2000). *Cell Death Differ.*, 7, 102-111.
- Nagata, S. (2000). *Exp. Cell Res.*, 256, 12-18.
- Nunomura, A., Moreira, P.I., Lee, H.G., e col. (2007). *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets*, 6, 411-423.
- Orrenius, S. (2007). *Drug Metab. Rev.*, 39, 443-455.
- Ortona, E., Margutti, P., Matarrese, P., e col. (2008). *Autoimmun. Rev.*, 7, 579-584.
- Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., e col. (2008). *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 532-542.
- Penaloza, C., Orlanski, S., Ye, Y., e col. (2008). *Curr. Pharma. Design*, 14, 184-196.
- Peter, M.E., Krammer, P.H. (2003). *Cell Death Differ.*, 10, 26-35.
- Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B., e col. (2008). *Oncogene*, 27, 6507-6521.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., e col (1998). *EMBO J.*, 17, 1675-1687.
- Schuler, M., Green, D.R. (2001). *Biochem. Soc. T.*, 29, 684-688.
- Schultz, D.R., Harrington, W.J. Jr. (2003). *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32, 345-369.
- Schütze, S., Tchikov, V., Schneider-Brachert, W. (2008). *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 655-662.
- Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., Takada, Y., e col (2005). *Antiox. Redox Sign.*, 7, 482-496.
- Smith, D.J., Ng, H., Kluck, R.M., Nagley, P. (2008). *IUBMB Life*, 60, 383-389.
- Utz, P.J., Anderson, P. (2000). *Cell Death Differ.*, 7, 589-602.
- Wong, W.W., Puthalakath, H. (2008). *IUBMB Life*, 60, 390-397.

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

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

NEUROTOXICIDADE, ESTRÉS OXIDATIVO, ENFERMIDADES NEURODEXENERATIVAS E ANTIOXIDANTES

M^a. Anunciación Lafuente

Laboratorio de Toxicoloxía. Facultade de Ciencias. Universidade de Vigo

Estrés oxidativo e neurotoxicidade

Durante a evolución dos organismos, a supervivencia nun ambiente aeróbico pasou pola xeración de respostas de adaptación, tanto para o metabolismo oxidativo endógeno como para os produtos químicos e radiación de baixo nivel a que se encontraban expostos e que levaban consigo a xeración de radicais libres, o que deu lugar a diversos sistemas de defensa antioxidantes (Genestra, 2007). No organismo prodúcese un estado de estrés oxidativo debido á xeración excesiva de radicais libres e/ou ao déficit nestes mecanismos antioxidantes, co conseguinte dano celular e tisular, lesións agudas ou dexenerativas, necrose, morte celular, etc. (Sies, 1991).

A maior parte das especies reactivas do oxíxeno (ROS) xeradas na célula están relacionadas coa redución incompleta do oxíxeno na cadea de transporte electrónico mitocondrial, estimándose que o 1% do fluxo de electróns mitocondrial intervéñen na formación de radicais superóxido (Lass e col., 1997). Como podemos observar na Figura 1 (Sayre e col., 2008), a produción mitocondrial de ROS parte da formación do anión superóxido ao captar o O_2 , un electrón da cadea de transporte electrónico. Este anión pode transformarse en peróxido de hidróxeno (H_2O_2) mediante unha reacción catalizada pola encima superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente, o H_2O_2 dará lugar ao radical hidroxilo mediante a reacción de Fenton (na que participan metais de transición en estado iónico). En ausencia de SOD, a dismutación do anión superóxido dá lugar á xeración do oxíxeno singlete, ou ben pode reaccionar con óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito.

O dano oxidativo producido nas macromoléculas biolóxicas por ROS foi vinculado á fisiopatoloxía de numerosas enfermidades, tales como a aterosclerose, cancro, cataratas, enfermidade de parkinson (EP), enfermidade de alzheimer (EA), diabetes, artrite, enfermidades autoinmunes e inflamacións crónicas, entre outras, e acelera o proceso biolóxico do envellecemento. No caso do cancro, as ROS producen unha oxidación do material xenético e en lípidos, dando lugar a produtos como o malondialdehído e o 4-hidroxi-2-nonenal, que son potentes mutáxenos e modulan as vías de sinalización implicadas na proliferación e a apoptose dos procesos relacionados co desenvolvemento do cancro (Márquez e col., 2007).

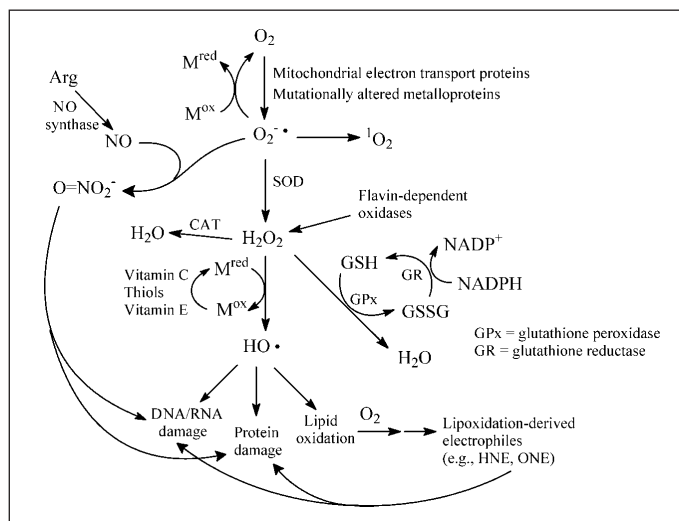


Figura 1. Produción mitocondrial de ROS

O sistema nervioso central (SNC) é particularmente sensible ao estrés oxidativo debido ao seu gran consumo de O₂, e presenta concentracións relativamente baixas de antioxidantes endóxenos (vitamina C, catalasa, superóxido dismutasa, etc.), e niveis elevados de lípidos poliinsaturados, os cales son moi susceptibles á oxidación. A nivel de SNC, os radicais libres pódense xerar como resultado da respiración mitocondrial, como consecuencia de procesos inflamatorios, ou ben por unha excesiva exposición a radiacións ou compostos tóxicos (Blass e Gibson, 1999). Durante os procesos inflamatorios o sistema mieloide, que constitúe un mecanismo de defensa fronte a infeccións a través da produción de radicais libres e ROS, actívase e sofre cambios morfolóxicos transformándose en microglía ameboide (Kreutzberg, 1996; Aloisi e col., 1999). Esta secreta factores solubles, a maioría dos cales son proinflamatorios e neurotóxicos, como o factor de necrose tumoral-α (TNF-α), interleuquina-1β (IL-1β), prostaglandina E2 (PGE2), NO e ROS (Blanco e col., 2008).

A sobreproducción e acumulación destes factores proinflamatorios ten carácter neurotóxico (Block e Hong, 2005) e xoga un papel fundamental na patoxénese de diversas enfermidades neurodexenerativas.

Outro aspecto que hai que ter en conta é a excitotoxicidade inducida por glutamato. O glutamato é un aminoácido neurotransmisor, responsable da maior parte da actividade sináptica excitatoria no cerebro dos mamíferos (Fonnum, 1984), involucrado nos procesos de estrés oxidativo que teñen lugar no cerebro a través de dous mecanismos. O primeiro deles está mediado polos seus receptores ionotrópicos, cuxa sobreactivación induce unha entrada masiva de calcio ao citosol e consecuentemente á mitocondria, provocando estrés oxidativo e activación de mecanismos moleculares responsables de desencadear a morte neuronal apoptótica, tales como:

- Proteasas, nucleasas e lipasas. A peptidasa calpaina I cataliza a conversión de xantino deshidroxenasa a xantino oxidasa, que participa en reaccións a través das cales se producen ROS.
- Óxido nítrico sintasa.
- Fosfolipasa A2, encima que induce un aumento dos niveis de ácido araquidónico, a cal activa a prostaglandina H sintetasa, xerándose ROS neste proceso. Ademais, esta encima estimula a autooxidación da dopamina, que leva consigo a produción de ROS.

O segundo mecanismo a través do cal o glutamato induce neurotoxicidade está mediado pola súa unión ao transportador de cisteína, posto que a privación deste último aminoácido causa un descenso da concentración intracelular de glutatión e unha acumulación de ROS (Bannai e Kitamura, 1980). Á súa vez, o aumento nos niveis de ROS relacionouse cun incremento da secreción de glutamato (Pellegrini-Giampietro e col., 1990).

Por outra parte, o glutamato pode ter un papel neuroprotector (Frade e col., 2008). Tal e como se mostra na Figura 2 (Frade e col., 2008), este aminoácido neurotransmisor regula a liberación de glutatión reducido desde os astrocitos, xa que induce extracelularmente un incremento dos niveis deste, que pode ser empregado polas neuronas para incrementar o contido intracelular de glutatión reducido (Dringen, 2000), facéndooas máis resistentes ao estrés oxidativo inducido por glutamato (Gegg e col., 2005). Ademais o glutatión reducido podería competir pola unión aos receptores de glutamato (Oja e col., 2000).

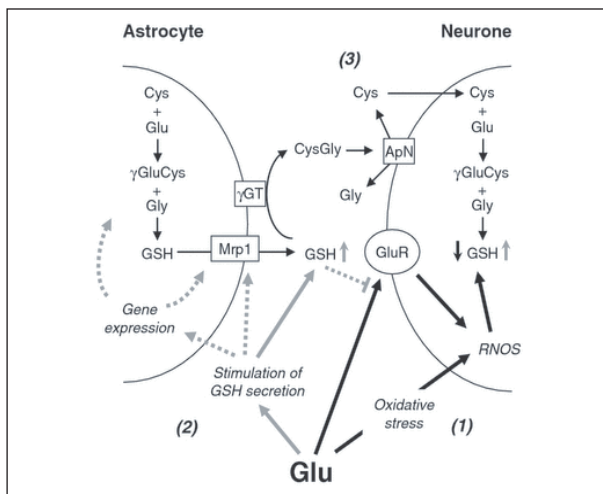


Figura 2. Regulación dos niveis de glutatión reducido por glutamato (Frade e col., 2008)

Envellecemento e enfermidades neurodexenerativas

Existen multitude de teorías sobre o envellecemento. Medvedev, na súa revisión de 1990, describiu máis de 300 mecanismos para explicar este proceso. Na actualidade acéptanse dúas destas teorías:

- Teorías deterministas. Segundo as cales os procesos de envellecemento están programados dentro da información do material xenético.
- Teorías estocásticas. O envellecemento estaría ligado a alteracións xenéticas e á desorganización celular inducidas polo estrés oxidativo.

Ligadas ao proceso de envellecemento encóntranse as enfermidades neurodexenerativas, entre as que destacan a EA e a EP por ser as que presentan unha maior incidencia. Na patoxénese destas enfermidades está implicado o estrés oxidativo, considerado a principal causa de dano neuronal, aínda que non está claro se é unha causa, un resultado ou un epifenómeno do proceso patolóxico ao estar intimamente ligado a outros compoñentes da evolución dexenerativa. Inicialmente o estrés oxidativo promove a formación de péptido β -amiloide no caso da EA e a agregación da proteína α -sinucleína en EP. Posteriormente, en ambas as dúas patoloxías obsérvase neurotoxicidade inducida por glutamato e un aumento da concentración intracelular de calcio coa conseguinte activación de encimas calcio-dependentes (NADPH oxidasa, fosfolipasa A2 citosólica, xantino oxidasa e óxido nítrico sintasa neuronal), producíndose un aumento de ROS e RNS. Ao mesmo tempo, o dano mitocondrial inducido por estas especies induce unha activación da síntese de ROS e da liberación

de calcio. O estrés oxidativo pode tamén estimular os astrositos e a microglia, o que induciría un aumento da secreción de citoquinas e o inicio da resposta inflamatoria (Shibata e Kobayashi, 2008).

Nas áreas cerebrais afectadas en EA e a EP observouse unha perda da homeostase de metais de transición redox-activos (como cobre e ferro) e redox-inactivos (como zinc). Estes metais que son esenciais nos sistemas biolóxicos (por exemplo, participan na reacción de Fenton), en situacións patolóxicas acumúlanse en tecidos e poden ter propiedades neurotóxicas, xa que median reaccións de estrés oxidativo (Sayre e col., 2000), e poden producir danos estruturais en péptidos e proteínas.

A EP caracterízase por unha alteración no control motor debido á dexeneración de neuronas dopaminérxicas na substancia negra *pars compacta* (SNpc). Existen diversas hipóteses para explicar a dexeneración neuronal nesta estrutura cerebral. A hipótese do estrés oxidativo baséase en estudos nos que se demostra a potencial xeración de H_2O_2 e doutras ROS durante o metabolismo da dopamina (DA) (Graham, 1978). Este neurotransmisor pode ser metabolizado por encimas endóxenos como as monoamina oxidasas (MAO), ou ben espontaneamente mediante autooxidación, xerándose H_2O_2 e quinonas (Sulzer e Zecca, 2000), con capacidade de danar proteínas con grupos sulfhidrilo como é o caso do glutatión. Estes feitos foron corroborados en análise postmortem de cerebros de enfermos de EP, nos que se observaron niveis elevados de estrés oxidativo e de ferro na SNpc, baixas concentracións de glutatión, un aumento da peroxidación lipídica e oxidación de ADN e proteínas (Sian e col., 1994; Alam e col., 1997).

É importante mencionar o descenso na actividade do complexo I na cadea de transporte electrónico mitocondrial observado en enfermos de EP (Schapira e col., 1990), o que levaría consigo un incremento da xeración de ROS, que podería alterar a cadea respiratoria, coa conseguinte produción de ROS e dano mitocondrial (Zhang e col., 1990). Ao mesmo tempo, a consecuente depleción enerxética podería alterar o almacenamento vesicular de DA, incrementándose a concentración citosólica de DA autooxidable (Dauer e Przedborski, 2003).

A inflamación foi tamén implicada na patoxénese da EP. Neste sentido, observáronse niveis elevados de ciclooixenasa-2 e microglía reactiva en cerebros de enfermos de EP (Teismann e col., 2003). Por outra parte, a activación da microglia está asociada cunha alteración da regulación do óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que resultaría nun aumento da produción de NO. Isto suxire que o estrés nitrosativo podería xogar un papel importante nesta enfermidade. Ademais, estes enfermos presentan unha maior concentración de glutamato en SNP.

En canto á EA, esta caracterízase por unha perda progresiva de memoria debido á deposición extracelular do péptido β -amiloide nas placas senís, e a aparición de nobelos neurofibrilares. O péptido β -amiloide prodúcese a partir da división encimática da proteína precursora de amiloide, mentres que os nobelos neurofibrilares están compostos por unha proteína do citoesqueleto, denominada *TAU*. O péptido β -amiloide induce unha neurodexeneración a través dun aumento extracelular de glutamato, un incremento da concentración intracelular de calcio, apoptose e a xeración de radicais libres. En enfermos de alzheimer atopáronse niveis elevados de zinc, ferro e cobre no cerebro, que poderían participar na agregación de péptidos β -amiloide (Connor e col., 2001).

Datos epidemiolóxicos e estudos experimentais recentes indican que a exposición a diversos tóxicos ambientais, como herbicidas, metais pesados e o composto metilfenil-tetrahidropiridina (MPTP), están relacionados coa patoxénese de enfermidades neurodexenerativas. No caso do paraquat, a exposición a este herbicida relacionouse cunha perda de neuronas dopaminérxicas e morte celular por apoptose (Peng e col., 2004). Evidenciouse tamén que o funxicida rotenona induce unha dexeneración do sistema dopaminérxico nigroestriatal, alteracións motoras (Inden e col., 2007) e unha inhibición do complexo I da cadea de transporte electrónico mitocondrial, o que conduce a un esgotamento do glutatión e un incremento do estrés oxidativo (Schuler e Casida, 2001). O cadmio está tamén implicado na etioloxía das enfermidades neurodexenerativas a través dun incremento na produción de ROS (Chen e col., 2008).

Antioxidantes

Os antioxidantes poderían protexer contra a neurotoxicidade inducida polo estrés oxidativo (Quintanilla e col., 2005). De feito, viuse nun estudo *in vitro* que a oxidación de proteínas, peroxidación lipídica e neurotoxicidade inducidos polo péptido β -amiloide son inhibidos tras o tratamento con vitamina E (Behl, 1999).

Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é unha neurohormona sintetizada fundamentalmente nos pinealocitos a partir do aminoácido triptófano. Está implicada en numerosas funcións, como a regulación dos ritmos circadianos, do sono, a función inmune, a presión sanguínea, etc. É tamén un potente antioxidante, podendo actuar directamente como scavenger de radicais libres, ou indirectamente, a través da indución de encimas antioxidantes, a estimulación da síntese de glutatión, o incremento da actividade doutras substancias antioxidantes, a protección de encimas antioxidantes fronte ao dano oxidativo e o aumento da eficiencia da cadea de transporte electrónico mitocondrial (Reiter e col., 1998). É unha substancia de carácter lipofíli-

co con capacidade para atravesar a barreira hematoencefálica. De feito, o cerebral é o tecido do organismo cunha maior concentración deste composto, concentración que depende dos niveis circulantes desta neurohormona.

Durante o envellecemento descenden os niveis de melatonina (Iguchi e col., 1982). Isto é importante xa que se viu que mitiga algúns dos cambios indesexables asociados co dito proceso fisiolóxico, así como os ligados a enfermidades neurodegenerativas e á exposición a axentes tóxicos implicados na patoxénese destas enfermidades (Mayo e col., 2005). O seu uso ten interese na prevención e tratamento da EA (Pappolla e col., 2000), xa que, ademais de presentar propiedades antioxidantes, é potencialmente antiinflamatorio, ao regular a actividade da ciclooxixenasa-2, e ten un papel protector fronte a excitotoxinas (Hardeland, 2005). Así mesmo regula os efectos do metabolismo da proteína precursora amiloide mediante a inhibición da súa secreción e a redución da síntese e deposición do péptido β -amiloide (Lahiri e col., 2004), e prevén a fosforilación da proteína TAU.

Tamén foron descritos efectos beneficiosos do tratamento con melatonina na EP, posto que pode evitar a acumulación de radicais libres na mitocondria e o dano do ADN mitocondrial (Chen e col., 2005), e promove a reparación do citoesqueleto (Benitez-King e col., 2004). Demostrouse que protexe o sistema nigro-estriatal do estrés oxidativo causado pola toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina no rato (Thomas e Mohanakumar, 2004) e pola 6-hidroxidopamina en rata (Dabbeni-Sala e col., 2001). Así mesmo, exerce un posible papel protector fronte á neurotoxicidade do cadmio (Romero e col., 2008).

Taurina

A taurina (ácido 2-aminoetano sulfónico) é inxerida a través da dieta e sintetizada a partir da cisteína. É un aminoácido con funcións importantes no SNC, xa que é neurotransmisor (Kuriyama e col., 1983), osmoregulador (Solís e col., 1988), mellora a integridade da membrana (Wright e col., 1986), modula a diferenciación, migración e desenvolvemento neuronal (El Idrissi e col., 1998), e é un neuroprotector fronte á morte celular por excitotoxicidade (Huxtable, 1989). Non se coñecen con claridade os mecanismos a través dos cales exerce o seu papel protector, pero podería actuar directamente como antioxidante ao ser scavenger de radicais libres, ou indirectamente debido ao seu papel protector fronte aos cambios na permeabilidade da membrana causados polo estrés oxidativo e á redución da peroxidación lipídica (Banks e col., 1992).

Nos últimos anos estudouse o valor terapéutico da taurina no tratamento da enfermidade de Huntington (El Idrissi e col. 2003), e o seu papel protector fronte á

neurotoxicidade de numerosos xenobióticos, tales como a micotoxina ácido 3-nitro-propiónico (Tadros e col., 2005) e o cadmio (Sinha e col., 2008).

Estradiol

O estradiol atenúa o dano neuronal debido a traumatismos (Dubal e col., 2006), excitotoxicidade (Perrella e Bhavnani, 2005) e estrés oxidativo (Behl e col., 1995), isto último debido á súa capacidade antioxidante, evidenciada tanto *in vitro* (Vedder e col., 1999) como *in vivo* (Rontu e col., 2004), debida tanto á capacidade antioxidante endóxena da molécula do estradiol (ou grupo libre fenil hidroxilo presente no anel A da molécula interrompe a cadea de reaccións que conduce á formación de radicais libres), así como á activación de factores de transcrición que leva consigo un aumento da expresión e da actividade de encimas antioxidantes (Strehlow e col., 2003). A protección ten lugar mediante mecanismos dependentes e independentes do receptor, tales como o descenso da produción de ROS (Prokai e col., 2003), atenuación de correntes de calcio (Hilton e col., 2006) e activación de *cascadas* de transdución de sinais para a promoción da supervivencia (Honda e col., 2000).

A administración de estróxenos demostrou ser eficaz no tratamento de numerosos modelos de patoloxías neuronais, como a esclerose múltiple, EP, epilepsia e EA (Leranth e col., 2000; Sribnick e col., 2003; Sierra e col., 2003; Heikkinen e col., 2004). Concretamente, protexe fronte á toxicidade inducida polo péptidos β -amiloide (Pike, 1999), fronte á toxicidade inducida por glutamato (Zaulyanov e col., 1999), por H_2O_2 (Moosmann and Behl, 1999), da privación de oxíxeno e glicosa (Regan e Guo, 1997), ferro (Blum-Degen e col., 1998), hemoglobina e tóxicos que actúan a nivel mitocondrial (Regan e Guo, 1997). De feito, estudos epidemiolóxicos demostraron que a terapia estroxénica tras a menopausia está relacionada cun descenso da incidencia de enfermidades neurodexenerativas (Zandi e col., 2002), aínda que esta acción neuroprotectora non se limita a femias, senón que tamén foi observada en machos (Hawk e col., 1998; Toung e col., 1998).

BIBLIOGRAFÍA

- Alam, Z. I., Jenner, A., Daniel, S. E., e col. (1997). *J. Neurochem.*, 69, 1196-1203.
- Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., e col. (1999). *Eur. J. Immunol.*, 29, 2705-2714.
- Banks, M.A., Porter, D.W., Martín, e col. (1992). *En: Lombardini JB, Schaffer SW, Azuma J, eds. Taurine: Nutritional Value and Mechanisms of Action. New York: Plenum Press*, 341-359.
- Bannai, S., Kitamura, E. (1980). *J. Biol. Chem.*, 255, 2372-2376.
- Behl, C., Widmann, M., Trapp, T., e col. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216, 473-482.
- Behl, C. (1999). *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 69, 213-219.
- Benítez-King, G., Ramírez-Rodríguez, G., Ortiz, L., e col. (2004). *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 3, 515-533.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., e col. (2008). *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19, 41-52. Review.

- Blass, J.P., Gibson, G.E. (1999). *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 10, 335-358.
- Block, M.L., Hong, J.S. (2005). *Prog. Neurobiol.*, 76, 77-98. Review.
- Blum-Degen, D., Haas, M., Pohli, S., e col. (1998). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152, 49-55.
- Chen, L., Liu, L., Huang, S. (2008). *Radic. Biol. Med.*, 45, 1035-1044.
- Chen, L.J., Gao, E.Q., Li, X.J., e col. (2005). *J. Pineal. Res.*, 39, 34-42.
- Connor, J. R., Milward, E.A., Moalem, S., e col. (2001). *J. Alzheimers. Dis.*, 3, 471-477.
- Dabbeni-Sala, F., Di Santo, S., Franceschini, D., e col. (2001). *FASEB J.*, 15, 164-170.
- Dauer, W., Przedborski, S. (2003). *Neuron.*, 39, 889-909.
- Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000). *Eur. J. Biochem.*, 267, 4912-4916. Review.
- Dubal, D.B., Rau, S.W., Shughrue, P.J., e col. (2006). *Endocrinology.*, 147, 3076-3084.
- El Idrissi, A., Harris, C., Trenkner, E. (1998). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 442, 385-396.
- El Idrissi, A., Messing, J., Scalia, J., (2003). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 526, 515-525.
- Fonnum, F. (1984). *J. Neurochem.*, 42, 1-11. Review.
- Frade, J., Pope, S., Schmidt, M., e col. (2008) *J. Neurochem.*, 105, 1144-1152.
- Graham, D.G. (1978). *Mol. Pharmacol.*, 14, 633-643.
- Gegg, M.E., Clark, J.B., Heales, S.J. (2005). *Brain. Res.*, 1036, 1-6.
- Genestra, M. (2007). *Cell. Signal.*, 19, 1807-1819.
- Hawk, T., Zhang, E.Q., Rajakumar, G., e col. (1998). *Brain. Res.*, 796, 296-298.
- Hardeland, R. (2005). *Endocrine.*, 27, 119-130.
- Heikkinen, T., Kalesnykas, G., Rissanen, A., e col. (2004). *Exp. Neuro.*, 187, 105-117.
- Hilton, G.D., Bambrick, L.L., Thompson, S.M., e col. (2006). *Endocrinology.*, 147, 1246-1255.
- Honda, K., Sawada, H., Kihara, T., e col. (2000). *J. Neurosci. Res.*, 60, 321-327.
- Huxtable, R.J. (1989). *Prog. Neurobiol.*, 32, 471-533.
- Iguchi, H., Kato, K.I., Ibayashi, H. (1982). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55, 27-29.
- Inden, M., Kitamura, E., Takeuchi, H., e col. (2007). *J. Neurochem.*, 101, 1491-1504.
- Jenner, P. (2003). *Ann. Neurol.*, 53, 26-36.
- Kuriyama, K., Ida, S., Nishimura, C., Ohkuma, S. (1983). *Prog. Clin. Biol. Res.*, 125, 127-140.
- Kreutzberg, G.W. (1996). *Trends. Neurosci.*, 19, 312-318. Review.
- Lahiri, D.K., Chen, D., Ge, E.W., e col. (2004). *J. Pineal. Res.*, 36, 224-231.
- Lass, A., Agarwal, S., Sohal, R.S. (1997). *J. Biol. Chem.*, 272, 19199-19204.
- Leranth, C., Roth, R.H., Elsworth, J.D., e col. (2000). *J. Neurosci.*, 20, 8604-8609.
- Márquez, A., Villa-Treviño, S., Guéraud, F. (2007). *Redox. Rep.*, 12, 35-39.
- Mayo, J.C., Sainz, R.M., Tan, D.X., e col. (2005). *J. Neuroimmunol.*, 165, 139-149.
- Moormann, B., Behlm, C. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 8867-8872.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, M. (1990). *J. Neurosci.*, 10, 1035-1042.
- Prokai, L., Prokai-Tatrai, K., Perjesi, P., e col. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100, 11741-1176.
- Oja, S.S., Janáky, R., Varga, V., e col. (2000). *Neurochem. Int.*, 37, 299-306.
- Pappolla, M.A., Chyan, E.J., Poeggeler, B., e col. (2000). *J. Neural. Transm.*, 107, 203-231.
- Peng, J., Mao, X.O., Stevenson, F.F., e col. (2004). *J. Biol. Chem.*, 279, 32626-3232.
- Perrella, J., Bhavnani, B.R. (2005). *BMC. Neurosci.*, 6, 34.

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

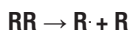
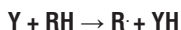
RADICAIS LIBRES, ESTRÉS OXIDATIVO E CARCINOXÉNESE

Arturo Hardisson de la Torre
Área de Toxicoloxía. Universidade da Laguna

Un radical libre é unha estrutura química capaz de existir independentemente, de vida media curta e que posúe un ou máis electróns desapareados no seu orbital máis externo. Os radicais libres poden formarse pola ruptura homolítica dun enlace molecular. Unha vez formados, poden iniciar un variado número de reaccións que se producen en cadea.

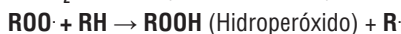
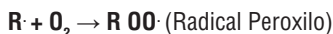
Estrés oxidativo: o mecanismo de estres oxidativo ou mecanismo de autooxidación explícase mediante tres tipos de reaccións secuenciais:

1. Reacción de INICIACIÓN:

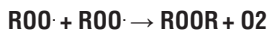


RH é unha estrutura que ten ácidos graxos poliinsaturados.

2. Reacción de PROPAGACIÓN (ocorre en presenza de oxíxeno):



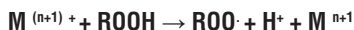
3. Reacción de TERMINACIÓN:



Pode existir, así mesmo, unha reacción de iniciación secundaria orixinada pola ruptura homolítica de hidroperóxidos:



Tamén é de sumo interese o papel que xogan os metais pesados na catálise das reaccións do estrés oxidativo. Se representamos as especies metálicas como M^{n+} , as reaccións que se poden producir son:



Os metais que máis frecuentemente son catalizadores deste tipo de reaccións son Fe e Cu.

Principais especies reactivas de oxíxeno que se producen nos sistemas biolóxicos

Na táboa 1 descríbense as especies oxíxeno activas coas súas respectivas vidas medias á temperatura corporal (37°C). Na Táboa 2 preséntanse as especies nitróxeno activas que tamén se forman nos organismos e que teñen capacidade oxidante.

A molécula de oxíxeno O_2 pode reducirse secuencialmente segundo as reaccións seguintes:

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

		Vida media (37°C)
$O_2^{\cdot-}$	Radical anión superóxido	$>10^{-6}$
$HO_2^{\cdot}$	Radical perhidroxilo	Inestable
$[H_2 O_2]$	Peróxido de hidróxeno	
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxilo	10^{-9}
$RO^{\cdot}$	Radical alcoxilo	10^{-6}
$ROO^{\cdot}$	Radical peroxilo	10^{-2}
$[ROOH]$	Hidroperóxido	
$[1 O_2^{\cdot}]$	Oxíxeno singlete	10^{-8}
O_2	Oxíxeno molecular	$>10^2$
$[-R-R]-O$	Epóxido	

Táboa 1. Principais especies reactivas de oxíxeno que se producen nos sistemas biolóxicos

Como se observa, se a redución non é completa ata a formación de auga, prodúcese especies oxíxeno activas moi oxidantes e daniñas para os tecidos como son o radical superóxido, a auga oxixenada e o radical hidroxilo, este último é o radical máis oxidante de todos.

		Vida media (37°C/S)
NO	Radical óxido nítrico	$>1^{-10}$
$NO_2^{\cdot}$	Radical dióxido de nitróxeno	
$ONOO^{\cdot}$	Peróxinitrito	0,05-1

Táboa 2. Especies reactivas de nitróxeno que se producen nos sistemas biolóxicos

Propiedades das principais especies de oxíxeno activas

a. Oxíxeno singlete ou singulete.

O oxíxeno singlete preséntase en dúas formas; o oxíxeno singulete delta $^1\Delta_g \text{O}_2$ e o oxíxeno singlete sigma $^1\Sigma_g \text{O}_2$. O máis importante bioloxicamente é o delta, xa que ten unha longa vida media fronte ao sigma, que é unha especie con vida media moi curta e alta reactividade.

b. Radical superóxido.

O radical superóxido resulta da captación dun electrón por parte da molécula de oxíxeno. Á súa vez, a reacción entre dous radicais superóxido con dous protóns e catalizada pola superóxido dismutasa (SOD) dá lugar a auga oxixenada. Se o pH diminúe, pódese formar o radical perhidroxilo.

c. Peróxido de hidróxeno.

O peróxido de hidróxeno ou auga oxixenada é un potente oxidante dos sistemas biolóxicos que actúa sobre macromoléculas orgánicas disoltas na auga. Difúndese pasivamente a través das membranas celulares e convértese nun oxidante citotóxico. Como se viu no apartado anterior, pode formarse na reacción entre dous radicais superóxido catalizada pola superóxido dismutasa.

d. Radical hidroxilo.

É o radical máis oxidante. A principal fonte de radicais OH· é a denominada reacción de HABER-WEISS.

Produción de especies oxíxeno activas nos tecidos

A produción de radicais libres de oxíxeno pódese levar a cabo nos sistemas biolóxicos mediante:

1. A acción de radicais sobre moléculas como o retinol, a riboflavina, a clorofila ou a bilirrubina.
2. As reaccións REDOX con metais de transición como o Fe.
3. As reaccións REDOX catalizadas por encimas.

Fontes exógenas e endógenas de radicais libres de oxíxeno

As fontes que proceden do medio exterior ao organismo son múltiples e variadas. Podemos destacar inflamacións, fume do tabaco, exceso de exercicio físico, os con-

taminantes atmosféricos (SO_2 , NO_2), as radiacións ionizantes e ultravioleta, certos medicamentos como anestésicos, antimicrobianos e citostáticos, unha dieta moi rica en PUFA's, e a presenza de xenobióticos.

As fontes intracelulares ou endóxeas de radicais libres de oxíxeno son tamén diversas. Entre elas pódense citar os compostos de baixo peso molecular presentes no citosol (flavinas, catecolaminas, quinonas, tiois e difenóis), as moléculas que conteñen pigmentos como a hemoglobina e a mioglobina; as proteínas encimáticas (monoaminoxidasa (MAO), aldehidooxidasa ou ciclooxixenasa); os peroxisomas que son orgánulos que forman H_2O_2 pois teñen moitas oxidasas e as cadeas de transporte electrónico mitocondrial e microsomal.

Dano molecular dos radicais libres de oxíxeno

A produción de radicais libres de especies oxíxeno activo conduce a unha interacción coas principais moléculas do organismo, tales como proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ácidos nucleicos. Iso provoca unha alteración do metabolismo celular con dano subcelular, orixinando unhas alteracións da homeostase celular (citotoxicidade) que pode conducir ao envellecemento e á enfermidade (enfermidades coronarias, cancro, cataratas, etc.).

Normalmente, as especies oxíxeno activas e entre elas o radical $\text{OH}^\bullet$ desnaturalizan as proteínas por escisión das cadeas polipeptídicas, despolimerizan os polisacáridos, escinden as febras de ADN ou modifican as súas bases e peroxidan os lípidos. Así mesmo, as moléculas de baixo peso molecular perden a súa funcionalidade.

a. Dano radicalario ás proteínas.

Os radicais actúan sobre moléculas proteicas que teñen dobres enlaces e sobre moléculas con grupos axofrados. Deste xeito, as proteínas cos aminoácidos triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina e cisteína, son as máis sensibles ao ataque radicalario.

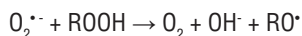
Un potente carcinóxeno como é o fume do tabaco cando entra en contacto reiterado cos pulmóns incrementa os neutrófilos e cando estes se activan xeran máis radicais libres. Estes radicais $\text{A}^\bullet$ actúan preferentemente sobre os grupos tiólicos das proteínas ($-\text{SH}$).



b. Dano radicalario aos lípidos.

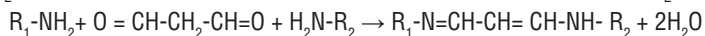
Os radicais libres actúan sobre a fracción insaturada dos lípidos orixinando peróxidos. Os peróxidos son potentes oxidantes que actúan sobre a membrana celular e sobre biomoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, etc.

O fenómeno de peroxidación lipídica é iniciado polos radicais $\text{OH}^\bullet$ e polos hidroperóxidos ROOH . Non intervéñen o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, este é capaz de reaccionar cos hidroperóxidos orixinando radicais alcóxilos:



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

O indicador da peroxidación lipídica é o aldehído malónico ou malondialdehído ($\text{O} = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{O}$). Este pode reaccionar con bases nitroxenadas ($\text{R}-\text{NH}_2$) do ADN.



c. Dano radicalario aos ácidos nucleicos.

O dano radicalario aos ácidos ADN e ARN implica a posible aparición de cancro. Sábese que o radical máis activo sobre estas moléculas é o $\text{OH}^\bullet$. Mutacións e morte celular asóciáanse ás reaccións de radicais libres co ADN. Coñécense os lugares máis sensibles do ADN, que son: pirimidinas (timina e citosina), purinas (adeninas e guanina) e o monosacárido desoxirribosa.

A exposición do ADN aos radicais libres de oxíxeno pode provocar a ruptura das cadeas deste ácido nucleico, ou ben xeran sitiosapurínicos ou apirimidínicos. Así mesmo, e indirectamente, a rotura das febras de ADN pode deberse á activación de endonucleasas (proteasas e fosfolipasas) mediante o calcio, debido a unha alteración da homeostase deste ión divalente por dano aos canais de calcio da membrana celular.

Tamén, o ADN mitocondrial é unha diana moi sensible aos radicais de oxíxeno reactivos, xa que a mitocondria é a principal fonte de anións superóxido e de auga oxixenada.

d. Dano radicalario aos carbohidratos.

O dano aos hidratos de carbono por parte dos radicais libres abrangue desde os monosacáridos ata as macromoléculas poliméricas. Así, poden verse afectados monosacáridos como a glicosa, o manitol e os desoxiazucres; os nucleótidos que reaccionan co radical $\text{OH}^\bullet$, producíndose novos radicais libres altamente reactivos e os hidratos de carbono complexos que poden sufrir fragmentacións nas súas estruturas poliméricas.

O ácido hialurónico é un composto formado por unidades de ácido glicurónico e de N- acetilglicosamina. A súa función é manter a viscosidade do líquido sinovial. Cando o ácido hialurónico se despolimeriza, perde a súa acción lubricante.

Outra enfermidade das articulacións, como é a artrite reumatoide, tamén parece ter a súa orixe nun mecanismo radicalario.

Sistemas de defensa antioxidante

Existen no organismo diversos sistemas que nos defenden das agresións dos radicais e que manteñen a homeostase do medio interno.

Podemos clasificar estes sistemas en dous grupos: os sistemas defensivos primarios que son preventivos e reaccionan cos radicais directamente xerados do oxíxeno bloqueando a fase de iniciación e os sistemas defensivos secundarios que son “scavenger” de radicais propagadores.

Os sistemas primarios poden ser de tipo encimático ou non encimático. Entre os primeiros atópanse as encimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión redutasa, glicosa-6-fosfato-deshidroxenasa e DT-diaforasa. Os secundarios non encimáticos son: proteínas, glutatión, a vitamina C, o ácido úrico e a taurina.

Os sistemas de defensa antioxidante secundarios tamén, ao igual que os primarios, poden ser de tipo encimático e de tipo non encimático.

As especies máis representativas na defensa antioxidante de carácter secundario son: oxidoreductasas específicas de proteínas, proteasas, glutatión peroxidasa non selenio dependente, fosfolipasas e diversos sistemas de reparación do ADN. Dentro dos non encimáticos atopámonos cos tocoferois, os carotenoides, a bilirrubina e a ubiquinona.

Mecanismo da carcinoxénese

A aparición de cancro nos individuos pode deberse a factores xenéticos e a factores ambientais. Os factores dependentes do ambiente son probablemente dominantes na xénese do cancro. Algúns autores consideran que os factores nutricionais e outros factores englobados no denominado “estilo de vida” poden ter relación coa aparición do 30% dos cancros.

Na carcinoxénese considéranse tales fases sucesivas, desde que unha célula normal se transforma en maligna.

A fase de iniciación, na cal se produce unha mutación (alteración da información xenética) nunha molécula normal. Cabe a posibilidade da reparación do ADN. Nesta iniciación interveñen factores xenotóxicos ou carcinógenos como os hidrocarburos aromáticos polinucleares, as nitrosaminas ou as aminas heterocíclicas.

A fase de promoción, é unha fase de proliferación celular cun período de latencia moi longo, que abrangue entre 10 e 30 anos. Trataríase de células premalignas que poden retornar á normalidade ou, pola contra, converterse lentamente nunha neoplasia.

Nesta fase as células premalignas poden pasar a células iniciadas mediante a utilización de vitaminas antioxidantes. É dicir, pode ser posible a reversión.

A fase de progresión, é unha fase co cancro en estado constituínte, onde se produce metástase, ben por invasión dos tecidos veciños, ou ben por metástases sistémicas.

Nesta fase xa non é posible a prevención e o que procede é o tratamento con cirurxía, radioterapia e/ou quimioterapia.

Nutrientes antioxidantes

Os nutrientes antioxidantes son fundamentalmente catro: a vitamina E, a vitamina C, os carotenoides e o selenio.

Vitamina E

Esta vitamina está composta por 8 estruturas, 4 tocoferois e 4 tocotrienois. Destes 8 vitámeros, o de maior actividade vitamínica é o α -tocoferol. Esta vitamina está presente nalgúns froitos secos, no xerme de trigo en aceites de sementes (aceite de oliva, xirasol, etc.). Tamén está presente en verduras, hortalizas e cereais. As propiedades da vitamina E consisten en actuar como antioxidante neutralizando os radicais libres. A vitamina E estabiliza as membranas biolóxicas e protéxelas da peroxidación lipídica. Ademais, intervéen na agregación plaquetaria, a hemólise e na activación de certas encimas. Tamén mellora a resposta inmunolóxica do organismo. A vitamina E é un antioxidante sinérxico con certos sistemas antioxidantes endóxenos como a glutatión peroxidasa, a catalasa e a superóxido dismutasa (SOD). Á súa vez, a vitamina C e o glutatión reducido poden rexenerar o α -tocoferol a partir do radical tocoferilo. Tamén a vitamina E protexe a vitamina A e inhibe a conversión de nitritos en nitrosaminas potencialmente canceríxenos.

Vitamina C

O ser humano necesita vitamina C para evitar unha enfermidade carencial chamada escorbuto. Quimicamente é o ácido L-ascórbico, a forma D é inactiva. O ácido L-ascórbico atópase fundamentalmente nos vexetais frescos. Os alimentos que con-

teñen máis vitamina C son a acerola, a grosella e o amorodo. No entanto, as fontes máis importantes para a poboación son os cítricos (laranxa, limón, lima e kiwi). A vitamina C é un potente axente redutor e como se trata dunha vitamina hidrosoluble, atribúenselle as mellores propiedades antioxidantes do líquido extracelular, aínda que tamén ten efectos no líquido intracelular.

Carotenoides

Estes compostos de cor amarela avermellada ou laranxa divídense en dous grupos: os carotenos e as xantofilas. Dentro dos carotenos, atopamos compostos provitamina A, tales como o α -caroteno, o β -caroteno e o γ -caroteno e outros non provitamínicos, tales como o licopeno, o fitoeno e o fitoflueno. Á súa vez, as xantofilas teñen compostos provitamínicos como a β -criptoxantina e non provitamínicos como a luteína, a zeaxantina, a cantaxantina e a equinenona. Os mecanismos de protección que exercen os carotenoides sobre as células fundaméntanse na súa acción fotoprotectora fronte aos efectos masivos das radiacións solares, ou tamén actuando sobre os radicais de oxíxeno activo responsables do estrés oxidativo celular. Non todos os carotenoides teñen acción antioxidante, pero os que teñen actividade son os seguintes: o β -caroteno, o α -caroteno, a β -criptoxantina, a luteína e o licopeno, este último é o captador de radicais máis potente do grupo, que non ten actividade provitamínica e que se encontra presente en cantidades altas no tomate.

Selenio

O selenio forma parte do sistema defensivo do corpo e é un protector do dano orixinado polos radicais libres do oxíxeno. O selenio é un compoñente da encima glutatión-peroxidasa que destrúe os peróxidos dos ácidos graxos. Unha molécula desta encima contén 4 átomos de selenio, por iso se considera unha encima selenio dependente.

Dada a capacidade que ten o Se para substituír o S dos aminoácidos axofrados, este oligoelemento atópase predominantemente presente nos alimentos proteicos. Polo tanto, atópase maioritariamente en alimentos de orixe animal, como a carne, as vísceras e os mariscos. Tamén está presente en alimentos vexetais do grupo dos legumes, cereais e froitos secos. Obviamente, estes últimos ao consumírense en pouca cantidade non achegan suficiente selenio á dieta. Outros alimentos vexetais como as froitas e as hortalizas apenas teñen selenio. Os grupos de risco que presenten achegamentos subclínicos de selenio son persoas novas con dietas desequilibradas, vexetarianos, anciáns que viven sos e non coidan a súa dieta, mulleres xestantes e lactantes, fumadores e enfermos crónicos.

Os efectos do selenio son os seguintes:

- É un antioxidante que prevén a peroxidación dos lípidos celulares.
- Prevén a formación de coágulos inhibindo a formación plaquetaria.
- Aumenta a resistencia do sistema inmune.
- Inhibe o dano aos cromosomas, as infeccións e o cancro.
- É fundamental para a produción de hormonas tiroideas.
- Ten un efecto antitóxico contra os efectos prexudiciais dos metais pesados.

O selenio activa os linfocitos T e os macrófagos, polo que se considera un potente estimulador do sistema inmune. Hai zonas do mundo con moi baixos niveis de selenio, como Escandinavia ou a rexión de Keshan en China, onde se presentou unha enfermidade que afecta o músculo cardíaco sobre todo en mulleres novas e nenos.

Antioxidantes non nutrientes

Está composto por grupos fenólicos e polifenólicos, entre os que destacan os bioflavonoides. Tamén debemos destacar á ubiquinona, que é un antioxidante liposoluble sintetizado polas células animais.

Os bioflavonoides non teñen acción vitamínica, pero reducen a permeabilidade e/ou fragilidade capilar. Tamén forman complexos con metais divalentes tales como o Fe^{2+} e o Cu^{2+} , o que evitaría o papel catalítico destes ións no estrés oxidativo. Atópanse en alimentos estimulantes como o té ou o café, o viño tinto, as olivas, a soia, etc.

A ubiquinona é o coenzima Q de tanta importancia no metabolismo intermediario, actúa como molécula antioxidante e rexeneradora da vitamina E, unha vez que o tocoferol reaccionou cunha especie radicalaria.

Exemplos de xenobióticos con mecanismo de toxicidade radicalario

Tetracloruro de carbono: é un potente axente hepatocarcinógeno que genera o radical $\text{Cl}_3\text{C}^\bullet$, que é un potente axente alquilante, fortemente electrofílico e capaz de reaccionar con moléculas nucleofílicas como o ADN.

Aflatoxina B_1 : é outro potente hepatocarcinógeno, que se atopa en cereais e pensos contaminados polo fungo do xénero *Aspergillus*. Esta molécula metabolízase seguindo reaccións de oxidación. A súa biotransformación orixina varios metabolitos, un dos cales é a aflatoxina B_1 Epóxido, que é capaz de reaccionar con macromoléculas celulares como o ADN.

Na Figura 1 preséntanse os metabolitos da aflatoxina B_1 que se producen na súa biotransformación.

3,4-Benzopireno: este hidrocarburo aromático policíclico é un composto presente no fume do tabaco e en alimentos afumados. Considérase o axente produtor do cancro de pulmón nos fumadores. O seu mecanismo de toxicidade provén da súa biotransformación oxidativa en metabolitos “epoxi”. O epóxido-benzopireno únese á guanina do ADN, colocándose entre a dobre hélice deste ácido nucleico, o que leva consigo a unha replicación defectuosa desta molécula e na posterior aparición de cancro.

A Figura 3 representa a interacción do 3,4-benzopireno e a dobre hélice do ADN.

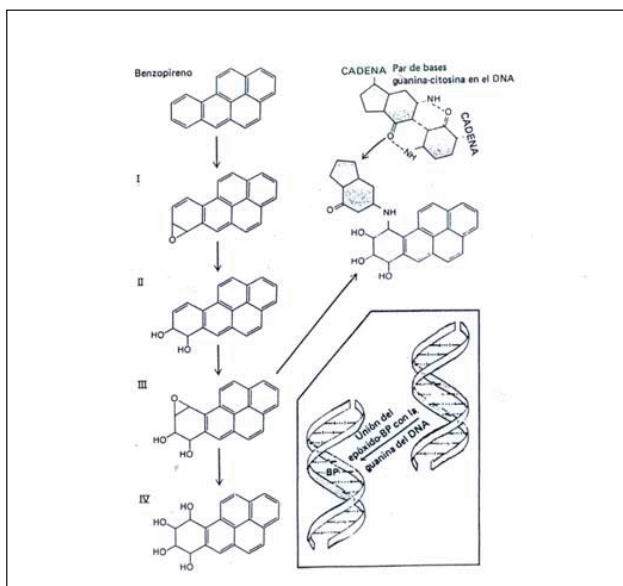


Figura 3. Interacción do benzopireno co ADN

BIBLIOGRAFÍA

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



BLOQUE III. APLICACIONES



QUIMIOMETRÍA E ANTIOXIDANTES

Carlos Herrero Latorre

Dpto. Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía. Facultade de Ciencias. Universidade de Santiago de Compostela

A quimiometría é unha rama da química analítica que se define como a utilización de técnicas estatísticas, matemáticas e de lóxica formal para: (a) deseñar ou seleccionar procedementos experimentais óptimos, (b) extraer a máxima información relevante mediante a análise de datos químicos e (c) obter calquera coñecemento de sistemas químicos. Nos últimos anos, a quimiometría converteuse nunha ferramenta fundamental na investigación sobre os antioxidantes: “In the research on the antioxidant capacity..., the improvent of the current methods and the development of new evaluation tools are clarly prime objectives for the future... One very recent solution looks highly promising, it involves subjecting a set of samples to various analysis methods and then procesing the results through chemometric procedures...” (Laguerre e col., 2007). Os aspectos de maior utilización de técnicas quimiométricas na investigación en antioxidantes son os seguintes:

- Propoñer, desenvolver e optimizar metodoloxías analíticas para a determinación de compostos con capacidade antioxidante.
- Avaliar e modelizar a capacidade antioxidante de diferentes compostos.
- Caracterizar diferentes tipos de alimentos (pola súa orixe xeográfica, calidade...) en relación coa súa composición química e, en especial, en función da súa achega en compostos antioxidantes.

Esta ponencia divídese en dúas partes: 1. Fundamentos quimiométricos e 2. Aplicacións quimiométricas na investigación sobre antioxidantes.

Fundamentos quimiométricos

Os procedementos agrupados segundo as diferentes técnicas foron as seguintes:

- Técnicas de visualización
 - Análise en compoñentes principais
 - Análise de clusters
- Técnicas de regresión multivariada
 - PLS (Partial least squares regression)
 - PCR (Principal component regression)
 - Redes neuronais

- Técnicas de recoñecemento de modelos supervisadas
 - Análise discriminante
 - KNN (K-nearest neighbours)
 - SIMCA (Soft independent modelling of class analogy)
 - Redes neuronais

No presente resumo non se pretende profundar na explicación destes procedementos matemáticos, polo que unicamente se recomenda un conxunto de textos básicos de quimiometría que poden servir ao interesado para coñecer as bases matemáticas e estatísticas das técnicas antes indicadas. Véxanse por exemplo: Meloun e col., 1992; Vandeginste e col., 1998 e Kowalski, 1984.

Aplicacións quimiométricas na investigación sobre antioxidantes

1. Proposición, desenvolvemento e optimización das metodoloxías analíticas para a determinación de compostos con capacidade antioxidante

Mediante diversos exemplos ilústrase a posibilidade de desenvolver novas metodoloxías analíticas nas que a medida dun conxunto amplo de variables ou sinais analíticos permite calibrar e determinar simultaneamente diferentes tipos de axentes oxidantes nunha única medida de forma rápida e eficiente. Véxanse como exemplos a determinación de Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Propyl gallate (PG) e tert-Butylhydroquinone (TBHQ) a partir dunha medida voltamétrica e posterior calibración multivariada (Ni e col., 2000); ou o uso doutro diferente sinal analítico como a absorción infravermella, que serviu para a determinación, neste caso, de antioxidantes (Irganox 1010 e Irgafos 168) en polietileno empregando unha regresión PLS para a cuantificación dos citados antioxidantes (Camacho e Karlsson, 2002).

2. Avaliación e modelización da capacidade antioxidante de diferentes compostos

Os estudos de avaliación e, no seu caso, posterior modelización da actividade antioxidante de diferentes compostos en diferentes condicións, constitúen a aplicación máis habitual da quimiometría á investigación nos antioxidantes. Empregáronse diversas técnicas de regresión multivariada e de clasificación para a predición da capacidade oxidante de certos compostos en función da súa estrutura molecular (estudos estrutura-actividade: QSAR). Un exemplo moi ilustrativo son os traballos de Weber e col. (2006a, 2006b); no primeiro destes desenvólvese un modelo de regresión multivariada no que, en función das características químicas de diferentes flavonoides, predise con éxito a súa actividade antioxidante. No segundo caso o enfoque é distinto, baseándose nas mesmas propiedades clasifícanse os flavonoides

en cuestión mediante diversos sistemas multidimensionais, quedando estes agrupados en función da súa actividade antioxidante. Outros exemplos poden ser: Farkas e col. (2004) que empregaron PLS para a predición da actividade antioxidante doutro conxunto de diferentes flavonoides; Kamal e Anderson (1997) que avaliaron a actividade antioxidante de tocoferol proveniente de diferentes aceites vexetais; e Dumarey e col. (2008) que mediante os diferentes modelos de regresión (PCR e PLS) modelizaron a actividade antioxidante de té verde en función dos datos cromatográficos.

3. Caracterización dos diferentes tipos de alimentos en función da súa achega de compostos antioxidantes

Neste último bloque de aplicacións presentáronse diversos exemplos de uso das distintas técnicas de clasificación para a caracterización e tipificación de alimentos en función da súa composición química, e en especial, tendo en conta a posible achega á dieta de compostos con poder antioxidante. García e col. (2003) demostraron a diferente composición polifenólica de catro aceites de oliva virxe procedentes de catro variedades de oliva diferentes (Picual, Arbequina, Hojiblanca e Cornicabra) e por ende, a súa diferente capacidade de achega de antioxidantes. Neste traballo desenvolveron un modelo de clasificación que permite a diferenciación das catro clases de aceites. Similares formulacións foron levadas a cabo por outros autores en diferentes tipos de alimentos: Betroncelj e col. (2007) en mel, Rebolo e col. (2000) en viños, Hernández e col. (2005) en tomate, Jahan (2005) en carne de polo, entre outros.

Conclusión

A aplicación de técnicas quimiométricas á información química obtida na investigación sobre antioxidantes é unha ferramenta útil. O uso de diferentes técnicas matemáticas e estatísticas permite, en base a sinais analíticos apropiados, a obtención de sistemas de predición da actividade antioxidante de diferentes compostos e/ou produtos, así como a clasificación destes en función da súa capacidade antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Betroncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., e col. (2007). *Food Chem.*, 105, 822-828.
- Camacho, W., Karlsson, S. (2002). *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 7, 41-51.
- Dumarey, M., Naderkassel, A., Deconick, E., y col. (2008). *J. Chromatog. A*, 1192, 81-88.
- Farkas, O., Jakus, J. e Heberger, K. (2004). *Molecules.*, 9, 1079-1088.
- García, A., Brenes, M., García, P., e col. (2003). *Eur. Food Res. Tecnol.*, 216, 520-525.
- Hernandez M. e col. (2005). *EJEAFChe.*, 4, 1035-1043.
- Jahan. K. (2005). *Poultry Sci.*, 84, 158-166.
- Kamal-Eldin, A., e Andersson, R. A. (1997). *JAOCS.*, 74, 375-380.
- Laguerre, M., Leconte, J. P., e Villeneuve, P. (2007). *Progr. Lipid Res.*, 46, 244-282.

Nin, E., Wang, L., e Kokot, S. (2000). *Anal. Chim. Acta*, 412, 185-193

Rebolo, S., Pena, R. M., Latorre, M. J., e col. (2000). *Anal. Chim. Acta*, 417, 211-220.

Weber, C., Honorio, K., Bruni, A., e col. (2006a). *Struc. Chem.*, 17, 307-320.

Weber, C., Honorio, K., Bruni, A., e col. (2006b). *J. Mol. Model.*, 12, 915-920.

ASPECTOS LEGAIS DO USO DE ANTIOXIDANTES EN ENVASES DE ALIMENTOS, NOVAS FORMULACIÓNS DE ENVASES ACTIVOS

Víctor Teruel Muñoz

Área de Xestión de Riscos Químicos. Subdirección Xeral de Xestión de Riscos Alimentarios

Introdución

No seu concepto inicial, os envases tiñan as funcións de conservar, conter, transportar e protexer os alimentos. A aparición de novos materiais de síntese, sen un historial de uso ao longo da historia, deu lugar a que xurdise unha preocupación da saúde dos consumidores e comezouse a legislar as substancias autorizadas para o seu uso nos materiais que forman parte dos envases, así como as súas restricións de uso. De xeito que xurdiu no ano 1976 a primeira norma comunitaria neste sentido, chegando ata o actual marco lexislativo regulado mediante o Regulamento 1935/2004 do Parlamento Europeo e do Consello, do 27 de outubro de 2004, sobre os materiais e obxectos destinados a entrar en contacto con alimentos e polo que se derroga as Directivas 80/590/CEE e 89/109/CEE.

Este Regulamento 1935/2004 introduce aspectos novidosos nas funcións dos envases, entendendo que estes poden tamén informar sobre o estado dos alimentos e alongar a súa vida útil.

A finalidade deste novo marco legal é garantir o mercado interior e proporcionar a base para cumprir o elevado nivel de protección relativo á saúde humana e aos intereses dos consumidores. O seu ámbito de aplicación abrangue os materiais e obxectos rematados, incluídos os activos e intelixentes, en contacto con alimentos, tanto aqueles que estean destinados a entrar en contacto con alimentos como aqueles dos que haxa que esperar razoablemente, que entrarán en contacto con alimentos ou que transferirán os seus compoñentes aos alimentos en condicións normais ou previsibles de emprego.

Novos conceptos

O Regulamento 1935/2004 introduce como novidade destacable a incorporación dos materiais e obxectos activos e intelixentes.

Os materiais e obxectos activos están destinados a ampliar o tempo de conservación dos alimentos ou a manter ou mellorar o seu estado, e para iso poden:

- Incorporar compoñentes que transmitan substancias aos alimentos envasados ou ao contorno destes ou
- Absorber substancias dos alimentos envasados ou do contorno destes.

Por outro lado, os materiais e obxectos intelixentes son aqueles que controlan o estado dos alimentos envasados ou o contorno deles.

Requisitos xerais da lexislación sobre os envases

Os envases destinados a estar en contacto con alimentos deben ser fabricados de conformidade coas boas prácticas de fabricación para que nas condicións normais ou previsibles de emprego non transfiran os seus compoñentes aos alimentos en cantidades que poidan:

- Representar un perigo para a saúde humana
- Provocar unha modificación inaceptable da composición dos alimentos
- Provocar unha alteración das características organolépticas destes.

Ademais, a etiquetaxe, a publicidade e a presentación dos materiais ou obxectos non deberán inducir a error aos consumidores.

Requisitos especiais dos envases activos e intelixentes

O Regulamento 1935/2004 tamén establece requisitos especiais aplicables aos materiais e obxectos activos e intelixentes:

- Poden ocasionar modificacións da composición ou das características organolépticas dos alimentos a condición de que as ditas modificacións cumpran as disposicións comunitarias aplicables aos alimentos, como poden ser as disposicións sobre os aditivos alimentarios e as medidas de aplicación correspondentes, ou, de non existir normativa comunitaria, as disposicións nacionais aplicables aos alimentos.
- Deben utilizarse substancias autorizadas por disposicións comunitarias ata a adopción das medidas específicas que se están preparando.
- As substancias que se incorporen aos alimentos teñen consideración de “ingredientes”, polo que están suxeitas aos requisitos de etiquetaxe previstos na Directiva 2000/13/CE.
- Os materiais e obxectos activos non poden ocasionar modificacións da composición nin das características organolépticas dos alimentos, como por exemplo enmascarando a súa deterioración, que poidan inducir a error aos consumidores
- Deben levar unha etiquetaxe adecuada que permita ao consumidor identificar as partes non comestibles, cando estean xa en contacto cos alimentos.

- Deben estar convenientemente etiquetados para indicar que os ditos materiais e obxectos son activos ou intelixentes, ou ambas as dúas cosas.

Medidas lexislativas específicas sobre os envases activos e intelixentes

O Regulamento 1935/2004 cobre aspectos globais de materiais e obxectos activos e intelixentes pero non todos os detalles necesarios, de aí a necesidade de dispoñer dunha medida específica que se está debatendo a nivel europeo.

A proposta que se está traballando incorpora a definición de “compoñente” como a substancia individual ou combinación destas que causan a función activa e/ou intelixente dun material, incluíndo os produtos de reacción in situ destas substancias. Nesta definición non se inclúen as partes pasivas do envase que non son responsables da función activa e intelixente.

Existen tres tipos de compoñentes que poden formar parte destes materiais e obxectos:

- Os que estean na lista comunitaria de substancias que se poden usar en compoñentes activos e intelixentes (que se establecen na medida específica).
- Substancias incorporadas para liberarse en alimentos ou no seu contorno, que deben cumprir coa normativa nacional ou comunitaria aplicable aos alimentos.
- Substancias que non van entrar en contacto co alimento nin o contorno por existir unha separación cunha barreira funcional, polo que a migración va ser inferior a 0,01 ppm, aínda que están suxeitas a certas restricións.

En canto aos aspectos de etiquetaxe, proponse incluír o texto “NON COMER” nas partes do envase que non sexan comestibles e, se é tecnicamente posible, a incorporación do logotipo (Figura 1).



Figura 1. Logotipo do texto "NON COMER"

Por último, a medida específica vai incluír a información que debe figurar na declaración de conformidade que debe acompañar os envases. Esta declaración de conformidade serve para que o fabricante certifique a conformidade do envase coa lexislación aplicable.

Estímase que a lista comunitaria de substancias que se poden usar en compoñentes activos e intelixentes vai estar dispoñible aos 3 anos e medio da publicación da medida específica, que será un regulamento comunitario.

Normativa aplicable aos alimentos

A medida específica establece que as substancias incorporadas para liberarse en alimentos ou no seu contorno deben cumprir coa normativa nacional ou comunitaria aplicable aos alimentos.

A normativa actual é bastante extensa e abrangue a distintos grupos de substancias en función da súa aplicación. A continuación faise un repaso dos distintos tipos de substancias que se poderían empregar con este fin, suxeitos lóxicamente ás condicións das súas lexislacións establecidas.

- **Aditivos alimentarios:** defínense como substancias que ordinariamente non se consomen como alimentos en si mesmas e que se engaden expresamente para que sexan compoñentes dos produtos alimenticios. A súa adición é intencionada e ten un propósito tecnolóxico. A utilización de aditivos alimentarios como compoñentes en materiais e obxectos activos só se pode realizar se se atopan recollidos na lista de aditivos alimentarios autorizados e cumpren coas condicións de uso e coas especificacións de identidade e pureza. A súa utilización implica a súa incorporación nos alimentos, polo que van ser ingredientes destes e deben figurar na súa etiquetaxe.
- **Coadxuvantes tecnolóxicos:** calquera substancia que non se consuma como ingrediente alimenticio ou en si, que se utilice intencionadamente na transformación de materias primas, de produtos alimenticios ou dos seus ingredientes, para cumprir un obxectivo tecnolóxico determinado durante o tratamento ou a transformación, e que poida ter como resultado a presenza non intencionada, pero tecnicamente inevitable, de residuos da dita substancia ou dos seus derivados no produto acabado sempre que os ditos residuos non presenten risco sanitario e non teñan efectos tecnolóxicos sobre o produto acabado. Non teñen consideración de ingrediente, polo que non van a figurar na etiquetaxe dos alimentos.
- **Aromas alimentarios:** a súa función é dar a os alimentos olor e/ou sabor.
- **Encimas alimentarios:** son un tipo de coadxuvante tecnolóxico que é obxecto dunha regulación específica.

- **Produtos fitosanitarios:** unha das funcións dos produtos fitosanitarios é mellorar a conservación dos produtos vexetais, sempre e cando as ditas substancias ou produtos non estean suxeitos a disposicións particulares do Consello ou da Comisión sobre conservantes.
- **Axentes descontaminantes:** o Regulamento 853/2004 establece que os operadores da empresa alimentaria non utilizarán para eliminar a contaminación de superficie dos produtos de orixe animal ningunha substancia distinta da auga potable, salvo que se autorice o seu uso polo Comité Permanente da Cadea Alimentaria e Sanidade Animal. A utilización deste tipo de substancias en materiais activos estaría condicionada á súa autorización previa e sempre e cando exista unha eliminación tras o seu uso impoñan indicacións de etiquetaxe.

Por último indicar que os biocidas, regulados pola Directiva 98/2/CE, non teñen cabida nos materiais activos, posto que o seu uso non está contemplado en alimentos.

Procedemento de autorización do uso de substancias

O esquema de autorización do uso de substancias para o seu uso nos materiais e obxectos destinados a estar en contacto cos alimentos atópase recollido no Regulamento 1831/2003. A solicitude preséntase ante a autoridade competente dun Estado membro da Unión Europea, que se remite para a opinión da Autoridade Europea de Seguridade Alimentaria (EFSA). O ditame de EFSA vai incluír:

- Designación da substancia e as súas especificacións
- Recomendacións sobre as condicións ou restricións de uso da substancia avaliada e do material ou obxecto en que se utiliza
- Avaliación da adecuación do método analítico proposto para os fins de control previstos.

Finalmente, a Comisión Europea, co ditame favorable dos Estados membros da UE a través do Comité Permanente da Cadea Alimentaria e Sanidade Animal, adopta unha medida coa autorización, se procede, da substancia.

A Autoridade Europea de Seguridade Alimentaria (EFSA) establecerá unhas directrices coa documentación necesaria para a avaliación do risco dos materiais e obxectos activos e intelixentes, que deberá estar dispoñible antes de que se abra o prazo de presentación das solicitudes de acordo coa medida específica destes materiais que se está tramitando.



INTERESE DOS ANTIOXIDANTES NA INDUSTRIA DOS ALIMENTOS

Nick Hedges

Unilever. Colworth House. UK

Unilever é unha das maiores compañías industriais dedicadas á alimentación no mundo. A súa misión é engadir vitalidade á vida tendo en conta as necesidades diarias de nutrición, hixiene e coidado persoal que axudan ás persoas a sentirse ben e saudables. Unilever realiza unha extensiva investigación internacional para establecer as necesidades dos consumidores e focaliza as súas capacidades investigadoras e innovadoras para abordar estas necesidades. Simultaneamente, a empresa ten o obxectivo de transmitir valor desde a ciencia e a tecnoloxía cara aos consumidores, sendo as súas principais liñas de investigación e desenvolvemento a ciencia de consumidores, as ciencias de materiais e nanotecnoloxía, as biociencias, a enxeñaría de procesos, as ciencias de datos e medicións e a nutrición. Dado que vitalidade e nutrición son significativamente importantes en Unilever, os produtos pesqueiros son unha parte importante da produción da empresa, que ademais ten presente a sustentabilidade na produción de alimentos.

Nesta área de mercado, Unilever traballa fundamentalmente no produto pesqueiro conxelado. A empresa considera que a investigación sobre a calidade nutricional, os ingredientes naturais e a preservación de orixe natural son cruciais. A prevención da oxidación das graxas e a perda de textura é fundamental para manter os compoñentes saudables e a calidade dos produtos pesqueiros. Neste sentido, Unilever participou no proxecto europeo SeafoodPlus: *Health promoting, safe seafood of high eating quality in a consumer driven fork-to-farm concept*, en concreto no subproxecto LIPIDTEXT: *Preventing seafood lipid oxidation and texture softening to maintain healthy components and quality of seafood*. No marco deste proxecto, Unilever colaborou co Instituto de Investigacións Mariñas de Vigo no desenvolvemento de antioxidantes naturais baseados en ácidos hidroxicinámicos para estabilizar as perdas de calidade de filetes de peixe conxelados debidas ao desenvolvemento da rancidez oxidativa e a perda de textura. A oxidación das graxas do peixe provoca a aparición de aromas e sabores rancios, cambios en cor e textura, e a perda de importantes compostos desde o punto de vista nutricional como ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes naturais. Durante o desenvolvemento deste proxecto de investigación estudouse a prevención da oxidación lipídica e dos cambios de textura mediante a adición de compostos antioxidantes. Os compostos estudados demostraron unha significativa inhibición da oxidación, especialmente nos ensaios realizados en peixe refrixerado. A efectividade antioxidante mostrou unha elevada dependencia coa estrutura molecular dos compostos. A orde de efectividade antioxidante determinada

nos ensaios efectuados en músculo refrixerado foi similar á orde calculada nos ensaios en músculo en conxelado. Nestes últimos a eficacia antioxidante alcanzada foi menor probablemente debido a unha menor difusión dos compostos na matriz do peixe, e polo tanto a unha menor interacción cos compostos que interveñen na reacción de oxidación lipídica.

No entanto, os estudos efectuados sobre as alteracións nas proteínas asociados a unha perda na capacidade de retención de auga e modificacións na textura do músculo de peixe demostraron que non houbo diferenzas entre as mostras tratadas con antioxidantes e polo tanto, non oxidadas, fronte a aquelas non tratadas con antioxidantes que mostraban un elevado grao de oxidación. É dicir, non se encontraron evidencias que suxiran que os tratamentos antioxidantes reduzan os cambios en textura do músculo de peixe durante a conservación en conxelado. Así mesmo, a agregación proteica que se produciu durante o almacenamento a baixa temperatura e evidenciada no estudo dos cambios na solubilidade das proteínas, non foi acompañada dunha significativa desnaturalización proteica determinada mediante calorimetría diferencial de varrido.

Pode concluírse que é posible empregar compostos de orixe natural para protexer o músculo de peixe da oxidación durante a conservación a baixa temperatura e que os ensaios realizados no músculo refrixerado poden empregarse para predicir a eficacia dos antioxidantes no músculo conxelado.

Agradecimientos

Ao Proxecto Integrado SEAFOODplus, financiado pola Unión Europea, contrato No 506359.

ENVASES ACTIVOS ANTIOXIDANTES. DESENVOLVEMENTO E PERSPECTIVAS DE USO NO ENVASADO DE CARNE FRESCA

Pedro Roncalés Rabinal

Dpto. Producción Animal e Ciencia dos Alimentos. Facultade de Veterinaria. Universidade de Zaragoza

As formas tradicionais de comercialización e venda de carne deron paso axiña a outros sistemas baseados no autoservizo nos que, por unha parte, o consumidor non dispón xa do consello profesional do carnicero, e por outra, a que o establecemento de venda deba asegurar unha longa conservación da carne nos lineais dos supermercados. A iso súmase o feito de que os consumidores demandan cada vez máis calidade, seguridade e comodidade nos alimentos que compran, sen esquecer que “se compra cos ollos”.

Para acadar estas metas desenvóléronse sistemas de mellora da etiquetaxe e rastrexabilidade e, o que é máis importante, sistemas de envasado que permiten manter a carne en boas condicións sensoriais e hixiénicas durante máis tempo. A implantación das atmosferas modificadas no envasado da carne foi un fito crucial na mellora da conservación desta. No entanto, a necesaria presenza de oxíxeno no envase dá lugar á oxidación da carne. Así, a vida útil da carne non é todo o extensa que sería de desexar. A utilización de antioxidantes pode contribuír a diminuír a velocidade de oxidación e aumentar polo tanto a vida útil da carne. De feito, o uso de extractos de plantas e outros antioxidantes naturais demostrouse de gran utilidade para este propósito. Os desenvolvementos actuais neste campo fan prever un novo avance; os envases activos, tanto antioxidantes como antimicrobianos, son un bo exemplo diso. Só falta que a lexislación ao respecto estea á altura que as novas circunstancias requiren.

Envasado en atmosfera modificada con antioxidantes

O estado actual dos sistemas de envasado da carne permite manter a vida útil da carne durante períodos de tempo relativamente longos. No entanto, as formas de distribución reclaman tempos aínda máis estendidos que permitan unha rotación máis lenta das bandexas expostas nos lineais. En todo caso, os cambios deteriorativos que se producen son resultado de reaccións de oxidación. Tales reaccións teñen como substrato, ben a mioglobina, o que dá lugar á formación de cores pardas, ou ben os ácidos graxos, o que leva consigo a formación de olores “a carne vella”. A oxidación, por outra parte, vese favorecida pola presenza da elevada presión de oxíxeno no envase, que é necesaria á súa vez para que a mioglobina estea oxixenada

e teña polo tanto a cor vermella típica da carne fresca. A iluminación a que deben ser sometidos os envases para a súa exposición nos lineais dos supermercados tamén contribúe á oxidación. É sabido que a luz, e en particular as radiacións ultravioletas, son un forte catalizador das reaccións oxidativas. Así pois, o límite da vida útil da carne envasada nas atmosferas modificadas usadas comunmente vén determinado pola velocidade das reaccións de oxidación, aínda que esta velocidade está influída tamén pola poboación microbiana da carne.

Os antioxidantes naturais foron utilizados desde antigo para mellorar a conservación dos alimentos; os exemplos son innumerables: especias, condimentos e todo tipo de herbas. Nos últimos anos o noso grupo de investigación dedicou un gran esforzo para avaliar o efecto da adición directa de diversos antioxidantes a carnes frescas e algúns elaborados cárnicos frescos.

Resumen de la extensión de la vida útil

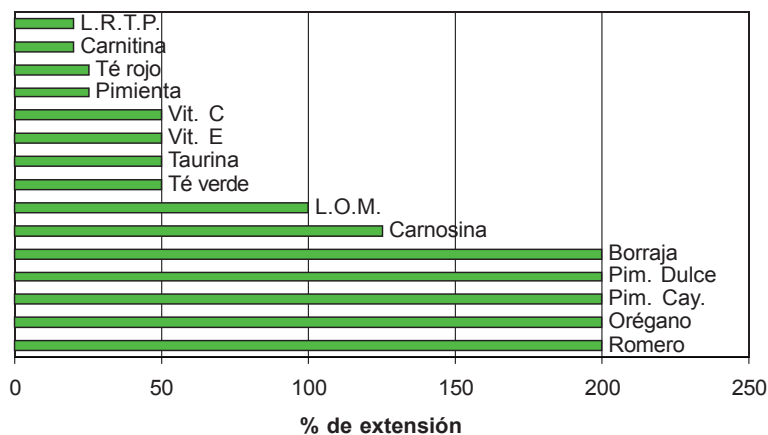


Figura 1. Extensión da vida útil da carne envasada en atmosfera modificada por diversos antioxidantes

A Figura 1 mostra de maneira resumida a extensión da vida útil de varias carnes frescas, avaliada pola medida sensorial da cor e olor, por acción dalgúns dos antioxidantes naturais avaliados. Obsérvase o extraordinario efecto do romeu, ourego, pemento doce e picante e borraaxe. Todos eles dan lugar a unha inhibición da oxidación, medida como substancias reactivas ao ácido tiobarbitúrico, superior ao 90% durante os días de conservación da carne envasada. No entanto, tanto os pementos, que proporcionan unha cor vermella e sabor forte, como a fariña de borraaxe, que confire unha cor esbrancuxada, modifican substancialmente as características da carne.

Pola contra, o romeu e o ourego, que poden ser utilizados na súa forma desodorizada, exercen a súa acción sen modificar practicamente as propiedades sensoriais da carne ou do elaborado cárnico. En consecuencia, a maior parte do desenvolvemento centrouse nestes extractos de plantas da familia das Labiadas. É de destacar que a extensión da vida útil conseguiuase incluso nas condicións habituais de exposición da carne nos supermercados, é dicir, con forte iluminación nas vitrinas frigoríficas.

Os aspectos legais relativos á utilización de condimentos en carnes frescas, non obstante impiden a súa adición nestes alimentos non elaborados. Así pois, o uso de antioxidantes está limitado aos preparados de carne, sexa en forma de elaborados ou en forma de mariñados, adubados, etc. Este é un campo de desenvolvemento en clara expansión, en especial en mercados evolucionados e abertos como son os EEUU ou o Reino Unido.

Envases activos antioxidantes

Nos últimos anos asistimos ao desenvolvemento dun novo tipo de envases, deseñados para frear as reaccións oxidativas por unha vía indirecta. Estes novos envases son os envases activos antioxidantes, que poden ser definidos como aqueles que exercen sobre a carne unha acción inhibidora da oxidación sen que o axente activo estea en contacto directo co alimento. É dicir, as moléculas antioxidantes están contidas no material do envase e actúan sobre a carne a través da atmosfera protectora. Aínda está en discusión se as ditas moléculas actúan na carne ao ser liberadas do material de envasado, ou no propio envase, secuestrando moléculas de oxidación que proceden da carne (Pezo e col., 2008). Nin que dicir ten que os axentes antioxidantes en estudo son substancias naturais; en xeral, extractos de plantas ben coñecidas e utilizadas desde antigo: romeu, ourego e outras similares.

As investigacións levadas a cabo polo noso grupo utilizan un dos varios posibles sistemas de xeración do envase activo. No noso caso, un extracto de ourego ou romeu inmovilízase en primeiro lugar nun verniz, aprobado para estar en contacto cos alimentos (Garcés e col., 2003). O dito verniz co axente antioxidante incorpórase á cara interna do material plástico usado para construír o envase, normalmente un material barreira multilaminado, cuxa cara interna está constituída por polietileno. Este polímero é necesario, á súa vez, para asegurar o selado do material plástico á bandexa que contén a carne e asegurar así a estanquidade do envase.

Os primeiros resultados obtivéronse en carne de vacún fileteada e envasada nunha atmosfera modificada rica en oxíxeno, utilizando unha versión preliminar do envase activo, que foi mellorada con posterioridade. Previamente, demostrárase que o envase activo deseñado era capaz de exercer unha acción antioxidante significativa

sobre diversas moléculas susceptibles de sufrir oxidación, en particular a mioglobina (Nerín e col., 2003).

O efecto do envase activo sobre a carne de vacún móstrase nas figuras 2 e 3. A Figura 2 demostra o efecto de inhibición da oxidación de mioglobina con envases contendo concentracións crecentes de axente activo (verniz con romeu); os resultados están expresados en porcentaxe de metamioglobina (forma oxidada) na superficie do filete. A utilización do envase activo deu lugar a que a dita porcentaxe fose inferior ao 40% os 14 días de conservación da carne; esta porcentaxe é aproximadamente o necesario para que o aspecto do filete apareza como pardo ao ollo humano (Djenane e col., 2002; Martínez e col., 2006). A Figura 3, pola súa parte, demostra o efecto inhibitor da oxidación de ácidos graxos, responsable da aparición de olores “a carne vella”. Neste caso, os resultados represéntanse como índice TBARS (substancias reactivas ao ácido barbitúrico, expresadas en forma de malonaldehído), forma habitual de medir a oxidación lipídica. Este índice apenas chegou a 1,5 ao cabo dos 14 días, límite a partir do cal os olores anormais empezan a percibirse polo nariz humano (Green and Cumuze, 1981; Sánchez-Escalante e col., 2003). A conclusión do estudo foi que, nas condicións utilizadas, a carne no noso envase activo tivo unha vida útil de 12-14 días, fronte aos 9 da mostra control.

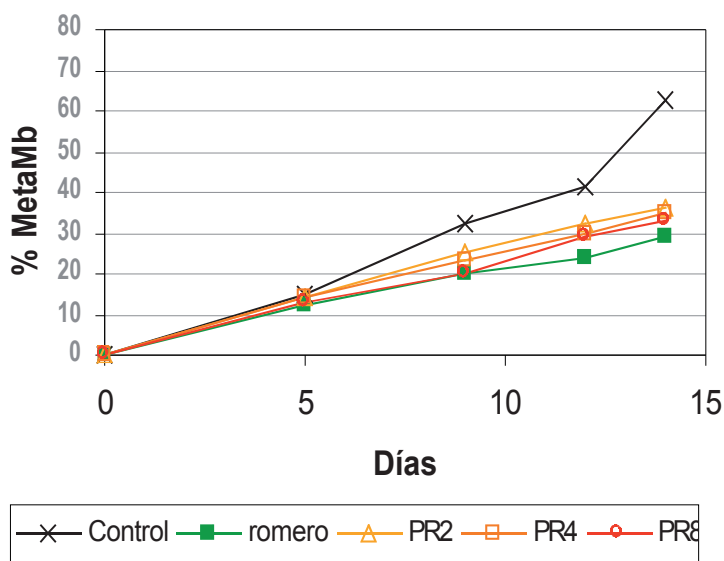


Figura 2. Evolución da porcentaxe superficial de metamioglobina en filetes de vacún envasados en atmosfera modificada cun material activo contendo concentracións crecentes de extracto de romeu

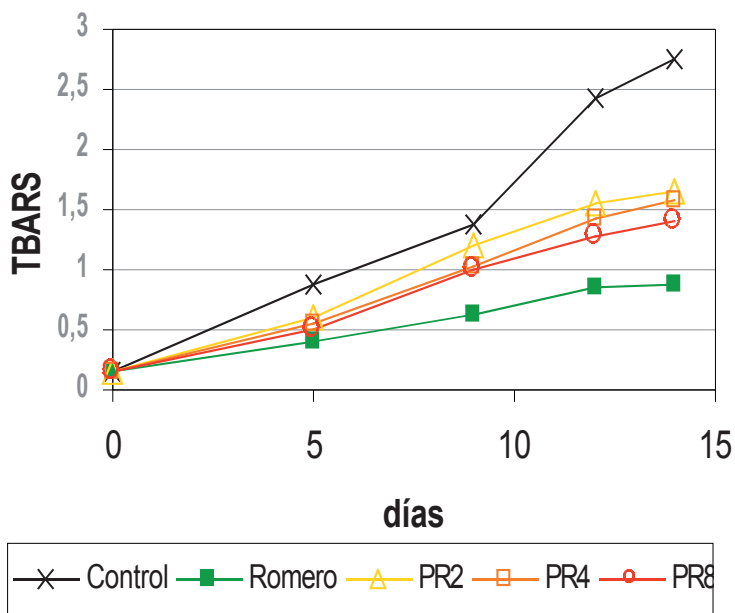


Figura 3. Evolución das substancias reactivas a TBA en filetes de vacún envasados en atmosfera modificada cun material activo contendo concentracións crecentes de extracto de romeu

Unha vez demostrado o efecto antioxidante do envase activo, estudamos comparativamente a acción de romeu ou ourego como axente activo e aplicámolo á carne de año fileteada. Para iso, envasáronse costeletas de perna de año en envases control ou activos cun ou outro axente en presenza dunha atmosfera modificada de 80% O₂ e 20% CO₂, e mantivéronse nun expositor frigorífico a 1±1°C sometidas a iluminación; é dicir, en condicións similares ás de venda habitual nun supermercado (Camo e col., 2008). É preciso lembrar que a luz é un forte catalizador das oxidacións (Djenane e col., 2001). Incluíronse ademais costeletas cun nebulizado superficial de extracto de romeu, para comparar o efecto do axente activo en contacto ou non coa carne.

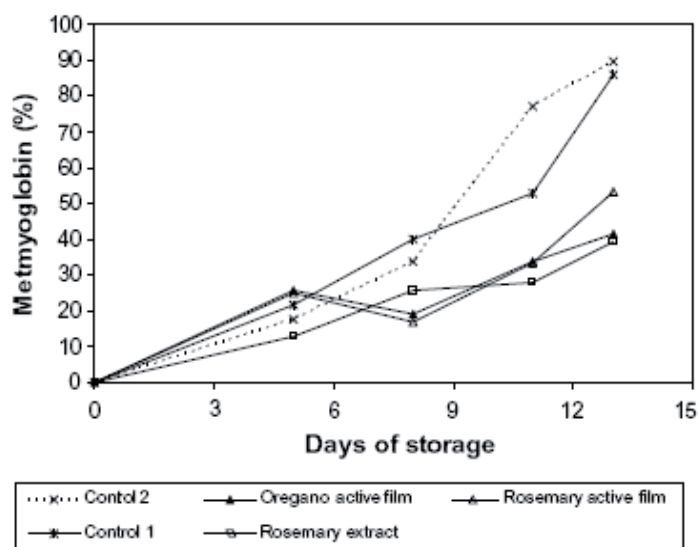


Figura 4. Evolución da porcentaxe superficial de metamioglobina en filetes de año envasados en atmosfera modificada cun material activo contendo extractos de romeu ou ourego

A Figura 4 mostra os resultados da formación de metamioglobina. Apréciase claramente nela o efecto inhibitor da oxidación por parte de ambos os dous envases activos, moi similar por outra parte ao do extracto de romeu engadido en superficie. O límite do 40% de metamioglobina alcanzouse despois dos 11 días.

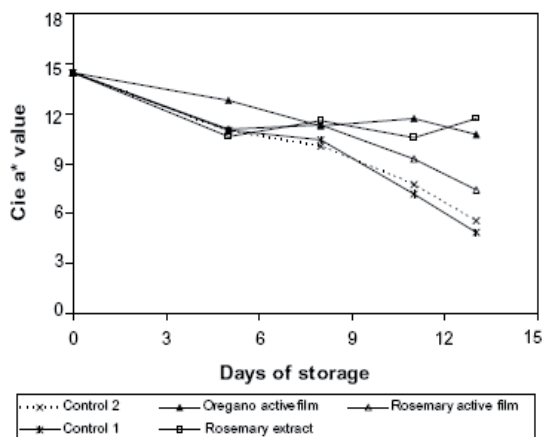


Figura 5. Evolución do índice de vermello (a^*) en filetes de año envasados en atmosfera modificada cun material activo contendo extractos de romeu ou ourego

A Figura 5 representa a evolución do índice de vermello (a^*). En concordancia co anterior, a carne mantivo un valor de a^* máis elevado nos envases activos; no entanto, o ourego parecía ser moito máis eficaz que o romeu. Neste caso, os valores de a^* mantivéronse por enriba de 10, límite aproximado da cor vermella típica da carne fresca, ata os 13 días de exposición.

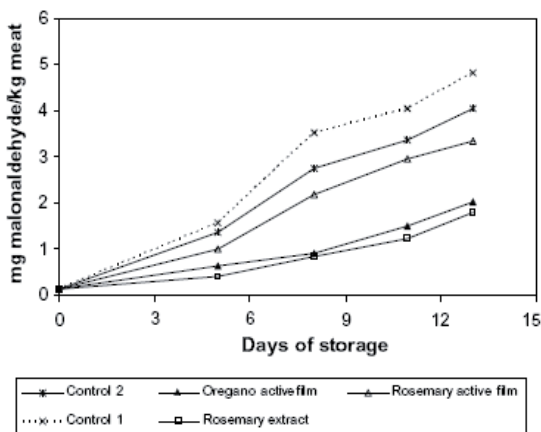


Figura 6. Evolución das substancias reactivas a TBA en filetes de año envasados en atmosfera modificada cun material activo contendo extractos de romeu ou ourego

Na Figura 6 recóllense os resultados da evolución da oxidación lipídica. A dita oxidación foi moi eficazmente inhibida polo envase activo con ourego, mentres que o que contiña romeu tiña só un lixeiro efecto; de feito, o primeiro deu lugar a que as costeletas alcanzaran un valor superior a 1,5 só ao final da exposición, fronte aos 6-7 días que tardaron en alcanzalo as costeletas control.

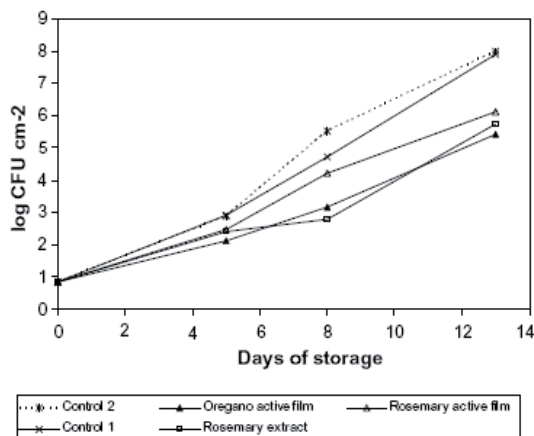


Figura 7. Evolución da poboación de psicrotrofos aerobios en filetes de año envasados en atmosfera modificada cun material activo contendo extractos de romeu ou ourego

A Figura 7 mostra a evolución da poboación microbiana na superficie da carne. A utilización dos envases activos deu lugar tamén a unha inhibición significativa da poboación microbiana habitual na superficie das costeletas, en particular cando se utilizou ourego. A dita inhibición deu como resultado uns recontos inferiores en 1-2 ordes de magnitude, aproximadamente, aos dous controis. Por outra parte, no caso do envase activo con ourego, os recontos non chegaron a 10^6 nin sequera ao final do período de exposición. Este efecto antimicrobiano dos extractos de romeu e ourego, xa coñecido, contribuirá tamén á extensión da vida útil da carne, pois os cambios deteriorativos da carne están relacionados, non só coa oxidación, senón tamén coa poboación microbiana presente.

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

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

Táboa 1. Evolución dos valores sensoriais de filetes de año envasados en atmosfera modificada cun material activo contendo extractos de romeu ou ourego

Por último, a Táboa 1 recolle as puntuacións sensoriais dadas por un panel de expertos para os parámetros cor vermella, decoloración e “off-odour” (“olor a carne vella”), utilizando unha escala de 1 a 5, na que 1 é o valor característico da carne fresca e 5 o da carne totalmente deteriorada. Debe facerse fincapé en que, de acordo con esta escala, valores iguais ou superiores a 3 en cada atributo significan que esa carne chegou ao final da súa vida útil, é dicir, non é vendible. Obsérvanse as notables diferenzas entre as mostras. A vida útil das carnes control non pasa de 8 días, mentres que a do envase activo con ourego alcanza unha vida útil de 13 días.

En conclusión, a utilización dun envase activo con extracto de ourego deu lugar a unha extensión moi significativa da vida útil da carne de año, en condicións similares ás que se usan na súa comercialización, que pasou de 8 a 13 días. Estes resultados, evidentemente, significan un gran avance na mellora dos métodos de conservación na distribución e venda da carne de año. Na actualidade proséguese cos experimentos para mellorar e optimizar esta forma de envasado activo, coa vista posta na súa utilización industrial. Non obstante, a situación legal destes envases activos é confusa e terá que ser desenvolvida nun futuro próximo.

BIBLIOGRAFÍA

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

APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES PARA A MELLORA DA SEGURIDADE E A CALIDADE SENSORIAL E TECNOLÓXICA DA CARNE E PRODUTOS CÁRNICOS

José Antonio García Regueiro
IRTA. Tecnoloxía dos Alimentos

A oxidación dos alimentos é un dos problemas máis importantes que afectan a súa calidade e seguridade. Desde hai máis de 60 anos estase estudando como prever o principal problema: a rancidez. A oxidación é un fenómeno que se atribúe á formación de radicais que nunha reacción en cadea e despois de varias fases finaliza na formación de compostos que dan un flavor característico aos alimentos e que provoca o rexeitamento dos consumidores. Esta resposta pódese asociar á prevención da inxesta dun alimento que perdeu a súa estabilidade e que pode danar a saúde da persoa. Unha forma de evitar ou de reducir a oxidación é a utilización de antioxidantes ou de procesos que a limiten.

O noso metabolismo emprega procesos oxidativos para obter enerxía, o que leva consigo un control da formación de radicais e da súa eliminación mediante varios mecanismos nos que interveñen antioxidantes, encimas e outras moléculas de modo coordinado. No entanto, se se produce un desequilibrio nesta regulación as células sofren danos nos seus compoñentes que poden chegar a desenvolver ou contribuír á aparición de enfermidades. Demostrouse a importancia do control da oxidación dos alimentos para a saúde humana. Un grupo de antioxidantes actúan de modo coordinado formando unha rede: vitaminas C e E que son esenciais e os producidos no organismo: glutatión (Glu, Cys, Gly), ácido lipoico (recicla glutatión), coencima Q10 (relacionada coa función da vitamina E). Estes antioxidantes actúan de modo distinto a outros antioxidantes (como os polifenóis). A vitamina E localízase nas membranas celulares e nas lipoproteínas de transporte para prever a oxidación de lípidos. Os ácidos graxos “libres” non son compoñentes maioritarios, por iso a acción dos antioxidantes *in vivo* está destinada a protexer as estruturas críticas para a función celular e metabólica. Os antioxidantes que non realizan esta función poden contribuír, pero en xeral actúan na redución de radicais libres de modo menos específico nos tecidos.

Esta liña de investigación ten un desenvolvemento moi activo. Entre os anos 2003-2008 pódense encontrar máis de 1200 artigos relacionados coa oxidación e a carne. Neles evidénciase que o antioxidante máis estudado con aplicacións prácticas é a vitamina E (α -tocoferol). Un factor que contribuíu é a redución do custo da produción sintética deste antioxidante, aínda que se obtén en forma all-rac que é menos activa. Os organismos vivos posúen sistemas para controlar a oxidación provocada

pola xeración de radicais libres mediante sistemas de alta eficacia e complexidade. Na produción de carne, cando cesa o metabolismo pola morte do animal, a acción dos mecanismos fisiolóxicos é nula ou mínima e a oxidación pode progresar. Se un alimento pode sufrir un proceso de deterioración pola acción de oxidantes tense que protexer sobre todo se o seu consumo non é inmediato.

A efectividade dun antioxidante depende da súa estrutura molecular e da polaridade da molécula. Os antioxidantes sintéticos desbotáronse para o seu uso na alimentación. Como indica Frankel (2000), esta decisión presenta certa arbitrariedade sobre todo se se considera que moitos antioxidantes naturais non foron estudados para determinar posibles efectos secundarios cando se usan en concentracións superiores ás dunha dieta de referencia.

Os factores que se consideran no uso de antioxidantes en produción animal: xenética, metabolismo dos lípidos, composición da dieta, fonte de graxa. Os antioxidantes máis utilizados son: vitamina E, carotenos, polifenóis, extractos de cítricos e doutras plantas.

Produción animal e antioxidantes

A produción de carne de calidade require, nas condicións actuais, asegurar o seu valor nutritivo en procesos de conservación e elaboración que poden modificar a calidade sensorial e a súa seguridade. A comercialización da carne en lascas envasadas en diferentes formas, sobre todo en atmosferas modificadas, necesita aumentar a estabilidade oxidativa para manter a cor e a calidade sensorial. A forma máis sinxela de lograr un aumento da estabilidade oxidativa é a adición nos pensos de α -tocoferol. Este composto incorpórase no tecido muscular e, en particular, nas membranas celulares onde exerce o seu efecto protector de modo eficaz. Números traballos mostraron a súa eficacia e a acumulación no tecido muscular con aumentos respecto ao grupo control de entre 3-5 veces. O custo desta práctica foi durante un tempo unha limitación pero o prezo reduciuse de modo que é viable. A redución da aparición de olores relacionados coa rancidez durante o cociñado da carne e o seu posterior consumo foi demostrada.

Outros antioxidantes pódense empregar en produción animal, pero a súa efectividade non é a mesma que a do α -tocoferol. O emprego do β -caroteno en concentracións superiores a 15 mg/Kg mostrou en polos unha acción pro-oxidante, dependente do tipo de graxa ou aceite vexetal utilizado. Un grao elevado de instauración induce un maior estrés oxidativo, e por iso resulta máis crítico o seu control. O β -caroteno é un precursor de vitamina A e dos seus derivados, con efectos filolóxicos complexos, como é o caso do ácido retinoico. Isto provoca que a cantidade subministrada deba ser axustada para evitar efectos non desexados. Unha dificultade para interpretar

de modo adecuado os efectos dalgúns antioxidantes é a determinación analítica no tecido muscular. A concentración de β -caroteno e licopeno, no tecido muscular de animais alimentados con suplementos destes antioxidantes, é moi baixa polo que ou ben a metodoloxía analítica non é óptima ou ben a súa concentración é tan baixa que resulta difícil poder explicar os seus efectos antioxidantes ou pro-oxidantes. Os antioxidantes luteína e zeaxantina acumúlanse na mácula da retina nalgúns animais, o que mostra as diferenzas de acción dos posibles antioxidantes que se van empregar en produción animal.

A acción do α -tocoferol e o β -caroteno na composición dos ácidos graxos do tecido muscular é mínima e por iso o tipo de graxa ou aceite usado na dieta determina, xunto coas condicións de manexo, a composición dos lípidos corporais.

Determinación da estabilidade antioxidante

A avaliación da estabilidade antioxidante adóitase efectuar na maior parte dos estudos mediante a determinación dos TBARS (substancias que reaccionan co ácido tiobarbitúrico). Este procedemento é un índice global que indica o grao de oxidación producida despois da formación de peróxidos. A súa aplicación, en practicamente todos os traballos publicados, permite unha comparación efectiva dentro dun estudo, pero en menor grao entre estudos. Cando se realizaron exercicios de intercomparación, os valores obtidos entre diferentes laboratorios presentaban unha dispersión demasiado elevada. Un dos problemas radica en que o fundamento do método reside na reacción do ácido tiobarbitúrico co malonaldehído que se forma a partir da oxidación do ácido linolénico (C18:3). No entanto, esta reacción ocorre con outros aldehídos ou compostos que poidan reaccionar co ácido tiobarbitúrico. A pesar destes problemas, o TBARS está aceptado como un parámetro esencial nos estudos relacionados coa oxidación.

Outras medidas baséanse na actividade dos encimas antioxidantes SOD, CAT e GS-PHx. Na figura podemos observar a actividade destes encimas na peituga de polo. Pódese apreciar como a actividade da GS-PHx é a máis elevada en relación ás actividades da CAT e da SOD (Carreras e col., 2005).

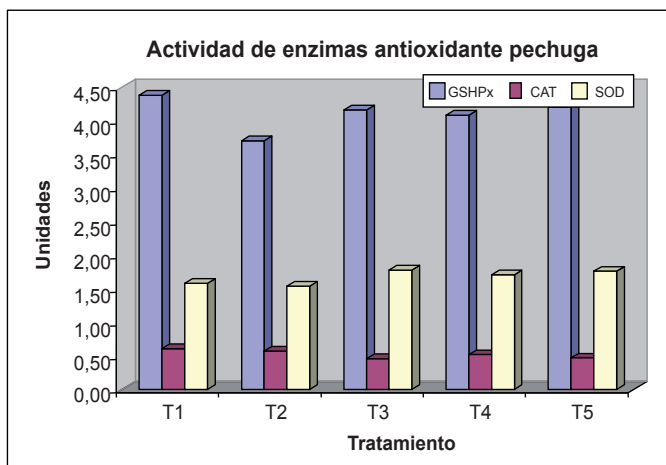


Figura 1. Actividades de encimas antioxidantes na peituga de polo. Adaptado de Carreras (2005)

Na Figura 2 obsérvanse as concentracións de α -tocoferol; segundo isto podemos observar que, a pesar dunha maior concentración deste composto nos tratamentos T4 e T5, as actividades dos encimas non se viron afectadas. Pódese apreciar como a concentración de α -tocoferol é máis elevada no zanco que na peituga de polo. No zanco o tipo de músculos e o seu metabolismo facilitan unha maior acumulación de α -tocoferol.

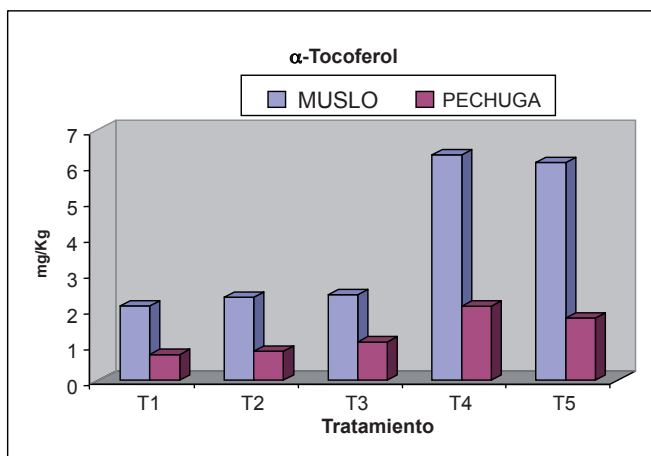


Figura 2. Concentración de α -tocoferol no zanco e peituga de polo. Adaptado de Carreras (2005)

Outras formas de determinar o grao de oxidación son o índice de peróxidos e a determinación de volátiles, entre eles o hexanal que se asocia ao descritor sensorial de rancidez. No entanto, hai máis alternativas para determinar o grao de oxidación e estanse investigando métodos máis fiables e adaptados a condicións específicas en función do alimento que se vai estudar. A estabilidade de aceites vexetais mediante o emprego da técnica Rancimat é un exemplo deste enfoque.

BIBLIOGRAFÍA

Carreras, I. (2005). Tese Doutoral. Universidade de Girona.

Carreras, I., Castellari, M., Valero, A., e col. (2005). *J. Sci. Food Agric.*, 85, 2407-2412.



ACHEGA Á OPTIMIZACIÓN DO PERFIL NUTRITIVO DO LEITE MEDIANTE A ALIMENTACIÓN DO GANDO: ANTIOXIDANTES

Ismael Martínez Lede
Dpto. de I+D de FEIRACO

Antioxidantes na alimentación de ruminantes

Un dos principais problemas ao que se confrontan os nutricionistas de vacas de leite nas fórmulas en base a ácidos graxos insaturados é a oxidación destes. Os lípidos con dobres enlaces de carbono tales como os presentes nos ácidos graxos insaturados (p.e. C18:1, C18:2, C18:3, EPA, DHA) e as vitaminas é que son susceptibles de oxidarse. O átomo de carbono adxacente ao dobre enlace é oxidado formando metabolitos reactivos con oxíxeno e radicais libres que propagarán aínda máis dita reacción de oxidación. O resultado final é unha perda dos ácidos graxos insaturados da graxa dietética e a xeración de radicais libres que atacarán a outros ácidos graxos insaturados. A oxidación da graxa non só reduce o valor biolóxico e enerxético desta, senón que tamén propaga a oxidación a outros ingredientes lipídicos, tales como graxas engadidas, sementes oleaxinosas e grans de destilación que, en caso de non ser estabilizados, poden contribuír significativamente á carga de radicais libres no animal.

No corpo existe un equilibrio natural entre a formación de radicais libres durante o metabolismo normal das células e a capacidade antioxidante endóxena do animal que evita que os radicais libres se acumulen e danen as células. No entanto, en situacións en que os niveis de radicais libres exceden a capacidade antioxidante do animal, pode darse unha situación de estrés oxidativo. As vacas de alta produción son propensas a sufrir un estrés oxidativo, e a situación pode verse incluso exacerbada en determinadas condicións ambientais, fisiolóxicas e dietéticas. Os radicais libres, mediante a oxidación de ácidos graxos esenciais das membranas lipídicas, poden danar as células e afectar a produción e o estado sanitario do animal.

A capacidade antioxidante endóxena do animal consiste en tres grupos principais de antioxidantes (Miller e col., 1993). O primeiro grupo, antioxidantes encimáticos, está representado pola superóxido dismutasa (SOD) e a glutatión peroxidasa (GSH-Px). Estas forman parte do principal sistema de defensa intracelular e o principal sistema de defensa fronte a radicais libres como son os peróxidos e hidroperóxidos. SOD é un encima antioxidante involucrado na eliminación de formas reactivas de oxíxeno formadas nas células. Cu, Zn e Mn son elementos esenciais na actividade de SOD. Deficiencias en Cu, Zn e Mn resultan nunha resposta inmune comprometida en va-

cas de leite e gando bovino de alta produción, facendo que estes animais sexan máis propensos a sufrir un estrés oxidativo.

O estrés oxidativo dáse cando existe un desequilibrio entre os niveis de materias primas altamente oxidables (MPO) e a capacidade antioxidante do animal. Unha acumulación indesexable de radicais libres dáse nas células, iniciándose entón unha reacción oxidativa en cadea e a oxidación lipídica. O efecto directo é principalmente un dano oxidativo aos lípidos e a diferentes macromoléculas. Este efecto altera a membrana celular, resultando en rutas metabólicas modificadas nunha fisioloxía alterada e en patoloxías do propio animal. Debido a este motivo, o estrés oxidativo podeu ser asociado a un incremento na incidencia de desordes sanitarias tales como tetania dos prados (milk fever) e desprazamento do abomaso (Weiss, 1998; Miller e col., 1993).

Os antioxidantes dietéticos poden evitar a oxidación dos lípidos dietéticos o propio penso e mellorar a produtividade do animal. A literatura en aves describiu en profundidade a redución significativa en ganancia de peso e en índice de conversión que experimentan os animais ante a inclusión de graxa oxidada na dieta (Cabel e Waldroup, 1988; Dibner e col., 1996) e como a inclusión de aditivos antioxidantes dietéticos diminúe este efecto. Os antioxidantes dietéticos, mediante unha redución dos niveis de oxidación das MPO e posterior oxidación lipídica, son capaces de reducir o impacto negativo da graxa oxidada. Alimentar con graxa oxidada leva consigo un incremento da taxa de renovación intestinal e compromete a resposta inmune do animal (Dibner e col., 1996). Os antioxidantes poden, mediante unha estabilización das MPO no medio, manter a integridade dos biles intestinais e a taxa de renovación intestinal.

No gando bovino de carne, estabulado, a integridade da parede ruminal vese comprometida cando o animal é alimentado con dietas ricas en concentrado permitindo as bacterias penetrar na corrente sanguínea, así como o desenvolvemento de abscesos hepáticos. Nunha recompilación de experimentos con bovino de carne, a suplementación con antioxidantes na dieta permitiu reducir a incidencia de abscesos hepáticos así como mellorar a ganancia de peso (Vázquez-Añón e col., 2006). A suplementación con antioxidantes permitiu unha mellora directa do estado oxidativo do animal tal e como se puido observar nos superiores niveis séricos de vitaminas E e A e un inferior estado oxidativo lipídico da carne picada (Krumstiek e Owens, 1998). Os antioxidantes dietéticos, mediante unha estabilización das MPO, son capaces de reducir a carga de peróxidos no animal e de mellorar a capacidade antioxidante do animal.

Alimentar con graxa oxidada o animal non tan só incrementa a carga de peróxidos deste, senón que tamén pode afectar negativamente a fermentación ruminal. O

efecto dunha alimentación con graxa oxidada sobre a dita fermentación ruminal foi comprobada mediante a utilización de sistemas de cultivo continuo de fermentación (Vázquez-Añón e col., 2006). Unha alimentación con graxa oxidada reduciu a síntese proteica microbiana, así como a súa eficiencia, e o efecto puido verse aliviado mediante a adición de antioxidantes na dieta. A suplementación con antioxidantes tamén mellorou a dixestibilidade da fibra neutra e o ácido deterxente na graxa fresca e oxidada, suxerindo así un efecto global positivo do uso de antioxidantes sobre a microflora ruminal. A suplementación de antioxidante na dieta é capaz de mellorar a produtividade láctea e a eficacia de produción, así como a dixestibilidade de materia orgánica no rume.

As vacas de alta produción alimentadas con niveis moderados a elevados de ácidos graxos insaturados son propensas a sufrir estrés oxidativo. Niveis indesexables de radicais libres poden oxidar a membrana lipídica afectando os rendementos e a saúde dos animais. Os lípidos dietéticos tales como graxas engadidas, sementes oleaxinosas e grans de destilación, se non son estabilizados, poden contribuír significativamente a un incremento na carga de radicais libres no animal. Os antioxidantes dietéticos evitan a oxidación dos lípidos no alimento final. No gando bovino de leite, a suplementación con antioxidantes na dieta mellora a función ruminal e a produción láctea. Así pois, pódese concluír como a suplementación con antioxidantes na dieta pode estabilizar o contido lipídico desta e mellorar a produtividade e estado sanitario do ruminante.

Atendendo ao exposto, a alimentación das vacas que producen o leite UNICLA supleméntase con vitamina E e complexos orgánicos de minerais (zinc e manganeso en forma de quelatos de metionina, e selenio en forma de lévados enriquecidos que achegan este mineral en forma de selenoaminoácidos). Deste xeito protexemos as vacas do estrés oxidativo. Ademais, a vitamina E protexe as materias primas da oxidación.

FEIRACO cuantificou a presenza en leite do selenio incorporado á alimentación das vacas. Isto foi resultado dun proxecto de I+D realizado entre 2003 e 2005, titulado “Estudo da corrección de déficit de selenio na dieta mediante a suplementación de especies químicas biodisponíbles para mellorar a súa achega de forma natural a través do leite”. O obxectivo deste foi a obtención do leite, de forma natural e a través da alimentación das vacas, enriquecido con selenio nunha forma biodisponíble. No seu desenvolvemento realizouse a suplementación do alimento do gando con distintas especies químicas de selenio (selenio inorgánico e selenio orgánico) e concluíuse que a selenometionina é a forma que máis incrementa o contido de selenio no leite, ademais de ser a forma máis biodisponíble para a especie humana.

BIBLIOGRAFÍA

Cabel, M.C. e Waldroup, P.W. (1988). *Poult. Sci.*, 67, 1725-1730.

Dibner, J.J., Atwell, C.A., Kitchell, M.L., e col. (1996). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 62,1-13.

Krumsiek, C.L. e Owens, F.N. (1998), *Oklahoma Agric. Exp. Stat. Res. Rep.*, 965, 64-68.

Miller, N.J., Diplock, A.T., Rice-Evans, C., e col. (1993). *Clinical Science*, 84, 407-412.

Vázquez-Añón, M., Kratzer, D., González-Esquerro, R., e col. (2006). *Poult. Sci.*, 85, 693-705.

Weiss, W.P. (1998). *J. Dairy Sci.*, 81, 2493-2501.

ANTIOXIDANTES E OXIDACIÓN LIPÍDICA DE PRODUTOS CÁRNICOS

Daniel Franco Ruiz

Dpto. Producción Animal. Centro Tecnolóxico da Carne.

Os novos retos a que se enfrontan as sociedades avanzaron de tal forma que os obxectivos que persegue unha “dieta equilibrada” fóronse modificando desde a mera satisfacción de necesidades nutricionais ata o punto de promover o consumo de alimentos saudables que diminúan o risco de enfermidades crónicas. Cada vez son maiores os esforzos en investigación para avaliar a influencia da alimentación sobre a saúde; entendendo esta non só como a ausencia de enfermidade, senón como un equilibrio entre benestar físico e psicolóxico. Existen probas científicas que confirman a hipótese de que certos alimentos e/ou algúns dos seus compoñentes teñen efectos beneficiosos sobre a saúde humana. Nace así a idea dunha “nutrición óptima” centrada na mellora da calidade da inxesta diaria en termos de nutrientes ou non nutrientes que favorecen o mantemento da saúde.

Ao longo dos últimos 20 anos diversos factores como o aumento do tempo de ocio ou a incorporación da muller ao mercado laboral provocaron unha diminución no tempo dedicado á elaboración e preparación da comida. Sumado isto ao feito de que as preferencias do consumidor priorizaron a seguridade alimentaria e o valor nutritivo aos criterios exclusivamente sensoriais (Hernández, 2002), é cada día máis habitual a venda de pratos conxelados ou produtos de elevada preparación, como é o caso de carne fileteada e envasada en diferentes formatos e/ou atmosferas. En sentido comercial hai que considerar que a decisión de compra da carne por parte do cliente baseábase fundamentalmente na cor (Shackelford e col., 1992), e actualmente tense ademais en conta, coa mesma importancia ou máis, os aspectos xa comentados como o valor nutricional ou a garantía sanitaria.

Importancia da graxa na saúde humana

O consumidor interésase cada vez máis por alimentos saudables con garantía sanitaria. A incidencia do contido total e composición da graxa sobre a obesidade e enfermidades cardiovasculares, derivadas do sedentarismo e alimentación desequilibrada, fai que o interese sexa maior por alimentos de contido moderado en graxa. No caso da carne, valóranse os esforzos que se realicen para que sexa máis saudable, como é a diminución en ácidos graxos saturados (AGS) polo seu efecto prexudicial e o enriquecemento en ácidos graxos polinsaturados (AGPS) $\omega 3$ e pola súa acción beneficiosa en problemas cardiovasculares e tumorais (Hu e col., 2002). Consumidores preocupados por estes aspectos nutricionais agradecen que se lles informe da carne de animais que en razón de raza, peso/idade de sacrificio, alimentación

e manexo teñan índices máis favorables que os recomendados como mínimos ou máximos pola Organización Mundial da Saúde (OMS). Neste punto hai que destacar que cambios relativos á produción animal como a dieta poden modificar o perfil de ácidos graxos dos seus produtos, facéndoo máis atractivos desde o punto de vista da saúde (Scollan e col., 2001).

O consumidor demanda todo isto pero sen que desmereza a calidade sensorial, xa que cando se senta á mesa e para que sexa fiel a unha marca é necesario que a carne satisfaga a súas expectativas de flavor, tenrura e aspecto zumarento.

Vida útil da carne

Enténdese como vida útil da carne ao período que esta permanece no expositor a disposición do cliente no punto de venda. Comeza cando a carne está madura e o final está marcado pola data de caducidade fixada previamente en condicións normais de transporte, almacenamento e exposición; ou incluso antes, por descarte debido a apreciación de zonas con degradación ou alteración da cor e/ou enranciamiento da graxa e/ou degradación microbiana dos aminoácidos, provocando olores e sabores desagradables (Cornet e Bousset, 1990; Kato e col., 1989).

A data de caducidade é importante porque obriga a retirada do produto, sendo unha información que consultan normalmente os consumidores. O produto debe chegar a esta data, normalmente, con todas as súas características sensoriais. Pero a modificación dos parámetros do proceso que leva desde a canal ata a data de caducidade pode determinar o descarte da carne como de calquera outro alimento perecedoiro antes de que se cumpra esta. O descarte na carne envasada en filetes realízase, fundamentalmente, debido a cambios na cor de fácil percepción que incitan ao rexeitamento do comprador, ademais de ser o primeiro signo de alteración da calidade da carne. Outra causa de rexeitamento é pola apreciación de viscosidade superficial, pegañenta ao tacto, que indica unha proliferación microbiana non desexable de *Pseudomonas* spp., entre as que hai que destacar *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. fragi*.

A duración da vida útil é polo tanto moi importante comercialmente porque prolonga a oportunidade de venda minimizando as perdas por descarte.

Os factores que afectan a duración da vida útil son numerosos, podéndose prolongar coa diminución da contaminación microbiana (Borch e col., 1996), a redución do tempo de almacenamento, as baixas temperaturas (Gill e Molin 1991), a ausencia de luz ultravioleta (Djenane e col., 2001), o tipo de envasado (Borch e col., 1996) e a adición de antioxidantes e/ou antimicrobianos (Ahn e col., 2002; Sánchez-Escalante e col., 2003).

Influencia da graxa na vida útil da carne e produtos cárnicos

O contido en graxa da carne de vacún depende de factores diversos como a raza ou a idade de sacrificio e, fundamentalmente, da porcentaxe de ácidos graxos da alimentación. Aínda que un enriquecemento da carne en AGPI, ω 3 e CLA é beneficioso desde o punto de vista da saúde, estes compoñentes reducen a estabilidade oxidativa da carne e predispónena ao enranciamiento.

Con excepción da carga microbiana, o dano oxidativo é o factor máis importante na deterioración da carne e vese reflectido co aumento de rancidez e perda de cor debido á oxidación da graxa e da mioglobina, respectivamente, e das dúas fraccións lipídicas da carne, fosfolípidos de membrana e triglicéridos, os primeiros conteñen maior proporción de AGPI e por iso son responsables da iniciación da oxidación lipídica. Incluso as carnes magras son susceptibles aos ditos fenómenos oxidativos, xa que aínda que teñen un reducido contido graxo, a que diminúe é a fracción triglicérida (composta fundamentalmente por AGS), mentres que a fracción fosfolipídica vese menos afectada (Monahan, 2002).

Polo tanto o enriquecemento con antioxidantes é necesario para paliar ao máximo o dano oxidativo (Jakobsen, 1999). É necesario prever a presenza de suficiente contido destes compostos na alimentación do animal e/ou engadilos á carne durante o almacenamento.

Adición de antioxidantes

A utilización de antioxidantes permite prolongar o tempo de conservación, o que incrementa a súa oportunidade de venda sen que estean deterioradas as súas características nutritivas e sensoriais, máis aínda que no momento actual en que o comercio da carne manexa partidas máis voluminosas e alcanza puntos de venda cada vez máis distantes.

A estabilidade da carne pódese ver incrementada pola adición de antioxidantes. A súa principal acción na extensión da vida útil radica nas seguintes capacidades:

- *Aumentar a estabilidade da cor* => principalmente por evitar a transición prematura de mioglobina a metamioglobina.
- *Manter as condicións organolépticas* => evitar ou retardar o enranciamiento da graxa. Acción especialmente importante en carne procedente de animais aos que se lles suplementaron ácidos graxos poliinsaturados, os máis facilmente oxidables.
- *Evitar o escurecemento* (ou perda de cor) inducido por radicais libres xerados pola acción da luz á que é exposta a carne nas condicións de venda. Esta acción non é atribuíble a todos os antioxidantes, pero si aos de natureza polifenólica

e aos extractos de plantas, que teñen a capacidade de captar a radiación ultra-violeta.

- Ampliar a *resistencia ao crecemento bacteriano*, pois os antioxidantes de natureza polifenólica posúen frecuentemente actividade antimicrobiana.

Procesos oxidativos en carne e produtos cárnicos

Un dos paradoxos da vida neste planeta é que unha molécula que sustenta a vida aeróbica, o O₂, esencial para o metabolismo enerxético e a respiración, poida constituir o punto de partida para un tipo de dano celular coñecido como “estrés oxidativo”, consecuencia dun desequilibrio entre a produción de especies reactivas e os mecanismos de defensa antioxidante (Marx, 1985). Estas substancias xéranse tanto a nivel intracelular como extracelular e son capaces de difundir polo citosol e a través das membranas deteriorar os distintos compoñentes celulares (Chihuailaf e col., 2002). Os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos constitúen o seu principal branco de actuación.

Acción sobre os lípidos

É precisamente sobre estas biomoléculas onde recae o maior dano derivado do estrés oxidativo, nun proceso coñecido como peroxidación lipídica. Afecta os ácidos graxos poliinsaturados, e as consecuencias son evidentes cando estes forman parte dos lípidos das membranas celulares xa que se ve alterada a súa adhesión, fluidez, permeabilidade e función metabólica (Yu, 1994).

A **peroxidación lipídica** e os cambios asociados a ela constitúen a principal causa de deterioración (Sevanian e Hochstein, 1985) xa que provoca a aparición de olores e sabores estraños, alteración da cor e, en xeral, unha redución da calidade organoléptica da carne. Por outro lado, provoca unha diminución do valor nutritivo da carne e a xeración de compostos potencialmente nocivos para a saúde relacionados co risco de padecer diversas patoloxías.

De forma xeral, cabe destacar que os produtos de oxidación máis estudados son os volátiles polos seus efectos a nivel sensorial e a maior facilidade de análise; no entanto, os produtos non volátiles poden ser máis importantes cuantitativamente e con efectos, en xeral, descoñecidos sobre a seguridade alimentaria e a calidade sensorial da carne, como poidan ser os óxidos de colesterol (Maraschiello, 1998).

Acción sobre as proteínas

Aínda que tamén constitúen un branco para as especies reactivas, o efecto sobre elas é menos intenso que no caso dos lípidos a causa da lenta progresión das reaccións. O ataque oxidativo ás proteínas pode provocar modificacións en aminoácidos

específicos, fragmentación da cadea peptídica, agregacións ou entrecruzamentos, alteracións da carga eléctrica ou incremento da susceptibilidade á proteólise (Shacter, 2000).

O termo **oxidación proteica** fai referencia á modificación dunha proteína inducida de forma directa mediante ROS ou ben indirectamente por reacción con produtos secundarios do estrés oxidativo. As principais consecuencias sobre a calidade da carne e produtos cárnicos aprécianse na cor. A mioglobina, proteína conxugada constituída por unha parte proteica (globina) e un grupo prostético non peptídico (grupo hemo), é a principal responsable da cor vermella do músculo. Na carne fresca dá unha cor vermella púrpura, en contacto co aire oxixénase dando lugar á oximioglobina de cor vermella brillante e cando a mioglobina se oxida xérase a forma férrica (Fe^{3+}), denominada metamioglobina, responsable da coloración marrón da carne. As proporcións relativas das formas oxixenadas e oxidadas na carne dependen da presión parcial do oxíxeno, sendo favorecida a formación de metamioglobina por presións de oxíxeno baixas (Bodwell e McClain, 1971).

Acción sobre outras biomoléculas

O ADN mitocondrial constitúe o principal branco de ataque xa que pola súa localización encóntrase exposto a un fluxo constante e elevado de especies reactivas provenientes da cadea respiratoria. Tamén se observou que algúns produtos de oxidación poden producir unha gran variedade de efectos biolóxicos adversos como a cooxidación de vitaminas e carotenoides, a inhibición da biosíntese do colesterol, aeroxénese, citotoxicidade ou carcinóxénese (Kanner, 1994).

Antioxidantes endóxeos presentes en produtos cárnicos

Natureza proteica: carnosina e taurina

Illáronse diferentes péptidos a partir de diversas fontes proteicas cárnicas con actividades quelantes no aparato dixestivo e no sistema inmunolóxico (como antimicrobianos e inmunomodulantes). Estes péptidos poderían utilizarse como aditivos funcionais alimentarios. Illáronse péptidos con actividade antioxidante *in vitro* e psicolóxica (efecto antifatiga) *in vivo* a partir de carne de porco (Arihara e col., 2005), polo (Arihara, 2006) e de becerro (Jang e Lee, 2005).

A carnosina é un dipéptido, abundante no tecido muscular, que xoga un papel importante como antioxidante na oxidación lipídica (Boldryev e col., 1997), xa que actúa capturando radicais libres no sarcoplasma e como axente quelante de metais (Decker e Crum, 1993). As súas propiedades antioxidantes baséanse na súa habilidade para actuar como quelante, como inactivador de radicais libres e como doador de H^+ . É hidrosoluble, polo tanto pode actuar na fase acuosa do músculo onde se en-

contran moitos catalizadores da oxidación lipídica. Ademais, protexe a cor da carne inhibindo a oxidación da mioglobina. Mantén a súa eficacia antioxidante nun rango de pH de 5,1 a 7,1, incluso despois do tratamento térmico, polo que ofrece un bo potencial como antioxidante en carnes procesadas (Kendler, 2002). A taurina, é un aminoácido que se encontra en forma libre, polo que non é constitutivo da proteína, e é un potente antioxidante.

Natureza lipídica: Ácido dihidrolipoico (DHHA)

Recibe este nome pola súa solubilidade en lípidos. Factor crítico no metabolismo enerxético mitocondrial, é producido endoxenamente aínda que en condicións de estrés fisiolóxico pode non xerarse en proporcións adecuadas e por iso se clasifica como un nutriente esencial. O ácido dihidrolipoico é un forte redutor capaz de interaccionar con especies reactivas de oxíxeno como os radicais hidroxilos, peroxilo e superóxido, o ácido hipocloroso e o oxíxeno singlete. Tamén é capaz de quelar ións metálicos e de rexenerar o ascorbato que, á súa vez, intervéen na reciclaxe da vitamina E (Kendler, 2002).

Vitaminas: Vitaminas A, C e E

Vitamina A

As máis importantes fontes de vitamina A son as froitas e os vexetais, pero a carne e o fígado tamén o son debido a que a eficacia de conversión de β -caroteno en vitamina A é menor en vexetais que se a tomamos directamente do fígado ou carne. Con 100 gramos de carne ou fígado diarios cóbrese o 100 % da RDA. Segundo Biesalski (2005) se o β -caroteno dos vexetais e froitas é a única fonte de vitamina A (p.e. dietas vexetarianas estritas), necesítanse máis de 500 g de vexetais ricos en β -caroteno diarios para alcanzar 1 mg de retinol (debido ao seu baixo índice de conversión 1:12). Isto pódese conseguir con 100 g de fígado consumidos 2 veces ao mes; este autor tamén opina que a inxesta diaria de vexetais achega máis contaminantes que os supostos ou cuestionables que poida ter o fígado (p.e. hormonas, metais ou xenobióticos, etc). Os animais e os humanos non son capaces de sintetizalos e absórbenos a través da dieta (Olmedilla, 2002). O β -caroteno podería complementar o papel antioxidante da vitamina E xa que esta é efectiva a presións parciais de oxíxeno superiores. Pola contra, a altas presións parciais de oxíxeno, o β -caroteno xera especies radicalarias capaces de promover a oxidación. Estudos de suplementación deste carotenoide na dieta animal poñen de manifesto que o β -caroteno pode manifestar a capacidade antioxidante ou prooxidante en función da concentración á que se encontre e do tipo de graxa subministrada na dieta (Ruiz e col., 1999; Maraschiello, 1998).

Vitamina C

O mecanismo antioxidante do ácido ascórbico (vitamina C) é complexo debido ás súas múltiples funcións. Por un lado, ten capacidade de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} que, á súa vez, pode descompoñer hidroperóxidos lipídicos (ROOH) ou peróxido de hidróxeno (H_2O_2), xerando radicais libres alcoxilo ou hidroxilo, respectivamente. Polo tanto, en presenza de ferro, peróxidos lipídicos e/ou peróxido de hidróxeno, o ácido ascórbico pode actuar como prooxidante (Niki, 1987). Por outro lado, o ácido ascórbico considérase o antioxidante hidrosoluble máis importante nos fluídos extracelulares. Reacciona de forma directa cos radicais superóxido, hidroxilo e con hidroperóxidos lipídicos (Chihuilaf e col., 2002). Ademais, participa na reciclaxe da vitamina E, reducindo o radical tocoferil e rexenerando o α -tocoferol nativo (Niki, 1987). Cando os radicais libres se xeran na fase acuosa, os antioxidantes hidrosolubles como a vitamina C actúan en primeiro lugar e cando os radicais chegan ás membranas, actúa a vitamina E; neste caso, a vitamina E e a vitamina C teñen un efecto aditivo. En cambio, cando os radicais libres se xeran a nivel da membrana, a vitamina E actúa sobre eles en primeiro lugar e a función da vitamina C consiste en rexenerar o α -tocoferol, permitindo así que este volva actuar; neste caso, as dúas vitaminas teñen un efecto sinérxico (Niki, 1987). En xeral, o ácido ascórbico tende a ser prooxidante a baixas concentracións e antioxidante a concentracións elevadas (Morrissey e col., 1998).

Vitamina E

O termo vitamina E fai referencia a unha familia de compostos relacionados estruturalmente e que inclúe todos os derivados tocol e tocotrienol que manifestan a actividade biolóxica do α -tocoferol. De forma xeral, o termo vitamina E utilízase para referirse ao α -tocoferol. É un composto minoritario, pero que está presente entre os constituíntes lipídicos das membranas celulares e as lipoproteínas. A vitamina E é un nutriente esencial que non pode ser sintetizado polos animais, polo que a súa presenza nos tecidos destes reflicte a inxestión a través da dieta. Debido ás súas características liposolubles, a absorción da vitamina E depende da capacidade do animal para absorber e dixerir a graxa da dieta. Debido ás súas características hidrofóbicas, a vitamina E localízase principalmente nos depósitos de graxa e as membranas celulares. É esta localización preferencial a que fai que a vitamina E sexa tan eficaz no seu papel antioxidante e estabilizador das membranas celulares (Wang e Quinn, 1999). O fígado, músculo esquelético e tecido adiposo son os tecidos con máis capacidade de acumulación de α -tocoferol (Bjorneboe e col., 1990). A vitamina E é o principal antioxidante liposoluble capaz de romper a cadea de propagación da oxidación lipídica. Protexe principalmente os AGPI dos fosfolípidos das membranas e das lipoproteínas plasmáticas. O seu principal papel consiste en capturar radicais peroxilo antes de que estes ataquen un substrato lipídico diana e propaguen a peroxidación lipídica. Actúa cedendo o H do grupo hidroxilo do carbono 6

ao radical peroxilo e fórmase o radical α -tocoferoxil. O incremento da concentración tisular de α -tocoferol protexe da oxidación, non soamente aos lípidos de membrana, senón tamén a mioglobina, importante para o mantemento da estabilidade da cor especialmente en carnes vermellas (Liu e col., 1995). A acumulación de vitamina E é músculo-dependente. A capacidade de almacenar α -tocoferol difire segundo a composición do músculo. Observouse que os músculos esqueléticos con máis capacidade oxidativa (ricos en fibras do tipo I e IIA) teñen máis capacidade de almacenaxe. Isto podería deberse a que estes tipos de músculos posúen máis capilares sanguíneos, polo que a achega de vitamina E é superior, conteñen máis mitocondrias e máis membranas onde acumular a vitamina e o contido lipídico tamén é superior, o que supón máis capacidade de almacenaxe da vitamina (Jensen e col., 1998). O α -tocoferol incorporado ao tecido muscular non se degrada durante a almacenaxe nin a cocción da carne, polo que o seu efecto protector se mantén (Jensen e col., 1998). O suplemento de alfa-tocoferol empregouse como tratamento para manter a cor da carne, así como aumentar a estabilidade oxidativa da graxa. A súa principal influencia é o mantemento da cor.

Sistema encimático endógeno (Catalasa, SOD e GSPHx)

Glutación peroxidasa (GSHPx)

É unha selenoproteína que se encontra na matriz mitocondrial e no citosol das células. Considérase o encima con maior capacidade para eliminar peróxidos. Actúa sobre o peróxido de hidróxeno e peróxidos lipídicos. A GSHPx necesita selenio (Se) en forma de selenocysteína, no centro activo, aínda que se describiu outra glutación peroxidasa independente de Se que é reactiva unicamente fronte a peróxidos lipídicos (Lawrence e Burk, 1976). Algúns estudos con animais demostraron que a actividade GSHPx dependente de Se está moi relacionada coa inxestión dietética de Se (DeVore e col., 1983).

Catalasa (CAT)

É unha hemoproteína de ampla distribución intracelular, pero encóntrase principalmente nos peroxisomas e nas mitocondrias. Descompón o peróxido de hidróxeno en H_2O e O_2 (Schwimmer, 1981). En xeral, baixas concentracións de H_2O_2 estimulan a actividade de peroxidasas como a GSHPx, mentres que a CAT actúa a concentracións superiores de H_2O_2 (Yu, 1994).

Superóxido dismutasa (SOD)

É unha metaloproteína presente nas células (citosol, mitocondrias, lisosomas, núcleo) e fluídos extracelulares. A biosíntese deste encima encóntrase fortemente regulada pola concentración do substrato sobre o cal actúa (Yu, 1994).

Estratexias de control da oxidación lipídica

Existen tres fenómenos principais que diminúen a calidade da carne (desde o punto de vista organoléptico, nutricional e de seguridade) durante as etapas de produción, transformación, envasado, transporte e posterior exposición; en definitiva, o que se coñece como vida útil dun produto como son a oxidación proteica e lipídica e a contaminación microbiana. Aínda que o factor limitante na vida útil da carne fresca é a carga microbiana, a oxidación lipídica e proteica son causas importantes de perda da calidade e son aspectos cruciais para consumidores e produtores. A oxidación proteica nas carnes frescas (oxidación da oximioglobina ata metamioglobina) leva consigo a perda de coloración desde o vermello brillante ata unha coloración marrón e é unha das principais causas de rexeitamento do consumidor (Faustman e Cassens, 1990). Por outra parte, a oxidación lipídica en principio nos fosfolípidos de membrana por ser de contido máis insaturado provoca a aparición de olores e sabores estraños e incluso a xeración de compostos potencialmente nocivos para a saúde, como poidan ser aldeídos, cetonas..., etc. Ambos os dous tipos de oxidación están intimamente relacionadas (Kanner e Harel, 1985).

Hai diferentes estratexias para o control da oxidación lipídica, como pode ser o control de substancias prooxidantes, como radicais ou catalizadores ou intermediarios das reaccións de peroxidación. Outras estratexias poden basearse en alterar os substratos da oxidación, como podería ser aumentar a estabilidade oxidativa da carne aumentando a proporción de ácidos graxos saturados na dieta, pero isto non é do todo desexable desde un punto de vista nutricional. Se pensamos en alimentos como a carne, encontrámonos con dúas opcións á hora de aplicar antioxidantes para estender a vida útil desta: alimentar o animal *in vivo* con estes ou suplementar a carne co antioxidante. A primeira opción ten como principais limitacións a dispoñibilidade e custo do antioxidante, pero non limitacións legais especiais. De feito, o suplemento pódese realizar non empregando concentrados de antioxidante ou antioxidante puro, senón empregando materias vexetais onde se concentra a substancia (como os carotenoides, por exemplo). A segunda opción ten máis implicacións desde o punto de vista legal e de seguridade alimentaria, se se pretende empregar un antioxidante máis ou menos purificado ou concentrado, que é, entón un aditivo.

Antioxidantes na dieta animal. Etapa *in vivo*

O pastoreo incrementa o contido en ω 3 da carne de vacún debido á alta porcentaxe de ácido linolénico da herba, mellora a relación PUFA:SFA e os índices ω 6/ ω 3 (Realini e col., 2005). Este aumento da instauración da fracción graxa leva consigo un maior estrés oxidativo *in vivo* pero que tamén é compensado na dieta propia do pastoreo, xa que é rica en antioxidantes, como ácido ascórbico, β -caroteno e α -tocoferol, aumentando os seus niveis a nivel tisular (Descalzo e col., 2005) res-

pecto a unha alimentación máis intensiva. Cunha alimentación intensiva rica en PU-FAS tamén se pode paliar cunha maior suplementación de vitamina E (α -tocoferol) na dieta. Sloan (2000) logrou aumentar en 7 veces respecto ao seu nivel normal os niveis de vitamina E en becerros. Hai moitas situacións nas que a adición *postmortem* de antioxidantes non é do todo efectiva debido a que estes compostos non se sitúan no lugar óptimo para bloquear as reaccións de oxidación (Schaefer e col., 1995), iso é debido a que a adición do antioxidante no produto final pode resultar dificultosa, no entanto a suplementación de antioxidantes na dieta de forma continuada permite a súa incorporación nas membranas do tecido muscular e adiposo. Un claro exemplo da actuación sinérxica de antioxidantes *in vivo* é o formado pola parella β -caroteno e α -tocoferol, pois mentres o primeiro se localiza dentro da rexión hidrofóbica das membranas celulares, a vitamina E está preto das superficies das ditas membranas, e sendo a vitamina E máis efectiva contra a oxidación, ambos os dous protexen da oxidación as membranas celulares desde diferentes posicións (Tsuchihashi e col., 1995).

Antioxidantes no produto final. Etapa *posmortem*

A vida útil da carne pode prolongarse coa adición de antioxidantes e/ou antimicrobianos (Ahn e col., 2002; Sánchez-Escalante e col., 2003). Finaliza coa súa data de caducidade, fixada pola apreciación de zonas con degradación da cor, xa que incitan o rexeitamento do comprador, e polo enranciamiento e dano oxidativo das proteínas que poden sufrir cambios conformacionais e fragmentación da cadea peptídica liberando aminoácidos, o que provoca olores e sabores desagradables (Cornet e Bousset, 1990). Na prevención do enranciamiento dos alimentos utilizáronse antioxidantes sintéticos, a maioría son derivados de estruturas fenólicas, sendo os máis comúns: Butilato hidroxianisol (BHA), Butilato hidroxitolueno (BHT), Ésteres do ácido gálico e Tertbutilhidroxiquinona (TBHQ). O uso destes antioxidantes está limitado a certas cantidades e actualmente estase cuestionando desde o punto de vista da seguridade alimentaria xa que se sospeita do seu posible rol como promotores do cancro e/ou teratóxenos (Van Esch 1996). Se a estes feitos se suma unha lexislación en seguridade alimentaria, cada vez máis restritiva e complexa, compréndese que o interese se centrase en antioxidantes de orixe natural, cuxa aplicación inmediata sería o campo alimentario (Moure e col., 2001). Coñécense un gran número de produtos naturais, con propiedades antioxidantes, sendo os máis comúns derivados de estruturas polifenólicas como flavonoides, tocoferois, etc. Destaca o extracto de romeu, debido á presenza de carnosol, rosmanol, isorosmanol e rosmaridifenol, compostos con elevado poder antioxidante. Comercialízase como aceite que contén estes compostos concentrados e que non presenta o olor nin o flavor característicos da planta, os cales modificarían as propiedades sensoriais dos produtos aos que se lles aplicase. Utilizouse con éxito en diversos alimentos como salsas, maionesas, carnes procesadas e polo. Nun estudo de Sánchez Escalante (2002) sobre os diver-

sos sistemas antioxidantes para prolongar a vida útil de hamburguesas de vacún envasadas en atmosfera modificada, o romeu mostrou unha gran capacidade antioxidante ademais de certo efecto antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, J., Grün, I. U., e Fernando, L.N. (2002). *J. Food Sci.*, 67, 1364-1369.
- Arihara, K., Tomita, K., Ishikawa, S., e col. (2005). Japan patent, submitted to government.
- Arihara, K. (2006). En: *Advanced technologies for meat processing* (pp. 245-274). N.M.L. Nollet e F. Toldrá (Eds.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Biesalski, H.-K., (2005). *Meat Sci.*, 70, 509-524.
- Bjorneboe, A., Bjorneboe, G. A. e Drevon, C. A. (1990). *Am. Inst. Nutr.*, 233-242.
- Bodwell, C. E. e McClain, P. E. (1971). En: *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos* (Price, J.F., Schweigert, B.S., eds.) p.80-211, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Boldyrev, A. A., Stvolinsky, S. L., Tyulina, O. V., e col. (1997). *Cell. Molecul. Neurobiol.*, 17, 259-271.
- Borch, E., Kant-Muemansb, M.-L., e Blixt, Y. (1996). *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 103-120.
- Chihuahailaf, R. H., Contreras, P. A. e Wittwer, F. G. (2002). *Vet. Méx.* 33, 265-283.
- Comet, M. e Bousset, J., (1990). *Proceedings of the 36th ICOMST, Havana* pp. 22623 1.
- Decker, E. A. e Crum, A. D. (1993). *Meat Sci.*, 34, 245-253.
- Descalzo, A. A., Insani, E. M., Biolatto, A. e col. (2005). *Meat Sci.*, 70, 35-44.
- DeVore, V. R., Colnago, G. L., Jensen, L. S. e col. (1983). *J. Food Sci.*, 48, 300-301.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., e col. (2001). *J. Food Sci.*, 66, 181-186.
- Faustman, C. e Cassens, R. G. (1990). *J. Mus. Foods*, 1, 217-243.
- Gill, C. D. e Molin, G. (1991). In: N. J. Rusell and G. W. Gould (editors). *Food Preservatives*. Blackie, Glasgow, 172-199.
- Hernández, J. M. (2002). *Eurocarne*, 106, 33-44.
- Hu, F. B., Bronner, L., Willett, W. C., e col. (2002). *J. Am. Med. Assoc.*, 287, 1815-1821.
- Jacobsen, C., Hartvigsen, K., Lund, P., e col. (2001). *Eur. Food Res. Technol.*, 212, 308-318.
- Jang, A., e Lee, M. (2005). *Meat Sci.*, 69, 653-661.
- Jensen, M., Essen-Gustavsson, B. e Hakkarainen, J. (1988). *J. Vet.Med.*, A35, 487-497.
- Kanner, J. (1994). *Meat Sci.*, 36, 169-189.
- Kanner, J., e Harel, S. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.*, 237, 314-319.
- Kato, H., Rhue, M. R. e Nishimura, T. (1989). En: *Flavor Chemistry. TrenaLs and developments*. eds. R. Teranishi, R. G. Buttery e F. Shahidi, ACS Symp Series 388, 158-174. ACS, Washington DC.
- Kendler, B. S. (2002). *Nutr.*, 18, 700-701.
- Lawrence, R.A. e Burk, R.F. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71(4), 952.
- Liu, Q., Lanari, M. C. e Schaefer, D. M. (1995). *J. Anim. Sci.*, 73, 3131-3140.
- Maraschiello, C. (1998). Tese doutoral. Universidade Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Marx, J. L. (1985). *Sci.*, 235, 529-531.
- Monahan, F. J. (2002). *Eurocarne*, 109, 89-96.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., e col. (1998). *Meat Sci.*, 49, S73-S86.
- Moure, A, Cruz, J. M., Franco, D., e col. (2001). *Food Chem.*, 72, 145-171.

- Niki, E. (1987). *Chem. Phys. Lipids*, 44, 227-253.
- Olmedilla, B. (2002). *Alimentaria*, 11-19.
- Realini, C. E., Duckett, S. K., Brito, Q. W., e col. (2005). *Meat Sci.*, 66, 567-577.
- Ruiz, J. A., Pérez-Vendrell, A. M. e Esteve-García, E. (1999). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 448-454.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrecano, G., e col. (2003). *J. Food Sci.*, 68, 339-344.
- Schaefer, D. M., Liu, Q., Faustman, C., e col. (1995). *J. Nutr.*, 125, 1792-1798.
- Schwimmer, S. (1981). En: *Source Book of Food Enzymology*, 202-217, The AVI Publishing Company, INC Westport, Connecticut, USA.
- Scollan, N. D., Choi, N. J., Kurt, E., e col. (2001). *Br. J. Nutr.*, 85, 115-124.
- Sevanian, A. e Hochstein, P. (1985). *Ann. Rev. Nutr.*, 5, 365-390.
- Shackelford, S.D.; Purser, D.E.; Smith, (1992). *J. Anim.Sci.*, 70, 465-469.
- Shacter. (2000). *Drug Metab. Rev.*, 32 (3&4), 307-326.
- Sloan, E. A. (2000). *Food Trends. Food Technol.*, 54, 33-58
- Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M., e col. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.*, 323, 137-147.
- Van Esch, G. T. (1996). *Food Chem Toxicol.*, 24, 1063-1066.
- Wang, X. e Quinn, P. J. (1999). *Prog. Lipid Res.*, 38, 309-336.
- Yu, B. P. (1994). *Physiol. Rev.*, 74, 139-162.

EXTRACCIÓN DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVA RELACIONADOS COAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓXICAS E FUNCIONAIS

Celestino Santos-Buelga

Dpto. de Nutrición e Bromatoloxía. Facultade de Farmacia. Universidade de Salamanca

Introdución

Os compostos fenólicos son os produtos máis importantes do metabolismo secundario dos vexetais e encóntranse amplamente distribuídos en hortalizas, froitas e produtos derivados destas, incluíndo a uva e o viño. Quimicamente trátase de substancias que conteñen polo menos un anel aromático cun ou máis substituíntes hidroxilo, que derivan biosinteticamente das rutas metabólicas do siquimato, que dá lugar a estruturas fenilpropanoide (C6-C3), e da dos poliquétidos (C6) ou de ambas as dúas conxuntamente. Nas plantas existen, non obstante, outras substancias que poden conter substituíntes fenólicos na súa estrutura, pero que non se clasifican dentro das familias de compostos fenólicos ao derivar doutras vías metabólicas, como é o caso dalgúns produtos de natureza terpenoide ou de alcaloides. Trátase de compostos que xogan importantes papeis nas plantas superiores, participando en funcións defensivas (fronte a radiación UV, patóxenos, patoloxías vexetais ou distintos tipos de estrés fisiolóxico), nodulación (leguminosas), protección fronte a herbívoros (como disuasores), pigmentación, etc. (Lattanzio *e col.*, 2008). Nos alimentos contribúen á definición dalgunhas características organolépticas, como a cor, o sabor ou a astrinxencia, e relacionáronse tamén con potenciais beneficios para a saúde humana ao tratarse de substancias capaces de exercer distintos tipos de actividades biolóxicas, ben establecidas en estudos *in vitro*, en particular, actividade antioxidante e captadora de radicais libres, capacidade para secuestrar metais de transición ou para interaccionar con proteínas e modular a actividade dalgúns encimas.

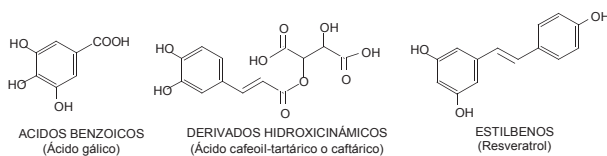
Clasificación

Dentro dos compostos fenólicos inclúense un grupo amplo de substancias con estruturas diversas, que van desde moléculas sinxelas ata complexas estruturas poliméricas, sendo habitual clasificalos de acordo ao seu esqueleto básico en: fenóis simples (C6), ácidos benzoicos (C6-C1), ácidos fenilacéticos (C6-C2), fenilpropanoides (C6-C3; ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, cromonas...), estilbenos (C6-C2-C6) e flavonoides (C6-C3-C6), así como derivados oligo/poliméricos destes, como ligninas (C6-C3)_n ou taninos hidrolizables (C6-C1)₂ e condensados (C6-C3-C6)_n. O número

de substancias fenólicas identificadas supera xa as 8000 e continúa aumentando (Andersen e Markham, 2006).

No caso particular da uva, os compostos fenólicos máis representativos pertencen ás familias dos ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico), derivados hidroxicinámicos (que se encontran maioritariamente esterificados con ácido tartárico), flavonoides, entre os que encontramos antocianos, flavanois (catequinas e proantocianidinas ou taninos condensados) e flavanois; e, en cantidades menores, estilbenos (resveratrol e piceido). Ademais dos anteriores, no viño pódense encontrar tamén taninos hidrolizables (galo- e elagitaninos) procedentes da madeira das barricas. Na Figura 1 recóllense os grupos de compostos fenólicos máis representativos da uva (e o viño).

COMPOSTOS FENÓLICOS NON FLAVONOIDES



FLAVONOIDES

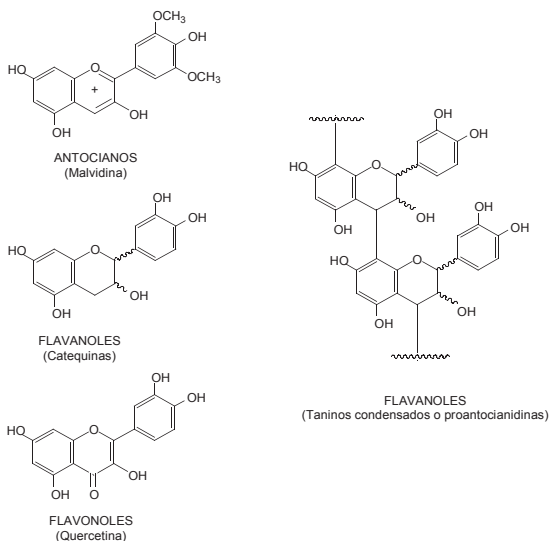


Figura 1. Compostos fenólicos representativos da uva e o viño

Composición fenólica da uva e o viño

As substancias fenólicas encóntranse irregularmente distribuídas dentro da uva, cada unha de cuxas partes presenta unha composición máis ou menos específica (Figura 2). Así, encontramos taninos condensados tanto nos raspóns, como na pel e sementes, mentres que antocianos e flavonóis se encontran case exclusivamente na pel e derivados hidroxicinámicos na polpa.

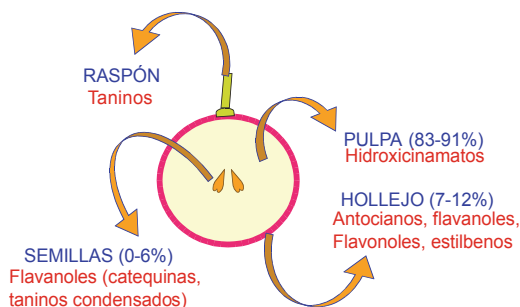


Figura 2. Distribución dos principais tipos de compostos fenólicos na uva

Na táboa 1 recóllense os intervalos aproximados de concentración de compostos fenólicos nas distintas partes da uva. Estes contidos deben considerarse exclusivamente orientativos, xa que existen notables diferenzas dependendo da variedade de uva, grao de maduración, condicións climáticas ou características do cultivo (solo, orientación, modo de condución do viñado, etc.). En principio, salvo pola presenza de antocianos, presentes exclusivamente en variedades tintas, non existen diferenzas relevantes en canto á composición fenólica en uvas brancas e tintas.

	Peles	Sementes	Polpa
Flavanois monómeros (catequinas)	14-100	50-1000	Tr
Flavanois condensados (taninos)			Tr
Oligómeros	35-200	120-1400	
Polímeros	20-750	>1200	
Antocianos	200-5000		*
Flavonois	20-200		
Ácidos fenólicos	25-200		40-500
Estilbenos	Tr-20		

*As variedades tintureiras, como Garnacha tintureira e Alicante-Bouchet, presentan tamén certas cantidades de antocianos na polpa.

Táboa 1. Concentracións aproximadas de compostos fenólicos nas distintas partes da uva (mg/Kg uva, expresado en peso fresco). Fonte: elaboración propia

O tipo e concentración de compostos fenólicos presentes no viño van depender da composición cualitativa e cuantitativa da uva e do proceso de vinificación empregado, que determinará os fenómenos de difusión e extracción dos compostos desde as partes sólidas da uva (e desde a madeira das barricas, se hai crianza) ao mosto. Tamén a modo orientativo, na táboa 2 recóllense os contidos medios habituais que poden ser encontrados nun viño novo.

	Viño tinto	Viño branco
Non flavonoides totais	240-500	160-260
Ácidos hidroxibenzoicos	0-250	0-100
Derivados hidroxicinámicos	60-330	130-150
Estilbenos (resveratrol)	Tr-15	Tr-4
Flavonoides totais	750-1100	25-30
Antocianos	20-500	Tr
Flavanois	50-450	15-30
Flavonois	10-200	Tr
Substancias fenólicas totais	900-2500	190-290

Táboa 2. *Concentración (mg/L) de substancias fenólicas no viño. Fonte: elaboración propia*

Influencia dos compostos fenólicos nas características sensoriais do viño

As substancias fenólicas xogan un papel determinante na definición das propiedades organolépticas e funcionais dos viños. De maneira xeral, asúmese que as características de cor, astringencia e calidade global dos viños tintos están positivamente relacionadas co contido de compostos fenólicos de natureza flavonoide. Nos viños brancos os compostos fenólicos xogan, salvo excepcións, un papel sensorial menor, estando máis ben na orixe de defectos de cor e estabilidade, de modo que a calidade se asocia a outros parámetros, como “frescura” ou compoñentes aromáticos.

De particular interese para a calidade sensorial dos viños tintos son os antocianos e flavanois (catequinas, proantocianidinas ou taninos condensados). Os primeiros son os principais responsables da cor do viño tinto, mentres que os segundos inflúen sobre o amargor e a astringencia e resultan determinantes para a estrutura, complexidade e sensación en boca dos viños; ademais, contribúen tamén á estabilidade e expresión da cor dos antocianos, a través da súa implicación en procesos de copigmentación. Da concentración e tipo de taninos presentes e o seu balance en relación cos antocianos depende, en gran medida, a aptitude dos viños para o envellecemento. Outros flavonoides, como os flavonois, poden ter tamén certa influencia sobre a cor e o amargor dos viños, aínda que a súa concentración nestes é moito máis baixa; igualmente, poden contribuír á compoñente amarela da cor nos viños brancos. Os derivados hidroxicinámicos da uva (e tamén os flavanois) son substra-

tos preferentes en procesos de apardazamento encimático, que poden deteriorar a calidade dos viños, especialmente no caso dos brancos. Aínda que incoloros, todos estes compostos poden influír indirectamente sobre a cor a través das súas interaccións cos antocianos (copigmentación). Pola súa parte, os ácidos fenólicos e taninos hidrolizables, extraídos da madeira das barricas, poden tamén influír sobre o sabor e a cor dos viños.

O viño, non obstante, é un medio dinámico sometido a unha evolución constante na súa composición fenólica, que se vai volvendo progresivamente máis complexa. Ao longo da vinificación, conservación e envellecemento, sucédense unha serie de procesos encimáticos, microbiolóxicos e químicos que afectan os compostos fenólicos e que conducen a produtos de oxidación, degradación e condensación destes. Os novos compostos formados posúen propiedades sensoriais diferentes ás dos seus precursores, influíndo deste modo sobre a calidade e características dos viños. A modo de exemplo, pódese comentar o caso dos antocianos. É coñecido que ao longo da vida do viño, a cor vai modificándose, pasando dos tons vermello púrpura inicial dos viños tintos novos a tonalidades tella, alaranxadas ou pardas, propias dos viños envellecidos. Estes cambios teñen a súa orixe nas características estruturais e de estabilidade dos antocianos, os cales existen baixo distintas formas dependendo do medio disolvente no que se encontren a composición e a acidez deste. Os antocianos adoitan representarse como catións flavilio, que posúen unha coloración avermellada; estas formas en medios acuosos experimentan reaccións de transferencia de protón, que levan á formación de bases quinoidais azuladas e procesos de hidratación, que xeran aductos hemiacetal incoloro en equilibrio con estruturas calcona (Figura 3). A proporción de cada forma está determinada polo pH, de modo que os catións flavilio só predominan en disolucións moi ácidas (Brouillard *e col.*, 1977), mentres que en medios acuosos ou hidroalcohólicos debilmente ácidos, como é o viño, existirían basicamente formas hemiacetal incoloras. Por outra parte, a normal presenza nos viños de sulfitos, cos que os catións flavilio forman tamén aductos incoloros, achega motivos adicionais para a decoloración dos antocianos. No entanto, a pesar de todo iso, os viños tintos continúan mostrando unha máis ou menos intensa cor vermella, o que se atribúe á existencia no viño de, polo menos, dos mecanismos de estabilización da cor: (1) a asociación non covalente dos cromóforos antociánicos con outros compoñentes do viño (fundamentalmente compostos fenólicos), a través dun proceso denominado copigmentación que os protexería da súa hidratación e decoloración, e (2) a substitución progresiva dos antocianos da uva por pigmentos máis estables resultantes da súa transformación. O primeiro proceso tería particular importancia en viños tintos novos, mentres que o segundo participaría principalmente na cor dos viños envellecidos. Todos estes cambios non só teñen repercusións sobre a cor, senón que inflúen tamén sobre outras características sensoriais, como a astrinxencia, ao implicar nestes a outras

substancias fenólicas e, en particular, aos flavanois (Santos-Buelga e de Freitas, 2009).

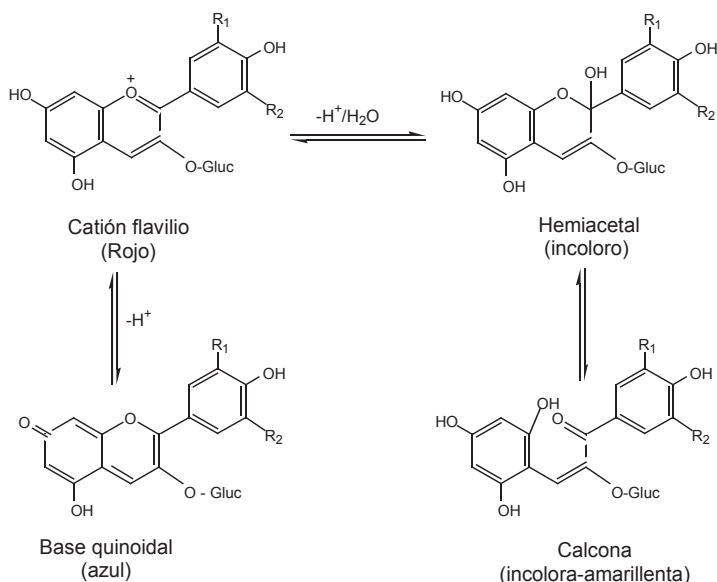


Figura 3. Equilibrios entre formas estruturais dos antocianos

Compostos fenólicos do viño e propiedades saudables

Nos últimos anos difundíronse estudos onde se relaciona o consumo moderado e responsable de bebidas alcohólicas con beneficios para a saúde en determinados individuos. En particular, estes beneficios refírense a unha mellor saúde cardiovascular (St. Leger *e col.*, 1979; Renaud e de Lorgeril, 1992), aínda que hai traballos que suxiren que podería tamén protexer fronte a outras patoloxías, como diabetes (Koppes *e col.*, 2005), déficits cognitivos ou demencias (Letenneur, 2004). É coñecido que o alcohol (etanol) favorece o aumento nos niveis circulantes de lipoproteínas de alta densidade (HDLs), exerce actividade fibrinolítica e diminúe a agregación plaquetaria (Pellegrini *e col.*, 1996), o que, en certa medida, podería explicar un posible efecto protector cardiovascular. No entanto, a maior parte dos estudos prospectivos realizados por distintos investigadores apuntan a que existe un maior efecto protector no caso do viño que o doutras bebidas alcohólicas, como cervexa ou bebidas espirituosas. Unha razón que se achegou para xustificar o maior efecto protector observado entre consumidores de viño é que nos países onde o seu consumo é tradicional existen hábitos dietéticos máis saudables (p.e. dieta mediterránea) e é

inxerido xunto coas comidas. Por outra parte, en poboacións onde non é tradicional, o viño adoita ser máis consumido por xente de maior nivel cultural e económico e con estilos de vida máis saudables (Johansen *e col.*, 2006). Deste modo, os potenciais beneficios non derivarían tanto dos efectos do viño senón dos patróns de vida asociados ao seu consumo. No caso doutras bebidas alcohólicas acostuma ter maior tendencia a pautas de consumo irregular, concentrado e excesivo, estando establecido que este tipo de consumidores mostran taxas de mortalidade coronaria e global máis elevadas que os bebedores que realizan un consumo lixeiro e regular de alcohol (Rehm *e col.*, 2003). Non obstante, a razón máis comunmente apuntada para xustificar os maiores efectos protectores do viño é a presenza neste, ademais do alcohol de compostos fenólicos, ausentes ou presentes en menor cantidade noutras bebidas. Neste sentido, cabe esperar efectos máis positivos por parte dos viños tintos que dos brancos ou rosados, moito menos ricos neste tipo de substancias.

Moitos compostos fenólicos que se poden encontrar na uva e no viño compórtanse como potentes antioxidantes en ensaios *in vitro* e encontráronse, de feito, relacións entre a capacidade antioxidante dos viños e o seu contido en substancias fenólicas (Burns *e col.*, 2001; Paixão *e col.*, 2007). Así mesmo, en distintos estudos observouse que extractos polifenólicos obtidos da uva ou viño tinto son capaces de diminuír a agregación plaquetaria, inducir vasorrelaxación, inhibir a peroxidación lipídica, regular os niveis plasmáticos de triglicéridos, modular a expresión da sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) inducendo a liberación de NO de maneira dose dependente ou inhibir a síntese de endotelina-1, un péptido vasoactivo cuxa sobreproducción é un factor clave no desenvolvemento de enfermidade vascular e aterosclerose (revisado por Dell'Agli *e col.*, 2004). Estes efectos asociáronse sobre todo ás proantocianidinas (Corder *e col.*, 2006), que constitúen, en xeral, a fracción polifenólica maioritaria nos viños tintos.

Outro composto fenólico tamén presente no viño é o estilbeno resveratrol, para o cal tamén se demostrou unha ampla variedade de actividades biolóxicas. Recentemente viuse que o resveratrol a través da súa actuación sobre as sirtuinas, unha familia de encimas deacetilasas implicadas na regulación celular, era capaz de aumentar ata nun 40% a duración de vida en diversos organismos habitualmente utilizados en ensaios de laboratorio, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ou rato (Baur e Sinclair, 2006). De confirmarse estes efectos estaríamos ante un composto con gran potencialidade terapéutica, aínda que parece improbable que coas concentracións ás que se encontra no viño se poidan chegar a inducir efectos similares aos encontrados en animais de experimentación. A modo de exemplo pódese indicar que un viño tinto cunha concentración media (optimista) de resveratrol de 5 mg/L achegaría $\sim 27 \pm \text{g/kg}$ peso nunha persoa de 70 kg cunha inxesta de 375 mL/día, concentracións de magnitude arredor de oitocentas veces inferior ás ensaiadas en ratos (22,4 mg/kg peso/día).

Con relación aos posibles efectos beneficiosos do viño, débese ter en conta que os datos científicos de que se dispón ao respecto son incompletos e indirectos, derivados de ensaios en modelos *in vitro* ou con animais de experimentación, sendo difícil que poidan chegar a obterse evidencias definitivas en humanos, toda vez que a realización de estudos de intervención debe descartarse por razóns éticas. Por iso, as evidencias dispoñibles baséanse en observacións epidemiolóxicas que, aínda que sólidas e consistentes, non constitúen unha proba definitiva sobre a existencia de efectos beneficiosos do viño, dada a diversidade de factores que poden influír sobre estas.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, O.M. e Markham, K.R., eds., (2006). *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1237 pp
- Baur, J. A. e Sinclair, D.A. (2006). *Nature Reviews*, 5, 493-506.
- Brouillard, R., Delaporte, B. e Dubois, J. E. (1977). *Journal of the American Chemical Society*, 99, 8461-8468.
- Corder, R., Mullen, W., Khan, N. Q., e col. (2006). *Nature*, 444, 566.
- Dell'Agli, M., Buscials, A. e Bosio, E. (2004). *Cardiovascular Research*, 63, 593-602.
- Johansen, D., Friis, K., Skovenborg, E., e col. (2006). *British Medical Journal*, 332, 519-522
- Koppes, L. L., Dekker, J. M., Hendriks, H. F. J., e col. (2005). *Diabetes Care*, 28, 719-725.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau, S., e col. (2008). En: *Recent Advances in Polyphenols Research*. Vol II. (F. Daayf & V. Lattanzio, eds.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK., 1-35.
- Letenneur, L. (2004). *Biological Research*, 37, 189-193.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., e col. (2007). *Food Chemistry* 105, 204-214.
- Pellegrini, N., Pareti, F., Stabile, F., e col. (1996). *European Journal of Clinical Nutrition*, 50, 209-213.
- Rehm, J., Sempos, C.T. e Trevisan, M. (2003). *Journal of Cardiovascular Risk*, 10, 15-20.
- Renaud, S. e de Lorgeril, M. (1992). *The Lancet*, 1, 1523-1526.
- St. Leger, A. S., Cochrane, A. L. e Moore, F. (1979). *The Lancet*, 1, 1017-1020.
- Santos-Buelga, C. e de Freitas, V. (2009). En: *Wine Chemistry and Biochemistry* (C. Polo & M.V. Moreno-Arribas, eds.), Springer Science. N. York, USA, 527-569.

INFLUENCIA DO NIVEL DE MADURACIÓN DA UVA E DAS TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN SOBRE A COMPOSICIÓN EN COMPOSTOS FENÓLICOS DO VIÑO

Fernando Zamora

Grupo de Investigación en Tecnoloxía Enolóxica (TECNENOL). Dpto. de Bioquímica e Biotecnoloxía. Facultade de Enoloxía de Tarragona. Universidade Rovira i Virgili

O concepto de madurez fenólica non é un tema novo senón que é un dos temas que durante as últimas dúas décadas suscitaron maior interese aos elaboradores de viños tintos. Non cabe a menor dúbida de que a concentración e extractibilidade dos antocianos presentes na pel da uva, así como a proporción de tanino das sementes, son algúns dos principais factores que condicionarán a futura calidade do viño tinto (Ribéreau-Gayon *e col.*, 1999). Por esta razón, durante os últimos anos falouse- e continuarase falando- da necesidade de dispor de metodoloxías eficaces para determinar o nivel de madurez fenólica real das uvas, para deste modo dispor dun criterio máis adecuado para decidir a data óptima de vendima (Glories e Agustín, M., 1993; Lamadon, 1995; Izcarra e González, 2001; Zamora, 2002).

Para ilustrar estes conceptos é necesario mostrar a evolución dos compostos fenólicos da uva ao longo do proceso de maduración (Figura 1).

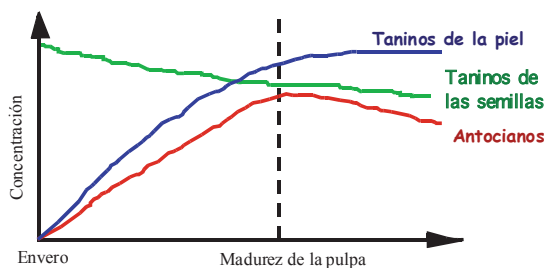


Figura 1. Evolución dos compostos fenólicos durante a maduración

Na maduración pódese ver que a concentración de antocianos aumenta ata alcanzar un valor máximo. Posteriormente obsérvase un lixeiro descenso. Pola súa parte os taninos da pel aumentan durante o proceso de maduración, mentres que os das sementes diminúen (Ribéreau-Gayon *e col.*, 1999).

Como se pode ver na Figura 2, a astringencia dos taninos da pel tende a diminuír, mentres que a dos taninos das sementes mantense constante ao longo do proceso

de maduración. No seu conxunto, a uva verde posúe menos taninos que a madura, pero en cambio a contribución de taninos das sementes, e polo tanto a súa astrinxencia global, será maior (Delteil, 1998; Ribéreau-Gayon *e col.*, 1999).

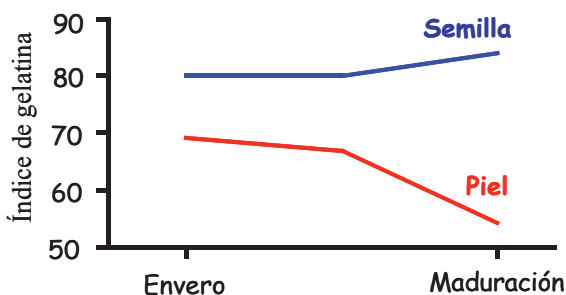


Figura 2. Evolución da astrinxencia dos taninos durante a maduración

A principal razón pola cal os taninos das sementes son máis astrinxentes que os das peles está relacionada co feito de que os taninos das sementes e os das peles non presentan a mesma composición. Basicamente, os taninos das peles son ricos en prodefinidinas e apenas posúen unidades galoiladas, mentres que os das sementes son especialmente ricos en unidades galato de epicatequina, o que lles confire a súa maior astrinxencia (Vidal *e col.*, 2003).

Outro factor importante a ter en conta é o feito de que o grao de madurez da uva tamén inflúe sobre a extractibilidade da cor durante a vinificación. Na Figura 3 móstrase un esquema ilustrativo deste fenómeno (Zamora, 2003).

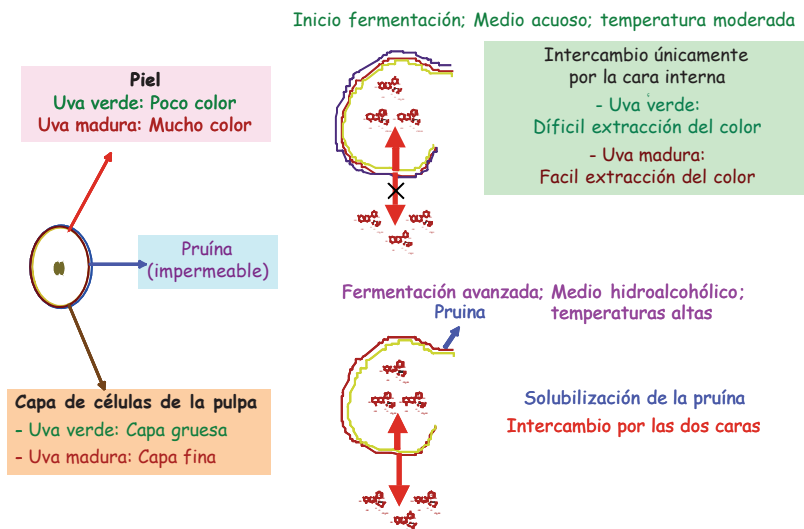


Figura 3. Influencia do grao de madurez sobre a solubilización dos antocianos

A pel do gran de uva esta recuberta cunha capa impermeable dunha substancia ceróide, a pruína. Ao comezo da fermentación/maceración, o medio é acuoso e as temperaturas son polo xeral baixas. Nestas condicións a pruína actúa impedindo a solubilización de substancias pola capa externa da pel. Nestas condicións a solubilización dos antocianos unicamente poderá ter lugar pola cara interna do gran da uva. Non obstante, a medida que a fermentación avanza, libérase etanol e sobe a temperatura. Ambos os dous factores provocan a solubilización da pruína e fan posible que o intercambio tamén teña lugar pola cara externa da pel. Resumindo todo o exposto, a uva verde posúe unha baixa concentración de antocianos que ademais serán de difícil extracción. Así mesmo, a uva verde presenta unha gran concentración de taninos das sementes, polo que se se forza a maceración co fin e efecto de extraer a suficiente cor, extraerase tamén tanino astrinxente e herbáceo. Pola contra, a uva madura terá unha alta concentración de antocianos facilmente extraíbles e dará lugar a viños con corpo e de taninos suaves. Por todo o exposto resulta evidente que o grao de madurez fenólica da uva é un factor determinante da calidade do viño tinto, e polo tanto a determinación da data de vendima deberá de ser efectuada utilizando este criterio.

A Figura 4 mostra a cinética de solubilización dos compostos fenólicos ao longo da maceración.

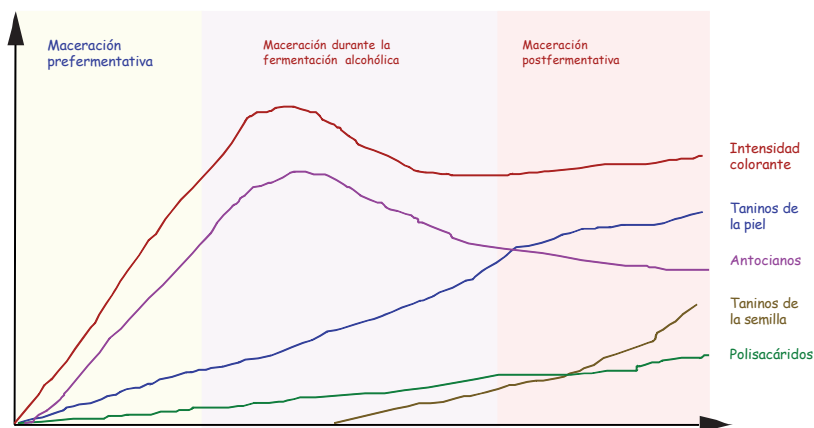


Figura 4. Cinética de extracción dos compostos fenólicos durante a fermentación/maceración

Como se ve, os antocianos extraírense relativamente rápido, aínda que a velocidade de solubilización dependerá, tal e como xa se comentou, do nivel de madurez fenólica da uva, así como de diversos factores tecnolóxicos. De feito, a máxima extracción dos antocianos ten lugar en poucos días, para despois observarse unha tendencia á diminución, debido principalmente a fenómenos de oxidación, precipitación e adsorción. Un comportamento similar obsérvase na intensidade colorante, aínda que a súa diminución é en ocasións máis marcada, debido a que a aparición do etanol diminúe os fenómenos de copigmentación e a que se forman combinacións antociano-flavanol, algunhas das cales son inicialmente incoloras.

Os taninos solubilízanse máis lentamente. De feito durante a maceración prefermentativa, ao non haber etanol no medio e ao ser as temperaturas moderadas, a súa extracción é moi limitada. Posteriormente ao aparecer alcohol no medio durante a fermentación alcohólica e aumentar a temperatura do medio, favorecese a súa solubilización. É necesario tamén distinguir entre os taninos da pel e os das sementes, xa que a súa cinética de extracción é diferente. Os taninos da pel comezan a solubilizarse conxuntamente aos antocianos, aínda que a súa extracción se prolongase máis tempo. Pola contra, os taninos das sementes non se solubilizarán ata a metade da fermentación, cando o alcohol disolva a cutícula. Por todo iso, a tancidade do viño incrementase a medida que se alonga a maceración.

Finalmente, durante a vinificación pódese aplicar técnicas que permiten modificar a extracción dos diferentes compostos fenólicos. A Figura 5 inclúe os puntos clave, dentro do diagrama de fluxo da vinificación en tinto, onde se pode incidir para mellorar a extracción.

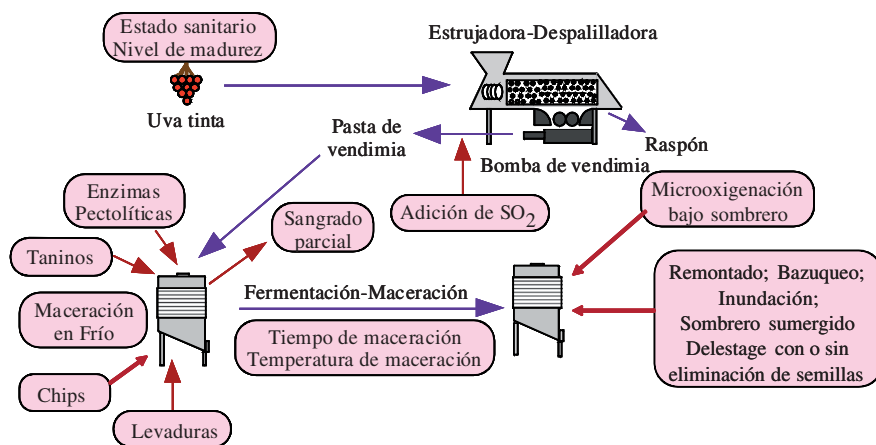


Figura 5. Vinificación en tinto. Puntos críticos para a extracción e estabilización da cor

BIBLIOGRAFÍA

- Delteil, D. (1995). Les macerations en rouge: L'art du détail. *Rev. Enol.*, 77, 23-25.
- Glories, Y. e Agustín, M. (1993). Actes du Colloque "Journé technique du CIVB", Bordeaux, 56-61.
- Izcarra, E. e González, M.L. (2001). *Enólogos*, 14, 14-18.
- Lamadon, F. (1995). *Rev. Œnolog. Techniq. Vitvinic. Œnol.*, 76, 37-38.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., e col. (1999). En: *Handbook of enology*, Vol 2, John Wiley & sons, Ltd, Chichester, 129-186.
- Vidal, S., Francis L., Guyot S., e col. (2003) *J. Sci. Food Agric.*, 83, 564-573.
- Zamora, F. (2002). *Enólogos*, 18, 24-28
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto; aspectos científicos y prácticos*. Mundi-Prensa. AMV Edicións, Madrid.



APLICACIÓN DA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA NO APROVEITAMENTO DOS SUBPRODUTOS DE VINIFICACIÓN

Miguel Rodríguez Rodríguez

Dpto. de Enxeñería Química. Tecnoloxía dos Alimentos e Tecnoloxías do Medio Ambiente. Universidade de Cádiz

Os fluídos supercríticos

Un fluído supercrítico (FSC) pode considerarse como un “estado de agregación da materia en condicións de presión e temperatura superiores ás do seu punto crítico”.

Os fluídos supercríticos exhiben propiedades intermedias entre gases e líquidos. Presentan unha viscosidade relativamente baixa (próxima á dos gases) e unha difusividade alta, polo que poden penetrar nos materiais sólidos porosos de forma máis eficaz que os solventes líquidos.

O poder disolvente dun FSC depende da súa densidade, a que a diferenza dos solventes líquidos se controla por cambios de presión e/ou temperatura. Este feito permite optimizar o proceso de extracción cambiando simplemente unha ou ambas as dúas variables.

A extracción supercrítica (ESC) emerxe como unha operación competitiva respecto doutras operacións de separación convencionais como destilación, extracción con disolventes, evaporación, etc., que requiren con frecuencia operar nunhas condicións de temperaturas que poden afectar as substancias termolábiles e/ou a utilización de disolventes que pola súa natureza tamén poden incidir negativamente sobre o ambiente, a calidade dos produtos e a saúde dos consumidores.

Actualmente, a maioría dos procesos de extracción de produtos naturais utilizan disolventes líquidos como axentes extractantes. As principais vantaxes que presentan as ditas substancias están asociadas á alta solubilidade que presentan os diversos solutos nestes disolventes. Agora ben, o feito de que, en xeral, haxa que eliminar o disolvente do produto extraído, require operacións de evaporación ou destilación que implican a utilización de temperaturas elevadas. Nestas condicións pode producirse a degradación térmica de substancias termolábiles. Ademais a necesidade de adicionar unha nova operación encarece o proceso de produción.

Como alternativa, xorde a extracción con disolventes en condicións supercríticas e, máis concretamente, con dióxido de carbono.

Os procesos de extracción con dióxido de carbono en condicións supercríticas son máis rápidos que os convencionais debido ás excelentes propiedades difusionais

deste. O feito de que a temperatura crítica do dióxido de carbono estea próxima aos 30°C permite que o proceso de extracción se poida realizar a temperaturas relativamente baixas. Ademais, é gasoso en condicións ambientais, o que facilita enormemente a separación do produto extraído.

O principal inconveniente da utilización desta substancia como disolvente é a súa baixa polaridade que o fan pouco adecuado para a extracción de substancias polares. No entanto, xorde a posibilidade de realizar a extracción en condicións supercríticas con codisolventes. Esta técnica consiste en adicionar ao dióxido de carbono unha pequena cantidade dunha substancia modificadora da súa polaridade. Esta adición permite aumentar a polaridade da mestura disolvente provocando un incremento do rendemento na extracción de substancias polares.

Finalmente, investigacións recentes utilizan mesturas líquidas a alta presión, técnica análoga á anterior cuxa diferenza estriba en que a porcentaxe de codisolvente na mestura é maior. Ao aumentar esta porcentaxe, pásase a condicións subcríticas, é dicir, utilizaríanse mesturas de dióxido de carbono en estado líquido e un disolvente líquido convencional.

ESC de suprodutos de vinificación

De forma xenérica, o proceso de vinificación produce un residuo denominado bagazo. Este subproduto da vinificación está constituído, fundamentalmente, por sementes, raspóns e pel.

Por un lado, as sementes poden ser aproveitadas polo seu contido en aceite que ten un alto valor dietético e nutricional, mentres que o residuo pode ser destinado a alimentación animal. Por outra parte, a pel, pode sufrir unha fermentación para a obtención de etanol, e o residuo resultante pode someterse a un proceso de extracción para a recuperación de antocianos e tartratos, dependendo do tipo de vinificación. De todas as substancias que se poden recuperar, os antocianos son as substancias que teñen maior interese debido ás súas aplicacións como colorantes naturais e ás súas propiedades antioxidantes.

Extracción de antocianos

Os experimentos realizados dividíronse en función do proceso de extracción utilizado:

- Proceso de extracción supercrítica con CO₂ + codisolventes
- Proceso de extracción con mesturas líquidas de CO₂ + codisolventes a alta presión
- Proceso de extracción convencional con metanol.

Os disolventes utilizados foron en cada caso dióxido de carbono e un 5% de metanol ou auga para as probas supercríticas con codisolventes, dióxido de carbono e un 20% de metanol ou auga, no caso das probas líquidas a alta presión e metanol para a extracción convencional.

Os valores das variables de operación foron os seguintes:

- 100 e 500 bar, para as probas a alta presión, e presión atmosférica, para a extracción convencional.
- 40 e 60°C de temperatura para garantir que se está por encima do punto crítico do dióxido de carbono e evitar a posible degradación térmica dos antocianos.
- Con respecto ao caudal, diversos estudos preliminares indicaron que a zona onde se encontra o máximo rendemento está comprendida entre 12 e 22,6 mmol/min.

Os resultados mostran que, en xeral, o rendemento do proceso é maior a 100 bar que a 500 bar. Mentres que parece claro que a solubilidade dun soluto aumenta coa presión, debido ao aumento de densidade que experimenta o disolvente, os resultados obtidos por diversos autores estudando o proceso de extracción de carotenoides con codisolventes amosan unha clara diminución do rendemento da extracción coa presión.

Esta diverxencia pode atribuírse a un aumento coa presión da solubilidade dos diversos cosolutos presentes na pel, con respecto ao aumento de solubilidade dos antocianos, o cal se traduce nunha diminución da solubilidade efectiva destes.

Con respecto ao efecto da temperatura o rendemento do proceso de extracción máis alto obtense a 60°C. Este feito pode ser atribuído a varios factores: por un lado, ao aumento da presión de vapor do soluto coa temperatura, o que facilita a súa disolución, e por outro, a un aumento da difusividade do disolvente e a unha diminución da viscosidade coa temperatura, mellorando enormemente as propiedades de transferencia de materia deste.

Para avaliar cal dos dous sistemas disolvente-codisolvente utilizados é mellor, compáranse os rendementos obtidos tras dúas horas de extracción. Os resultados mostran claramente que as probas realizadas utilizando metanol como codisolvente presentan un rendemento moito maior que cando se utiliza auga, debido ás mellores propiedades difusionais do dito sistema disolvente fronte ao formado coa auga.

Extracción de resveratrol, catequina e epicatequina

Realizáronse probas coa pel de uva de dúas variedades: tempranillo e garnacha a 100 bar e 400 bar de presión e a 35°C e 55°C de temperatura, utilizando CO₂ como disolvente e auga e etanol como codisolvente

Os resultados obtidos mostran que:

- Para as substancias estudadas, os mellores resultados obtéñense cando se opera a 400 bar de presión e 55 °C de temperatura.
- Das dúas variedades estudadas, as mostras de tempranillo proporcionan mellores resultados que as de garnacha en, practicamente, todas as extraccións realizadas para as condicións de presión e temperatura anteriores.

No caso dos residuos de uva palomino realizáronse extraccións a mostras de sementes, raspón, pel e bagazo nas mesmas condicións de presión e temperatura.

Os datos obtidos sobre contido en resveratrol indican que cando se utiliza como sistema disolvente CO₂ + etanol a 400 bar e 55°C obtéñense resultados mellores que os obtidos coa extracción convencional.

RECUPERACIÓN E CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES DOS RESIDUOS DE ALCOHOLEIRA

Beatriz Díaz Reinoso

Dpto. Enxeñería Química. Universidade de Vigo

Dende un punto de vista xenérico, o proceso de vinificación produce un residuo denominado bagazo, o cal está constituído, fundamentalmente, por sementes, raspóns e pel. Este residuo sométese a un proceso de fermentación para posteriormente mediante un proceso de destilación deste bagazo fermentado obter bebidas espirituosas. A información existente sobre a presenza e extracción de antioxidantes usando este substrato é moi escasa, sobre todo se se compara con todas as publicacións relacionadas co bagazo de vinificación e o seu emprego para a obtención de antioxidantes. Este residuo é un dous máis estudados como fonte alternativa de antioxidantes naturais, mesmo autores como Saura-Calixto (1998) propoñen o seu uso directo.

A produción de bebidas espirituosas leva consigo a xeración dun bagazo fermentado esgotado, o cal habitualmente é empregado como fertilizante nos propios viñedos das empresas produtoras, no entanto as elevadas producións anuais deste tipo de bebidas elevan a xeración destes residuos e fan que esta reutilización non sexa suficiente para a súa completa eliminación e os produtores necesitan os servizos de empresas xestoras que se encarguen da súa eliminación.

Algúns estudos (Cruz e col., 2004; Pinelo e col., 2005, Díaz-Reinoso e col., 2009) demostraron que os compostos fenólicos presentes nestes residuos son máis activos que os presentes en bagazos non destilados, ao mesmo tempo que se formula o aproveitamento de compostos presentes no disolvente embebido no substrato despois da destilación (Cruz e col., 2004, Díaz-Reinoso e col., 2009). Nestes licores identificáronse unha ampla variedade de compostos fenólicos dende procianidinas, flavan-3-oles monoméricos como (catequina, epicatequina, epigallocatequina, quercetina e quercetina-3- glicósidos), ácido galico esterificados con unidades de catequina (galatos de epigallocatequina) e ácidos benzoicos.

O emprego da tecnoloxía de membranas para concentrar e purificar compostos bioactivos presentes en correntes de procesado de industrias agroalimentarias é un campo de traballo que adquiriu un grande interese por parte da comunidade investigadora nos últimos anos. Exemplos neste campo empregando residuos similares encontramos a Nawaz e col. (2006), que procesa extractos hidroalcohólicos de sementes de uva, e a Santamaría e col. (2002) e Kalbasi e Cisneros-Zavillos (2007) que fracciona proantocianos e antiocinanos.

O fraccionamento de compostos fenólicos presentes en extractos acuosos de champiñón (Cheung e Cheung, 2005) foi realizado logrando a súa separación en compostos de alto e baixo peso molecular. Este tipo de procesos e a separación de compostos presentes en correntes líquidas poden ser melloradas empregando un tipo de membranas que presenten interaccións cos compostos que se van separar. Un exemplo disto é a separación de flavonoides de extractos de Ginkgo biloba empregando membranas de PVP modificado que interaccionan cos compostos presentes establecendo pontes de hidróxeno e favorecendo a súa separación (Xu e col., 2005).

Unha alternativa á tecnoloxía de membranas para a separación e purificación de compostos fenólicos, en xeral, e de antocianos, flavonoides e hidroxycinnamatos, en particular, é o emprego de resinas poliméricas (Llorach e col., 2004, Saleh e col., 2008; Scordino e col. 2005). Alternativas como a proposta neste traballo, na cal se unen tecnoloxía de membranas e tecnoloxía de adsorción foi usada por Li e col. (2005) e D'Alvise e col. (2000) para recuperar ou eliminar compostos fenólicos de licores de té e concentrados proteicos de alfalfa.

A Figura 1 mostra diferentes alternativas para o aproveitamento do residuo de alcoholeira mediante a obtención de diferentes produtos finais con diferentes características antioxidantes.

O bagazo destilado foi cedido pola Cooperativa Vitivinícola do Ribeiro (Ourense). Os licores embebidos no bagazo extráense por prensado e obtense unha media de 0,3 L de licores por cada kg de bagazo húmido. Estes licores obtidos por prensado conteñen 4,4 g de compostos fenólicos por litro determinados como equivalentes en ácido gálico.

O dispositivo experimental empregado consta de membranas comerciais de diferentes tamaños de corte, traballando sobre as condicións optimizadas en anteriores traballos do grupo (Díaz-Reinoso e col., 2009). Os pasos de concentración e fraccionamento por membranas leváronse a cabo operando de xeito pechado recirculando ao tanque de operación a corrente de permeado e rexeitamento, deste xeito conséguense optimizar as condicións hidráulicas que conducen a un mellor rendemento do proceso. E operando en modo aberto, recirculando a corrente de rexeitamento e eliminando a corrente de permeado conseguindo unha redución do volume de alimentación concentrado o efluente en compostos bioactivos. Mediante este procedemento obtívose o “produto 1” (Figura 1).

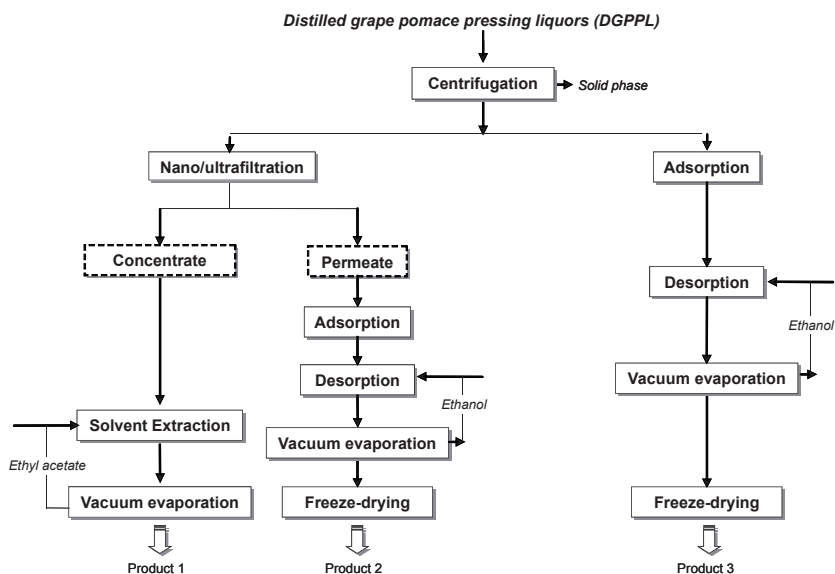


Figura 1. Alternativas para o aproveitamento do residuo de alcoholeira

Os licores procedentes do proceso de filtración por membranas operando en aberto aínda presentan un alto contido en compostos polifenólicos de baixo peso molecular. Este tipo de compostos poden presentar alta actividade antioxidante en función do grao de substitución do anel fenólico. Estes compostos son susceptibles de aproveitamento mediante unha recuperación destes compostos en resinas adsorbentes tipo poliméricas. Neste traballo empregouse a resina Sepabeads SP700, unha resina comercial de grao alimentario subministrada por Resindion, S.R.L. (Mitsubishi Chemical Corporation).

Na Táboa 1 móstrase a caracterización de diversos produtos obtidos mediante as secuencias mostradas na Figura 1.

	Contido fenólico (g GAE ¹ /100 g produto)	TEAC (g Trolox/g produto)	DPPH (EC ₅₀) g produto/L	FRAP (mM Ácido Ascórbico/g produto)	Poder reducto (mM Ácid. ascórbico/g produto)	b-carote- no (AAC) (2 g produto/L)
a) Liofilizado						
Nanomax 95	9,5	0,385	1,51	0,413	0,207	189
Nanomax 50	10,3	0,395	1,64	0,464	0,232	213
Inside Céram	10,2	0,410	1,58	0,444	0,222	209
b) Extraído en acetato de etilo ² (Produto 1 ³)						
Nanomax 95	37,1	1,83	0,613	1,76	2,81	24
Nanomax 50	42,5	2,09	0,293	1,84	2,97	176
Inside Céram	38,6	2,00	0,533	1,79	2,70	126
c) Adsorción-desorción				(mMol Fe/g produto)		1 gr/L
DGPPL (Produ- to 3 ³)	49,9	9,9	0,255	5,48	2,12	230
Nanomax 50	53,6	10,3	0,218	5,37	1,94	177
Inside Céram	39,4	10,5	0,229	4,99	2,07	163
¹ Gallic acid equivalents (GAE)						
² Rendementos de extraction: Nanomax 95: 3,79 g sólidos solubles/ 100 g sólidos iniciais; Nanomax 50: 2,91 g sólidos solubles / 100 g sólidos iniciais; Inside Céram: 3,51 g sólidos solubles / 100 g sólidos iniciais						
³ De acordo coa nomenclatura presentada na Figura 1						

Táboa 1. Caracterización de rexeitamentos procesados mediante a) liofilización, b) extracción con acetato de etilo e c) adsorción-desorción

O comportamento das diferentes membranas seleccionadas neste traballo pódese ver na Figura 2. O coeficiente de rexeitamento aparente calcúlase a partir dos datos experimentais obtidos nos experimentos en aberto e nos cales se operou ata alcanzar un factor de redución de volume (VRF, polas súas siglas en inglés) de entre 3 e 5. Cando se opera en condicións de concentración (modo aberto) durante un período diferencial de tempo, no cal o volume de retido decreceu dende V_r ata $V_r - dV_r$, un volume de permeado dV_p (numericamente igual a dV_r) pasa a través da membrana. Se se considera que a concentración de solutos no permeado e o retido son C_p e C_r , respectivamente, pódese establecer un balance de materia aos solutos do xeito seguinte (Moure e col., 2006),

$$C_p dV_r = d(V_r \cdot C_r) \quad [1]$$

Se se asume que R é independente da concentración de retido, C_r obtense como unha función de C_{r0} e a ecuación pódese resolver para obter unha expresión como a que segue:

$$\ln [C_r/C_{r0}] = R \ln [V_{r0}/V_r] \quad [2]$$

Na cal C_{r0} e V_{r0} son a concentración e o volume da alimentación, e o termo V_{r0}/V_r é o denominado con anterioridade factor de redución de volume (VRF). Baixo esta hipótese $\ln(C_r/C_{r0})$ varía linealmente con $\ln(VRF)$ e R pode ser calculada como a pendente da curva representada, como se mostra na Figura 2. Para a membrana Nanomax este valor do coeficiente de rexeitamento foi de 96,6%, mentres que para unha membrana do mesmo material pero cun tamaño de corte lixeiramente menor, o valor do coeficiente de rexeitamento encontrado foi do 51,5%. Á súa vez o efecto do tipo de material de construción da membrana quedou reflectido no valor do coeficiente de rexeitamento encontrado para unha membrana de material cerámico (Inside ceram), 71,7% cun tamaño de corte similar á membrana nanomax 50.

As capacidades como captadores de radicais libres dos produtos procesados por membranas móstranse na Táboa 1. En xeral, estes valores para o catión ABTS foron menores que a actividade dada por un antioxidante sintético (trolox), mentres que a actividade como captadores de radical DPPH foi intermedia entre a actividade encontrada para BHA e BHT. Os resultados para estes extractos resultaron ser lixeiramente menores aos achegados para antioxidantes sintéticos, non obstante comparados con extractos metanólicos obtidos de uva por Jayaprakassha *e col.* (2001) a actividade mostrada foi da orde de 2,5- 3 veces superior.

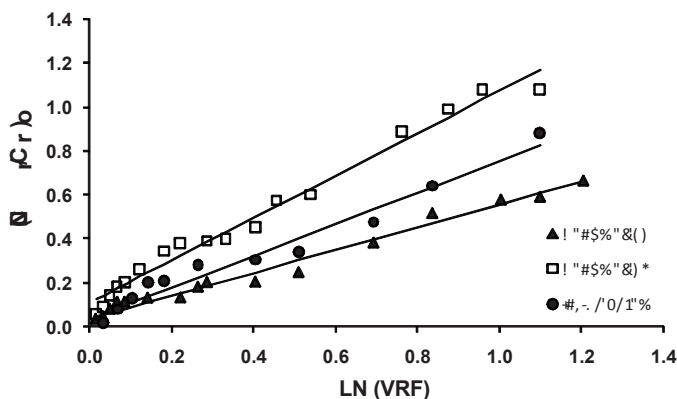


Figura 2. Coeficientes de rexeitamento aparente estimados mediante a linealización de $\ln (C_r/C_{r0})$ vs $\ln (VRF)$ para os compostos fenólicos presentes nos licores de bagazo destilado obtidos por prensado

Nun intento de mellorar estes resultados, estes extractos foron extraídos con acetato de etilo (Figura 1) e os rendementos da extracción e as actividades antioxidantes dos extractos obtidos móstranse na Táboa 1. Os extractos de acetato de etilo obtidos a partir do concentrado producido coa membrana Nanomax 50 é o que presenta unha maior actividade de captación do radical DPPH, tendo unha actividade similar á de antioxidantes comerciais.

O seguinte paso para mellorar os resultados obtidos ata o momento foi probar os procesos de adsorción-desorción sobre resinas dos compostos activos aínda presentes no permeado das correntes filtradas (Figura 1). Na Táboa 2 preséntanse os datos obtidos para a resina Sepabeads SP700 cando se adsorbeu sobre ela o material de partida (DGPPL) ou os permeados obtidos dos procesos de filtración deste efluente inicial (DGPPL) polas membranas Nanomax 50 e Inside Céram.

De acordo cos datos aquí mostrados, a capacidade de adsorción da resina, representada por q .

	q. (mg GAE/g resina)	Adsorción (g GAE adsorbidos/ 100 gr GAE iniciais)	Desorción		TEAC (mMol Trolox)
			Total desor- bido	Pico principal	
DGPPL	13,3	83,3	61,6	56,8	108,3
Nanomax 50 (Produto 2 ²)	8,23	91,7	65,0	56,3	57,0
Inside Céram (Produto 2 ²)	5,41	91,3	57,6	46,3	50,2
¹ Porcentaxe de desorción do pico principal recuperado e identificado como extracto purificado					
² De acordo coa nomenclatura mostrada na Figura 1					

Táboa 2. Capacidade de adsorción, porcentaxe de adsorción-desorción (referenciado á fracción adsorbida) e capacidade varredora do radical ABTS dos permeados

É significativamente diferente en función da corrente de alimentación empregada. O diferente comportamento entre o uso da corrente inicial (DGPPL) ou os permeados está relacionado cos cambios producidos polo tratamento de membranas na composición química das correntes. A adsorción de compostos fenólicos determinada como porcentaxe de adsorción é maior cando se emprega os permeados que para a corrente inicial, non obstante a actividade antioxidante do produto desorbido a partir da corrente inicial é da orde de dúas veces superior aos valores de actividade antioxidante encontrada para os produtos desorbidos cando a mostra empregada para o proceso de adsorción son os permeados do proceso de filtración.

Na Táboa 1, apartado c, móstranse o contido fenólico e as actividades antioxidantes para estes produtos de desorción. O produto final presenta concentracións de compostos fenólicos 4-5 veces superiores á dos produtos obtidos unicamente mediante tecnoloxía de membranas (Táboa 1c), e lixeiramente superiores aos extractos de acetato de etilo (Táboa 1b). A actividade antioxidante como captadores de radicais libres (ABTS) é vinte veces mellor que a dos produtos obtidos unicamente por membranas e 5 veces que os extractos de acetato de etilo.

Como conclusión pódese dicir que 1 gramo de extracto obtido mediante liofilización das mellores condicións dos procesos de desorción ten unha capacidade antioxidante comparable á de case 10 gramos de Trolox e un valor de FRAP equivalente a 0,5 g de ácido ascórbico. Isto quere dicir que a inxestión de 0,18 g do concentrado podería chegar a ser equivalente ao efecto da vitamina C contida en 100 g de kiwi, 100 g de goiaba, 600 g de limón ou 250 gramos de pemento encarnado.

BIBLIOGRAFÍA

- Cruz, J. M., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2004). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5612-5620
- D'Alvise, N., Lesueur-Lambert, C., Fertin, B., e col. (2002). *Sci. Technol.*, 35, 2453-2472.
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., e col. (2009). *J. Food Eng.*, 91, 587-593.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. PÁX., e col. (2001). *Food Chem.*, 73, 285-290.
- Kalbasi, A., Cisneros-Zevallos, L. (2007). *J. Agric. Food Chem.* 55, 7036-7042.
- Llorach, R., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F. (2004). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5109-5116.
- Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., e col. (2006). *Pur. Technol.*, 48, 176-181.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., e col. (2005). *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 284-290.
- Saleh, Z. S., Wibisono, R., Lober, K. (2008). *Int. J. Food Eng.*, 4, 13.
- Saura-Calixto, F. (1998). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4303-4306.
- Scordino, M., Di Mauro, A., Passerini, A., e col. (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 651-658.

