

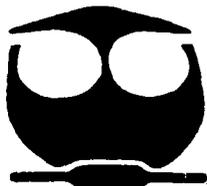


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FLAVONOIDES Y SU IMPORTANCIA EN LA ALIMENTACION.

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO DE ALIMENTOS PRESENTA; ALEJANDRO DAVID RODARTE CASTREJON



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

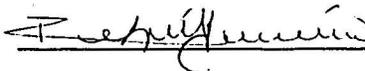
## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: LUCÍA GABRIELA BASCUÑAN TERMINI  
Vocal: MIGUEL ANGEL HIDALGO TORRES  
Secretario: REBECA LÓPEZ GARCÍA  
1<sup>er</sup> Suplente: LUCÍA CORNEJO BARRERA  
2<sup>do</sup> Suplente: LUIS ORLANDO ABRAJAN VILLASEÑOR

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Departamento de Alimentos y Biotecnología  
Facultad de Química  
Ciudad Universitaria

### **Asesor del tema**



**Dra. Rebeca López García**

### **Sustentante**



**Alejandro David Rodarte Castrejón**

## **AGRADECIMIENTOS**

Dedicado a mis papas, José y Marisela, por su imprescindible cariño, comprensión, guía, patrocinio y confianza en todo momento.

A mis hermanas, Andrea y Adriana, por el enorme placer de compartir con ustedes el mismo molde y ser un reflejo de lo que soy.

A Rebeca López-García por su incansable paciencia al asesorar la realización de este trabajo y por sus valiosas enseñanzas durante el proceso. Gracias por ser un verdadero mentor y un ejemplo a seguir.

A Miguel Ángel Hidalgo por contagiarme su genuina visión de los alimentos y la industria alimentaria.

A Lucía Bascuñan por su amable disposición y sugerencias en la revisión de este documento.

A mis amigos quienes con curiosidad solo abrirán este documento para buscarse en esta sección. Omito menciones particulares por que créanme, todos juegan una parte indispensable para mi. Gracias por dejarme ser parte de su vida.

**“ Libremos al cuerpo de sus toxinas, alimentémoslo  
correctamente y estará hecho el milagro de la salud “**

***Dr. Arbuthnot Lan***

# INDICE

I	RESUMEN	
II	OBJETIVOS	
III	INTRODUCCIÓN	1
<b>CAPÍTULO 1</b>		
	Fitoquímica y metabolitos secundarios	5
1.1	<i>Fitoquímicos y su estudio</i>	5
1.2	<i>Metabolitos secundarios</i>	8
1.3	<i>Metabolitos secundarios en frutas y verduras</i>	9
1.4	<i>Compuestos polifenólicos</i>	10
<b>CAPÍTULO 2</b>		
	Distribución y química de flavonoides	13
2.1	<i>Aspectos históricos sobre el estudio de flavonoides</i>	13
2.2	<i>Generalidades</i>	14
2.3	<i>Biosíntesis de flavonoides</i>	19
2.4	<i>Subclases de flavonoides</i>	22
2.4.1.	<i>Algunas diferencias entre subclases</i>	24
	<i>Flavonoles y flavonas</i>	24
	<i>Flavanoles</i>	25
	<i>Antocianinas</i>	25
	<i>Flavanonas</i>	26
	<i>Isoflavonas</i>	26
<b>CAPÍTULO 3</b>		
	Funciones de los flavonoides en la fisiología vegetal	27
3.1	<i>Los flavonoides como metabolitos secundarios e importancia dentro de las plantas</i>	28
3.1.1	<i>Los flavonoides en la biología de la polinización</i>	28
3.1.2	<i>Los flavonoides y su papel biológico en el fruto</i>	31

3.1.3 Señalamiento y comunicación en la simbiosis planta- microorganismos	32
<b>CAPÍTULO 4</b>	
Métodos de análisis para flavonoides	35
4.1 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para flavonoides	42
<b>CAPÍTULO 5</b>	
Los flavonoides como antioxidantes	46
5.1 Concepto de radicales libres	47
5.2 Mecanismo de acción de antioxidantes	49
5.3 Aspectos estructurales que les confieren características antioxidantes	52
5.4 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante	56
5.4.1 Inhibición de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados	57
5.4.2 Métodos basados en el secuestro de radicales	58
5.4.3 Daño oxidativo al ADN como método de evaluación antioxidante	61
5.5 Consideraciones para flavonoides como antioxidantes	62
<b>CAPÍTULO 6</b>	
El papel de los flavonoides en la alimentación humana	63
6.1 Principales flavonoides en los alimentos	63
6.2 Ingesta diaria promedio de flavonoides totales	71
6.3 Flavonoides asociados con alimentos particulares	75
6.3.1 Vino tinto	75
6.3.2 Té verde	76
6.3.3 Soya	79
6.3.4 Frutos cítricos	81
6.4 Flavonoides y otros compuestos fenólicos como parte del perfil fitoquímico de los alimentos	84

<b>CAPÍTULO 7</b>	
Factores que afectan el contenido y consumo de flavonoides	86
7.1 <i>Las condiciones ambientales y de cultivo y su repercusión en el contenido de flavonoides</i>	86
7.2 <i>Efecto del contenido de flavonoides durante el procesamiento de los alimentos</i>	88
7.3 <i>Absorción, biodisponibilidad y metabolismo</i>	92
7.4 <i>Consumo de flavonoides en algunas poblaciones del mundo</i>	96
7.5 <i>Fitoquímicos en la dieta mexicana</i>	98
<b>CAPÍTULO 8</b>	
Efectos de los flavonoides en la fisiología humana y su relación con enfermedades crónico degenerativas	101
8.1 <i>Estudios epidemiológicos</i>	102
8.2 <i>Los procesos oxidativos y su efecto en el desarrollo de enfermedades</i>	106
8.2.1 <i>Generación de radicales libres en el organismo</i>	107
8.2.1 <i>Estrés oxidativo y enfermedades crónico degenerativas</i>	109
8.3 <i>Cáncer</i>	112
<i>Efecto genotóxico</i>	116
8.4 <i>Aterogénesis y enfermedades cardiovasculares</i>	117
<b>CAPÍTULO 9</b>	
Los flavonoides dentro del concepto de alimento funcional	123
9.1 <i>Generalidades sobre alimentos funcionales</i>	123
9.2 <i>Compuestos con actividad biológica en los alimentos</i>	126
9.3 <i>Marco regulatorio en otros países</i>	137
9.4 <i>El caso de los alimentos funcionales en México</i>	140
<b>IV CONCLUSIONES</b>	147
<b>V REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	151

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen metabólico de los principales metabolitos secundarios de las plantas.	6
Figura 2. Núcleo flavona, estructura básica de las subclases de flavonoides.	15
Figura 3. Carbohidratos que pueden estar enlazados a la aglicona de la subclase de flavonoles, la quercetina.	17
Figura 4. Biosíntesis de flavonoides en los tejidos vegetales a partir del aminoácido fenilalanina.	21
Figura 5. Agliconas de la subclases principales de flavonoides.	23
Figura 6. Identificación preliminar de subclases de flavonoides y sus glicósidos en una cromatografía en papel con sistema de eluyentes de dos dimensiones.	38
Figura 7. Mecanismo propuesto de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (LH) por compuestos polifenólicos (AH).	51
Figura 8. Sitios de enlace propuestos de metales de transición a flavonoides.	56
Figura 9. Agliconas de flavonoides por subclase prominentes en alimentos.	64
Figura 10. Estructuras químicas de catequinas, teaflavinas y tearubigenos principales del té verde en su proceso de fermentación para la elaboración de té negro.	78
Figura 11. Estructuras químicas de fitoestrógenos, isoflavonas predominantes daidzeína, genisteína y gliciteína) y cumarina (cumestrol) en relación al estrógeno sintetizado por los mamíferos $17\beta$ -estradiol).	80
Figura 12. Reacción de la producción del edulcorante naringin dihidrocalcona a partir de la flavona naringina.	83
Figura 13. Posible participación de fitoquímicos en las etapas principales de carcinogénesis.	115
Figura 14. Aterogénesis en las células de la pared arterial.	119
Figura 15. Reacción en cadena iniciada por radicales libres de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las lipoproteínas de baja densidad (LBD).	121
Figura 16. Factores que participan en la relación alimento/ salud.	134
Figura 17. Algunos factores a considerar para el éxito de alimentos funcionales en el mercado mexicano.	143

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Las clases de compuestos fenólicos más importantes en las plantas.	11
Tabla 2. Base Química del color en plantas angiospermas.	30
Tabla 3. Rangos de absorción ultravioleta de flavonoides.	36
Tabla 4. Aislamiento y purificación de flavonoides. Relación entre el color de mancha y la estructura durante la interpretación de cromatografía en papel bidimensional.	40
Tabla 5. Aplicaciones básicas de técnicas instrumentales para la elucidación de estructuras de flavonoides.	41
Tabla 6. Características estructurales de dos flavonoides y su influencia en la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos insaturados de las lipoproteínas de baja densidad.	53
Tabla 7. Potencial antioxidante relativo total de flavonoides en relación a la vitamina C y vitamina E, expresados como equivalentes TROLOX <sup>®</sup>	60
Tabla 8. Contenido de Flavonoles y flavonas (mg /Kg de peso fresco) en alimentos determinados por HPLC después de la hidrólisis de sus glicósidos.	66
Tabla 9. Contenido de antocianinas totales en frutas y verduras comunes.	69
Tabla 10. Ingesta diaria promedio en diferentes grupos de la población.	74
Tabla 11. Contenido de ácidos fenólicos en varios alimentos	85
Tabla 12. Contenido de quercetina en bayas frescas y en productos a base de bayas.	89
Tabla 13. Estudios epidemiológicos en la relación entre la ingesta de flavonoides y enfermedades cardiovasculares (EC) y ataques cardíacos (AC).	105
Tabla 14. Factores prooxidantes y las defensas antioxidantes.	110
Tabla 15. Constituyentes biológicamente activos en alimentos que pueden prevenir enfermedades crónico degenerativas.	128
Tabla 16. Como se modifican los alimentos para darles el carácter de alimentos funcionales.	132
Tabla 17. Resumen de la legislación relacionada con alimentos funcionales en diferentes países.	139
Tabla 18. Principales causas de mortalidad general en los Estados Unidos Mexicanos.	141

## RESUMEN

Los flavonoides son fitoquímicos que están presentes en gran número de alimentos consumidos normalmente. A estos compuestos se les ha evaluado su actividad biológica, en particular sus propiedades antioxidante, y se han estudiado los posibles mecanismos en que participan en la protección de enfermedades como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. De esta forma se ha analizado su contenido en diversidad de alimentos y se ha calculado la ingesta diaria promedio para algunos grupos de la población alrededor del mundo, lo cual ha servido para relacionar esta ingesta total con la incidencia de las enfermedades ya mencionadas. Estos fitoquímicos son parte de un numeroso grupo de compuestos contenidos naturalmente en los alimentos de origen vegetal que también se les está estudiando su actividad biológica y están considerados como alimentos funcionales. Los últimos son alimentos que contienen sustancias con efectos benéficos a la salud adicionales a aquellos de los de la nutrición tradicional. La adición de compuestos con actividad biológica, como los flavonoides, en productos alimentarios implica retos que involucran un gran esfuerzo de investigación científica, del sector industrial y necesidades a nivel legislativo y de recomendaciones dietarias, entre otros.

# **OBJETIVO**

## **OBJETIVO GENERAL**

Hacer una revisión monográfica sobre los flavonoides como compuestos fitoquímicos de importancia en la alimentación humana.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

- Proporcionar información de actualidad sobre los flavonoides como valiosos microcomponentes presentes en los alimentos de origen vegetal.
- Estudiar las posibles contribuciones de los flavonoides presentes en la dieta en el mantenimiento de la salud y el bienestar.
- Exponer la importancia del análisis de alimentos con respecto a la presencia, composición y cuantificación de compuestos fitoquímicos con reconocida actividad biológica.
- Ofrecer elementos para una mejor comprensión entre la relación de los fitoquímicos presentes en la dieta y la salud.
- Presentar los aspectos más sobresalientes de los flavonoides y mostrar su aportación dentro de la actual corriente de los alimentos funcionales.

## INTRODUCCIÓN

La importancia de la dieta en la salud y el bienestar es un concepto reconocido hace mucho tiempo. Se sabe que la ausencia de ciertos nutrimentos esenciales o el exceso de algunos compuestos puede resultar en ciertas enfermedades o predisponer al cuerpo a otros padecimientos. Sin embargo, recientemente, estos conceptos han variado y se ha empezado a reconocer que muchos compuestos presentes en la dieta pueden tener una función específica en la prevención de enfermedades crónicas tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y diabetes (Caragay A.B., 1992). Existen diversos estudios epidemiológicos que han proporcionado datos que ayudan a reconocer que los buenos hábitos alimenticios juegan un papel significativo en la prevención de muchas enfermedades, como las mencionadas anteriormente. Uno de los conceptos en los que suele haber consenso de la comunidad científica es que las dietas ricas en fitoquímicos (proporcionados por un alto consumo de frutas y verduras) se consideran como dietas protectoras donde los flavonoides participan de manera importante. (Manach C., *et al.*, 1999)

Los flavonoides que pertenecen al vasto grupo de compuestos fenólicos, son de interés particular ya que parecen participar en todas las funciones que se les atribuyen a los metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos de bajo peso molecular son importantes constituyentes minoritarios de la dieta humana por lo que no se les consideraba importantes hasta hace poco. Se encuentran en frutas, verduras, nueces, semillas, y flores. En años recientes, se ha descubierto que estos compuestos tienen una gran variedad de efectos fisiológicos, tanto en plantas como animales, sirviendo como activadores e inhibidores de enzimas, quelantes metálicos, antioxidantes, secuestrantes de radicales libres,

reguladores de la transcripción, agentes antimutagénicos, agentes carcinogénicos y anticancerígenos y también como sustancias antialérgicas, antiinflamatorias, citotóxicas, y antineoplásicas. (Dixon R.A. *et al.*, 1998; Magnani L. *et al.*, 2000; Beecher G., 1999).

Con el desarrollo de técnicas científicas modernas, se ha podido aislar, identificar y purificar diversos flavonoides a partir de sus fuentes naturales. Esto ha permitido el estudio de sus mecanismos de acción y sus efectos en la salud sobretodo de los mamíferos. Incluso, algunos de estos hallazgos han tenido ciertas aplicaciones comerciales.

El presente trabajo se encuentra dividido en 9 capítulos. El capítulo 1 introduce al lector a al estudio de los metabolitos secundarios, se mencionan los diferentes grupos y se ubica a los flavonoides dentro del grupo al que pertenecen, los compuestos polifenólicos. El capítulo 2 contiene elementos fundamentales de la química de los flavonoides. A su vez, se describe la forma en que son sintetizados en la planta y se indican las características principales de las subclases más importantes. El capítulo 3 hace referencia de las funciones que cumplen los estos compuestos en las plantas y su relevancia dentro del contexto ecológico. En el capítulo 4 se incluyen algunos de los métodos experimentales que se emplean con mayor frecuencia para el análisis y la cuantificación de este grupo de compuestos polifenólicos. La actividad antioxidante en relación a la estructura de los flavonoides es desarrollada en el capítulo 5. Se explican algunos posibles mecanismos de su capacidad antioxidante y los métodos empleados para dichas evaluaciones. Ya en el capítulo 6 se describe el contenido de las distintas subclases en algunos alimentos y se introduce al concepto de ingesta diaria promedio. Mientras que los elementos que provocan cambios en el contenido de flavonoides se exponen en el capítulo 7. Por su lado, en el capítulo 8 se explican aquellas enfermedades crónico degenerativas que se han vinculado con el consumo

de estos compuestos y se hace referencia a los estudios epidemiológicos que se han realizados para determinar sus efectos en la prevención o retardación de enfermedades. Por último, en el capítulo 9 se establece la relevancia del estudio de compuestos con actividad biológica, en su caso los flavonoides, en la producción de alimentos con beneficios a la salud denominados alimentos funcionales.

# CAPITULO 1

## Fitoquímica y metabolitos secundarios

### *1.1 Fitoquímicos y su estudio.*

El conocimiento progresivo por parte del hombre del reino vegetal en sus distintas formas ha sido factor decisivo en los fenómenos sociales y económicos determinantes en la evolución de la humanidad. A la identificación y selección de plantas útiles, y aquellas que eran dañinas, siguió su explotación racional y cultivo, surge así la agricultura. (Barba Chávez J.M., 1997)

La fitoquímica, ciencia que combina los métodos de investigación de la botánica y la química, tiene como objetivo principal el estudio de los múltiples compuestos químicos que se encuentran en las células vegetales; dicho estudio abarca su biosíntesis, metabolismo, distribución natural, función biológica, aislamiento, purificación y estructura química. (Valencia Ortiz C., 1995) Técnicamente el término fitoquímico se refiere a cualquier sustancia química que se presenta de forma natural en las plantas. (Caragay A.B., 1992)

A partir de las moléculas agua y dióxido de carbono, y con la energía solar, las plantas verdes elaboran carbohidratos, lípidos y proteínas que son considerados como metabolitos primarios; a su vez sintetiza una diversidad de compuestos a los que se conocen como metabolitos secundarios. Las funciones de los metabolitos secundarios son muy variadas y juegan un papel importante en la fisiología vegetal. En la figura 1 se resume el origen de los metabolitos secundarios a partir del metabolismo de los carbohidratos.

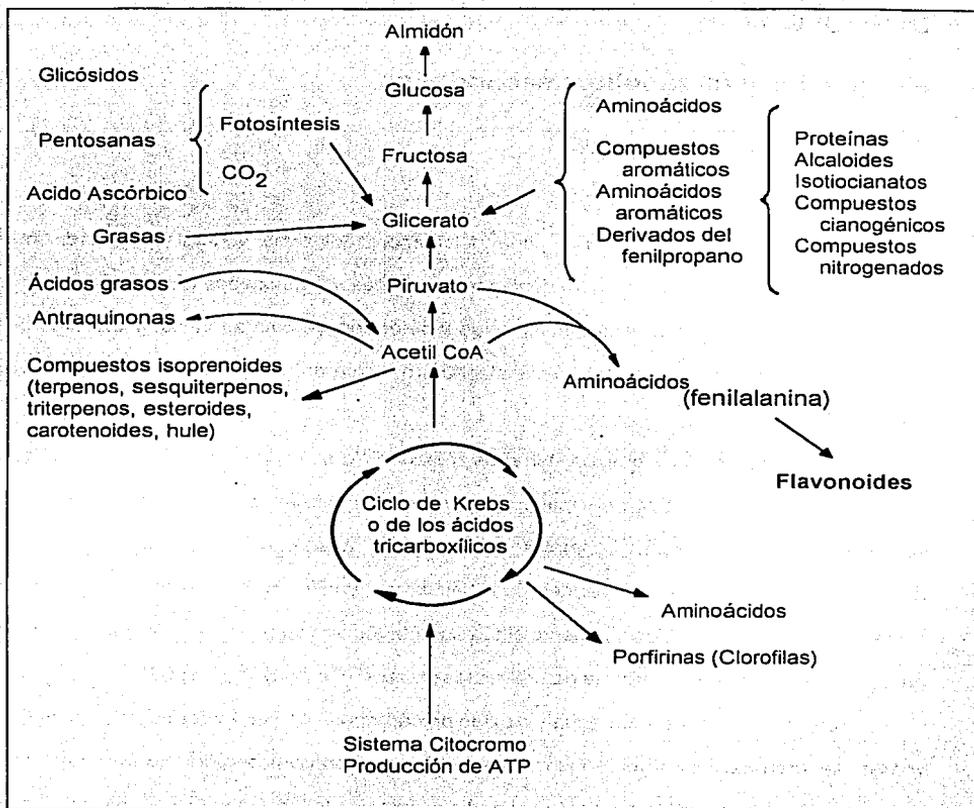


Figura 1. Origen metabólico de los principales metabolitos secundarios de las plantas: Valencia Ortiz C., 1995

Algunos de estos constituyentes químicos son metabolitos que se acumulan en los tejidos y son responsables de una variedad de efectos en la fisiología de los mamíferos. En muchos casos a este efecto se le conoce como actividad biológica. Es sorprendente saber que más del 25% de los medicamentos recetados por médicos tienen sus orígenes de compuestos químicos que se encuentran naturalmente en las plantas. (Houghton P.J., 2001)

A los constituyentes estructurales de las plantas sin aparente actividad farmacológica tales como la celulosa, hemicelulosa, lignina, y almidón, se les conoce como constituyentes inertes. Mientras que los constituyentes activos de importancia medicinal son un grupo de compuestos químicos con diversas estructuras y por tanto, con diferentes características físicas, químicas y fisiológicas tales como la solubilidad, estabilidad y actividad biológica, respectivamente.

Los fitoquímicos pueden clasificarse de manera muy amplia de la siguiente forma: (Amelio D. Y Frank S., 1999)

- 1) aceites, grasas y ceras (lípidos)
- 2) fenoles
- 3) taninos
- 4) proteínas
- 5) alcaloides
- 6) carbohidratos
- 7) glicósidos
- 8) aceites volátiles
- 9) resinas

De los compuestos químicos presentes en las plantas las tres clases principales son los terpenoides (terpenos) del grupo (1 y 8) metabolitos fenólicos (grupo 2) y alcaloides (grupo 5). (Dillard C.J. y German B., 2000)

## ***1.2 Metabolitos secundarios***

La definición más aceptada de metabolitos secundarios los propone como sustancias que se encuentran en la naturaleza que no son vitales para la supervivencia inmediata del organismo vegetal que los produce, y no son parte esencial del proceso de construcción y mantenimiento de células vivas. Sin embargo, investigaciones actuales indican que los metabolitos secundarios también son importantes en la funcionalidad química de la planta, determinando el papel específico que tendrá una especie en particular con su entorno. (Dixon R.A. et al., 1998) Algunas otras definiciones los denominan como componentes no nutritivos, ya que aparentemente no tienen ningún valor nutritivo para el humano. También se les conoce como compuestos biológicamente activos cuando se considera que tienen un efecto fisiológico y bioquímico en el metabolismo.

En el reino vegetal existe una enorme complejidad y diversidad química, lo cual se puede observar en la capacidad de las plantas para producir moléculas con estructuras desde muy sencillas hasta muy complejas; se cree que el origen de estos compuestos es una estrategia de supervivencia que se desarrolló, a través de miles de años donde se generaron mecanismos para interactuar con los elementos que amenazaban su existencia.

Estos compuestos participan a nivel celular como reguladores de crecimiento y moduladores de la expresión genética. Los metabolitos secundarios son cruciales en las defensas de la planta contra fuentes de estrés tales como las variaciones de luz, humedad y temperatura, competencia de otras plantas, presencia de animales herbívoros, y ataque patógeno. Las plantas también han incorporado estos metabolitos secundarios a funciones fisiológicas especializadas como producción de semillas y señalamiento intracelular.

A nivel de las diferentes especies de plantas, los metabolitos secundarios también son frecuentemente funcionalmente únicos, y compuestos individuales taxonómicamente discretos responsables de funciones idénticas en especies separadas. (Dixon R.A. et al., 1998) Un grupo de estos metabolitos secundarios, que comprende el más grande de los fitoquímicos distribuidos en las plantas superiores es el de los compuestos fenólicos. (Dillard C.J. y German B., 2000)

### ***1.3 Metabolitos secundarios en frutas y verduras***

Los metabolitos secundarios en frutas y verduras juegan una diversidad de papeles. Entre otras cosas son responsables del color, apariencia y sabor. Diferentes aspectos durante las etapas de pre- y post-cosecha pueden afectar la cantidad y composición de metabolitos secundarios presentes en frutas y verduras. Como pueden ser responsables de algunas características sensoriales como el color y el sabor, su contenido también afectará

su selección por el consumidor y el derivado placer de su consumo. Además, se ha demostrado que alguno de estos metabolitos secundarios de frutas y verduras tienen beneficios a la salud al ayudar a combatir el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas.

Durante la vida postcosecha de frutas y verduras, sus tejidos siguen vivos, metabólicamente activos y por lo tanto al ser sometidos a diferentes procesos tecnológicos para extender su vida de anaquel, ocurren cambios en sus metabolitos secundarios que influyen directamente en la calidad de los mismos. El importante rol de los metabolitos secundarios desde el punto de vista nutricional, siendo estos compuestos aportados en la dieta y que no proporcionan energía, es que no se relacionan directamente con sus funciones naturales en la planta. Por otro lado, muchos metabolitos secundarios típicos de frutas y verduras de especies silvestres tienen efectos tóxicos y se les denominan factores antinutricionales o antifisiológicos. En muchas ocasiones el remojo y cocimiento de estos vegetales, como es el caso de diversas leguminosas de consumo humano (como el frijol de soja), ayuda a degradar o remover metabolitos considerados como antinutricionales.

#### **1.4 Compuestos polifenólicos**

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8,000 compuestos distintos. (Valverde, I.M. 2000). Su rasgo común es el de tener al menos un sistema de anillo aromático sustituido con un grupo hidroxilo. Como se puede observar en la tabla 1, todas las clases de polifenoles,

independientemente del número de carbono de sus estructuras, tendrán como mínimo un anillo aromático,  $C_6$ .

Tabla 1. Las clases de compuestos fenólicos más importantes en las plantas.

Número de átomos de carbono	Esqueleto básico	Clase
6	$C_6$	fenoles simples, benzoquinonas
7	$C_6 - C_1$	ácidos fenólicos
8	$C_6 - C_2$	acetofenona, ácido fenilacético
9	$C_6 - C_3$	ácido hidroxicunámico, polipropeno, cumarina, isocumarina
10	$C_6 - C_4$	naftoquinona
13	$C_6 - C_1 - C_6$	xantona
14	$C_6 - C_2 - C_6$	estilbena, antraquinona
15	$C_6 - C_3 - C_6$	flavonoides, isoflavonoides
18	$(C_6 - C_3)_2$	lignanos, neolignanos
30	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	biflavonoides
	$(C_6 - C_3)_n$	ligninas
n	$(C_6)_n$	catecolmelanina
	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	(taninos condensados)

J. B. Harborne, 1980

Los polifenoles pueden conferir a alimentos de origen vegetal cualidades tanto deseables como no deseables. El oscurecimiento enzimático, por reacciones de oxidación de los compuestos polifenólicos hacia la formación de quinonas por la acción de la enzima

polifenoloxidasas. Este fenómeno se puede propiciar y es aceptable en algunos procesos tales como en el tostado del café y el chocolate. En otros casos, pueden representar un gran problema en el procesado de frutas y verduras. Por otro lado, históricamente se han considerado como antinutrientes por que algunos como los taninos pueden llegar a provocar efectos adversos en el metabolismo humano. (Kaur C., y Kapoor H.C., 2001) Estos efectos adversos pueden incluir la obstrucción de la absorción de nutrimentos por la formación de complejos insolubles (proteínas, aminoácidos y minerales) y la reducción de la actividad de enzimas digestivas. (Dillard C.J. y German B., 2000)

Se reporta que los tipos de estrés a los que están expuestas las plantas (mecánico, químico, radiación UV, ambiental y microbiológico) inducen en estas la generación de especies de oxígeno reactivas. Estas especies de oxígeno activas promueven una cascada de reacciones que finalmente producen una serie de compuestos fenólicos, los cuales protegen a la planta contra las lesiones a nivel celular. (Kanner J., 1999)

## CAPÍTULO 2

### Distribución y química de flavonoides

#### *2.1 Aspectos históricos sobre el estudio de flavonoides*

Los flavonoides, en cuanto a la apariencia colorida que aportan a las plantas, han atraído la atención del hombre desde hace siglos. Empíricamente algunos flavonoides obtenidos de plantas se utilizaron como los primeros tintes. Sin embargo, su estudio sistemático comenzó hasta finales del siglo XIX. (Dixon R.A. *et al.*, 1998) Hace más de 170 años, Lebreton (1828) caracterizó al primer flavonoide, la hesperidina, principal glicósido de flavanona en los cítricos. Desde entonces, el estudio de los flavonoides ha atraído el interés de generaciones de científicos. Asimismo, el uso de plantas medicinales, que entre otros compuestos, son ricas en flavonoides ha persistido a lo largo de la historia de la humanidad.

El interés en el estudio de propiedades biológicas de los flavonoides se dio a partir de que en 1936, el húngaro Szent-Györyi descubrió que los flavonoides cítricos eran importantes para la adecuada función capilar, ya que disminuyen la permeabilidad y fragilidad capilar. (Manthey J.A., Buslig B.S., 1998) Debido a esta última propiedad, se le confirió a los flavonoides, por un tiempo, el estatus de vitamina y se les denominó Vitamina P. El uso de este término se discontinuó en 1950. (Middleton E. y Kandaswami Ch., 1994) Investigaciones subsecuentes han mostrado una lista creciente de sistemas biológicos en los que los flavonoides juegan un papel significativo. El paso de las investigaciones se han

acelerado y hoy en día ha emergido un entendimiento más claro de la trascendencia de estos compuestos, no solo en las plantas, sino también en sistemas animales y por tanto, en la repercusión sobre la salud humana.

## **2.2 Generalidades**

Los flavonoides comprenden uno de los grupos de metabolitos secundarios en las plantas más grande y se presentan de manera ubicua en el reino vegetal. (Harborne J.B., 1988) En la literatura se reporta constantemente un valor de más de 4 mil flavonoides identificados, sin embargo, se estima que existen mucho más de 10 mil flavonoides diferentes. En la actualidad, se continúan identificando nuevos flavonoides a una velocidad aproximada de 10 nuevas estructuras al mes. (Berhow M.A., 1998) Los flavonoides se encuentran en todas las partes de la planta, incluyendo frutos, polen, raíces, hojas, tallos y hasta en el corazón de la madera. (Ikan R., 1991)

Todas las clases de flavonoides comparten un esqueleto estructural común de difenilpirano ( $C_2-C_6-C_3$ ), o sea, dos anillos de benceno (anillos A y B) enlazados por un anillo pirona (anillo C) (ver figura 2). Los 3 anillos conforman el núcleo flavona de  $C_{15}$ . (Harborne J.B., 1984)

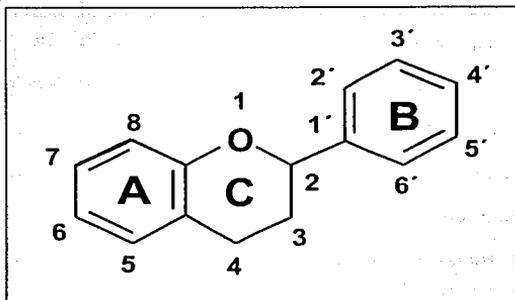


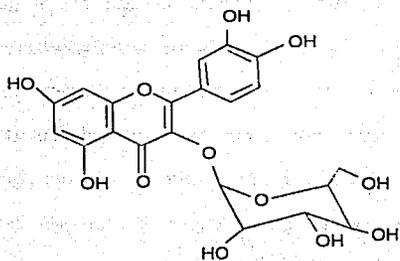
Figura 2. Núcleo flavona, estructura básica de las subclases de flavonoides.

Merkem H.M., Beecher G.R., 2000

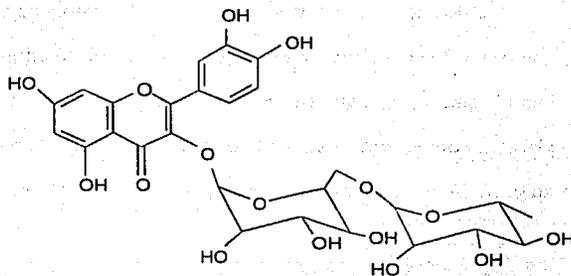
Los flavonoides normalmente se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo sustituido algún hidrógeno fenólico (para formar flavonoides-O-glicósidos) o hidrógeno del anillo (para formar flavonoides-C-glicósidos) por un carbohidrato. La forma glicosídica es una característica general de los flavonoides, con excepción de los flavanoles, donde los glicósidos son raros. Los carbohidratos se enlazan al núcleo flavonoide predominantemente por un enlace  $\beta$ -glicosídico. Las moléculas de carbohidratos se pueden enlazar al núcleo flavonoide en varias posiciones, pero existe una preferencia por la posición 3. Cuando carecen de ese hidroxilo como en las subclase de las flavonas y flavanonas que se describirán con detalle más adelante, la conjugación aparece frecuentemente en la posición 7 (Por ejemplo, la narirutina). (Beecher G., 1999) Esta característica los hace más hidrosolubles y por lo tanto más menos reactivos que la porción de difenilpirano, que por si sola es más reactiva y lipofílica. Que los glicósidos de flavonoides sean más solubles en

medio acuoso permite que se acumulen en las vacuolas de las células, donde son encontrados frecuentemente. (Markham K.R., 1982) A la molécula de flavonoide libre de carbohidrato se le denomina aglicona:

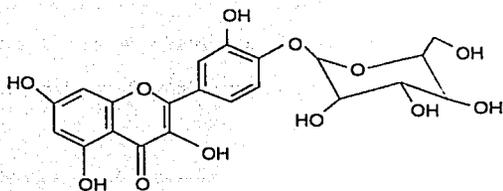
En las plantas se han encontrado más de 80 carbohidratos diferentes unidos a flavonoides. En estos glicósidos existen con más frecuencia monosacáridos y disacáridos, pero también trisacáridos y hasta tetrasacáridos. Algunos carbohidratos que se encuentran comúnmente, son la glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-apiosa, pero también D-ácido glucurónico. Y para ejemplificar esta diversidad estructural tenemos que se han descrito en la naturaleza 179 glicósidos del flavonol quercetina diferentes. En la figura 3 se muestran algunos glicósidos de quercitina que se encuentran con frecuencia en las plantas, entre ellos la rutina (quercetin-3-O- $\beta$ -rutinósido).



Quercetin-3-O-β- D-galactosido



Quercetin-3-O-β- rutinosido



Quercetin-4'-O-β- D-glucósido

Figura 3. Carbohidratos que pueden estar enlazados a la aglicona de la subclase de flavonoles, la quercetina. Beecher G., 1999

Algunos otros flavonoides tienen diferentes grupos químicos lo que le da gran variedad a sus estructuras. Entre estos se puede citar a la acilación de los carbohidratos que los conjugan, por ácido acético, benzoico, hidroxibenzoico, hidroxibenzóico, y málico entre otros. Los flavonoides, así como otros compuestos fenólicos, son de carácter ácido debido a la disociación de sus grupos hidroxilo (-OH). Pueden formar enlaces de hidrógeno intramoleculares, siempre y cuando, no haya impedimento estérico por las conjugaciones existentes

Originalmente, surgió interés en la identificación inequívoca de flavonoides para estudiar relaciones evolutivas y taxonómicas entre diferentes géneros y entre especies de un mismo género de plantas: (Hollman P.CH., 2000) Las investigaciones sobre flavonoides en plantas, considerando su estudio más específicamente en frutas y verduras, se ha reportado en gran cantidad de publicaciones científicas y los enfoques más comunes incluyen:

- Caracterizar fitoquímicamente a alguna especie vegetal específica.
- Determinar el grupo o grupos de flavonoides predominantes en alguna familia, género o especie vegetal específica.
- Conocer el consumo diario de flavonoides totales en una población particular de acuerdo a encuestas de los vegetales, frutas y bebidas (como el té y el vino tinto) más consumidos.
- Identificar y seleccionar aquellas variedades con mayor contenido de flavonoides, además de estudiar los cambios en contenido según la estación del año.
- Analizar los efectos de distintas condiciones de proceso y también de cocinado en el contenido de flavonoides de las diferentes plantas.

- Determinar la actividad antioxidante de las distintas subclases de flavonoides que se han encontrado en cierta especie vegetal.

### **2.3 Biosíntesis de Flavonoides**

Los flavonoides son sintetizados en las plantas a partir del aminoácido fenilalanina por medio de la ruta biosintética denominada "vía general fenilpropanoide". Esta importante vía genera un gran número de compuestos que tienen en común un grupo fenil estructural. Los metabolitos secundarios derivados de esta vía incluyen, además de los flavonoides, taninos, fenoles, ácidos benzoicos, estilbenos, ésteres de cinamatos y cumarinas. Una secuencia de reacciones convierte la fenilalanina a derivados de coenzima A (CoA) y sucesivamente a ácidos cinámicos sustituidos. Estos son subsecuentemente transformados a otros metabolitos. (Berhow M.A., 1998)

Específicamente, los flavonoides se derivan de la conjugación de *p*-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA para formar naringenin calcona (ver figura 4), la cual es considerada la precursora de todos los flavonoides. Tres moles de malonil coenzima A (CoA) provenientes del metabolismo de glucosa se condensan por medio de la enzima calcona sintetasa para formar el anillo A de la estructura básica de los flavonoides. El anillo B y el C también vienen del metabolismo de la glucosa, pero por la vía general fenilpropanoide, a través de la fenilalanina, la cual es convertida a ácido cinámico y luego a ácido cumárico. Posteriormente el ácido cumárico convertido en *p*-cumaril-CoA se condensa con tres moléculas de malonil CoA, en un único paso enzimático, para formar naringenin calcona. (Merken H.M., Beecher G.R., 2000)

La naringenina se convierte rápidamente a su forma flavonona, la naringenina. La naringenina sufre modificaciones enzimáticas adicionales para dar lugar a los otros flavonoides. Las reacciones que dan lugar a los demás flavonoides son de reducción, oxidación, hidroxilación, O-metilación, O-glicosilación, C-glicosilación, sulfonación, rearrreglo y polimerización. (Berhow M.A., 1998) Como ejemplo de las modificaciones enzimáticas que dan lugar a otros flavonoides, el anillo C se cierra y es hidratado para formar 3-hidroxi flavonoides (catequinas), 3,4-diol flavonoide ( quercetina) y procianidinas.

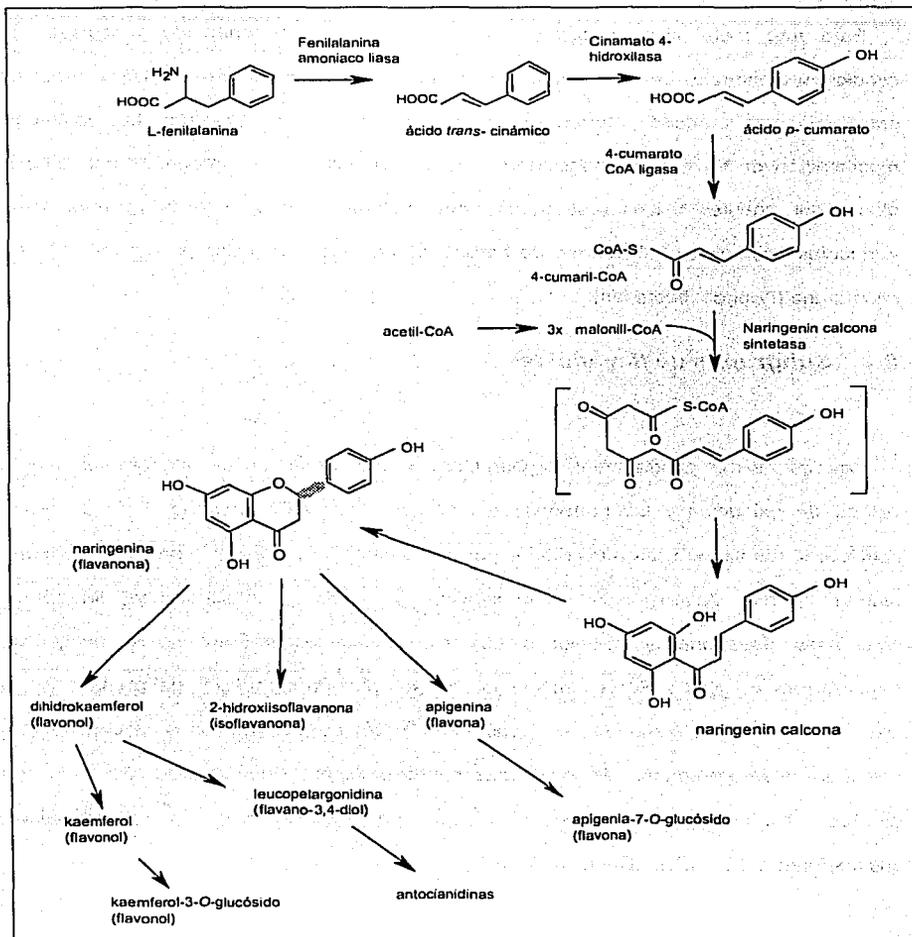


Figura 4. Biosíntesis de flavonoides en los tejidos vegetales a partir del aminoácido fenilalanina.  
Markham, K.R. 1982

Esta ruta metabólica de biosíntesis de flavonoides es controlada y regulada bajo condiciones normales de crecimiento. También puede ser inducida estímulos exógenos tales como lesiones, ataques patogénicos o exceso de luz y temperatura. La biosíntesis y modificación de flavonoides constitutivos puede ser estimulada o reprimida por daño a la planta por agentes físicos (estrés por agua, heladas, viento, metales pesados, ciertos herbicidas, viento, ozono), ataque de herbívoros (insectos, animales pastando), e invasión microbiana (hongos, bacterias).

#### **2.4 Subgrupos de flavonoides**

Los flavonoides generalmente se han clasificado en doce subclases diferentes debido al estado de oxidación y los patrones de sustitución del anillo propano. Seis de ellos se consideran los flavonoides mayoritarios por su abundancia y presencia predominante en las plantas, y son: flavonoles (o dihidroxiflavonas), flavonas, antocianidinas, flavanoles o catequinas, flavanonas y isoflavonas. Las agliconas de estas 6 subclases principales se muestran en la figura 5. Sobre estas subclases se enfocará la atención del presente trabajo. Las seis subclases restantes se consideran flavonoides minoritarios y son: auronas, calconas, dihidrocalconas, biflavonoides, proantocianidinas, y neoflavonas. Dentro de cada subclase, las moléculas de flavonoides específicas se diferencian por la diversidad de sustituciones adicionales. (Beecher G., 1999)

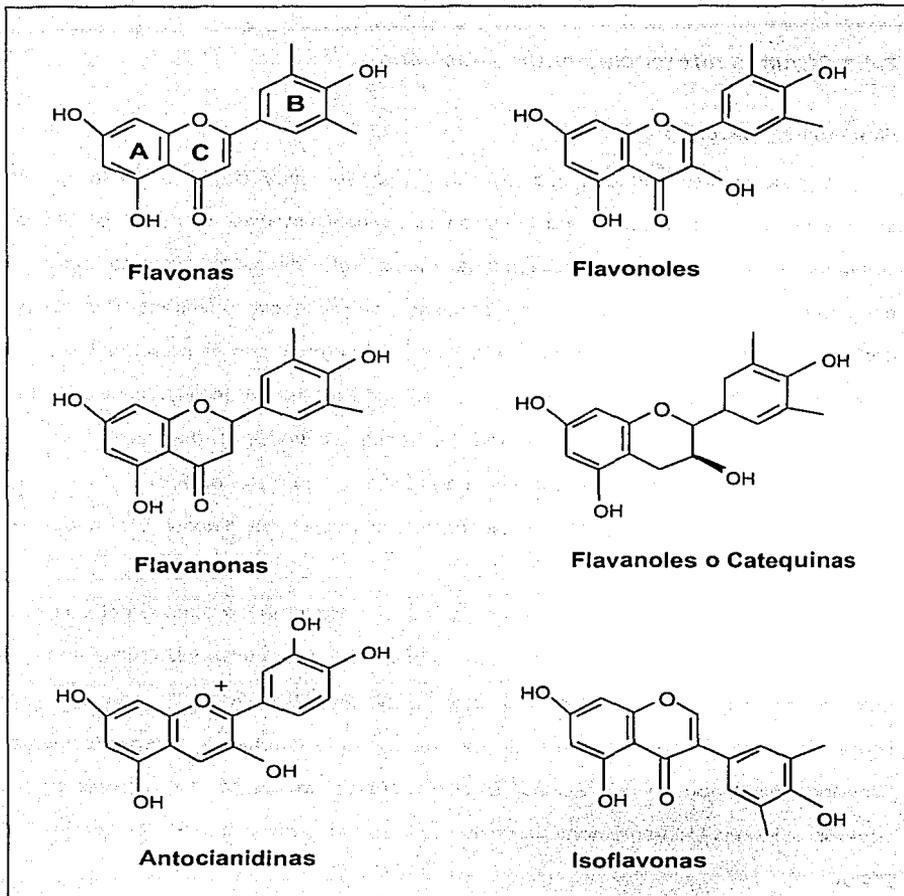


Figura 5. Agliconas de las subclases principales de flavonoides.

Pietta P., Simonetti P., 1999

### 2.4.1 Algunas diferencias entre subclases

#### *Flavonoles y flavonas*

Los flavonoles son una subclase de flavonoides muy difundida en las plantas, y aunque se conocen alrededor de 3000 agliconas de flavonoles, solo tres se encuentran comúnmente en la naturaleza: quercetina, kaempferol y mirecitina. El resto son variantes estructurales simples de los flavonoles comunes y su presencia es limitada. Por ejemplo, un derivado O-metilado de la quercitina es la isoramnetina (metil eter en posición 3) y otro es la azaleatina (metil eter en la posición 5). De todos los glicósidos de quercitina conocidos, el más común, por mucho, es la rutina (quercetin 3-rutinosido) (Harborne J.B., 1984). Identificada en 1842 por A. Weiss de las hojas de ruda (*Ruta graveolens*) y Schmidt, queen 1896, encontró que la rutina era un disacárido compuesto por glucosa y ramnosa. (Griffith J.Q. y Krewson Ch.F., 1955)

Los flavonoles y flavonas, presentan semejanzas estructurales como la doble ligadura en la posición 2 a 3 del anillo C. Las flavonas, a diferencia de los flavonoles, carecen del grupo hidroxilo en la posición 3 del mismo anillo. (Hollman P.Ch., 2000) Siendo la luteolina y apigenina análogos estructurales de la quercetina y kaempferol, respectivamente. En glicósidos de flavonoles y flavonas, el sitio preferido de enlace del carbohidrato es la posición 3, menos frecuentemente la posición 7 y en casos raros la 4', 3' y 5'. (Hollman P.Ch, 2000)

## **Flavanoles**

La característica estructural más distintiva de los flavanoles, que solamente tienen en común con las antocianidinas, es la falta del grupo ceto (C=O) en la posición 4 del anillo heterocíclico C. La falta de la doble ligadura en la posición 2-3 y la presencia del grupo hidroxilo en 3, crea dos centros de asimetría (carbonos en 2 y 3). Hasta la fecha, solo se han encontrado en la naturaleza flavanoles con la configuración 2R. Los flavanoles predominantes son (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina, los ésteres de ácido gálico siguientes: (-)-epicatequingalato y (-)-epigalocatequingalato. (Hollman P.Ch., 2000)

## **Antocianinas**

Las antocianinas son los glicósidos y acilglicósidos de las antocianidinas, cuya estructura común es el ión flavilio (2-fenilbenzopirilio). El nombre antocianina fue propuesto en 1835 por Marquart para denotar el pigmento azul de la planta, aciano. (Ikan R., 1991) En la naturaleza existen más de 250 antocianinas, todas ellas O-glicosiladas con diferentes carbohidratos sustituyentes. Los carbohidratos que más comúnmente sustituyen las antocianidinas, en orden de frecuencia de aparición, son glucosa, ramnosa, xilosa, galactosa, arabinosa y fructosa. Las antocianinas comunes están glicosiladas o en posición 3 o en 3 y 5. (Wang H., Cao G., Prior R.L., 1997) Según los patrones de hidroxilación de las antocianidinas principales son la cianidina corresponde al flavonol quercetina, la pelargonidina al kaemferol y la delphinidina a la mirecitrina. (Harborne J.B., 1984)

### **Flavanonas**

La hesperidina fue aislada por primera vez por Lebreton en 1828 la porción interior esponjosa de la cáscara de las naranjas (el albedo) de la familia Hesperides, de ahí su nombre. DeVry descubrió la naringina en 1866 en las flores de los árboles de toronja en Java. Este compuesto se acumula principalmente en el albedo de la toronja. En 1874 fue encontrada en limones por Pfeiffer. A esta flavanona se le encontró la propiedad de reducir la fragilidad de los vasos capilares. (Ikan R., 1991).

Las flavanonas se encuentran como glicósidos, usualmente son rutinósidos (6-O- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucósido) y neohesperidósido (2-O- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucósido) adherido a la posición 7. (Tomás-Barberán F.A., 2000)

### **Isoflavonas**

De las subclases ya mencionadas, las isoflavonas normalmente se tratan aparte al encontrarse solamente en concentraciones significativas en algunas leguminosas, especialmente en el frijol de soya. Son isómeros estructurales de las demás subclases y su estructura es similar, pero difiere la forma en que se enlaza al puente de propano. Las isoflavonas y sus metabolitos tienen estructuras parecidas al estradiol, estrógeno sintetizado por los mamíferos. (Merken H.M., Beecher G.R., 2000) Esta última característica permite que actúen como fitoestrógenos (ver sección 6.3.3).

## CAPITULO 3

### Funciones de los flavonoides en la fisiología vegetal

Es posible que los flavonoides hayan formado parte del metabolismo de los seres vivos desde hace más de mil millones de años. Por esto, se cree que sus funciones se han desarrollado junto con los organismos en evolución. Hoy, se sabe que los flavonoides llevan a cabo funciones de suma importancia en la naturaleza lo que explica su permanencia durante la evolución de las plantas vasculares. (Middleton E., Kandaswami Ch., 1994)

Dentro de cada familia de plantas, las especies individuales pueden variar considerablemente en su contenido y tipo de flavonoides, esto ha permitido su estudio como marcadores taxonómicos. Adicionalmente, las plantas individuales dentro de una misma especie producen y acumulan diferentes flavonoides dependiendo de diversos factores, como el estado de crecimiento de la planta, estado reproductivo, el tejido vegetal particular de que se trate, el tipo de estrés ambiental o ataque patogénico involucrado. ( Berhow M.A., 1998)

### ***3.1 Los Flavonoides como metabolitos secundarios y su importancia dentro de las plantas.***

Los flavonoides tienen importantes efectos en la fisiología y bioquímica de las plantas, actuando como antioxidantes, inhibidores de enzimas, precursores de sustancias tóxicas, pigmentos y pantallas de luz. Por esto, se considera que tienen varias funciones entre las que se puede mencionar protección contra la luz ultravioleta, insectos, hongos, virus; atracción de polinizadores; control de hormonas de las plantas; e inhibición de enzimas. (Hertog M., 1997) Adicionalmente, estos compuestos están involucrados en la fotosensibilización y transferencia de energía, las acciones de hormonas y reguladores de crecimiento, el control de la respiración, morfogénesis y determinación de género, y protección contra infección. (Middleton E., Kandaswami Ch., 1994) Entre todas las funciones mencionadas, se considera que existen tres principales: su función en la biología de la polinización, su participación en la biología del fruto y su papel en mecanismos de simbiosis. Estas tres funciones se explicarán con mayor detalle a continuación.

#### ***3.1.1 Los flavonoides en la biología de polinización***

Los flavonoides son responsables de gran parte de los colores de flores presentes en la naturaleza. Cada tipo de polinizador exhibe preferencias de color particulares, como es el caso de las flores polinizadas por abejas que tienden al azul, las polinizadas por escarabajos que prefieren el color blanco o verdoso con olores frutales fuertes, y las polinizadas por

mariposas que tienden al rosa o violeta claro (malva). (Brouillard R., Dangles O., 1994) Se puede decir que existen diversas evidencias de la selección natural del color de las flores con base en la concentración de compuestos de color como los son los flavonoides y las antocianinas entre otros en las plantas angiospermas. El color de la flor también puede ser una señal de disponibilidad para la polinización. La producción de color en las flores es un proceso dinámico que puede cambiar con el tiempo de tal manera que la flor una vez polinizada pierde atractivo al insecto. El cambio aumenta la eficiencia del proceso de polinización, permitiendo que el insecto se concentre en las flores aun no polinizadas.

Por otra parte, las especies de flores blancas no carecen de pigmento, sino que contienen glicósidos de flavonas y flavonoles en las células epidérmicas de los pétalos. Estos no solo contribuyen a la apariencia visual, dando coloraciones blancas, crema o amarillo pálido, sino que también por su absorbancia en el ultravioleta, pueden ser vistos por insectos sensibles a estas regiones del espectro (como las abejas). (Brouillard R., Dangles O., 1994) La naturaleza química del pigmento según el tono que le dé a la planta se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Base química del color en plantas angiospermas

Color	Pigmento responsable
Blanco, crema, marfil	Flavonas (ej. luteolina) y/o flavonoles (ej. Quercetina)
Amarillo	- Carotenoide solo - Flavonol amarillo solo - Carotenoide y flavonoide amarillo
Naranja	- carotenoide solo - pelargonidina y aurona
Escarlata	- pura pelargonidina - cianidina y carotenoide
Café	Cianidina en un fondo carotenoide
Magenta, carmesi	Pura cianidina
Rosa	Pura peonidina
Violeta, violeta claro	Pura delfinidina
Azul	- cianidina y copigmento - delfinidina y copigmento - delfinidina y acilación aromática
Morado negruzco	Delfinidina a altas concentraciones
Verde	Clorofilas

Brouillard R., Dangles O., 1994

### **3.1.2 Los Flavonoides y su papel biológico en el fruto**

El fruto maduro es una parte de la planta, que de acuerdo a los cambios químicos que se dan durante la maduración, se hace visible a través del cambio de color. Consecuentemente, en cierto momento se presentará desprotegido, y será atractivo a los animales que a cambio dispersarán las semillas contenidas dentro del mismo.

El fruto inmaduro difiere del fruto maduro tanto nutrimentalmente como en su química secundaria (metabolitos secundarios). El fruto inmaduro, presentará pigmentos verdes (de la clorofila) para camuflajearse entre el follaje de las hojas y protegerse de los animales herbívoros. También tiene rasgos químicos (acidez, amargor, astringencia) que detienen a la mayoría de los herbívoros. Durante la maduración habrá cambios como un incremento en el valor nutrimental, cambios significativos en el perfil de metabolitos secundarios, y la desaparición o reducción de constituyentes tóxicos. Otro cambio en la maduración es el desarrollo de pigmentos (de tonos amarillo, rojo o negro) que hacen evidente al fruto contra el fondo verde del follaje. El fruto maduro está usualmente expuesto a los herbívoros por su color atrayente y distintivo. También se desarrollan aromas atractivos y sabores agradables. (Harborne J.B., 1997)

Para protegerse, la planta también sintetiza sustancias que son desagradables o tóxicas a los herbívoros, y un caso particular es el de los taninos condensados, oligómeros y polímeros de flavanoles. Estos compuestos están distribuidos en las hojas de la mayoría de

las plantas leñosas y se ha visto que a concentraciones arriba del 4% en base seca, las hojas son rechazadas por animales como primates. La astringencia que los taninos le confieren a la hoja y a los frutos, se sugiere que representa un obstáculo para su consumo en algunas especies de primates. ( Harborne J.B., 1997)

La característica, durante esta etapa de maduración, que interesa de momento, es el color ya que varios tonos serán proporcionados por flavonoides. El color, o más propiamente el tono, en las plantas está dado por tres grupos de pigmentos que incluyen a las clorofilas, carotenoides y flavonoides. De los flavonoides, específicamente la subclase de las antocianidinas, sin embargo, otras subclases también pueden actuar como copigmentos. Las frutas verdes contendrán clorofilas, las amarillas, naranjas y rojas carotenoides, y las de color rojo a morado oscuro (hasta casi negro) tendrán antocianidinas; o una mezcla de estos pigmentos. Ciertas frutas como la manzana pueden contener las tres clases de pigmentos o alguno de ellos según la variedad. De esta forma se puede observar que las plantas, van a disuadir en un inicio la interacción entre sus frutos y los animales herbívoros para posteriormente fomentarla y utilizarla como mecanismo para la propagación de sus semillas.

### ***3.1.3 Señalamiento y comunicación en la simbiosis planta-microorganismo***

Las simbiosis planta-hongo más ampliamente distribuida es la de antiguos hongos Zigomicetos, los hongos arbusculares micorrizales (HAM). Se cree que los flavonoides, entre otros compuestos, excretados por las raíces juegan un papel en la señalización y

comunicación entre las plantas y los hongos con los que mantienen relaciones simbióticas. Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, parecen ser moléculas señalizadoras universales y juegan un papel importante en la comunicación de la asociación simbiótica entre las raíces de legumbres (haba, garbanzos) y los hongos *Rhizobium ssp.* (Vierheilig H. *et al.*, 1998)

*Micorriza arbuscular* es el nombre que se le da a la asociación entre las raíces de más de 80% de las plantas terrestres con un pequeño grupo de hongos (Glomales) comúnmente encontrados en la tierra. Esta asociación es benéfica para ambas partes, pues la planta anfitriona recibe nutrimentos minerales a través del micelio del hongo y este obtiene compuestos de carbono producidos fotosintéticamente. Los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes antimicrobiales, o como moléculas señales que modulan la interacción planta-microorganismo.

Una gran variedad de compuestos fenólicos están presentes en las raíces de las plantas y al ser colonizadas por HAM, se incrementa la concentración de estos compuestos. Esto se ha visto en el incremento de cumestrol (una cumarina) y daidzeína (una isoflavona) en las raíces de la leguminosa *Glycine max*, la conocida planta de la soya. En las raíces colonizadas del ajo, *Allium cepa*, se ha visto el incremento de ácido cumárico y ferúlico. En general, se ha mostrado que los flavonoles son compuestos estimulantes del crecimiento de las hifas de HAM, como *Gigaspora margarita*. El crecimiento de las hifas de HAM promueve su adhesión a la raíz y las etapas de precolonización y colonización de la simbiosis micorriza

arbuscular. Efecto que parece ser dependiente de la concentración de CO<sub>2</sub> y la especie de HAM que se trate.

Los ejemplos dados son tan solo algunos aspectos importantes de las funciones de los flavonoides en las plantas. Por lo tanto se puede decir que los flavonoides cumplen funciones relevantes en la interacción de la planta con su entorno. Entonces se pueden considerar como reguladores de ciertos eventos ecológicos dentro de un ecosistema de seres vivos, como promover la polinización o señalizadores en la comunicación de la planta con hongos del suelo. También ciertos flavonoides pueden ser reconocidos por receptores en los insectos para poder identificar aquellos árboles cuyas hojas les sirven como alimento o que son adecuados para que puedan poner sus huevecillos, o sea que los flavonoides actúan como estimulantes (Harborne J.B., Grayer, 1993).

## CAPÍTULO 4

### Métodos de análisis para flavonoides

El análisis y presencia de los flavonoides en la naturaleza es un tema ampliamente discutido y examinado en la literatura científica. Vale la pena mencionar la serie "Los flavonoides: avances en investigación" editadas por Jeffrey B. Harbone ya que ofrece de las revisiones más extensas sobre su presencia en el reino vegetal y sus variedades estructurales. Esta serie incluye 3 volúmenes y ha abarcado los más recientes avances en esta área de investigación desde 1975 hasta 1991.

Las metodologías generales empleadas para el análisis e identificación de los flavonoides también son iguales a las que se utilizan para el estudio de varios de los otros grupos químicos en los productos naturales. El estudio sistemático de los flavonoides se ha realizado por más de un siglo, tiempo que definitivamente ha permitido que se desarrollen caminos experimentales para llegar a la rápida identificación del tipo de flavonoide y su patrón de sustitución dentro una mezcla compleja de compuestos. Sin embargo, aunque existen una enorme variedad de estructuras reportadas en la literatura, el número de estructuras básicas comunes es limitado. Por lo tanto, debido a la variedad casi ilimitada de glicósidos de flavonoides, el punto de partida para mayoría de los análisis de identificación es el reconocimiento de la aglicona. (Bloor S.J., 2001) Por otro lado, las subclases más abundantes, por mucho, son las flavonas y flavonoles.

Estos compuestos presentan espectros a longitudes de onda en la región UV-visible muy distintivos (tabla 3) y la más ligera diferencia en la estructura se ve reflejada directamente en el espectro, lo cual ha representado una ventaja particularmente importante para el análisis de flavonoides.

Tabla 3. Rangos de absorción ultravioleta de flavonoides

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
250-280	310- 350	flavona
250- 280	330- 360	flavonoles (sustituidos 3-OH)
250- 280	350- 385	flavonoles (libre 3-OH )
245- 275	hombro 310- 330	isoflavonas
	pico 320	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxigenadas)
275- 295	hombro 300- 330	flavanonas y dihidroflavonoles
230- 270 (baja intensidad)	340- 390	calconas
230- 270 (baja intensidad)	380- 430	auronas
270- 280	465- 560	antocianidinas y antocianinas

Markham K.R., 1982

Actualmente la combinación de técnicas de análisis más tradicionales con técnicas instrumentales modernas permite la identificación parcial de la mayoría de los componentes flavonoides sin tener que hacer una purificación exhaustiva de los compuestos individuales. Para facilitar el análisis, los flavonoides se pueden clasificar básicamente en tres tipos: glicósidos de flavonoides, flavonoides no polares (agliconas, flavonoides metilados o alquilados) y antocianinas. Por sus características químicas, cada uno de estos grupos requiere un enfoque diferente de la técnica analítica a seguir. (Bloor S.J., 2001)

Históricamente la cromatografía en papel ha sido el método preferido para el análisis de flavonoides y están disponibles los datos de movilidad relativa (Rf) para una gran variedad de compuestos. También la cromatografía en capa fina en celulosa ha sido de gran utilidad para el análisis de glicósidos de flavonoides. Dentro de estos métodos, existen diversos reportes de diferentes sistemas de disolventes tanto para cromatografía en papel como de capa fina según el tipo de flavonoides a analizar. (Harborne J.B., 1975) Para los análisis preliminares de un extracto natural se utilizan, generalmente, dos sistemas de solventes para cromatografía bidimensional: ácido acético 15% y TBA (t-butanol: ácido acético: H<sub>2</sub>O, 3:1:1, la fase superior). Con este sistema para cromatografía en papel y la movilidad relativa de los componentes flavonoides de una solución o extracto vegetal, se puede obtener información general de las subclases que la integran (ver figura 6). Es decir que una solución o extracto vegetal puede contener una mezcla de flavonoides de distintas subclases, los cuales al correrse en una cromatografía de papel o de capa fina se ubicará en diferentes posiciones debido a la naturaleza química de cada subclase y a la polaridad del eluyente.

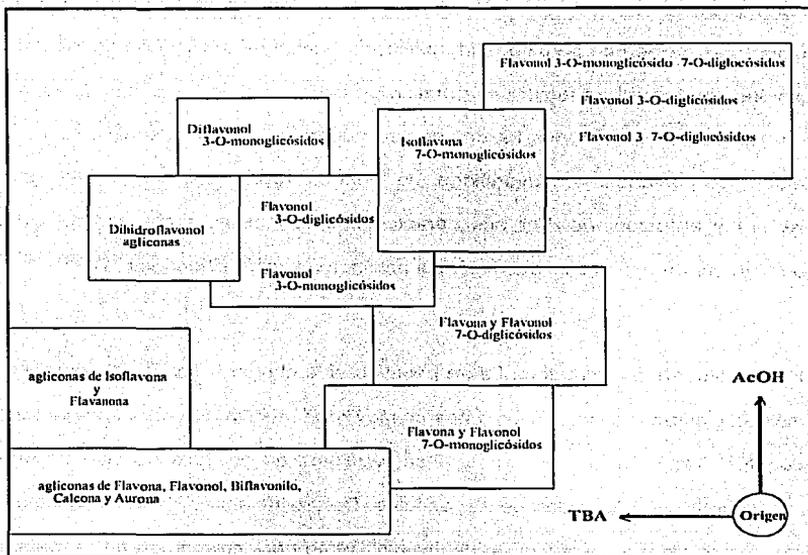


Figura 6. Identificación preliminar de subclases de flavonoides y sus glicósidos en una cromatografía en papel usando un sistema de eluyentes de dos dimensiones: AcOH (ácido acético al 15%) y TBA (*t*-butanol: ácido acético: H<sub>2</sub>O, 3:1:1, la fase superior). Los recuadros muestran la ubicación por zonas de elusión de los diferentes flavonoides.

Markham K.R., 1982

En la cromatografía, la movilidad relativa de las manchas y su apariencia bajo la luz UV (longitud de onda larga, 365 nm), antes y después de ser rociadas por varios reactivos, proporcionan una muy buena aproximación de la subclase y características estructurales

particulares de los compuestos flavonoides presentes (como se puede observar en la tabla 4). Adicionalmente, el uso de bases de Siefert ( 5%  $AlCl_3$  en metanol, NaOMe, acetato de sodio sólido, ácido bórico sólido) y el subsecuente espectro al UV-visible son herramientas extremadamente útiles para conocer hasta cierto punto los patrones de sustitución de una variedad de flavonoides. (Bloor S.J., 2001; Markham K.R., 1982).

Tabla 4. Aislamiento y purificación de flavonoides. Relación entre el color de mancha y la estructura durante la interpretación de cromatografía en papel bidimensional.

Color de mancha a luz Ultravioleta (366nm)	Color de mancha a luz Ultravioleta (366nm) y NH <sub>3</sub>	Tipos de estructuras comunes
Morado oscuro	Amarillo, sombras amarillo-verdosas o cafés  Rojo o naranja  Poco o ningún cambio	Flavonas (5 y 4' OH) Flavonoles (3-OR y 4-OH) Flavanonas (5-OH) sin OH's en anillo B Calconas (4'-OH) sin OH's en anillo B Calconas (2'-OH con 2 o 4-OH libre) Flavona C-glicósido (5-OH) Flavonas (5-OH y 4'-OH) Flavonas (5-OH y 3, 4'-OH) Isoflavonas (5-OH ) Dihidroxiiflavonas (5-OH ) Dihidroxiiflavonas (5-OH ) Biflavonilos (5-OH )
Amarillo fosforescente, amarillo-verdoso, azul-verdoso o verde	Poco o ningún cambio Rojo o naranja	Flavonoles (3-OH) Auronas (con 4'-OH libre) Calcionas 2º 4-OH
Magenta, rosa, amarillo fosforescente	Azul con el tiempo	Antocianinas
Azul fosforescente	Amarillo-verdosos o azul-verdosos  Sin cambio Azul brillante	Flavonas (5-OR) Dihidroxiiflavonas Flavonoles (3,5-OR) Isoflavonas (5-OR) Ácidos cinámicos y derivados
Invisible	Azul fosforescente ligero	Flavonoles (con 3-OH o 5-OH libre)

Adaptado de Mabry T.J., Markham K.R., 1970; Bloor S.J., 2001

También es apropiado resaltar la utilidad de las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM) para la elucidación de las estructuras de flavonoides. Las metodologías para el análisis estructural ya están muy bien establecidas (Markham K.R., 1982). Asimismo, existen publicaciones que recopilan una amplia gama de diferentes espectros de flavonoides (Mabry T.J. y Markham K.R., 1970, Agrawal P.K., 1989). En la tabla 5 se resume la información que se puede obtener a partir de estas técnicas de análisis instrumental.

Tabla 5. Aplicaciones básicas de técnicas instrumentales para la elucidación de estructuras de flavonoides

RMN- <sup>1</sup> H	RMN- <sup>13</sup> C	Espectrometría de masas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Definir el patrón de oxigenación (para los 3 anillos)</li> <li>- Determinar el no. y posición de los grupos metoxilo</li> <li>- Distinguir isoflavonas, flavanonas y dihidroflavanoles</li> <li>- Determinar el no. de carbohidratos presentes (si están enlazados en <math>\alpha</math> o <math>\beta</math>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Establecer el no. total de átomos de C por molécula, el no. de C oxigenados en el núcleo flavona y el no. de C en la porción carbohidrato</li> <li>- Identificar carbohidratos y si están enlazados O- o C-</li> <li>- Determinar puntos de enlace interglucosídicos</li> <li>- Identificar sustituyentes acilos y el sitio de acilación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar los pesos moleculares</li> <li>- Establecer la distribución de los sustituyentes entre los anillos A y B</li> <li>- Determinar la naturaleza, sitio de enlace de los carbohidratos en glicósidos O- o C- de flavonoides</li> </ul>

Adaptado de Markham K.R., 1982

Adicionalmente, los espectros UV-visible característicos de la mayoría de los flavonoides y la extendida disponibilidad de los sistemas de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con capacidad de múltiple longitud de onda, han hecho del HPLC el método predilecto para el análisis de flavonoides y su cuantificación.

#### ***4.1 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para flavonoides***

En 1976, los investigadores Fisher y Wheaton fueron los primeros en analizar flavonoides por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Posteriormente, en el libro titulado "Técnicas para la identificación de flavonoides" publicado en 1982 (Markham K.R., 1982) se reconoce la popularidad en aumento de este método para el análisis de flavonoides. Sin embargo aún no estaba ampliamente difundido y todavía se consideraba muy costoso. Ya para la década de los 90's, el HPLC se volvió uno de los métodos más frecuentemente empleados para estos análisis, apoyándose también de otras técnicas como la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas.

Así también se han publicado gran variedad de condiciones cromatográficas de HPLC para el análisis de las distintas subclases de flavonoides en diferentes plantas y alimentos. En los trabajos reportados se han encontrado factores en común. Las condiciones de la columna (la fase estacionaria) son casi exclusivamente de fase inversa de  $C_{18}$ , con longitudes de 100 a 300mm de longitud y 4.6mm de diámetro interno. Los sistemas de elución o fase móvil, usualmente son binarios, con un solvente polar acuoso (A) acidificado con ácido perclórico,

ácido acético, ácido fosfórico o ácido fórmico y un solvente orgánico menos polar (B) como metanol, acetonitrilo, en ocasiones también acidificado. Como la mayoría de los flavonoides son ionizables, se les agrega usualmente ácido a la fase móvil para controlar el pH. El orden de elusión de la fase más polar a la menos polar significa que los triglicéridos (o glicósidos superiores) son eluidos más rápidamente, junto con la mayoría de los glicósidos de antocianinas, seguidos por los diglicósidos, los monoglicósidos, los glicósidos acilados o alquilados, y por último las agliconas. (Bloor S.J., 2001) Muchos menos frecuentemente se utilizan sistemas isocráticos o terciarios, también se han reportado trabajos que emplean fases cuaternarias. Las corridas normalmente son de una hora como máximo, con un período de equilibrio entre corridas. Los flujos van de 1.0 a 1.5ml/min. Las columnas controladas termostáticamente, normalmente se mantienen a temperatura ambiente o ligeramente arriba de la temperatura ambiente. (Merken H.M., Beecher G.R., 2000)

La detección se lleva a cabo en la región del ultravioleta. Los flavonoides tienen dos bandas de absorción características. La banda II con máximos de absorción entre 240 a 285 nm,, lo que se cree que es debido al anillo A de la estructura básica. La Banda I, tiene máximos de 300 a 550 nm, y probablemente surge del anillo B (ver figura 2 del núcleo flavona, donde se identifican los anillos A, B, y C) La detección de flavonoides en análisis de alimentos se lleva a cabo usualmente con detección UV-visible con arreglo de diodos.

Durante la preparación de la muestra, normalmente se realiza la extracción con soluciones de alcohol acuoso y frecuentemente se realiza hidrólisis ácida, alcalina o enzimática para remover la parte de carbohidrato de los glicósidos. En las metodologías de

análisis de flavonoides se realiza la hidrólisis ya que existe mayor disponibilidad de los estándares de las agliconas que del glicósido completo.

Actualmente se han desarrollado técnicas de análisis para cada subclase de flavonoides, por lo que es necesario hacer varios análisis en el alimento cuando éste contiene varias subclases de flavonoides. Se requiere un sistema de análisis riguroso que pueda medir de manera exacta y precisa todos los flavonoides prominentes observados en alimentos vegetales y suplementos dietarios comúnmente consumidos. El departamento de agricultura de los E.U.A., a través del Servicio de Investigación Agronómica ha abordado esta problemática desarrollando un sistema de HPLC para la separación y cuantificación de 17 flavonoides, en forma aglicona, que representan 5 subclases y que son prominentes en alimentos consumidos comúnmente. (Merken H.M., Beecher G.R, 2000)

Para el análisis e identificación de flavonoides específicos se seguirá haciendo uso de las técnicas tradicionales y con más frecuencia, aquellas más precisas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Sin embargo, debido al auge que están teniendo el estudio de flavonoides, así como otros fitoquímicos, serán necesarias técnicas de análisis de mayor rapidez y precisión. También debido al interés de estandarizar el contenido de compuestos biológicamente activos contenidos en concentrados y extractos utilizados como ingredientes en alimentos y bebidas, o como suplementos dietarios. Estas deberán estar estandarizadas y validadas para que se utilice un misma metodología experimental para los análisis a nivel comercial y también para las inspecciones a las que puedan estar sujetos los productos que contengan estos compuestos. Esto permitirá tener la certeza de que lo que se

esta declarando en la etiqueta es lo que realmente contiene el producto, además de permitirle al productor de alimentos asegurar la calidad de proceso al poder monitorear el contenido de fitocompuestos a lo largo de las etapas de producción y en el producto final.

Poder analizar el contenido de flavonoides y otros fitocompuestos en productos alimentarios utilizando técnicas validadas le ofrece cierta seguridad al consumidor de la veracidad de los valores que se están declarando en las etiquetas y que estos sean los más cercanos a la realidad.

## CAPÍTULO 5

### Los Flavonoides como antioxidantes

Hace poco más de 25 años, se descartaba totalmente cualquier noción que propusiera que los nutrimentos podían tener efectos a la salud aparte de prevenir enfermedades por deficiencias. Asimismo se rechazaba mucho más cualquier idea que se atreviera a sugerir que sustancias no nutrimentales de los alimentos podían ser benéficas a la salud. La hipótesis de que los antioxidantes presentes en los alimentos podrían proteger contra enfermedades crónico degenerativas, fue de las primeras ideas no tradicionales sobre la alimentación y la salud en ganar respetabilidad científica. (Langseth L., 2000) Hoy en día, el concepto de los alimentos y sus posibles beneficios a la salud más allá de la nutrición básica, es una idea difundida y es parte de la ideología de los alimentos funcionales (ver capítulo 9). Como parte de esta corriente, están los antioxidantes inherentes a los alimentos y otros materiales vegetales que han atraído considerable atención por su presunta seguridad, potencial nutrimental y efectos terapéuticos. Las características químicas de los antioxidantes, así como su solubilidad, habilidad de regeneración, relaciones estructura/actividad y biodisponibilidad son factores indispensables al considerar su papel global en la salud humana (Kaur Ch.Y., Kapoor H.C., 2001).

A continuación se revisarán aspectos relacionados con uno de los grupos de esas sustancias antioxidantes no nutrimentales, los flavonoides. Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la alta actividad antioxidante de los flavonoides, la cual puede reflejarse en

el carácter protector hacia cáncer, enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. Sin embargo, el efecto *in vivo* de los flavonoides en humanos todavía está muy lejos de ser aclarado con precisión. (Manach C., *et al.*, 1999)

Los flavonoides son antioxidantes que actúan como donadores de hidrógeno en virtud de las propiedades reductoras de los múltiples grupos hidroxilo en los anillos (A, B y C) que componen su estructura (ver figura 2). Se ha visto que las diferentes sustituciones en el núcleo flavona y las posiciones que ocupen en este, tienen un efecto diferente sobre la capacidad antioxidante de los flavonoides individuales.

### **5.1 Concepto de Radicales libres**

Recientemente el término radicales libres empezó a aparecer indiscriminadamente en gran variedad de anuncios y productos, desde cremas faciales hasta en las cajas de cereal. Por lo cual vale la pena detenerse a analizar el significado real de dicho término. En 1954 se propuso que la mayoría de los efectos dañinos del oxígeno sobre los organismos vivos eran causados por la formación de entidades químicas denominadas radicales libres. Un radical libre es una molécula dañada que carece de al menos un electrón. Dicha deficiencia la hace altamente inestable y también altamente energizado. (Langseth L., 2000)

Los radicales libres reaccionan con prácticamente cualquier molécula con la que entren en contacto, tratando de capturar los electrones necesarios para recobrar su

estabilidad y en el proceso pueden ocasionar estragos en moléculas importantes para el buen funcionamiento del organismo o causar deterioro en la calidad de los alimentos (Kaur Ch.Y., Kapoor H.C., 2001). Esto se debe a que la molécula que ha reaccionado con un radical libre, pierde uno de sus electrones y se vuelve ella misma un radical libre; iniciando así una reacción en cadena con otras moléculas cercanas. Al ocurrir esto en el organismo vivo, puede dar lugar a lesiones celulares y eventualmente con el paso del tiempo, a enfermedades.

La formación de radicales libres es parte de la función celular normal, por lo que constantemente se está expuesto a estas moléculas inestables. Aunque los seres vivos también están expuestos a fuentes externas de radicales libres, incluyendo el humo del cigarro, contaminantes ambientales, luz ultravioleta o radiación ionizante, y ciertas drogas.(Langseth L. 2000) El cuerpo humano genera radicales hidroxilo (OH) en diferentes condiciones. El radical hidroxilo es producto de la descomposición del peróxido de hidrógeno, y es de los más potentes radicales en los tejidos biológicos y se cree que es un importante iniciador de la peroxidación de los lípidos. Otro de los accidentes químicos que ocurren en el cuerpo es la formación del radical de oxígeno, anión superóxido ( $O_2^-$ ). Algunas moléculas del cuerpo reaccionan directamente con el oxígeno para producir superóxido, se estima que del 1 al 3% de oxígeno que inhalamos es usado para formar superóxido. (Magnani L., *et al*, 2000)

En el capítulo 8 se desarrolla más sobre radicales libres y su efecto en el organismo.

## 5.2 Mecanismo de acción de antioxidantes

En cuanto a los flavonoides, se han contemplado diversos mecanismos de acción antioxidante, incluyendo:

- secuestro de radicales ( $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ) y de especies de oxígeno reactivas ( $HO\cdot$ ,  $O_2\cdot$ ,  $^1O_2$ ),
- inactivación de iones metálicos por quelación (figura 8), complejándose con proteínas (enzimas, apoproteína B-100 de LBD) y los sitios de enlace de metales de las enzimas,
- sinergismo al reducir los radicales del  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico oxidado.

Los flavonoides también pueden quelar uno o dos átomos de cobre inhibiendo, así, enzimas activadoras de cobre. (Frankel E.N. y Meyer A.S., 2000). Posteriormente se irán explicando los mecanismos mencionados en este y los siguientes capítulos.

Para desarrollar el mecanismo de acción antioxidante de flavonoides, se explicará inicialmente usando como modelo el  $\alpha$ -tocoferol como inhibidor de la autooxidación (o peroxidación) de los lípidos. (Fennema O., 1996) La peroxidación de los lípidos implica la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados (Middleton E. y Kandaswami Ch., 1994). El  $\alpha$ -tocoferol, que se encuentra en las membranas celulares y las lipoproteínas, bloquea la reacción en cadena de la peroxidación lipídica al secuestrar los radicales peroxilo intermediarios. (Magnani L., et al, 2000) Como otros antioxidantes fenólicos, el  $\alpha$ -tocoferol



excede su acción antioxidante al competir con la siguiente reacción:

Donde ROO es el radical peroxilo, LH es el sustrato de ácido graso poliinsaturado, ROOH es el hidroperóxido y L<sup>•</sup> el radical del ácido graso. Y el α-tocoferol (TH<sub>2</sub>) reacciona con el radical peroxil de la siguiente manera:



El radical α-tocoferilo es relativamente estable debido a la deslocalización del electrón desapareado y por eso es mucho menos reactivo que el radical peroxilo. Esta habilidad de deslocalizar el electrón desapareado al entrar en resonancia en la estructura química, es lo que hace que el α-tocoferol sea tan efectivo como antioxidante.

Los iones de cobre y hierro son eficaces promotores de daño por radicales libres, acelerando la peroxidación de los lípidos y ocasionando la formación de radicales hidroxilo. Para lidiar con esto, en los humanos evolucionaron sistemas complejos de transporte y proteínas de almacenaje para asegurar que estos metales rara vez se les permita circular con libertad por el organismo. (Gordon M.H., 1996)

En sistemas biológicos el ácido ascórbico (vitamina C) actúa como reductor del radical α-tocoferilo, es decir le dona un átomo de hidrógeno y así lo restituye a su forma original (Magnani L., *et al*, 2000). Según la capacidad reductiva relativa de los radicales antioxidantes, estos podrán interactuar con otros antioxidantes, restituyendo al antioxidante original. (Rice-Evans C., 1999) De acuerdo a lo anterior, se han hecho experimentos *in vitro*

que indican que los flavonoides regeneran el ácido ascórbico, y este a su vez regenera al  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).

En la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (figura 7), los antioxidantes polifenólicos (AH), como los flavonoides, pueden inhibir dos pasos importantes en la reacción en cadena por radicales libres al reaccionar con 1) radicales peroxilo e inhibiendo la formación de hidroperóxidos, y 2) radicales alcoxil e inhibiendo la formación de aldehidos. (Frankel E.N., Meyer A.S., 2000)

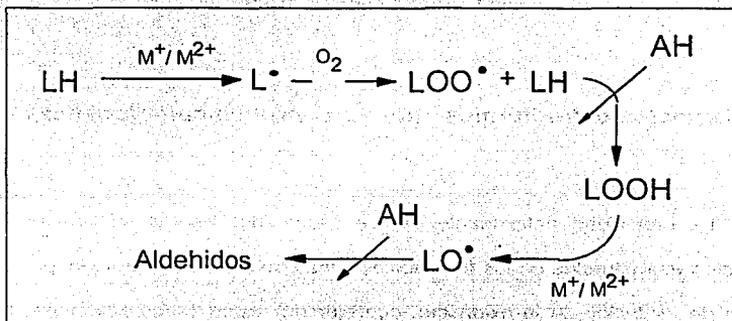


Figura 7. Mecanismo propuesto de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (LH) por compuestos polifenólicos (AH). Terao J., 1999

Para que un compuesto fenólico, como los flavonoides, pueda ser clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas (Martínez Valverde I, 2000; Kaur Ch.Y., Kapoor H.C., 2000) :

- 1) que cuando se encuentre en concentración baja con relación al sustrato susceptible a oxidación, pueda retardar o prevenir la autoxidación o la oxidación por radicales libres.
- 2) que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores.

Otra consideración importante para la actividad antioxidante es la accesibilidad del antioxidante al sitio de acción, que definida por su carácter hidrofílico o lipofílico, o su coeficiente de partición. (Frankel E.N. y Meyer A.S., 2000) Por ejemplo  $\alpha$ -tocoferol es un antioxidante más efectivo para romper reacciones en cadena secuestrando el radical lípido peroxil que lo que la vitamina C. (Rice-Evans C., 1999)

### ***5.3 Aspectos estructurales que les confieren características antioxidantes***

La capacidad antioxidante de los flavonoides es influenciada por un número de aspectos estructurales de los flavonoides. Una consecuencia de esto, por ejemplo, será el grado de inhibición de la oxidación, que ejercerá determinado flavonoide, sobre los ácidos grasos insaturados de las lipoproteínas de baja densidad (capítulo 8, sobre aterogénesis). El núcleo flavona por si solo, es un inhibidor pobre de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Para la actividad antioxidante de los flavonoides son indispensables las sustituciones hidroxilo y carbonilo, de hecho son la influencia principal. (McAnlis G.T., 1998)

La actividad secuestrante de radicales libres aumenta de acuerdo al grado de sustitución de grupos hidroxilo en el núcleo flavona. Las posiciones de sustitución más importantes, viendo la numeración de la estructura básica en la figura 2, son la 3 y 4 del

anillo B y las posiciones 5 y 7 del anillo A. Esto último se ejemplifica con la comparación del carácter antioxidante de dos flavonoides en función de sus estructura:

Tabla 6. Características estructurales de dos flavonoides y su influencia en la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos insaturados de las lipoproteínas de baja densidad

Flavonoide	Subclase	Carácter antioxidante	Anillo A	Anillo B	Anillo C
Quercetina	Flavonol	Más activo	OH en 5 y 7	OH en 3' y 4'	OH en 3 C=O en 4
Apigenina	Flavona	Más débil	OH en 5 y 7	OH en 4'	sin OH en 3 C=O en 4

OH grupo hidroxilo

C=O grupo carbonilo

Adaptado de McAnlis G.T., 1998

También es importante la combinación del grupo hidroxilo y el grupo carbonilo en el anillo pirona (el C), lo que le da a la molécula la habilidad quelante de iones metálicos (McAnlis G.T., 1998). La alta actividad antioxidante de la quercetina resalta la importancia del grupo hidroxilo en la posición 3 en el anillo pirona. Interesantemente al sustituir esta posición con el disacárido rutinosido, solo hay una ligera pérdida de la actividad antioxidante. (Arti A., *et al.*, 1998)

La evaluación de las propiedades antioxidantes de 12 hidroxiflavonas y 8 metoxiflavonas utilizando un método espectrofotométrico UV-Vis mostró que la hidroxilación de la posición 3 (anillo C), en flavonoles, incrementaba las propiedades antioxidantes más que la metoxilación. También se mostró que la hidroxilación en la posición 7, más bien ejercía un

efecto negativo en el poder antioxidante de los flavonoides, así como cuando hay un grupo metoxilo en esta posición. (Magnani L. *et al.*, 1996) Se observó que normalmente la presencia de sustituyentes hidroxilo en el núcleo flavona aumenta la actividad antioxidante, mientras que la sustitución con metoxilos la reduce. (Arti A., *et al.*, 1998)

Igualmente, la actividad antioxidante de los flavonoides depende críticamente de la parte de la molécula con las mejores propiedades donadoras de electrones, siendo en la mayoría de los flavonoides el anillo B. Por lo tanto la actividad antioxidante de los flavonoides como donadores de electrones/hidrógeno se relaciona a los potenciales de reducción y a la reactividad de los sustituyentes hidroxilo. (Rice-Evans C., 1999)

En general se tiene que en el núcleo flavona (figura 2) existen grupos estructurales determinantes para el secuestro de radicales :

- la estructura *o*-dihidroxi fenil (estructura catecol) del anillo B, la cual es un sitio blanco de radicales.
- la doble ligadura 2-3 en conjunción con la función 4-oxo del anillo C, que es responsable de la deslocalización.
- la adición de grupos hidroxil en la posición 3 y 5 para potenciales máximos de secuestro de radicales.

Por lo tanto la estructura *o*-dihidroxi fenil del anillo B es esencial para el secuestro de radicales en flavanoles y flavanonas que carecen de la doble ligadura 2-3. Tanto el flavonol, quercitina como el flavanol, epicatequina tienen la estructura *o*-dihidroxi, indicando que

ambos pueden actuar como inhibidores efectivos en la peroxidación de lípidos mediada por radicales de oxígeno. (Terao J., 1999). Los patrones de sustitución del anillo B afectan particularmente la potencia antioxidante de flavonoides (Arti A., *et al.*, 1998). En general se puede decir que entre más sustituyentes hidroxilo, el núcleo flavona, la potencia antioxidante es mejor.

En una investigación de la universidad de Peking en Beijing, China ( Wuguo D., Xingwang F., y Jilan W., 1997) donde se estudió la actividad antioxidante y relaciones estructurales de 5 flavonoides (baicalina, hesperidina, naringina, quercitina y rutina) en la peroxidación de lípidos inducida por iones  $Fe^{2+}$  y también por radiación  $\gamma$ , se encontró que los flavonoides actúan principalmente por la quelación de iones metálicos (ver figura 8) y el secuestro de radicales peroxilo, mientras que el efecto de secuestro de radicales hidroxilo es menos importante. Aquí también confirman lo que ya se ha mencionado de las posiciones y partes claves de la estructura en relación al secuestro de radicales y potencial antioxidante.

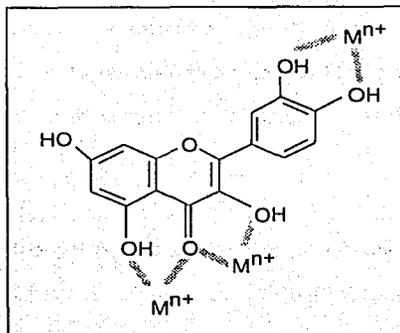


Figura 8. Sitios de enlace propuestos de metales de transición a flavonoides.

Rice-Evans C., 1999

#### 5.4 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante

Aunque existe una gran variedad de métodos para la examinar antioxidantes, no existe ninguno que haya sido aprobado y estandarizado. Los antioxidantes naturales son usualmente multifuncionales y por lo tanto, la actividad y mecanismo dominante en un sistema de prueba particular dependerá de las condiciones de oxidación, las cuales afectan tanto la cinética de oxidación como la composición del sistema. (Frankel E.N., 2000) El sondeo de flavonoides y otros compuestos fenólicos en fuentes vegetales por su actividad biológica como antioxidantes, se hace determinando su actividad secuestrante de radicales libres directa (como moléculas donadoras de hidrógenos o electrones), su habilidad quelante de metales de transición, su eficacia como antioxidantes interruptores de cadenas en el

secuestro de radicales lípido peroxilo, y como secuestrantes de especies de nitrógeno reactivas. (Rice-Evans C., 1999) Sin embargo, existen diversas críticas acerca del uso de ensayos unidimensionales para evaluar antioxidantes naturales ya que la actividad antioxidante se vuelve más compleja en alimentos completos y sistemas biológicos donde una serie de mecanismos están involucrados (Frankel E.N., 2000) como son la ruptura de la reacción en cadena de radicales, secuestro de especies de oxígeno reactivas, quelación de metales y la inhibición de enzimas oxidativas. En seguida se hace referencia a algunos de ellos.

### **Inhibición de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados**

En ensayos de este tipo, se manipulan ciertos parámetros para acelerar la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo la temperatura, catalizadores metálicos, presión de oxígeno, etc. Se ha demostrado que la suplementación dietaria con fuentes ricas en flavonoides, como extracto de raíz de regaliz, vino tinto y aceite de oliva, incrementan la resistencia de las LBD a la modificación oxidativa. (Aviram M., Aviram R., Fuhrman B., 1999) Este grupo a su vez, estudió la potencia antioxidativa *in vivo* de estos compuestos flavonoides en la oxidación de LBD inducida por iones cobre. Esto se estudió midiendo *in vitro* la inhibición de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados inducida por iones cobre y expresada por el IC<sub>50</sub>. El IC<sub>50</sub> es la concentración (µg/ml) del elemento estudiado que es necesario para inhibir la formación de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBA) en las LBD en un 50%. Posteriormente se evaluaron la capacidad antioxidante de los flavonoides purificados que componen los elementos estudiados. De acuerdo al IC<sub>50</sub> se

encontró que los flavonoides antioxidantes más potentes contra la oxidación de LBD fueron gingerol del jengibre, glabridina del regaliz, y quercitina y catequinas del vino tinto. La hesperidina de los cítricos tuvo un  $IC_{50}$  del doble que la quercitina, lo que lo hace un antioxidante menos efectivo.

### **Métodos basados en el secuestro de radicales**

Existen varios protocolos que se han desarrollado para medir la habilidad de captura de radicales de los antioxidantes utilizando una amplia gama de sistemas generadores de radicales y métodos para observar el progreso de la oxidación. (Kaur Ch.Y., Kapoor H.C., 2000) Varios de ellos cuantifican espectrofotométricamente los productos de la oxidación. Estos métodos de captura de radicales se usan para probar la capacidad antioxidante de muestras biológicas y extractos vegetales. A continuación se mencionan algunos de ellos y se desarrolla brevemente dos de ellos:

- el parámetro de captura de radicales totales (ensayo TRAP por sus siglas en inglés)
- el ensayo de capacidad de absorción de oxígeno radical (ensayo ORAC por sus siglas en inglés) el cual mide la capacidad antioxidante normal en sistemas biológicos
- el ensayo del radical DPPH

Los flavonoides presentes en frutas y verduras tienen la capacidad de secuestrar radicales, mediante la transferencia única de electrones, de oxígeno activos, superóxido y radicales de oxígeno. El método de secuestro de radicales libres estables de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) se puede usar para evaluar la actividad antioxidante de compuestos específicos o de extractos vegetales en un corto tiempo. En un estudio realizado en Taiwan

(Yan-Hwa Chu et al., 2000) analizaron el contenido de flavonoides (flavonoles y flavonas) y actividad antioxidante de 16 verduras consumidas comúnmente en China. Analizaron la actividad secuestrante de radicales de DPPH, superóxido e hidroxilo, así como la actividad antioxidante en un sistema de ácido linoléico. Para el DPPH encontraron una actividad secuestrante de más del 90% para los extractos vegetales analizados, excepto para una verdura que llaman gynura (18.2%), y la papa (66%). Por otro lado, la verdura que presentó mayor actividad secuestrante hacia radicales hidroxilo fue la papa (94%), seguida, entre otras, por la cebolla (88%) y la gynura (87.5%), y por último la espinaca (63.3%).

- el ensayo de actividad antioxidante de equivalentes TROLOX<sup>®</sup> (TEAC por sus siglas en inglés). El TROLOX<sup>®</sup> es un derivado hidrosoluble de la vitamina E. La actividad antioxidante total (TEAC) se define como la concentración de TROLOX<sup>®</sup> con el potencial antioxidante equivalente a una solución 1mM de la sustancia en prueba (Rice-evans C, Y Miller N.J., 1995).

Tabla 7. Potencial antioxidante relativo total de flavonoides en relación a la vitamina C y vitamina E, expresados como equivalentes TROLOX<sup>5</sup>

Compuesto	Subclase	TEAC
epicatequin galato	flavanol	4.93
epigallocatequingalato	flavanol	4.75
epigallocatequina	flavanol	3.82
quercetina	flavonol	4.72
rutina	flavonol	2.4
miricetina	flavonol	3.1
kaemferol	flavonol	1.34
taxifolina	flavanona	1.88
apigenina	flavona	1.45
crisina	flavona	1.43
vitamina C		1
vitamina E		1

Rice-evans C. Y Miller N.J., 1995

De acuerdo con la tabla 9 se puede observar que los flavonoides presentan mayor capacidad antioxidante que las vitaminas C y E, además también se aprecian las diferencias entre las subclases de flavonoides. Se puede concluir que las subclases con mayor capacidad antioxidante son los flavonoles y flavanoles.

## **Daño oxidativo al ADN como método de evaluación antioxidante**

El ensayo de electroforesis en gel de célula única, también se conoce como ensayo cometa y está basado en el principio que bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno ocasiona daño oxidativo al ADN de los linfocitos. Bajo condiciones alcalinas, las hebras de ADN con ruptura se desenrollan y son liberadas del núcleo, lo que se ve en la electroforesis como una mancha en forma de la cola de un cometa. El tamaño de la cola del cometa refleja el grado de ruptura de las cadenas de ADN y puede ser cuantificado intensificando las imágenes o por análisis en computadora. (Lean M.E.J., *et al.*, 1999) El ensayo cometa proporciona una medida de la protección de los tejidos contra estrés oxidativo estándar.

Un estudio (Lean M.E.J., *et al.*, 1999) se realizó para establecer, primero si los flavonoides de la dieta eran absorbidos consistentemente y segundo para observar si tenían un efecto biológico en la protección contra el estrés oxidativo en diabéticos tipo II. Se usó HPLC para determinar el grado de absorción de flavonoles, y el ensayo de electroforesis en gel de célula única usado para determinar el nivel de defensas antioxidantes midiendo el daño oxidativo del peróxido de hidrógeno sobre linfocitos después del consumo de dos dietas, una baja en flavonoles y otra suplementada. En una escala arbitraria de 0-400 unidades, el daño oxidativo sobre el ADN de linfocitos fue de 220 en la dieta baja en flavonoides, y 192 en la alta. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las dietas baja y alta de flavonoles, lo que sustenta la hipótesis que una mayor ingesta y mayor absorción de flavonoles está asociado con una protección contra estrés oxidativo a nivel de tejido significativamente mayor.

## **5.6 Consideraciones para flavonoides como antioxidantes de la dieta**

Existen varios factores que afectan la capacidad de los flavonoides y otros compuestos fenólicos para actuar como antioxidantes, los cuales pueden explicar las grandes diferencias en actividad encontradas por los investigadores. De ahí la necesidad de determinar la actividad antioxidante en sistemas que simulen en lo más posible las condiciones *in vivo*. Notablemente, un buen antioxidante dietario será aquel que no solo tenga alta capacidad secuestrante de radicales libres y un potencial redox bajo, sino uno con alta biodisponibilidad, que pueda alcanzar los puntos de oxidación *in vivo* y a una concentración crítica, y así proporcionar el efecto protector. (Kanner J., 1999)

Independientemente de sus propiedades antioxidantes, hay que tomar en cuenta que los flavonoides y otros polifenoles al tener la capacidad de quelar cationes divalentes, principalmente Fe y Zn, pueden actuar como antinutrientes de distintos minerales. Los compuestos fenólicos son liberados del alimento durante la digestión y pueden unirse a minerales como el Fe en el lumen intestinal haciéndolo no biodisponible. (Martínez Valverde I, 2000) Por otro lado, estos compuestos en altas concentraciones pueden a su vez actuar como prooxidantes.

## CAPÍTULO 6

### El papel de los flavonoides en la alimentación humana

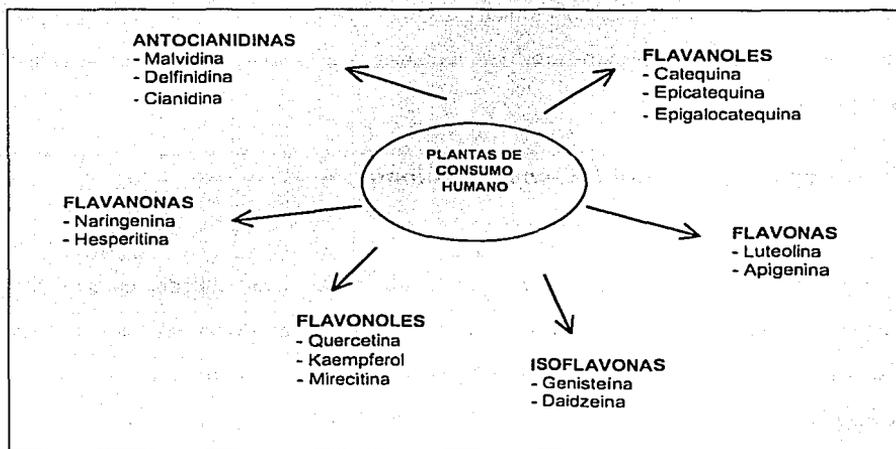
Existen un sinnúmero de publicaciones científicas que reportan la extensa distribución de los flavonoides en los productos vegetales. (Harborne J.B., Baxter H., 1999) Por lo tanto, el presente trabajo no pretende presentar todos los alimentos de origen vegetal a los que se les ha cuantificado el contenido de las subclases de flavonoides. Evidentemente lo anterior sería una lista muy extensa y una tarea más propia de una recopilación específica de los datos existentes para conformar un manual de tablas de flavonoides en alimentos. Esto se plantea como una buena posibilidad para un trabajo futuro ya que la necesidad de una recopilación de este tipo se ha hecho palpable para realizar estimados de ingesta total promedio de estos compuestos (ir a sección 6.2). Sin embargo, a continuación se mencionarán los alimentos más frecuentemente analizados por su contenido de flavonoides, así como aquellos flavonoides más relevantes.

#### *6.1 Principales flavonoides en los alimentos*

Los flavonoles que se encuentran en la naturaleza más abundantemente son la quercetina, kaemferol, mirecítina, e isoramnetina. Mientras que para las flavonas, son la apigenina y la luteolina. (Hollman, 2000) De tal forma, no es extraño que los flavonoides, previamente mencionados, son los más comúnmente analizados y cuantificados en frutas, verduras y otros productos naturales (tabla 8). A pesar de su relativa abundancia y la gran diversidad de alimentos en que se encuentran, estas dos subclases aparecen en

concentraciones substancialmente menores en comparación de las subclases de las antocianinas y los flavonoles (catequinas). (Beecher G., 1999) Por otro lado, el flavonol quercitina y el flavanol catequina definitivamente son los flavonoides más ampliamente distribuidos en plantas comestibles y en productos alimentarios derivados) de las plantas. (Manach C., et al., 1999) La forma más común de quercitina en los alimentos es la rutina, quercitin 3-O- $\beta$ -rutinosido, donde el rutinosido es un disacárido de ramnosa y glucosa. Asimismo, existen un número limitado de agliconas de flavonoides por cada subclase que se presentan normalmente en los alimentos vegetales de consumo humano. En la figura 9 se pueden observar las agliconas según las subclases más prominentes, en los alimentos.

Figura 9. Agliconas de flavonoides por subclase prominentes en los alimentos



En la naturaleza, los flavonoides se encuentran conjugados con mono y disacáridos, particularmente en los alimentos (Beecher G., 1999). Entonces la forma común en alimentos son los glicósidos de flavonoides, y la liberación de las agliconas suele ser resultado de las operaciones durante el procesamiento de productos alimentarios o en algunos casos, de algunos procesos de digestión o metabolismo.

Las bayas se consideran un grupo de frutos importantes por su alto contenido de flavonoides. El nombre genérico de baya se le da a los frutos carnosos con semillas, como la fresa, la grosella, la frambuesa, la zarzamora, etc. Estos frutos también se conocen frecuentemente como moras. Las bayas a pesar de contener flavonoles como la quercitina, se identifican principalmente por su contenido de antocianinas, y por lo tanto de sus tonos de color llamativos como el rojo, azul y morado.

Las frutas cítricas y sus jugos contienen una subclase única de flavonoides, las flavanonas. Normalmente se caracterizan por contener los glicósidos hesperidina, naringina y narirutina, así como sus agliconas correspondientes, hesperitina y naringinina. Las frutas cítricas contienen otros flavonoides en patrones cualitativos y cuantitativos definidos que son únicos para cada especie del género *Citrus*. Estas características se han sugerido como una herramienta sensible y útil para identificar la autenticidad de jugos cítricos y detectar adulteraciones. (Beecher G., 1999)

Tabla 8. Contenido de Flavonoles y flavonas (mg /Kg de peso fresco) en alimentos determinados por HPLC después de la hidrólisis de sus glucósidos. Solo se han considerado las partes comestibles de los vegetales analizados

Flavonoles= quercetina kaemferol y mirecitina,. Flavonas= luteolina y apigenina.

Alimento	Quercetina	Kaemferol	Mirecitina	Luteolina	Apigenina
Albaricoque	25- 26	-	-	-	-
Apio	-	-	-	5- 20	16- 61
Arándano	160	-	-	-	-
Brócoli	30- 37	60- 72	-	-	-
Cebolla	340- 347	-	-	-	-
Cereza	10- 15	-	-	-	-
Ciruela	9- 15	-	-	-	-
Coles de Bruselas	0- 6	7.4- 9	-	-	-
Col Morada	4,6	-	-	-	-
Ejote	16	-	-	-	-
Fresa	6- 8.6	-	-	-	-
Grosella	37	1	-	-	-
Haba	20	-	26	-	-
Jitomate	2- 14	-	-	-	-
Jitomate Cherry	63	-	-	-	-
Lechuga	14- 79	-	-	-	-
Manzana	20- 36	-	-	-	-
Jugo de manzana	2,5	-	-	-	-
Mora azul	7,3	-	-	-	-
Jugo de naranja	5,7	-	-	-	-
Pimiento Morrón rojo	-	-	-	5-11	-
Té negro	14- 17	14- 16	3	-	-
Toronja	4,9	-	-	-	-
Uva roja	15- 37	-	4.5	-	-
Uva verde	2- 12	-	4.5	-	-
Vino tinto	8,3	-	7.9	-	-

(-) debajo del límite de detección

Fuentes: Hertog *et al.* 1992, Crozier *et al.* 1997, Justesen *et al.* 1998.

Valores promedio reportados. Los valores promedio con límite inferior y superior, se dan cuando existía más de un valor reportado por alimento.

Adaptado de Hollman P. 2000

A diferencia de las investigaciones que generaron los datos de la tabla 8, otra investigación que analizó el contenido de flavonoles y flavonas en 31 verduras diferentes, utilizando los métodos de Hertog M. et al., 1992, si encontraron estos flavonoides en espinaca, remolacha roja, pepino, zanahoria, y en chucrut, col blanca, nabo de Suecia y col verde. (Hóvári J., Lugasi A., Dworschák E., 1999) Evidentemente, de un estudio a otro existirán variaciones en el contenido de flavonoides, no solo por la metodología empleada sino también por otros factores que afectan la biosíntesis de estos compuestos. Como se había mencionado con anterioridad, en el metabolismo de las plantas, la síntesis de flavonoides es sensible a muchos factores como la especie, variedad, fertilidad, diferencias de temporada y cantidad de luz recibida. Como ejemplo, se conoce que la formación de flavonoides es fotodependiente y como resultado vemos que las mayores concentraciones de estos compuestos se encuentran localizadas en las partes de las plantas expuestas a la luz, como las hojas. (Beecher G., 1999) Aunque una excepción de esto es la cebolla, cuyo bulbo crece bajo tierra y que tiene concentraciones significativas de flavonoles, en particular glicósidos de quercitina.

La concentración de antocianidinas en las frutas es la más alta de todos los flavonoides, lo cual se hace aparente al ver en la tabla 9 donde se expresa la concentración total de antocianinas en mg/100g, a diferencia de la concentración de flavonoles y flavonas que frecuentemente se encuentran en concentraciones de mg/1000g (ppm). Las antocianidinas contribuyen significativamente al color, y por tanto a la aceptabilidad de muchas frutas, algunas verduras y productos derivados como bebidas y conservas. Al pH de la mayoría de las frutas y verduras, las antocianidinas les confieren colores que van del rojo al morado.

(Clifford M.N., 2000) En la naturaleza, el licopeno es otro compuesto que da tonalidades rojas a los alimentos, como al jitomate, toronja rosada y a la sandía. Debido a su estructura molecular y más específicamente por su absorción en el UV, el resto de los flavonoides son incoloros, sin embargo, juegan un papel importante para dar el color blanco de alimentos como la cebolla, la coliflor, la col blanca, etc. En específico los flavonoles actúan como copigmentos de las antocianidinas. Estos copigmentos son importantes en la coloración de diversas flores. (Brouillard R. Y Dangles O., 1994)

Tabla 9. Contenido de antocianinas totales en frutas y verduras comunes

Alimento o bebida	Antocianinas totales mg/100g
zarzamora	83-326
mora azul (blueberry)	25-495
frambuesa	
negra	214-428
roja	20-60
cereza dulce	350-450
arándano agrio	78
jugo	18-87
fresa	7-30
uva roja	30-750
vino tinto	100-1000
grosella	
negra	250
roja	12-19
manzana	10
col morada	25
cebolla morada	9-21

Wang H., Cao G., Prior R.L., 1997

En cuanto a los flavanoles o catequinas, estos se han encontrado en los alimentos en concentraciones casi tan altas como las antocianidinas. Esta subclase normalmente se ha asociado con el té verde por que es una buena fuente de esta subclase. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de flavanoles en fresa, uva crespita o grosella silvestre,

pasa de Corinto o grosella (blanca, negra y roja), mora azul (blueberry) y ruibarbo. También se han reportado niveles bajos de (-)-epicatequina en el aguacate. (Hollman P.CH., 2000)

Diversos estudios reportan la existencia de flavonoides como dímeros, oligómeros y polímeros en diversos alimentos y bebidas. De estos, las procianidinas, una subclase de proantocianidinas, son los más relevantes en alimentos consumidos de manera habitual. Estos se encuentran formados por monómeros de catequinas ligados por enlaces carbono-carbono para formar dímeros, oligómeros y polímeros. (Beecher G., 1999) La polimerización de flavanoles monoméricos puede ser resultado de la oxidación, pero frecuentemente es catalizada por la enzima polifenoloxidasas. En la preparación del té y del cacao, durante el triturado y la fermentación se provoca la polimerización de flavanoles. Los compuestos resultantes dan lugar a los pigmentos cafés característicos de estos productos. Además las proantocianidinas o taninos condensados se asocian con la astringencia de estos productos y de muchas de las frutas comestibles antes de la maduración (Martínez Valverde I, 2000). En las moras azules se han identificado estos compuestos como responsables de prevenir las infecciones de las vías urinarias ocasionadas por *Escherichia coli*. (Kaur Ch.Y., Kapoor H.C., 2000)

El proceso de oxidación inducido para preparar el té negro a partir de las hojas de té verde, reduce considerablemente el contenido de flavanoles, hasta un 90%. (Tomas Barberan F.A., 2001) Consecuentemente sube la concentración de sustancias poliméricas derivadas de flavanoles y que son producto de la oxidación (ver sección 6.3.2).

En general, todavía existe una gran carencia de información respecto al perfil completo de flavonoides en los alimentos. En muchos alimentos solo se han analizado una o dos subclases de flavonoides, sin considerar la posible presencia de otras subclases importantes. Lo anterior se debe, en parte, a las pocas técnicas de análisis que contemplan de manera simultánea varias subclases. Y esto sin mencionar todos aquellos alimentos que aún no han sido analizados por su contenido de flavonoides. Esto abra la oportunidad para una ardua tarea de investigación y análisis para complementar la caracterización de los fitoquímicos contenidos en los alimentos.

## ***6.2 Ingesta diaria promedio de flavonoides totales***

Se ha confirmado que la ingesta diaria promedio de flavonoides excede la de otros antioxidantes naturales (Vitamina C, 70-100mg/día, Vitamina E, 7-10mg/día,  $\beta$ -caroteno, 2-3mg/día) y de esta forma proporciona una mayor contribución para asegurar el potencial antioxidante de la dieta.(Pietta P. Y Simonetti P., 1999) De tal forma, los flavonoides pueden representar una importante fuente exógena para que el organismo contraresta el desbalance entre prooxidantes y antioxidantes, el estrés oxidativo.

Cuando se mencionan valores de ingesta diaria promedio, habrá que especificar que subclase o subclases de flavonoides se están considerando en este estimado. Hay que considerar que cuando se dice flavonoides se pueden estar incluyendo varias subclases que puede preciso o que no necesariamente hayan sido analizadas y tomadas en cuenta para el cálculo de ingesta diaria promedio. En los estudios epidemiológicos existentes que

relacionan el consumo de flavonoides con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares o cáncer, normalmente solo se han considerado los flavonoles y flavonas de los alimentos comunes en el grupo poblacional estudiado.

En la literatura científica se reporta en diversas referencias un dato de ingesta diaria promedio de flavonoides totales de 1g para alimentos en Estados Unidos, calculado por Kühnau en 1976. Este valor difiere bastante de otros estimados, pero se debe tomar en cuenta que este investigador incluyó biflavanas (dímeros de flavonoides) que aportaban 460mg de esta ingesta, y el resto estaba distribuido entre antocianinas, catequinas, flavonoles, flavonas, y flavanonas. A pesar de que el método espectrofotométrico que utilizó para la cuantificación de flavonoides se considera actualmente poco preciso, es notable que haya incluido la mayoría de subclases de flavonoides. Lo cual proporciona un acercamiento más real de una ingesta de flavonoides totales. El análisis del contenido de flavonoides en alimentos utilizando métodos de análisis más sensibles y el desarrollo de bases de datos que resuman esta información, han resultado en estimados más precisos de consumo de flavonoides. (Beecher G., 1999)

La ingesta diaria promedio de flavonoles y flavonas en Holanda se ha estimado en 23mg/día. Los flavonoles contribuían a este valor de la manera siguiente, quercetina 16 mg/día, kaemferol 3.9mg/día y mirecítina 1.4mg/día. En el estimado para esta población, la principal fuente de flavonoles y flavonas fueron el té (48% de la ingesta total), cebollas (9%) y manzanas (7%). Cabe notar que en este estudio no se contempló el análisis de flavanoles, esta subclase por lo tanto, no se considera en el valor de ingesta promedio diaria. De haberlo

hecho, este valor se hubiese incrementado notablemente por el contenido de flavonoles del té. (Hertog M., et al., 1992)

El té, el vino y las frutas son las fuentes más importantes de flavonoles. Sin embargo, la falta de información precisa del contenido de flavonoles en gran variedad de alimentos, representa un gran obstáculo para estimar valores de ingesta promedio diaria. Como consecuencia, en este momento, no es posible estimar el consumo de flavonoles en una población dada.

En 1960 se determinó la ingesta de flavonoides de Japón, Holanda, la antigua Yugoslavia, los Estados Unidos de América, Finlandia, Italia y Grecia, cuantificando los flavonoles de acuerdo a los componentes alimentarios representativos de su dieta. La fuente principal de flavonoles en Japón y en Holanda fue el té, vino tinto en Italia, y cebollas en E.U.A. y la antigua Yugoslavia. La ingesta más alta fue en Japón (64 mg/día) y la más baja en Finlandia (6mg/día). En Finlandia una fuente importante de flavonoles fueron las distintas bayas que consumen frecuentemente en este país. (Hertog M., Kromhout D., Aravanis C., Hollman P.C.H., et al., 1995)

Como parte de los estudios epidemiológicos existentes, se ha determinado la ingesta diaria promedio de flavonoles de algunos grupos de poblaciones (tabla 10).

Tabla 10. Ingesta diaria promedio en diferentes grupos de la población.

Ingesta diaria promedio de flavonoles mg/ día	Población
20	Hombres estadounidenses de mediana edad en adelante
26	Hombres holandeses de edad avanzada
4	Hombres y mujeres fineses de mediana edad
26	Hombres galos de mediana edad

Breinholt V., 1999

Recientemente se han analizado los datos reportados de varios trabajos, y se han estimado los niveles de ingesta promedio de flavonoides totales diaria en Europa del Norte en alrededor de 50-150mg/día, incluyendo catequinas, flavonoles, flavanonas, flavonas y antocianinas. Estos niveles también son similares en otros países europeos. (Breinholt V., 1999)

Por otro lado, en E.U.A. se frecuenta el consumo de distintas bayas y se ha estimado la ingesta promedio diaria de antocianinas en 180-215mg/día. (Wang H., Cao G., Prior R.L., 1997) Aunque este valor reportado sea relativamente alto, se considera incompleto al no considerar otros flavonoides contenidos en bayas, en particular flavonoles y flavanoles.

Aunque normalmente la ingesta de flavonoides se ha limitado a aquellos contenidos en alimentos, también se pueden incluir aquellos flavonoides que son proporcionados en suplementos herbales; entre ellos los de Ginko biloba, los de corteza de picnogenol (*Pinus maritima*) y los de hierba de San Juan (*Hypericum sp.*).

## **6.3 Flavonoides asociados con alimentos particulares**

### **6.3.1. Vino tinto**

Las uvas constituyen el cultivo de frutas más grande del mundo y el 80% se destina para la producción de vinos. Se han publicado un número considerable de investigaciones sobre el contenido de flavonoides en las uvas y particularmente en el vino. (Frankel E.N. y Meyer A.S., 2000) El vino tinto contiene sustancialmente más polifenoles en comparación al vino blanco, ya que el primero está preparado con la piel de la uva que es más rica en flavonoides. Los flavonoides solubles en agua más importantes del vino tinto son las antocianinas (la subclase más abundante en el vino), malvidina y cianina, los flavonoles, quercitina y miricitina, y los flavanoles, catequina y epigallocatequina. (Aviram M., Aviram R., Fuhrman B., 1999) Además contiene otros compuestos fenólicos como ácido gálico y ácido caféico. A estos últimos compuestos se les atribuye parte de la actividad antioxidante del vino. El perfil de polifenoles del vino no es el mismo que la uva fresca ya que durante el proceso de producción del vino ocurren cambios significativos. Esto se debe a que las levaduras involucradas en la fermentación del vino, emplean los diferentes polifenoles como sustratos para obtener elementos vitales para su metabolismo.

También se ha estudiado el efecto del consumo de vino tinto en 17 individuos saludables que consumieron 400ml de vino tinto/día durante sus alimentos a lo largo de dos semanas. El resultado fue una significativa reducción en la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LBD) aisladas de los voluntarios a la oxidación por iones Cu, determinadas por la

formación reducida de un 46% de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico, 72% de peróxidos de lípidos y 54% de dienos conjugados. (Aviram M., Aviram R., Fuhrman B., 1999)

Goldberg *et al.* describieron el contenido de flavanoles de 836 vinos tintos de diversas regiones vinícolas alrededor del mundo y encontraron grandes diferencias entre la variedad de uva empleada, así como las condiciones climáticas de las viñas de la misma variedad de uva. Por ejemplo, la uva Pinot Noir, empleada para la mayoría de los vinos elaborados en la región de Borgoña en Francia, es la variedad que contiene un contenido excepcionalmente alto de flavanoles (hasta 287mg/L) en comparación con otras variedades. (Hollman P. CH., y Arts L., 2000) Las variaciones reportadas en el contenido de flavanoles puede ser debido en parte por las diferentes fases de desarrollo del fruto.

### 6.3.2. Té verde

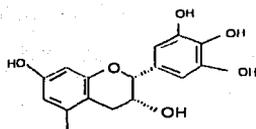
El té se prepara a partir de las hojas de dos variedades bien definidas de la planta del té *Camellia sinensis*, la variedad *assamica* y la *sinensis*. Prácticamente un 78% de la producción mundial de té se destina al procesamiento del té negro, el 20% a té verde y el 2% restante a té oolong. (Chen J. Y Han C., 1999) Una característica del té, y de ahí que valga la pena mencionarlo repetidamente, es que contiene cantidades significativas de flavonoides de la subclase de las catequinas, y también por sus efectos fisiológicos, como actividad antimutagénica y antitumorigénica. (Wiseman Sh. *et al.*, 1999)

Por el extenso número de estudios que se han realizado en modelos animales de la actividad biológica *in vivo* e *in vitro* de los flavonoles contenidos en el té, estos se han llegado

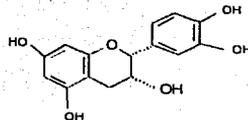
a denominar como los flavonoides del té. Esto no es del todo correcto, ya que los flavanoles están extensamente difundidos, no solo en el té, sino también en frutas y legumbres. Sin embargo, el té es considerado la fuente más importante de flavanoles en muchos países debido al patrón de consumo constante, y también por el alto contenido de flavanoles en la hoja fresca de té (en base seca). Además hasta el momento es la única planta para consumo humano conocida que contiene (-)-epigallocatequingalato. (Hollman P.Ch., 2000) La hoja tierna del té contiene las concentraciones más altas de catequinas, siendo el brote y la primera hoja especialmente rica en epigallocatequin galato. (Wiseman Sh. *et al.*, 1999) El (-)-epigallocatequingalato (EGCg) es la catequina predominante en el té verde, constituyendo más del 50% de las catequinas totales. (Frankel E.N. y Meyer A.S., 2000)

El procesamiento de la hoja fresca de té ocasiona cambios significativos en la composición de flavonoides. El té negro contiene una tercera parte del nivel de catequinas en el té verde y durante su manufactura, estos compuestos sufren condensaciones catalizadas por la enzima polifenoloxidasa. (Wiseman Sh. *et al.*, 1999) Debido a su proceso de producción, el té negro se somete a condiciones de oxidación y contiene varios dímeros únicos como la teaflavina, teacitrina y bisflavanoles (ver figura 10), así como un a gran familia de polímeros, los tearubígenos. Una de las subclases de dímeros más prominente son las teaflavinas que son formadas por la condensación y rearreglo de los anillos B oxidados de la epigallocatequina y epicatequina. Las teaflavinas constituyen del 3 al 6% de los sólidos del té negro, mientras que los tearubígenos del 12 al 18%. (Chen J. Y Han C., 1999) Otros alimentos donde se puede encontrar tearubígenos son en manzanas, uvas, té verde, ciruelas, cebada, cacahuates, vino, fresas, canela y cocoa. (Beecher G., 1999)

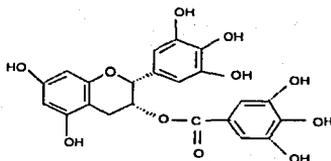
## Principales componentes del té verde



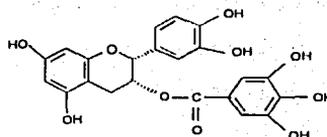
(-)-epicatequina



(-)-epicatequin-3-galato



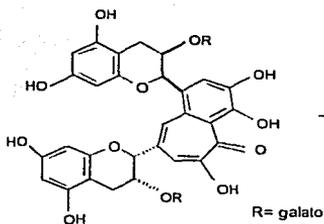
(-)-epigallocatequina



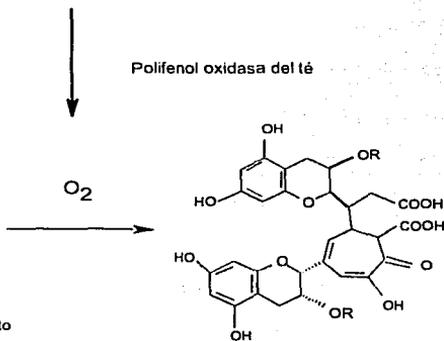
(-)-epigallocatequin-3-galato

FERMENTACIÓN

Polifenol oxidasa del té



teaflavinas



tearubigenos

Figura 10. Estructuras químicas de catequinas, teaflavinas y tearubigenos principales del té verde en su proceso de fermentación para la elaboración de té negro. Chen J. y Han Ch., 1999.

### 6.3.3 Soya

El frijol de soya ha sido un importante elemento de la dieta asiática por muchos siglos y en los últimos 15-20 años, los productos derivados de la soya han tenido un impacto significativo en la dieta occidental (Felix D'Mello J.P., 1997). El alto consumo de productos de soya en las poblaciones asiáticas se ha sugerido como la razón de la baja incidencia, en comparación con las poblaciones occidentales, de ciertos tipos de cánceres hormono-dependientes como el mamario y de la próstata. Los nutriólogos y bioquímicos se han enfocado en las isoflavonas de la soya como uno de los factores preventivos de la incidencia de estas enfermedades. (Choi Y-S., *et al.*, 2000) El frijol de soya contiene concentraciones relativamente altas de las isoflavonas genisteína, daidzeína y gliciteína, las cuales han sido examinadas por su actividad fitoestrogénica. Las concentraciones de daidzeína puede variar desde 28 a 233 mg/Kg de frijol de soya seco, y de genisteína de 7 a 149 g/Kg. (Felix D'Mello J.P., 1997)

Los estrógenos se han implicado ampliamente en la génesis y progreso del cáncer mamario. Evidencias epidemiológicas en mujeres indican que la exposición a largo plazo de las glándulas mamarias a los estímulos de estrógenos derivados del ovario, y a otros factores dietéticos, genéticos y ambientales son directamente proporcional al riesgo de contraer cáncer mamario. Los denominados fitoestrógenos son aquellos compuestos derivados vegetales que pueden regular la expresión de genes, mediada por un elemento de respuesta estrógena, en una manera comparable o aparentemente antagonista al 17 $\beta$ - estradiol (estrógeno sintetizado por los mamíferos), como resultado del enlace directo con el receptor estrogénico (Clarke R. *et al.*, 1996). En la figura 11 se pueden observar algunas estructuras de fitoestrógenos y el estrógeno 17 $\beta$ - estradiol.

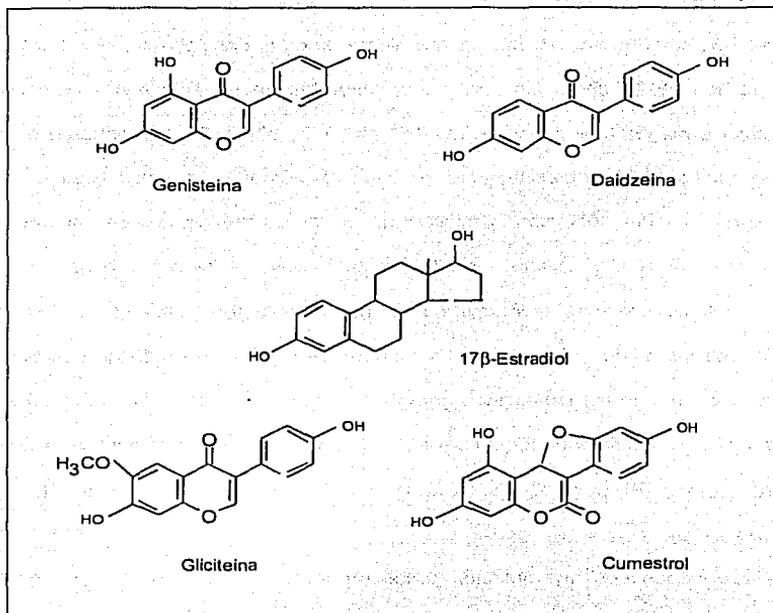


Figura11. Estructuras de fitoestrógenos, isoflavonas predominantes (daidzeina, genisteina y gliciteina) y cumarina (cumestrol) en relación al estrógeno sintetizado por los mamíferos (17β-estradiol).

Anderson J., Gamer S., 2000.

Algunos estudios con animales de granja que pastando tréboles, otra fuente rica en isoflavonas, han indicado que existe un riesgo potencial de estas sustancias en las funciones reproductivas. El consumo de este herbaje, se ha asociado a una marcada

declinación en la fertilidad de ovejas. Vale la pena pensar sobre casos como este ya que hace evidente el peligro que podría representar en el humano el sobreconsumo de suplementos con estos compuestos y la importancia de informarse bien sobre los productos que se encuentran en el mercado.

#### **6.3.4 Cítricos**

Las flavanonas son compuestos que caracterizan a los frutos cítricos y sus productos derivados. Se localizan tanto en el jugo como en los tejidos sólidos (cáscara, albedo, segmentos y membranas). Se distribuyen de manera no uniforme, pero es común que haya mayores concentraciones en los tejidos sólidos que en el jugo.

La cáscara de los cítricos, conocida como flavedo, es el tejido más rico y con excepción de algunas mermeladas, conservas y dulces, es una parte del fruto que rara vez es consumida. El limón, lima, mandarina (tangerina) están dominados por rutinósidos, (principalmente hesperidina) (Reyo A., y Saval S., 1990, Tomás-Barberán F.A., 2000). En las naranjas agrias (*Citrus aurantium*) se encuentra la neohesperidina, isómero de la hesperidina, la cual es un compuesto de gusto amargo. La hesperidina no es amarga y se encuentra principalmente en limones (*Citrus mitis*) y en naranja dulce (*Citrus sinensis*). (Ikan R., 1991)

La naringina, un flavanon 7-neohesperidósido, es amarga y le da su sabor característico a las toronjas. Sin embargo cuando es deglicosilada (es decir se le quita la porción de

carbohidrato) por acción de la enzima naringinasa da lugar a la aglicona, naringenina, la cual no tien gusto amargo.

Las flavanonas pueden transformarse fácilmente en calconas isoméricas en medio alcalino, lo cual es empleado para producir el edulcorante naringinin-dihidrocalcona (figura 12). Este edulcorante no carcinogénico e hipocalórico ha sido aceptado por la Food and Drug Administration (FDA) de los E.U.A. (Fennema O., 1996) Se puede utilizar en bebidas no alcohólicas, postres y confitería en concentraciones de 10-400 mg/Kg y es 1000 veces más dulce que la sacarosa.

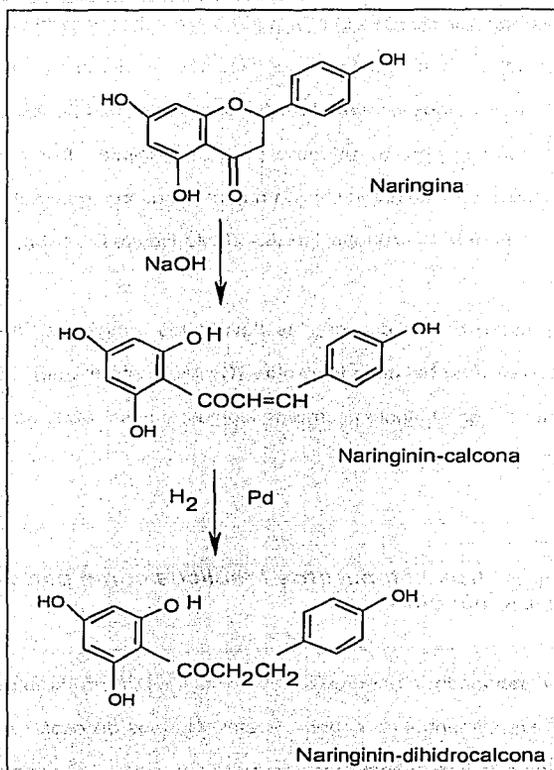


Figura 12. Reacción de la producción del edulcorante naringinin dihidrocalcona a partir de la flavona naringina.

Ikan R., 1991

Las flavanonas son compuestos que tienden a precipitar (especialmente la hesperidina) y cuando están en altas concentraciones representan un problema en el procesamiento y manejo comercial de los jugos cítricos. Las flavanonas se mantienen disueltas durante el pasteurizado de los jugos, pero al enfriarse pueden precipitar. Por otro lado, en jugos de toronja el sabor amargo de la naringina es un atributo sensorial deseable para el consumidor, siempre y cuando no supere los 700ppm (mg/L). (Mota Reyes D., 1992)

Aunque predominan en los cítricos, las flavanonas también se han encontrado en la planta de menta, en el té herbal de la legumbre (*Cyclopia intermedia*), en la miel proveniente de las flores de cítricos, en el lúpulo (*Humulus lupulus*) y hasta en la papa. (Tomás-Barberán F.A., 2000)

#### ***6.4 Flavonoides y otros compuestos fenólicos como parte del perfil fitoquímico de los alimentos***

Como se ha mencionado, a parte de los flavonoides existen otros compuestos fenólicos de importancia en los alimentos de origen vegetal. Algunos de ellos se incluyen en la tabla 11. Existen estudios que han cuantificado tanto el contenido de flavonoides como de ácidos fenólicos en especies vegetales de consumo humano, lo cual proporciona una percepción más comprensiva del perfil fitoquímico, en este caso de compuestos polifenólicos en los alimentos. Un ejemplo de lo anterior es los análisis realizados a 6 variedades de fresas y diferentes bayas del género *Vaccinium* (moras azúles, grosellas) cultivadas en 1997 en Finlandia y Polonia. (Häkkinen S.H. y Törrönen A.R., 2000) En este estudio cuantificaron la

cantidad de flavonoles (quercetina, kaemferol y mirecicina) y ácidos fenólicos (ácido elágico, *p*-cumárico, caféico y felúrico), les interesaba también estudiar la variedad de fresa Senga Sengana ya que es la que se emplea principalmente por la industria alimentaria fina. Precisamente la variedad que más explotan industrialmente resultó ser la variedad estudiada con menor contenido de compuestos fenólicos. En relación al efecto del sitio de cultivo, la misma variedad de fresa cultivada en Finlandia tuvo un contenido de compuestos fenólicos significativamente mayor que la cultivada en Polonia. Esta diferencia fue debida a mayor concentración de ácido elágico y *p*-cumárico en las fresas cultivadas en Finlandia.

Tabla 11. Contenido de ácidos fenólicos en varios alimentos.

Ácido Fénolico	Fuente dietética	Contenido en fuente importante
ácido caféico	manzanas, papas, haba de café, vino blanco, aceitunas, espincas, col, esparragos, lechuga	manzanas (100-130 mg/100g)
ácido ferúlico	trigo, arroz, maíz, jitomates, espinacas, col, esparragos, soya, frijoles	semillas de chia (200mg/100g)
ácido cumárico	vino blanco, jitomates, espinacas, col, cáscara de frutas cítricas, fresas, perejil	
ácido clorogénico	haba de café, manzanas, peras, cerezas, ciruelas, duraznos, moras azúles, jitomates	manzanas (100 mg/100g), café (8% del haba), haba de soya (1%)
ácido gálico	cerezas, uvas blancas y rojas	vino tinto (95 mg/L)

Breinholt V., 1999

## CAPÍTULO 7

### Factores que afectan el contenido y consumo de flavonoides

Existen factores que van a afectar el contenido de flavonoides en las distintas etapas de la cadena de producción de alimentos, como el cultivo, el tiempo de cosecha, y el procesamiento específico al que sea sometido determinado alimento. Así también al ser ingerido por el individuo hay que considerar la biodisponibilidad de estos compuestos y su metabolismo en el cuerpo. De manera adicional los diferentes patrones de consumo y la cultura alimentaria de los diferentes países determinarán el contenido de flavonoides de su dieta. A continuación revisaremos los aspectos mencionados.

#### *7.1 Las condiciones ambientales y de cultivo, y su repercusión en el contenido de flavonoides*

Ya se ha enfatizado anteriormente que la biosíntesis de flavonoides en las plantas está sujeta a ciertos factores ambientales que inducen su producción, por lo que a continuación se mencionarán algunos casos en que el contenido de flavonoides se ve directamente afectado.

En hortalizas con hojas como la parte comestible, el contenido de flavonoles por variaciones de temporada, ha sido de 3 a 5 veces mayores en verano que en otras temporadas. Como puede verse en los rangos encontrados en hortalizas como lechuga (2-30mg de quercitina /Kg), endibia, una variedad de escarola (15- 95 mg de kaemferol /Kg) y

puerro (11- 56 mg de kaemferol/Kg). (Hertog M., Hollman P.CH., Katan M.B., 1992) Ya que la síntesis de flavonoides es fotodependiente, estas variaciones eran esperadas.

Las condiciones ambientales particulares de un cultivo de un año a otro pueden afectar considerablemente el contenido de isoflavonas como se vio en las variedades japonesas de soya cultivadas en el estado de Iowa, E.U.A. donde el contenido de isoflavonas en 1992 se redujo en un 40% en comparación al cultivo de 1991. (Choi Y-S., Lee B-H., et al., 2000) Además se ha sugerido que la concentración de isoflavonas depende en su mayoría de los factores ambientales, del periodo de siembra y de los genotipos de las variedades de soya. Para esto se han conducido estudios para evaluar el contenido de las isoflavonas genisteína, daidzeína y sus glicósidos en los frijoles de soya recolectados en China y Corea para desarrollar cultivos ricos en isoflavonas (Choi Y-S., Lee B-H., et al., 2000). En este estudio encontraron que las especies silvestres tenían el más alto contenido de isoflavonas, mientras que las variedades de cultivo y terrenos cultivados mostraron una ligera diferencia del contenido de isoflavonas. Concluyeron que las especies silvestre pueden ser un buen recurso para la selección de semillas con alto contenido de isoflavonas. Adicionalmente los contenidos de isoflavonas de semillas de soya originarias de Corea del Norte y Corea del Sur fueron similares y tendían a ser mayores que las de China.

En frutas se ha visto que durante el crecimiento y madurez hay cambios en el contenido de flavonoides. En peras y manzanas se ha visto que durante el crecimiento hay un decaimiento rápido en la concentración de flavonoides, mientras que las fluctuaciones durante la maduración fueron bajas. Durante el almacenamiento de manzanas cosechadas

en la madurez comercial, mantenidas bajo condiciones de almacenamiento en frío por 6 meses, hubo pocos cambios en el contenido de (+)-catequina y de (-)-epicatequina. (Hollman P. CH., Arts L., 2000)

## ***7.2 Efecto en el contenido de flavonoides durante el procesamiento de alimentos***

En general, los análisis del contenido de flavonoides en alimentos de origen vegetal se han realizado en las partes comestibles del producto fresco. Los alimentos de origen vegetal por una parte son consumidos en su estado fresco, pero en la mayoría de los casos son consumidos como productos procesados. De ahí la necesidad de analizar y determinar las posibles pérdidas de flavonoides que pueden resultar de las operaciones unitarias de proceso involucradas para un producto alimentario específico para poder tener una idea más clara del consumo real de la población.

En Finlandia, el consumo de bayas representa una fuente de flavonoides importante. Sin embargo solamente una fracción de ellas se consume en fresco, mientras que la mayor parte se ingiere principalmente en forma de jaleas, mermeladas, jugos y postres. De tal manera Sari Häkkinen y colaboradores del Departamento de Nutrición Clínica de la Universidad de Kuopio, Finlandia analizaron el contenido de quercitina en bayas frescas, comparándolo con el contenido en productos de bayas realizados por un proceso a nivel doméstico (Häkkinen S., 1999). En Finlandia los frutos más cultivados y consumidos son la fresa, grosella negra,

arándano dulce, y lingonberry. Los resultados que obtuvieron se muestran en la tabla 12, donde podemos observar en la tabla las pérdidas de quercetina en los productos elaborados y las diferencias según el procesado doméstico utilizado.

Tabla 12. Contenido de quercitina en bayas frescas y en productos de bayas

Baya y respectivo producto	mg quercetina/ Kg
Fresa (fresca)	6
• Mermelada	3
Arándano dulce (congelado)	41
• Sopa	6
Grosella negra	53
• Jugo extraído al vapor	8
Baya lingonberry (fresca)	169
• Jugo crudo	9
• Triturada	100

Häkkinen S., 1999

Encontraron que el contenido de quercitina en mermelada de fresa (3 mg/Kg ), fue la mitad del de las fresas frescas ( 6 mg/Kg ). Mientras que en la elaboración tradicional de jugo de bayas, solo se extrajo el 15% de quercitina y el resto permaneció en el residuo sólido.

Durante la preparación de los alimentos, éstos por costumbre son sometidos a diferentes tratamientos térmicos. Los tratamientos rutinarios como el hervido, horneado o freído tendrán diferentes efectos en el contenido de flavonoides. Crozier *et al.* (1997) estudiaron el efecto de cocinado doméstico en el contenido de quercitina en cebolla y jitomate. En ambas

verduras, el hervido redujo el contenido de quercitina en un 80%, el cocimiento en horno de microondas en un 65% y el freído en un 30%.

A su vez, el procesamiento de jugos de frutas a nivel comercial, también afecta considerablemente el contenido de flavonoles en el producto final. El complejo proceso de preparación del jugo de manzana comercial, va disminuyendo sucesivamente el contenido de flavanoles a cada paso del proceso. En particular, el triturado y prensado, almacenamiento a temperatura ambiente del jugo concentrado y clarificado con carbón activado, destruye los flavanoles por completo. Lo mismo se ha visto en jugos de uva, encontrándose altas concentraciones de flavanoles en el jugo elaborado a nivel casero y en el jugo comercial son destruidos dependiendo del método de procesamiento empleado. (Hollman P. CH., y Arts L., 2000)

Al comparar el contenido de flavonoides en el producto fresco y en el procesado, habrá que considerar que normalmente a los productos procesados se les agregan otros ingredientes o que también se diluyen con agua para su consumo, como en el caso de los jugos. Además habrá operaciones unitarias que sean más destructivas que otras. Por lo tanto, se deberá evaluar las operaciones unitarias de un proceso específico y determinar en cual de ellas se da una mayor reducción del contenido de flavonoides y la subclase de flavonoides que se está degradando.

La reducción en el contenido de flavonoides durante el procesado doméstico o industrial de los alimentos es relevante al calcular la ingesta de flavonoides totales durante estudios

epidemiológicos que pretendan relacionar el consumo de flavonoides de la dieta con el riesgo de contraer alguna enfermedad crónico degenerativa. Los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento han utilizado los datos de contenidos de flavonoides obtenidos a partir del análisis de los alimentos en fresco. Esto sin considerar que las fuentes de flavonoides contempladas en estos estudios, frecuentemente son consumidas tanto en fresco como cocinadas, o como parte de un producto procesado.

Todavía no existe información suficiente sobre los efectos del procesado en el contenido de flavonoides. Y en general se han realizado pocos estudios que hayan evaluado el contenido de flavonoides a lo largo de un proceso industrial. Dicha información deberá de generarse para incluir en bases de datos pertinentes para que pueda ser considerada como variable en los estudios epidemiológicos. Además será de gran utilidad para la industria alimentaria en la formulación y planeación de proceso de sus productos a desarrollar en el caso de que se considere importante proteger la concentración de flavonoides en el producto final.

Ya considerando los cambios que pueda sufrir el contenido original de flavonoides en un alimento, se debe tomar en cuenta que al ser ingerido y al pasar por el tracto gastrointestinal, estos tendrán una determinada absorción y transformación en el organismo.

### **7.3 Absorción, biodisponibilidad y metabolismo**

Para entender los efectos biológicos de los flavonoides en el organismo y para evaluar de lleno el papel potencialmente benéfico para la salud humana, es esencial tener conocimiento comprensivo sobre la absorción, biodisponibilidad y metabolismo de estos compuestos. El conocimiento más reciente de la biodisponibilidad de las varias subclases de flavonoides aún se considera incompleto e insuficiente. (Ferro-Luzzi A. y Maiani G., 1999) Aunque la información al respecto aun es limitada, existe información disponible sobre la absorción intestinal y metabolismo de flavonoides específicos, tal es caso de estudios realizados en ratas y la ingesta de quercetina y catequina. (Manach C., *et al.*, 1999) Por tanto, los estudios reportados sobre la absorción de flavonoides, por lo general se ha limitado a dos subclases de flavonoides, los flavanoles y las catequinas. (Pietta, P y Simonetti P., 1999).

Los biomarcadores son una herramienta importante para poder investigar los efectos de los flavonoides en la salud. Los biomarcadores se han definido dentro del contexto de componentes de la dieta y la salud como cualquier medida bioquímica, molecular, genética, inmunológica o funcional de los eventos que ocurren en un sistema biológico después de la exposición de un componente dietario que se crea relevante para la salud (Ferro-Luzzi A. y Maiani G., 1999). De tal forma un biomarcador de la biodisponibilidad y metabolismo de los flavonoides puede ser la concentración del compuesto específico o de sus metabolitos en el plasma o en la orina.

Por mucho tiempo la absorción de flavonoides se consideró como insignificante. Puesto que en general este campo de investigación ha sido dominado por las siguientes aseveraciones:

- las paredes intestinales no secretan las enzimas capaces de degradar los enlaces  $\beta$ -glicosídico, y se sabe que los flavonoides en las plantas se encuentran enlazados a carbohidratos como  $\beta$ -glicósidos por lo tanto no hay liberación de la aglicona.
- la ruptura de los glicósidos de flavonoides solo puede ser realizada por la bacterias que forman la microflora del colon, liberando las agliconas solamente en el colon donde se cree que la absorción es despreciable
- la absorción de glicósidos solo se dará después de haberse liberado la aglicona el colon puede absorber las agliconas

las agliconas son absorbidas mejor que los glicósidos

Sin embargo, las investigaciones al respecto que fueron realizadas a finales de la década de los 90's han demostrado que algunas de estas aseveraciones no son del todo correctas.

Recientemente se han llevado a cabo experimentos de dosificación aguda que han demostrado lo contrario, o sea una mayor absorción de los flavonoles conjugados y mínima absorción de los agliconas. A su vez con dietas bajas y altas en flavonoides suministradas a pacientes diabéticos tipo II (5 hombres y 5 mujeres entre 54 y 70 años), claramente se evidenció la absorción significativa de flavonoles dietarios, específicamente quercetina y sus conjugados, con un aumento promedio de 12 veces sobre concentraciones de flavonoides bajo ayuno, a partir de un suplemento relativamente pequeño. (Lean M.E.J., *et al.*, 1999)

Pero en otro estudio para demostrar la absorción de glicósidos de quercetina (en sujetos desprovistos colon, y por lo tanto sin flora bacteriana para evitar problemas por degradación microbiana) se vió que la absorción de glicósidos de quercetina de la cebolla (52%) era mucho mejor que del aglicón puro (24%). La absorción de rutina (quercetin-3-ramnosilglicósido), principal glicósido de flavonol encontrado en el té, fue de 17%. Por lo

tanto, los glicósidos de flavonoides pueden ser absorbidos en el intestino delgado sin necesidad de una hidrólisis previa que puede llevarse a cabo en el colon por acción microbiana de la microflora intestinal.

Por otro lado, el destino de las agliconas en el colón sería de una mayor degradación por parte de la misma microflora, por lo que solo una fracción de las agliconas estaría disponible para su absorción. Además en principio, el colón tiene poca capacidad de absorción, con excepción de agua y electrolitos. Por lo que es poco probable que el colon sea un sitio activo para la absorción de agliconas (Ferro-Luzzi A. y Maiani G., 1999) A su vez, en estudios realizados en ratas y en humanos, administrándoles flavonoles de fuentes vegetales y catequinas de té verde, han confirmado que estos compuestos son parcialmente absorbidos en el intestino. (Pietta, P. y Simonetti P., 1999)

En dos estudios se compararon los rendimientos de absorción de quercetina de manzanas y de cebollas en individuos saludables. Se observó que la absorción de los glicósidos de cebolla fue mayor que la de los glicósidos de manzana, y la de rutina (quercetin-3-ramnosilglicósido) pura (reactivo analítico). La cebolla contiene principalmente quercetin- $\beta$ -glucósidos, (flavonol conjugado con glucosa) mientras que la manzana contiene una mezcla de quercetin- $\beta$ -galactósidos y quercetin- $\beta$ - xilósidos y quercetin- $\beta$ - rutinósido. Estó sugirió que la porción carbohidrato de glicósido de flavonoide es una determinante de la absorción y biodisponibilidad; esto también se observó en el estudio con los sujetos desprovistos colón. A su vez, se deja abierta la posibilidad del efecto de la matriz del alimento. (Hollman P. CH., y Arts L., 2000) Es decir que los efectos observados pueden ser

resultado de la interacción de todos los componentes presentes en el alimento y en las proporciones que se encuentran naturales. En el experimento se observaron resultados distintos cuando se consumió el alimento entero y cuando se administro el flavonoide en su forma purificada.

Se ha comprobado que en la mucosa intestinal los flavonoles y catequinas son transformados en la mayor parte a derivados de glucoronil. Posteriormente estos derivados pasan al hígado donde se llevan a cabo metilación, sulfación, y conjugación adicional con ácido glucurónico, sulfato y glicina. En el plasma de ratas obtenido una hora después de la administración de (-)-epicatequina se ha encontrado glucorónidos, sulfato de O-metilglucurónido y sulfato de glucurónido de epicatequina ( Pietta, P y Simonetti P., 1999)

Una característica común en el metabolismo de quercitina y catequina es que nunca se han recuperado como agliconas en el plasma de rata. La naturaleza de los derivados conjugados recuperados del plasma difirieron en las ratas según se hayan alimentado con dietas provistas de quercetina o con catequina. Los metabolitos de catequina eran solo glucuronados, mientras que los de quercitina eran sulfo y glucuro-sulfuronados. Las catequinas fueron eliminadas principalmente en la orina y quercetina fue excretada en la bilis. (Manach C., et al., 1999)

De acuerdo con la información que se ha presentado, se puede decir que el efecto in vivo de los flavonoides depende de la cinética de su absorción y eliminación, en la naturaleza y extensión de su metabolismo (conjugación, metilación), y en la actividad de cada

compuesto en la circulación sistémica. La naturaleza de los conjugados puede afectar su solubilidad en los fluidos biológicos y puede resultar en las diferentes velocidades de eliminación vía urinaria o biliar. Numerosos estudios han mostrado la actividad antioxidante y varios efectos en cepas celulares de las agliconas, pero pocos trabajos han tomado en cuenta que los metabolitos circulantes están en forma conjugada y que son metabolizados en el hígado, donde sufren modificaciones como metilación. (Manach C., et al., 1999)

#### ***7.4 Consumo de flavonoides en algunas poblaciones del mundo***

El consumo de flavonoides dependerá de las costumbres alimentarias en los diferentes países. Esto a pesar de que existan cultivos que son comunes para gran número de poblaciones en el mundo, ya que la frecuencia de consumo y los gustos variarán de país en país. Además hay cultivos particulares que son propios de una cultura o región y que son ajenos en otras partes del mundo. Esto se puede observar, por ejemplo, en la variedad de verduras consumidas regularmente en la región de Taiwan, en China (Yan-Hwa Chu et al., 2000) donde algunas de ellas son conocidas y frecuentes en la dieta mexicana como pepino, espinaca, col blanca, col morada, papa y cebolla, mientras que otras nos son desconocidas como la col china, guinura, espinaca de agua, col rizada china, hojas verdes del camote, calabaza esponja, perila, y col china, por mencionar algunas. Por su parte, las hojas verdes del camote crecen fácilmente en zonas tropicales, y son consumidas con frecuencia en Taiwan. Adicionalmente tienen un gran contenido de flavonoles (quercetina, mirecitina y kaemferol) y flavonas (luteolina y apiginina), 462.82 mg/Kg, en relación con otras 15

verduras de la región. Con esto, se puede apreciar que para la región de Taiwan, las hojas verdes del camote son una buena fuente de flavonoles y flavonas.

Las frutas y verduras regionales de una cultura tienen un perfil de flavonoides definidos y forman parte de la ingesta diaria promedio de flavonoides para una población en particular. Esto permite suponer, que de acuerdo a los diferentes vegetales que conforman la dieta de los habitantes de una región específica, variará el valor de la ingesta diaria promedio de flavonoides. Y esto también dependerá en las subclases de flavonoides que hayan sido analizadas en las especies vegetales y que factores se tomaron en cuenta para incluirlos incluidas en dicho valor.

Es posible entonces deducir que según la cultura alimentaria de determinado país, serán predominantes una o más subclases de flavonoides de acuerdo con los alimentos presentes su dieta. Como ejemplo, se puede observar que una subclase de importancia en la dieta oriental son las isoflavonas cuya principal fuente es el frijol de soya. De acuerdo a la información sobre el consumo de soya y sus productos generada por la encuesta nacional de nutrición de Corea, se estimó en 21mg la ingesta diaria promedio de daidzeína y genisteína de la población coreana. En otro estudio el estimado de isoflavonas totales a partir de productos de soya fue de 27.2mg/día para 178 mujeres koreanas de mediana edad (35 a 60 años). (Choi Y-S., Lee B-H., et al., 2000)

El Instituto Nacional de Higiene de Alimentos y Nutrición de Hungría ha cuantificado la concentración de flavonoides (flavonoles y flavonas) en verduras comúnmente consumidas en ese país para poder conformar una base de datos nacional, descubrir las principales fuentes de flavonoides y estimar la ingesta promedio diaria en diferentes grupos de la población húngara. (Hóvári J., Lugasi A. y Dworschák E., 1999) Esto es tan solo un ejemplo

que refleja el creciente interés de algunos países por caracterizar los componentes con actividad biológica presentes en su dieta.

### ***7.5 Fitoquímicos en la dieta mexicana***

No cabe duda que gran parte de los alimentos a los que se les ha analizado su perfil de flavonoides son parte integrals observados pueden ser resultad, tan solo basta revisar nuevamente la tabla 8 y 9o de la presentes en. No obstante al gran número de alimentos que se han analizado, en comparación se queda enormemente corto considerando la vasta riqueza de diferentes frutas, verduras y otros productos vegetales que componen nuestra dieta.

Ya se ha mencionado que cada país de acuerdo a sus costumbres alimentarias tendrá una ingesta de fitoquímicos muy particular y distintiva. La gran tradición y diversidad de los ingredientes empleados en la cocina mexicana debe ser un impulso para fomentar la ciencia básica para que se identifiquen y cuantifiquen los compuestos con actividad fisiológica que los componen, como su contenido de flavonoides. Hay una larga lista de frutas, verduras y especias de nuestra dieta que pueden tener un enorme potencial por su composición fitoquímica y su actividad biológica. Por solo nombrar una pequeña muestra de alimentos de interés para este campo de investigación tendríamos: jamaica, huazontles, flor de calabaza, quelites, nopal, mango, tamarindo, zapote negro, epazote, capulines, nanches, tuna, tejocotes, calabacitas, y no olvidemos las especias, chiles y otros ingredientes del suculento mole. La herbolaria mexicana es también una extensa fuente de compuestos con actividad biológica que pueden en el futuro ser parte de suplementos y alimentos procesados. De no

ser analizados y aprovechados por las instituciones académicas, gubernamentales o el sector industrial nacional, seguramente lo serán eventualmente por las grandes empresas transnacionales que verán en estos alimentos y muchos otros más, valiosas oportunidades para el desarrollo de concentrados, extractos, ingredientes o alimentos funcionales (vea el capítulo 9). También existe la posibilidad del desarrollo de fitofármacos a partir de plantas de la herbolaria tradicional mexicana.

Igualmente hay que comprender que el intercambio cultural, producto de la apertura a mercados internacionales (la ya famosa "globalización"), promueve la incorporación de nuevos productos a nuestra alimentación. Esto no es un fenómeno nuevo, tan solo recordemos que antes del descubrimiento de América, en este territorio no había cítricos (limón, mandarina, naranja, toronja), ni manzanas, peras, mangos, piñas, plátanos, papayas, ciruelas, membrillos, duraznos, cebollas, ajos, lechugas y muchos otros vegetales que ahora nos parecen fundamentales en la dieta nacional (Lozoya X., 1999).

Por otro lado, a pesar de tener una oferta de productos vegetales muy rica y diversa, el patrón alimentario mexicano es bastante homogéneo. El patrón alimentario se refiere al conjunto de productos que un individuo, familia o grupo de familias consumen de manera ordinaria según un promedio habitual de frecuencia; existen una serie de ingredientes que predominan en la dieta. En México las frutas y verduras consumidas con mayor frecuencia son plátano, papaya, mango y jugo de naranja, y jitomate, cebolla de rabo, papa, ajo, zanahoria, cebolla blanca, lechuga romana y chile verde, respectivamente. (Torres F. y Trápaga Y., 2001) Entonces al analizar el contenido de fitocompuestos en la dieta

mexicana, habría que considerar inicialmente aquellos alimentos predominantes en nuestra dieta. El sería una actividad importante al realizar una caracterización fitoquímica de los alimentos que consumimos frecuentemente y así poder conocer, en el caso de flavonoides, cuales son las subclases predominantes en determinado alimento.

## CAPÍTULO 8

### Efectos de los flavonoides en la fisiología humana y su relación con enfermedades crónico degenerativas

Se reporta una extraordinaria gama de actividades fisiológicas y bioquímicas de los flavonoides sobre gran variedad de especies animales y sistemas celulares. Con frecuencia se menciona la actividad antibacterial, antiviral, antioxidativa, antiaterogénica y anticarcinogénica de estos compuestos.

Como ejemplo, se ha demostrado que los flavonoides pueden afectar *in vitro* la actividad de muchos sistemas enzimáticos de los mamíferos y en la mayoría de los casos se ha demostrado una notable relación estructura-actividad. (Manthey J.A., Buslig B.S., 1998) Entre aquellos sistemas enzimáticos que ven modificada su actividad en presencia de flavonoides están: Histidina descarboxilasa, hialurodinasa, deshidrogenasa láctica, piruvato cinasa, catecol-O-metiltransferasa, aldosa reductasa, proteína cinasa C, proteína tirosin cinasa, adenosin trifosfatasa, fosfolipasa C, ornitin descarboxilasa, adenilato cinasa, amilasa, topoisomerasa, y glutatión-S-transferasa.

Así también, se reconoce la actividad antiviral de los flavonoides desde 1940, pero solo recientemente se han realizado intentos para modificar sintéticamente las estructuras naturales de estos compuestos para perfeccionar su actividad antiviral. Se ha reportado que quercetina, morina, rutina, dihidroquercetina (taxifolina), dihidroflisetina, leucocianidina, cloruro de pelargodina, apigenina, catequina, naringina y hesperitina poseen actividad antiviral ante algunos de 11 tipos de virus. La actividad antiviral parece estar asociada a los

compuestos no glicosídicos y un requisito para la actividad antiviral parece ser la hidroxilación en la posición 3 del núcleo flavona. (Middleton E. y Kandaswami Ch., 1994)

Sin embargo, las propiedades antiaterogénicas y anticarcinogénicas de los flavonoides son las más sobresalientes, y han generado gran interés de la comunidad científica por el significado que pueden tener para ampliar la comprensión y posible control de estas enfermedades. De tal forma, el siguiente capítulo se centra en las causas de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, y los estudios epidemiológicos que se han realizado para relacionar la ingesta de flavonoides con la posibilidad de prevenir estas enfermedades. Asimismo se hace mención de los factores que participan en la patogénesis de estas enfermedades como la acción de los radicales libres como iniciadores de procesos oxidativos en las macromoléculas del cuerpo.

### ***8.1 Estudios epidemiológicos***

Los estudios epidemiológicos se realizan para identificar factores que son comunes para los pacientes de determinada enfermedad, de acuerdo a su historial y estilo de vida. (Trichopoulos T., Li F.P., Hunter D.J., 1996) Por lo tanto proporcionan evidencias para explicar como la exposición a ciertos factores o características comunes en determinados grupos de la población puede aumentar significativamente la posibilidad de contraer y desarrollar alguna enfermedad específica.

En E.U.A. se han realizado estudios epidemiológicos durante los últimos 25 años que han correlacionado consistentemente los hábitos dietarios como un factor en la etiología de

las 5 principales causas de muerte en ese país, incluyendo enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, infartos, diabetes mellitus no insulino dependiente (tipo II) y aterosclerosis.

Entre los compuestos en los alimentos que han sido evaluados en estudios epidemiológicos como factores relacionados con la prevención de enfermedades crónico degenerativas están la Vitamina C, vitamina E, carotenos, la fiebra dietaria y los flavonoides. En el caso de flavonoides, por lo general se han realizado estudios epidemiológicos para ligar la ingesta diaria de estos compuestos con la incidencia de contraer y/o morir por causa de dos grandes grupos de enfermedades crónico degenerativas (ya que cada uno comprende varias enfermedades diferentes): cáncer y enfermedades cardiovasculares. Algunos estudios han correlacionado solo uno de estos grupos, otros ambos.

Hasta el momento existen 3 estudios epidemiológicos sobresalientes que han investigado la asociación entre la ingesta de flavonoles y flavonas de la dieta y el riesgo de contraer cáncer. Estos estudios epidemiológicos se denominan cohorte que significa el seguimiento de un determinado segmento de población por cierto tiempo para evaluar un factor específico. Dos de estos estudios están basados en cohortes de individuos realizados en Holanda, El Estudio de Gente Mayor de Zutphen (Hertog M., Feskens, E., Peter C.H., *et al.*, 1993) y el Estudio Cohorte de Holanda. El tercero es un estudio de ecología comparativa entre cohortes de varios países, el Estudio de 7 Países.(Hertog M., Kromhout D., Aravanis C., *et al.*, 1995) En el Estudio de Gente Mayor de Zutphen, se determinó la ingesta base de flavonoles y flavonas a partir de registros dietéticos de 800 hombres de 65 a 85 años en 1985. El seguimiento fue de 5 años y solo 57 individuos contrajeron cáncer del tracto alimentario y vías respiratorias, pero la ingesta de flavonoles y flavonas no se asoció a estos

tipos de cancer. En el Estudio Conjunto de Holanda tampoco se encontró una asociación entre el consumo del flavonol, quercetina y la subsecuente incidencia de cáncer. Este estudio se realizó con 120,852 hombres y mujeres de 55 a 69 años, que llenaron un cuestionario de frecuencia semicuantitativa de alimentos en 1986 y fueron monitoreados durante 4.3 años. En este periodo se presentaron 200 casos de cáncer de estomago, 650 de cáncer de colón, y 764 casos de cáncer de pulmón. La ingesta base de flavonoides no fue independiente de otros factores de riesgo asociados a ninguno de estos tipos de cáncer. (Hertog et al., 1997)

Un objetivo del Estudio de 7 Países, iniciado en 1960, fue investigar si la ingesta de flavonoides podía explicar las diferencias en los índices de mortalidad por enfermedades crónicas entre poblaciones. Este estudio consideró tanto enfermedades cardiovasculares como cáncer de diversas clases. Mostró que la ingesta basal de flavonoides no se relacionaba a las diferencias en el número de mortalidad por cáncer sitio específicas después de 25 años de seguimiento. (Hertog M., Kromhout D., Aravanis C., Hollman P.C.H., et al., 1995)

A diferencia de las leves asociaciones entre la ingesta de flavonoides y la protección contra el cáncer en humanos, una asociación inversa entre las enfermedades cardiovasculares y la ingesta de flavonoides se ha observado en 4 de 6 estudios epidemiológicos (Breinholt V.,1999). En la tabla 13 se resumen 5 de ellos con el respectivo efecto protector positivo o negativo.

Tabla 13. Estudios epidemiológicos en la relación entre la ingesta de flavonoides y enfermedades cardiovasculares (EC) y ataques cardiacos (AC).

Población	Número de individuos	Edad y años de seguimiento	Protección	Ingesta de flavonoides (mg/d)
Zutfen, Holanda, EC <sup>(1)</sup>	805 hombres	65- 84 (5)	+	12- 42
Finlandia, EC	5130 hombres y mujeres	30- 69 (20)	++	> 5
Zutfen, Holanda, AC <sup>(2)</sup>	552 hombres	50- 69 (15)	+	> 30
E.U.A., EC	34789 hombres	40- 75 (6)	-	7- 40
Caterfili, Inglaterra, EC	1900 hombres	49- 59 (14)	-	14- 43

Adaptado de Breinholt V., 1999, <sup>(1)</sup>Hertog M., *et al.*, 1993, <sup>(2)</sup>Sirving K., *et al.*, 1996

Así como los flavonoides, los ácidos fenólicos también están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Alimentos ricos en flavonoides como la manzana, el té y el vino tinto, contienen, a su vez, abundantes cantidades de ácidos fenólicos. Lo último complica la interpretación del papel de los flavonoides en estudios epidemiológicos, pues el efecto observado puede ser en parte por los ácidos fenólicos presentes en los alimentos. De momento, no se han conducido estudios epidemiológicos para investigar el potencial protector de los ácidos fenólicos en el cáncer humano. Para determinar el papel individual o combinado de flavonoides y ácidos fenólicos en enfermedades cardiovasculares, es

necesario realizar investigaciones que consideren, entre otros aspectos, la ingesta de ácidos fenólicos y los niveles en plasma de flavonoides y ácidos fenólicos empleando biomarcadores. (Breinholt V., 1999)

## **8.2 Los procesos oxidativos y su efecto en el desarrollo de enfermedades**

El oxígeno es evidentemente un elemento esencial para la vida de cualquier organismo de respiración aerobia. Sin embargo, este elemento también está ligado a una serie de procesos oxidativos que le son potencialmente peligrosos al sistema de los seres vivos. Por lo tanto un importante prerrequisito para el desarrollo de los organismos aerobios fue la detoxificación de especies de oxígeno reactivas y así contrarrestar el potencial altamente tóxico del oxígeno. (Sies H., 1985) Las primeras formas de vida aerobia evolucionaron múltiples líneas de defensa para contrarrestar los efectos tóxicos del oxígeno y al mismo tiempo desarrollaron la forma de emplearlo para generar energía.

A pesar de las defensas antioxidantes de los organismos, la acción de radicales libres y otras especies de oxígeno reactivas pueden causar daño oxidativo a nivel de las principales macromoléculas y componentes del material biológico de los organismos. El daño oxidativo resultante afecta proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos del ADN y aminoácidos libres. (Langseth L., 2000) Esto puede provocar interferencias en la función normal de las células del cuerpo. Los procesos oxidativos son eventos normales del organismo que pueden formar la base de un número de fenómenos fisiológicos y patológicos tan diversos como:

( Sies H., 1985):

- Inflamación

- Envejecimiento
- Carcinogénesis
- Acción y toxicidad de los medicamentos
- Defensa inmune contra protozoarios patógenos

Se ha comprobado que los procesos de oxidación y generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) están involucrados en varios pasos del proceso de carcinogénesis y que juegan un papel en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en varios pasos. (Breinholt V. 1999) Como se mencionó, las ERO tienen la habilidad de inducir alteraciones en el material genético al oxidar bases de ADN específicas o indirectamente al oxidar proteínas o lípidos que mantiene la integridad y homeóstasis de las células individuales. La acumulación, con los años, de estas modificaciones celulares puede incrementar el riesgo de contraer enfermedades crónico degenerativas. A esto hay que añadir la predisposición congénita de los individuos a determinadas enfermedades.

### ***8.2.1 Generación de radicales libres en el organismo***

Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno pueden ser sintetizados en el cuerpo de alguna de las siguientes formas (Salonen J.T., 1999):

- en la cadena respiratoria durante el metabolismo energético que se lleva a cabo en las mitocondrias
- como productos de los sistemas de defensa antimicrobial del cuerpo

- producidos por reacciones que son consecuencia de la exposición exógena del humo del cigarro, una dieta desbalanceada, ejercicio exhaustivo, contaminantes ambientales y por tóxicos en los alimentos.

En el humano existen varios sistemas de defensa antioxidante de carácter enzimático para protegerse de los efectos de los radicales libres. Un ejemplo es la superóxido dismutasa, la cual convierte el superóxido a peróxido de hidrógeno. Este último es removido por otra enzima, la catalasa. (Magnani L. *et al.*, 2000)

El superóxido es una sustancia biológicamente importante que puede descomponerse y formar especies oxidativas más fuertes, como oxígeno singlete y radicales hidroxilo. Mientras que el radical hidroxilo es altamente reactivo y puede ocasionar daño oxidativo al ADN, lípidos y proteínas. (Gordon M.H., 1996)

Los sistemas de defensa antioxidante no son completamente efectivos, para lo cual lo existen enzimas que ayudan a contrarrestar el daño ocasionado por las especies de oxígeno reactivas. Algunas destruyen proteínas dañadas por radicales libres, mientras otras retiran ácidos grasos oxidados de las membranas y otras reparan el daño de radicales libres al ADN. Todas estas defensas enzimáticas son intracelulares, pero también hay defensas antioxidantes que se encuentran extracelulares como la lactoferrina y la ceruloplasmina o transferrina. (Frei B., 1994)

## 8.2.2 Estrés oxidativo y enfermedades crónico degenerativas

Con el uso de biomarcadores de daño oxidativo sobre lípidos, proteínas y ADN, detectados en pacientes con aterosclerosis, ciertos cánceres, enfermedades neurodegenerativas y trastornos pulmonares, se ha demostrado la contribución de radicales libres como mediadores de procesos de patogénesis de enfermedades humanas. En los mecanismos de deterioro asociados con el desarrollo de enfermedades se han identificado una serie de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, incluyendo el radical superóxido, peróxido de hidrógeno, hipoclorito, radical hidroxilo, radicales lípido alcoxilo y peroxilo, peroxinitrito, óxido nítrico y radical dióxido de nitrógeno. (Rice-Evans C., 1999)

En el cuerpo humano, bajo condiciones normales, existe un balance entre los factores que promueven la oxidación y las defensas antioxidantes que inhiben este proceso (en orden aleatorio en la tabla 14. Un incremento en la producción de factores prooxidantes o la deficiencia en los sistemas de defensa antioxidante puede perturbar el balance en dirección de una oxidación aumentada. Entonces se le llama estrés oxidativo a la situación de desequilibrio ente prooxidantes y antioxidantes. (Langseth L., 2000)

En los organismos vivos, la gama de sistemas antioxidantes de defensa les sirve para contrarrestar las reacciones potencialmente dañinas iniciadas por los metabolitos de oxígeno (ver tabla 14). Estos abarcan todos los niveles de protección: prevención, intercepción y reparación. Algunos de ellos son sintetizados *in vivo* y otros son convenientemente aportados

por la dieta. Los sistemas antioxidantes de defensa se pueden clasificar en 3 categorías (Rice-Evans C., 1999):

- antioxidantes preventivos que suprimen la formación de radicales
- antioxidante secuestrantes de radicales libres que inhiben el inicio de reacciones en cadena e interceptan la propagación de estas
- antioxidantes involucrados en procesos de reparación

Tabla 14 . Factores prooxidantes y las defensas antioxidantes

Factores Prooxidantes	Defensas antioxidantes en los sistemas biológicos	
	No enzimáticos	Enzimáticos
Inflamación	$\alpha$ Tocoferol (Vit E)	Superóxido dismutasa
Humo del cigarro	Ascorbato (Vit C)	GSH peroxidasas
Contaminantes del aire	$\beta$ Caroteno (pre Vit A) y otros carotenoides	Catalasa
Radiación	Urato	Glutatión
Dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados	Proteínas del plasma	Glutatión peroxidasa
Carcinógenos	Aditivos alimentarios (e.g. BHA, BHT)	NADPH quinona oxido-reductasa
		Provisión de NADPH

Adaptado de Sies H., 1985 y Lansgeth L., 2000

El consumo de alimentos que contienen nutrientes antioxidantes y sustancias no nutrimentales antioxidantes, por medio de mecanismos de secuestro de radicales libres o de

iones metálicos pueden contribuir a reducir el estrés oxidativo y ayudar a restablecer el balance prooxidante/antioxidante del organismo. (Katur Ch, Kapoor H.C., 2001)

Como ya se mencionó, los radicales libres, como las especies de oxígeno reactivas, desfavorecen el estrés oxidativo y se cree que contribuyen con una gran variedad de enfermedades humanas, especialmente aquellas enfermedades crónico degenerativas asociadas con la vejez. Durante la vejez, las células y tejidos del cuerpo sufren cambios degenerativos, los cuales aumentan la vulnerabilidad a enfermedades. De esta se cree que los radicales libres contribuyen a esta degeneración biológica a través del tiempo. Algunas de las condiciones en las que se cree que participan los radicales libres son:

- cáncer
- aterosclerosis y sus consecuencias, incluyendo enfermedades cardiovasculares
- enfermedades que involucran inflamación, como artritis reumatoide
- mal de Parkinson
- mal de Alzheimer
- cataratas
- degeneración macular (manchas y lesiones cutáneas)
- envenenamiento por radiación
- enfisema
- enfermedades que implican una sobrecarga de hierro, como hemocromatosis

Después de las enfermedades del corazón, el cáncer es la segunda gran causa de mortalidad a nivel internacional. Aunque la predisposición genética continúa considerándose un factor de alto riesgo, la evidencia epidemiológica existente sugiere que aproximadamente el 30% de las muertes por cáncer se relacionan con la dieta y en general por la elevada ingesta de alcohol, y productos de pirrolisis, nitritos, aminas, etc. (Caragay A.B., 1992)

Los flavonoides pueden proteger contra enfermedades crónico degenerativas por tres posibles mecanismos: (Frankel E.N. y Meyer A.S., 2000)

- 1) inhibiendo la oxidación de LDL, protegiendo al colesterol de formar compuestos citotóxicos y previniendo aterogénesis.
- 2) interfiriendo con la respuesta inmune al reducir los monocitos de las paredes de los vasos, y
- 3) interfiriendo con la agregación de plaquetas involucradas en el proceso de coagulación y previniendo trombosis.

Por la alta incidencia a nivel mundial de cáncer y enfermedades cardiovasculares, y los efectos observados de los flavonoides sobre estas, se describirán continuación de aspectos relacionados con estas enfermedades.

### **8.3 Cáncer**

El término cáncer abarca un grupo de enfermedades que tienen como rasgo en común que a una célula o grupo de células que debido a la acumulación de un número de mutaciones a lo largo de los años, son alteradas de tal manera, que pierden control de su crecimiento. A causa de su incapacidad de restringir su proliferación, las células comienzan a replicarse desmedidamente, y eventualmente se forman los tumores, los cuales consisten principalmente de estas células anormales. Finalmente acaban afectando el funcionamiento normal del órgano donde estas células anormales se localizan. El principal riesgo de los

tumores malignos es que sufran metástasis, permitiendo que sus células migren y extiendan la enfermedad a otras partes del cuerpo. (Trichopoulos T., Li F.P., Hunter D.J., 1996)

Existe evidencia considerable de que la carcinogénesis es un proceso de varios pasos, el cual puede ser iniciado y modulado por agentes químicos presentes en el ambiente, así como por virus y radiación ultravioleta. Los compuestos que químicamente inhiben la carcinogénesis inducida se les denomina anticancerígenos.

Las etapas principales del proceso de carcinogénesis se caracterizan por lo siguiente:

- En la fase de iniciación, se daña irreversiblemente el ADN celular, lo que proporciona a la célula una ventaja de crecimiento relativa, posiblemente debida a la activación de proto-oncogenes.
- En la fase de promoción, se estimula la proliferación de la célula iniciada, posiblemente por el enlace y activación de receptores celulares involucrados en el control de crecimiento o por inhibición de la comunicación intra- o inter- celular.
- La fase de promoción lleva a un crecimiento benigno que puede llevar a cáncer a la tercera fase de progresión. La conversión maligna requiere, como la iniciación, de alteraciones genéticas en las que se inhibe aún más el control de crecimiento, posiblemente por la inhibición de genes supresores de tumores.

Es probable que los múltiples eventos de iniciación y promoción estén involucrados activamente en el desarrollo y crecimiento de tumores. La mayoría de las evidencias de este proceso multipasos se ha derivado con modelos en piel de ratón. En general se consideran 3 pasos distintivos de la carcinogénesis por agentes químicos: iniciación, promoción y conversión maligna o progresión. (Caragay A.B., 1992)

Se cree que el cáncer modulado por agentes químicos surge del efecto de dos tipos diferentes de cancerígenos. Una de estas categorías comprenden agentes que pueden dañar los genes involucrados en el control de la proliferación y migración celular. La otra categoría son agentes que no alteran los genes, pero sí promueven selectivamente el crecimiento de células anormales y sus precursores. Existe una cantidad abrumadora de evidencias experimentales y estudios epidemiológicos que ligan las formas más comunes del cáncer humano con factores relacionados al ambiente del estilo de vida, tal como la dieta. Lo anterior combinado con factores genéticos, influye a la susceptibilidad del individuo a estos factores. Un gran número de estudios epidemiológicos demuestran que el consumo de frutas y verduras está relacionado inversamente con el riesgo de contraer cáncer, especialmente aquellos del tracto alimentario y las vías respiratorias. Las frutas y verduras contienen un gran número de compuestos, que podrían por una variedad de mecanismos, justificar estos efectos protectivos del cáncer. (Hertog *et al.*, 1997) Entre los componentes de los alimentos que tradicionalmente han recibido más atención por sus efectos anticancerígenos, son las vitaminas, particularmente la vitamina C y la provitamina A, y la fibra dietaria. Sin embargo, se ha mostrado que los tejidos vegetales contienen una variedad de metabolitos secundarios potencialmente anticancerígenos, incluyendo flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, glucosinolatos, y carotenoides. En la figura 13 se pueden observar los etapas principales en el desarrollo del cáncer donde pueden estar involucrados estos fitocompuestos, así como los factores que lo originan.

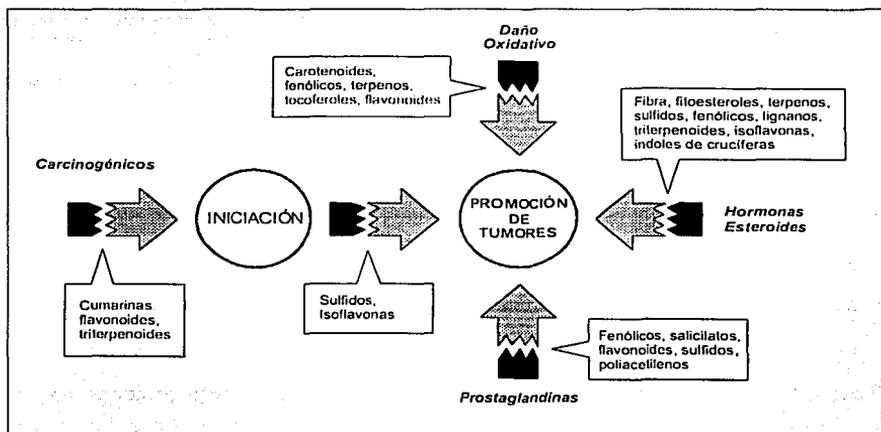


Figura 13. Posible participación de fitoquímicos en las etapas principales de la carcinogénesis.

Caragay A.B., 1992

Se ha demostrado a través de distintos estudios que la querucitina y otros flavonoides son anticancerígenos al inhibir la formación de tumores inducidos en ratas y ratones por compuestos carcinogénicos. Los carcinogénicos que se han utilizado para inducir la promoción de tumores en piel de rata son 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA por sus siglas en inglés), 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), benzo(a)pireno (BP), 3-metilcolantreno, urea N-metil-N-nitroso. (Hertog M., *et al.*, 1997) También se ha observado que los flavonoides son inhibidores de un gran número de enzimas necesarias para la activación celular en cancer, así como para la respuesta inflamatoria y alérgica. Estas enzimas incluyen: proteína

cinasa C, la proteína tirosina cinasa, lipoxigenasas, fosfatasa A2, fosfolipasas, ciclooxigenasas, topoisomerasa, NADH oxidasa y otras. (Manthey J.A., Buslig B.S. 1998)

La relación de los flavonoides en el proceso de carcinogénesis ha sido y es todavía un tema de controversia. Los estudios dirigidos específicamente a investigar el potencial de los flavonoides como moduladores de la carcinogénesis en animales experimentales son inconclusos ya que se obtienen resultados contradictorios. Por un lado se han observado efectos protectores, y por otro ningún efecto protector alguno o también una respuesta de cáncer incrementada. No obstante, una respuesta positiva o efecto protector ha sido la observación más frecuente en estas investigaciones. (Breinholt V., 1999)

#### ***Efecto genotóxico***

Debido a que los flavonoides son constituyentes regulares de nuestra dieta normal, ha aumentado el interés de examinar sus posibles efectos genotóxicos. Los trabajos con relación a la genotoxicidad de los flavonoides se ha desarrollado siguientes direcciones:

- el sondeo de diferentes flavonoides en cepas de *Salmonella typhimurium* y otros microorganismos para aclarar los requerimientos estructurales para la mutagenicidad.
- pruebas de mutagenicidad empleando extractos de alimentos que contienen flavonoides.
- examinando efectos genéticos en sistemas no microbiales *in vitro* e *in vivo*.
- examinando carcinogénesis en animales experimentales.

Más de 70 flavonoides se han examinado para comprobar mutagénesis en cepas de *Salmonella typhimurium* utilizando la prueba de Ames. Solo las agliconas de los flavonoides han mostrado una apreciable actividad mutagénica, entre algunos que se han reportado como mutagénicos activos están quercetina, miricetina, morina, tamarixetina y kaemferol. (Middleton E., Kandaswami Ch., 1994)

#### **8.4 Aterogénesis y enfermedades cardiovasculares**

El estudio de la relación de los flavonoides con las enfermedades cardiovasculares se ha estimulado, en gran parte, por el descubrimiento de la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares en la población francesa. Esto a pesar de tener una dieta alta en grasas y en la cual prevalece el hábito de fumar; a esta aparente contradicción se le denominó "La Paradoja Francesa". Se pensó que un factor que podía contribuir era el alto consumo de vino tinto en Francia y esto fue reforzado en 1993, cuando se mostró que los polifenoles del vino tinto inhibían la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LBD). (McAnlis G.T., 1998)

Es notable la actividad antioxidante de los flavonoides, en especial los flavonoles, y de particular importancia, en la protección contra oxidación de LBD, un paso clave en la patogénesis de la aterosclerosis. (Lean M.E.J. *et al.*, 1999) De acuerdo a una hipótesis aceptada ampliamente, la causa fundamental de enfermedades cardiovasculares, infartos y enfermedades de las arterias periféricas son las lesiones ateroscleróticas. La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias de mediano a gran tamaño del cuerpo. Se

desarrolla principalmente en la capa más interna de las tres capas de la pared arterial. Esta capa, conocida como túnica íntima, es normalmente muy delgada y se va engrosando a causa de la lesión aterosclerótica. (Leake D.S., 1997)

La lesión aterosclerótica va creciendo durante un periodo de años o de décadas y su abultamiento puede impedir el flujo de la sangre. La mayoría de los ataques al corazón se deben a la repentina fisura de la lesión. Las fisuras hacen que sustancias dentro de la lesión entren en contacto con la sangre y que se formen coágulos, llamados trombos. Estos pueden extenderse al interior de la arteria e impedir el flujo de la sangre. Si son arterias que llevan sangre al corazón puede darse un infarto miocárdico y si son arterias que llevan sangre al cerebro, una trombosis. En ocasiones hay lesiones en las arterias que irrigan el cerebro, estas lesiones debilitan las arterias y pueden empezar a filtrar sangre al tejido del cerebro, causando un infarto hemorrágico.

Se cree que la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LBD) juega un papel clave durante la temprana aterogénesis. (Aviram M., Aviram R., Fuhrman B., 1999) La teoría oxidativa de la formación de aterosclerosis, propone que las LBD no son aterogénicas por sí mismas, más bien, su oxidación en el interior de la membrana arterial. La función de las LBD es de transportar colesterol a las células. Para hacerlo, la proteína apo B-100, que las conforma, se enlaza a los receptores de LBD de las células y la LBD es introducida a la célula por endocitosis y llevada a los lisosomas. Ahí actúan las enzimas lisosomales para liberar los ésteres de colesterol de las LBD para que estén disponibles para la síntesis de membranas o hormonas esteroideas. Las LBD del plasma entran a la membrana

arterial y se cree que son oxidadas localmente por agentes oxidantes derivados de las células presentes en la lesión aterosclerótica, los macrófagos, células de músculo liso, linfocitos y células endoteliales. El tipo de célula más activa para la oxidación *in vitro* de LBD son los macrófagos. Se cree que las LBD oxidadas son reconocidas por varios receptores secuestrantes en la superficie del macrófago e introducidas a los macrófagos por endocitosis mediada por receptores. La cantidad de colesterol de las LBD liberado en los macrófagos, sobrepasa su capacidad y comienza a acumularse hasta que el macrófago se convierte en célula espuma (figura 14). (Leake D.S., 1997) La formación de células espuma cargadas de colesterol son un sello distintivo de los inicios de aterogénesis.

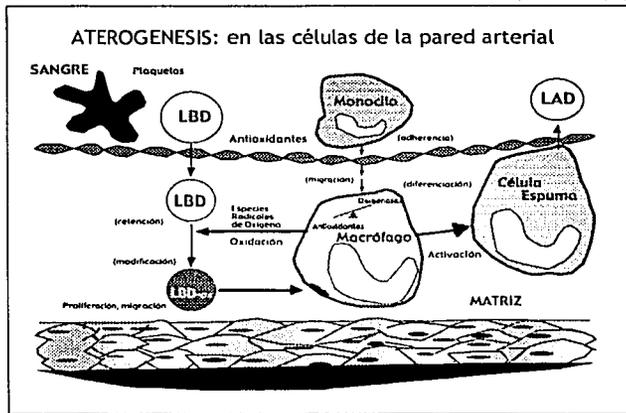


Figura 14. Cambios que se dan en las células de la pared arterial a partir de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad que eventualmente dan lugar a la formación de lesiones ateroscleróticas. Aviram M., 1999

Se desconoce con certeza, el mecanismo exacto en que las células de la pared arterial oxidan las LBD. Sin embargo, se sabe que debe involucrar la abstracción, por parte de un radical libre no, de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono en un ácido graso esterificado poliinsaturado en una LBD (figura 15). El radical lípido alquilo resultante, entonces sufrirá un rápido rearrreglo para formar un dieno conjugado, el cual sucesivamente formará el radical lípido peroxilo al enlazarse con oxígeno molecular. Este último atacará otro ácido graso poliinsaturado convirtiéndose ahora en un lípido hidroperóxido, mientras que el otro ácido graso poliinsaturado pasa a radical lípido alquilo. Este continuará el proceso como lo hizo el original, iniciándose así la reacción en cadena de peroxidación lipídica. Esta reacción en cadena se mantiene bajo control en las LBD por los antioxidantes que contienen. (Leake D.S., 1997)

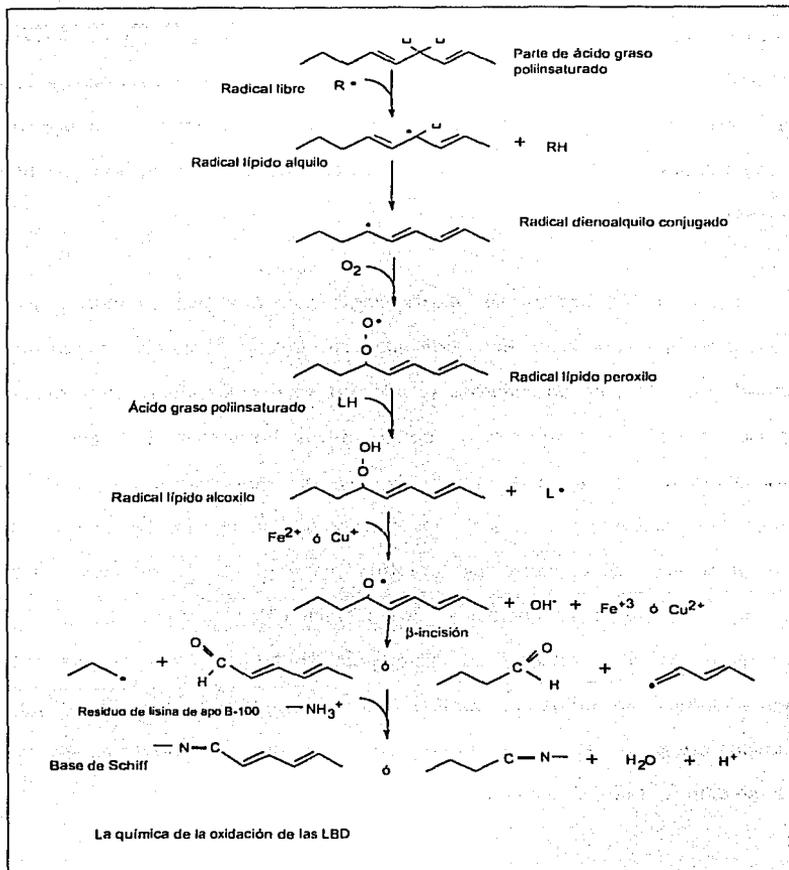


Figura 15. Reacción en cadena iniciada por radicales libres de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las lipoproteínas de baja densidad.

Leake D.S., 1997

La oxidación de LBD celular generalmente requiere de una fuente de iones de hierro o cobre. Se ha mostrado que las lesiones ateroscleróticas avanzadas contienen iones hierro y cobre catalíticamente activos. De estos iones metálicos, el cobre es más potente que el hierro como catalizador de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las LBD en la pared arterial.

Los estudios *in vitro* que se han realizado sobre la actividad biológica de flavonoides han mostrado que son compuestos con alta actividad antioxidante. La cual representa la propiedad más relevante en cuanto a su participación en los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativos. Sin embargo, todavía se carece de mucha información sobre sus efectos *in vivo*. El desarrollo de patologías como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son procesos multifactoriales y que requieren de muchos años para manifestarse. De tal forma, los estudios epidemiológicos han permitido relacionar la ingesta de flavonoides en los alimentos con un menor riesgo de que surjan estas enfermedades o retardar su inicio, especialmente en el caso de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, también hay que considerar los demás nutrimentos y fitoquímicos presentes en los alimentos que hayan podido contribuir a los efectos positivos, cuando se dieron, de estos estudios.

## CAPÍTULO 9

### Los flavonoides dentro del concepto de alimento funcional

#### *9.1 Generalidades sobre alimentos funcionales*

En las últimas dos décadas, ha emergido un nuevo paradigma sobre la nutrición que pone mayor énfasis en los aspectos positivos de la dieta y su intervención en el mantenimiento de la salud y el bienestar. (Bidlack W.R., 1998) Este paradigma va más allá del papel de los nutrientes en los alimentos y que son requeridos para sustentar la vida y el crecimiento adecuado del organismo. Sino uno que reconsidera, enriquece y revalora el papel de aquellos componentes de los alimentos, tradicionalmente considerados como no nutritivos, a uno de prevenir o retardar el inicio prematuro de enfermedades crónicas degenerativas. A partir de este nuevo paradigma yace el fundamento esencial de la actual corriente de los llamados alimentos funcionales.

La idea de los "alimentos funcionales" fue desarrollada en el Japón durante la década de 1980s como una necesidad para reducir el alto costo de los seguros de salud que aumentaban por la necesidad de proveer cobertura a una población con mayor esperanza de vida, gracias a los avances en cuidado médico y una buena nutrición. Hasta el momento, Japón es el único país que ha formulado un proceso regulatorio específico para la aprobación de alimentos funcionales. Estos son conocidos como "alimentos para uso específico de salud" ("foods for specified health use" o FOSHU) y aquellos alimentos que son elegibles pueden portar un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar. (Hasler, C. M., 1998, Vasconcellos J.A., 2000)

De forma progresiva se les ha dado a los alimentos una nueva connotación del término funcionalidad y como resultado, la prevención de enfermedades a base de la dieta diaria es vista cada vez mas como una opción para una vida saludable. Lo cual ha llevado al desarrollo de productos diseñados para cubrir necesidades de salud específicas.

El término alimentos funcionales ha estado sujeto a intenso debate por las diferentes acepciones que puede denotar y a pesar de no estar reconocido legalmente, este concepto está adquiriendo aceptación por parte del consumidor. (Milner J.A., 1998) Igualmente, existen alrededor del concepto de alimentos funcionales, diversos enfoques según el país, institución, autor y otros marcos de referencia. El nombre de alimentos funcionales es empleado con frecuencia en los países europeos, y en los E.U.A. se utiliza con mayor frecuencia el de nutracéuticos. En realidad no existe un acuerdo para definir en forma precisa lo que son los "alimentos funcionales". Muchos consideran que se trata de un concepto aún en desarrollo y hay quienes los han considerado como productos alimentarios intermedios entre los tradicionales y los productos medicinales. (Vasconcellos J.A., 2000)

Al desglosar esta expresión de alimentos funcionales, se entiende que cualquier alimento por concepto se le puede considerar funcional. Ya que estos nos proporcionan los nutrimentos esenciales para la vida, además de aportarnos una oleada de sensaciones agradables a los sentidos como el color, aroma, sabor, calor, frescura, textura, etc. A su vez, en tecnología de alimentos se utiliza el término funcionalidad para hacer referencia a las propiedades fisicoquímicas de aditivos e ingredientes utilizados en la industria alimentaria. Por ejemplo las proteínas aisladas del suero de la leche se usan como aditivos y tienen

características funcionales específicas al añadirse a un producto como retención del agua, fuerza del gel formado, temperatura de desnaturalización, etc.

Durante la década de los 90 han proliferado conferencias, reportes, libros y artículos (tanto científicos como comerciales) sobre los alimentos funcionales, y es notable y admirable la constante mención de una afirmación que nos remite al conocimiento clásico de hace unos 2500 años por parte del padre de la medicina, Hipócrates que dijo:

"Que tu alimento sea tu medicina y que tu medicina sea tu alimento"

Dicha aseveración además de mostrar su vigencia actual, se ha usado como ejemplo para darle fuerza al concepto de alimentos funcionales. Por otro lado, también expresa la transición que ha tenido la medicina tradicional, al ir incorporando hierbas, especias y plantas medicinales en forma de extractos y concentrados a los productos alimentarios comunes.

Consecuentemente al irse reconociendo las propiedades promotoras de la salud de ciertos alimentos contenidos en la dieta, surgen diversas cuestiones inherentes al hacer la transición de los hechos científicos a un beneficio directo a la sociedad a través de planeación de cultivos, suministro de alimentos, oferta de nuevos productos, programas de información, etc (figura 16 ).

Los avances en nutrición y salud pública en Estados Unidos en el siglo XX ilustran el progreso de la nutrición de un enfoque de acción para la prevención de enfermedades por deficiencias nutrimentales a uno de prevención de enfermedades no comunicables (enfermedades crónico degenerativas). (Center for Disease Control, 1999) Dicha transición se vuelve aparente también en otros países desarrollados, particularmente en las sociedades europeas, donde igualmente se ve el interés de los gobiernos e institutos de salud en invertir

en investigación básica de los compuestos biológicamente activos de los alimentos y su relación con el mantenimiento de la salud.

Entonces, aunque todavía prevalece la desnutrición en varios países del mundo o en segmentos particulares de la población de otros, las deficiencias nutrimentales se han desplazado en países industrializados por los excesos de ciertos componentes de los alimentos y por lo consiguiente, un desbalance en la dieta. Identificando los factores externos que contribuyen a las muertes prematuras, pueden auxiliar los esfuerzos, mejorar la calidad de vida y reducir los costos de salud pública (Bidlack W.R. y Wang W., 1999).

En E.U. A se estima que la velocidad de crecimiento del mercado de alimentos funcionales es de 15 a 20% por año (Nash N.P., 2001). Se calcula que dicha industria tiene un valor global de \$47.6 billones de dólares. El segmento más grande es el estadounidense con \$18.25 billones, seguido del europeo con \$15.4 billones y el japonés (el único país con una estructura legislativa) con \$11.8 billones. En Europa los países con mayor participación de mercado son Alemania con \$ 5.59 billones, Francia con \$3.37 billones y el Reino Unido con \$2.4 billones. (Sloan E.A., 2002)

## ***9.2 Compuestos con actividad biológica en los alimentos***

Esta revisión se ha centrado principalmente en los flavonoides y otros compuestos polifenólicos. No obstante existen también otros grupos de fitoquímicos en las plantas con importante actividad biológica y que pueden contribuir al efecto preventivo de enfermedades crónico degenerativas. La comprensión científica de cómo estos componentes no

nutrimentales actúan en el organismo todavía no es muy clara ya que estos compuestos se observan bajo una nueva percepción desde hace relativamente poco. No solo se está identificando y encontrando que aparentemente existen cientos de ellos en los alimentos, sino que también se está logrando establecer los mecanismos de acción de algunos de ellos. Es importante considerar que a pesar de que los fitoquímicos no contribuyen al aporte calórico o con material estructural al organismo, si pueden cumplir importantes funciones en el organismo. (Vasconcellos J.A., 2000 )

Desde la década de los 80s se han conducido estudios reveladores que indican la existencia de aproximadamente 14 clases de fitocompuestos diferentes que se presentan normalmente en los alimentos. Se cree que varios de estos tienen el potencial de interferir o bloquear las rutas bioquímicas a nivel celular que llevan al desarrollo de tumores malignos. Estos grupos son los siguientes: sulfidos, fitatos, glucaratos, flavonoides, carotenoides, cumarinas, mono- y tri-terpenos, lignanos, ácidos fenólicos, indoles, isotiocianatos, ftálicos y poliacetilenos. (Caragay A.B., 1992) Igualmente, se tiene que tomar en cuenta que aparte de compuestos con actividad biológica provenientes de fuentes vegetales, también los hay de fuentes animales como los ácidos grasos omega-3 en aceites de pescado o el ácido linoléico conjugado en derivados lácteos. Los compuestos con actividad biológica que se consideran hasta el momento como más relevantes se resumen en la tabla 15, con sus respectivas fuentes alimentarias y los beneficios que pueden aportar a la salud. Adicionalmente están las fuentes microbianas como microorganismos del género *Bifidobacterium* que favorecen el tracto gastrointestinal y la flora bacteriana, conocidos como probióticos.

Tabla 15. Constituyentes biológicamente activos en alimentos que pueden prevenir enfermedades crónico degenerativas.

Compuesto bioactivo	Fuente alimentaria	Beneficio potencial a la salud	Posible mecanismo y funciones
β- caroteno licopeno luteonina y otros carotenoides	jitomate zanahoria espinaca camote frutas cítricas	reduce enfermedades cardio- vasculares reduce el cáncer	antioxidante, secuestrante de radicales libres y oxígeno singuleto ; inducción de comunicación intercelular y control de crecimiento, inhibe la proliferación de leucemia mieloblástica aguda
epigallocatequina epigallocatequingalato	te verde uvas/vino	reduce el cáncer reduce enfermedades cardio- vasculares	Inhibe la iniciación, propagación y progreso del cáncer ; antioxidante ; reduce el daño oxidativo por radicales libres
daidzeína genisteína y otras isoflavonas	frijol de soya productos de soya	previene síntomas de menopausia previene osteoporosis reduce el cáncer	fitoestrógenos ; inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de pecho humano ; disminuye el colesterol, colesterol de LBD y triglicéridos ; estimula la absorción del calcio y deposición ósea
tocopheroles tocotrienoles	aceites vegetales	antioxidante inhibe el cáncer baja colesterol del suero disminuye enfermedades del corazón	Inhibe la proliferación de células cancerosas ; inhibe la HMG-CoA reductasa
ácidos grasos omega- 3	aceite de pescado algas linaza	baja colesterol del suero disminuye enfermedades del corazón inmunesupresante reduce triacilglicerol del suero	disminuye la relación LBD- LAD total ; aumenta las LAD del suero ; inhibe los productos derivados del ácido araquidónico como PGE y leucotrienos
ácido linoléico conjugado	productos lácteos aceites vegetales procesados	anticáncer antiatroesclerosis	inhibe el crecimiento de células cancerosas al interferir con la ruta mitogénica regulada hormonalmente ; disminuye la relación colesterol LBD a LAD y la relación de colesterol total a colesterol LAD en conejos

Continúa en la siguiente página.

disulfido dialílico alicina	ajos	anticáncer estimula la función inmune	Inhibe la proliferación de células tumorales humanas ; inhibe la activación metabólica de tóxicos y carcinógenos ; inhibe la biosíntesis de colesterol
sulforafanos y otros isotiocianatos orgánicos	verduras crucíferas (brócoli, coles de Bruselas, coliflor)	Quimopreención	actividad quimopreventora, modulación de enzimas metabolizadoras de medicamentos
limoneno	frutas cítricas	anticáncer	reguladores de la proliferación de células malignas, inhibe la isoprenilación post-translacional de proteína reguladoras del crecimiento celular
cumarinas	verduras frutas cítricas	Previene la coagulación sanguínea actividad anticarcinogénica	anticuagulante ; inhibidores e inactivadores de carcinógenos y mutagénicos; secuestrantes del radical anión superóxido
oligosacáridos fermentables no digeribles	ajo espárragos achicoria	Fortificación intestinal estimula la función inmune	efectivo como prebiótico ; sustrato para las bifidobacterias del intestino largo que generalmente se consideran benéficas por estimular el sistema inmune y protegiendo al cuerpo de infección ; modula el metabolismo de los lípidos

Bidlack W.R., Wang W., 1999

El auge de los alimentos funcionales ha surgido en un momento en que la prioridad de los consumidores es mantener la salud y el bienestar. Esto se da por diversos factores que incluyen el incremento en la esperanza de vida. En algunos países, la esperanza de vida ha aumentado tanto y los roles sociales han variado tan considerablemente que un adulto maduro al que antes se le consideraba "viejo" ahora se encuentra en plenitud de vida. En muchos casos, estas personas quieren seguir manteniendo una vida activa, trabajar, hacer deporte y tener una vida social activa. Por supuesto, todo esto va aunado al goce de una

buena salud. Por esto, se ha considerado que los factores como la dieta, el ejercicio y los hábitos de vida ahora juegan un papel mucho más importante en prolongar los años de vida activa de buena calidad. Además las sociedades industriales modernas han desarrollado una asentada nostalgia del apego con la naturaleza, lo que quizá sea responsable en gran parte de una renovada popularidad por remedios y alimentos "naturales". (López-García R., 2000)

En consecuencia, han proliferado las investigaciones sobre los efectos benéficos de compuestos biológicamente activos contenidos en la dieta y en plantas usadas en la medicina tradicional. Esto está provocando modificaciones en los lineamientos sobre los grupos de alimentos y raciones que se deben de consumir diariamente (la pirámide nutrimental). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado una ingesta de al menos 500g/día de una mezcla de frutas y verduras, lo cual ha sido apoyado por agencias gubernamentales y traducido a al menos 5 porciones (raciones) al día. Esto no solo por las concentraciones de compuestos antioxidantes de los productos vegetales, sino también por ser bajos en grasas, ricos en fibra y buenas fuentes de vitaminas y minerales. (Rice-Evans C., Miller N.J., 1995)

Últimamente las compañías productoras de ingredientes y aditivos han introducido al mercado una gran variedad de productos con compuestos biológicamente activos. Sucesivamente se ha favorecido el diseño y formulación de alimentos funcionales al aumentar la disponibilidad de extractos, concentrados, aislados, y otras presentaciones de ingredientes y aditivos funcionales. De tal manera que la composición de los productos alimentarios ordinarios pueda ser modificada para el desarrollo de alimentos nuevos con un beneficio adicional a la salud. Esto se logra de alguna de las siguientes formas :

- agregando ingredientes biológicamente activos que normalmente no están presentes en cierto alimento y que así tenga un efecto benéfico adicional.
- aumentando la concentración de un componente específico para alcanzar las dosis adecuadas que puedan ejercer el efecto benéfico.
- también reemplazando algún componente que esté en exceso o sea dañino, y sustituyéndolo por uno con efectos benéficos.

Con lo anterior vemos la enorme gama de posibilidades para la creación de nuevos productos, diseñados específicamente para proporcionar a lo largo plazo un beneficio a la salud (tabla 16). Proporcionándoles un carácter saludable diferente al que se reconocía tradicionalmente. Por otra parte, es importante considerar que esta tendencia parece haber evolucionado comercialmente mucho más rápido que nuestro conocimiento científico, clínico y legal por lo que es necesario retomar la conciencia y controlar de manera adecuada algunas de estas prácticas comerciales.

Tabla 16-Como se modifican los alimentos para darles el carácter de alimentos funcionales.

Modificación del alimento	Ejemplos de posible funcionalidad
Adición de fitoquímicos (como ingrediente vegetal o extracto)	Antioxidante, menor riesgo de enfermedades cardiovasculares, menor riesgo de cáncer, menor presión arterial
Adición de péptidos bioactivos	Incremento en la función inmune; una aumentada biodisponibilidad de minerales; hipotensivos
Adición de fibra dietaria	Prevención de constipación; menor riesgo de cáncer de colon; reduce el colesterol sanguíneo
Adición de ácidos grasos co-3 poliinsaturados	Menor riesgo de ataque al miocardio; menor riesgo de algunos tipos de cáncer; se promueve al sistema inmune
Adición de probióticos	Mejor función gastrointestinal; fortalece el sistema inmune; menor riesgo de cáncer de colon
Adición de prebióticos	Mejor función gastrointestinal; fortalece el sistema inmune; menor riesgo de cáncer de colon

Berner L. y O'Donnell J., 1998

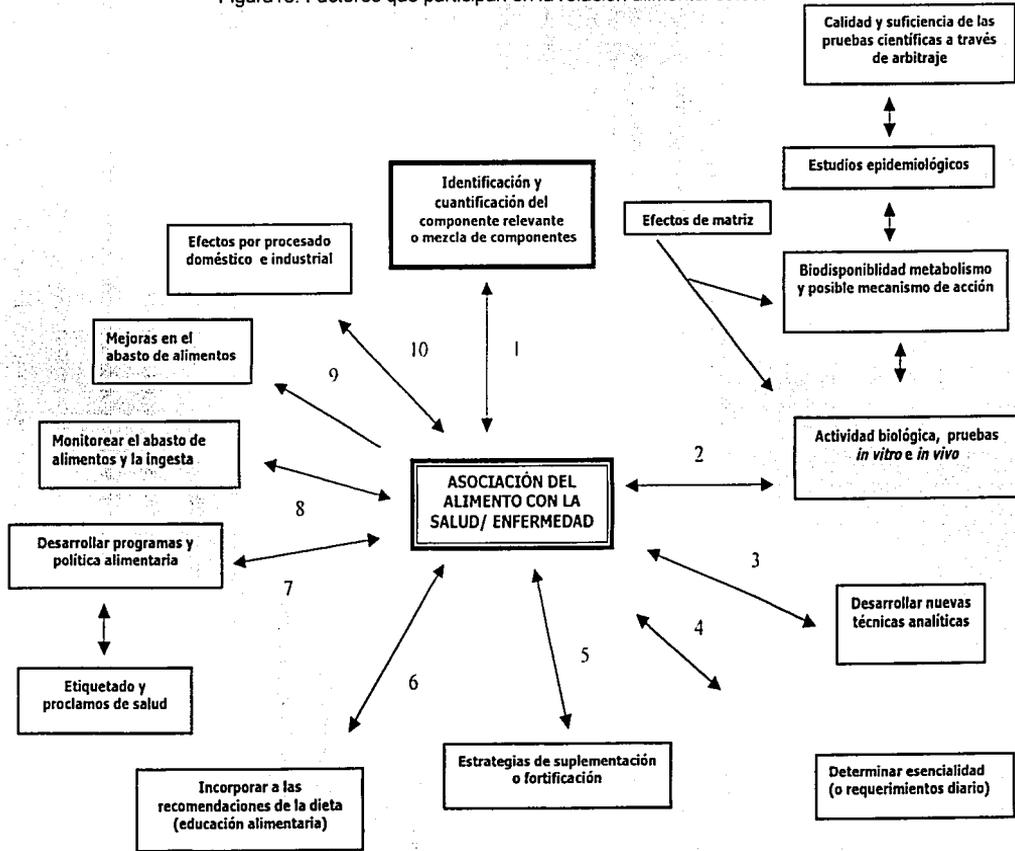
A pesar de la rapidez con la que ha crecido el sector de ingredientes con compuestos biológicamente activos para el diseño de alimentos especializados que promueven la buena salud, se ha recalcado que los alimentos funcionales no son la panacea para resolver los problemas relacionados con un estado de salud deficiente. Igualmente se hace énfasis en que no existen los alimentos "buenos" o "malos", si no más bien, dietas buenas o malas (Hasler, C. M., 1998). La calidad y variedad de la dieta diaria dependerá del patrón

alimentario de los habitantes de cierto país y puede estar reforzada por las recomendaciones dietarias que se le proporcione a dicha población a través de sus organismos de salud.

Continuamente habrá que recordar que la dieta es tan solo uno de los factores que puede ayudar a mantener una buena salud. Los estudios epidemiológicos también resaltan el efecto dañino de hábitos como el exceso en el consumo de alcohol, el fumar, y la falta de ejercicio. A los cuales hay que añadir la exposición a agentes contaminantes del agua, aire, o tóxicos en el lugar de trabajo. Los buenos hábitos y costumbres en nuestra vida diaria conforman nuestro estilo de vida, que en conjunto puede llevar al mantenimiento de la salud y un estado general de bienestar.

En lo que concierne a la dieta, es necesario que los consumidores estén conscientes de las recomendaciones alimentarias para que puedan llevar una dieta balanceada. Por lo tanto, para que se dé la asociación de un alimento, ya sea entero o algún compuesto con actividad biológica incluido en la formulación de un producto procesado, con un beneficio a la salud serán necesarias una serie de acciones que involucran en distintos niveles al sector científico, industrial, gubernamental, de salud y al consumidor. La figura 16 muestra la relación que existe entre los factores que están implicados al tratar el tema de componentes de los alimentos en el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades.

Figura16. Factores que participan en la relación alimento/ salud.



Adaptado de Schneeman B., 2000

El diagrama (figura 16) resalta los principales necesidades en investigación, desarrollo de productos, legislación así como de política alimentaria al establecer las relaciones alimento y/o componente - salud/ enfermedad. Hay varios factores que están involucrados y que deben ser evaluados cuidadosamente y es obvio que requieren un cierto orden para llevarse a cabo adecuadamente ya que como ya se había mencionado, la tendencia comercial parece haber crecido mucho más rápido que el conocimiento científico y el desarrollo de una legislación específica y adecuada. No se puede considerar que es lo mismo recomendar la ingesta de 5 porciones de fruta y verdura fresca al día que recomendar tomar un suplemento con un compuesto purificado o consumir un alimento procesado con altas dosis de un compuesto purificado. Se sugiere analizar los conceptos presentados en la figura 16 empezando del centro hacia el cuadro inmediato superior y posteriormente siguiendo la numeración en el orden de las manecillas de reloj. Las flechas bidireccionales indican la interrelación que debe existir entre cada aspecto del diagrama.

Los estudios epidemiológicos han sido una herramienta indispensable para poder reconocer y evaluar las asociaciones entre el riesgo de contraer ciertas enfermedades y un patrón dietético particular. Sin embargo, los datos arrojados se tienen que analizar con sumo cuidado ya que existen muchos otros factores que afectan las condiciones de la población. Entre estos factores se puede citar, además de la dieta, los factores genéticos, sociales y económicos de la región. Idealmente, al ir avanzando la investigación y acumularse suficiente evidencia de la efectividad de cierto componente, se deben tomar decisiones sobre la suficiencia de dicha evidencia para incorporar el componente específico a productos alimentarios. Asimismo, se debe recordar que tampoco es posible exigir una declaración

absoluta de seguridad y efectividad ya que estos son conceptos relativos y la seguridad absoluta no existe. Lo anterior puede llevarse a cabo siempre y cuando se haya evaluado su seguridad usando los patrones de análisis de riesgo aceptados por las autoridades científicas, la dosis requerida para obtener la respuesta deseada y su eficacia a lo largo del tiempo. Sucesivamente se deberá desarrollar la legislación pertinente al uso de determinado componente biológicamente activo y poder incluirlo en las recomendaciones dietarias para que el público consumidor lo adquiera a través de sus fuentes naturales o como ingrediente de alimentos procesados. Sin embargo, como se planteó anteriormente existen desacuerdos en la manera de definir y ubicar a los alimentos funcionales. Una interrogante común en relación a estos productos es: ¿En qué momento se puede volver un alimento en medicina y viceversa? Entonces, no es clara la manera en que deben ser legislados y las evaluaciones a las que se deben de someter, dado que los medicamentos requieren una inspección muy minuciosa y tardada de sus propiedades, efectos y seguridad. Mientras que los alimentos funcionales han gozado de cierta libertad legislativa al considerarse inocuos simplemente por contener componentes de fuentes naturales. Esto se debe a que existe una percepción generalizada de que todo lo "natural" es bueno para uno. Más hay que recordar que en fuentes naturales también hay potentes tóxicos como los venenos de las serpientes, la toxina del botulismo producida por el microorganismo *Clostridium botulinum*, o sustancias cancerígenas como las aflatoxinas producidas por especies de hongos que plagan los granos que consumimos. También habría que mencionar la gran variedad de narcóticos obtenidos de diferentes plantas. Por lo tanto, al incluir concentrados y extractos de sustancias con actividad biológica en productos habrá que evaluar la seguridad de dichos componentes en estudios toxicológicos a corto y a largo plazo.

### **9.3 Marco regulatorio en otros países.**

Aunque en muchos países, incluyendo México, no se tiene reconocido legalmente la categoría de alimentos funcionales, en algunos ha habido avances legislativos (tabla 17), especialmente en aquellos con el mayor mercado de productos funcionales: Japón, la Comunidad Europea y E.U.A. Uno de los aspectos entorno a los alimentos funcionales que ha requerido una regulación son los denominados proclamos de salud. Los proclamos de salud son declaraciones en el etiquetado que relacionan al producto con un beneficio a la salud particular. Japón fue el primer país que permitió realizar proclamos de salud para alimentos con ingredientes biológicamente activos. (Hasler C.M., 1998) Las propuestas de cada gobierno y el sector industrial son diferentes para cada país, pero todos comparten un elemento en común, el interés de proteger al consumidor de proclamos de salud dudosos en relación con los ingredientes biológicamente activos presentes en los nuevos productos alimenticios. (Rodríguez H.N., 2001) Es importante considerar que es muy complicado desarrollar este tipo proclamos de salud ya que no se pueden dar falsas esperanzas al consumidor ni prometer milagros. Sobre todo cuando se trata de problemas tan delicados como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. No se debe perder de vista que muchos estos compuestos solo funcionan en combinación con muchos otros factores que incluyen el estilo de vida, factores genéticos y la condición física del individuo sólo por mencionar algunos. La legislación por tanto, tiene que observar un equilibrio entre la protección global del consumidor y el fomento de la aplicación de nuevos conocimientos científicos que puedan contribuir al bienestar del consumidor. Asimismo, la legislación debe, en todo momento, prevenir las prácticas comerciales abusivas y engañosas. Esto puede ser

un problema, ya que en algunos países, la falta de legislación clara con respecto a este tipo de productos ha favorecido el comercio en un mercado totalmente desregulado donde el consumidor corre peligro de ser engañado y en algunos casos, se pone en grave riesgo la salud pública.

Tabla 17. Resumen de la legislación relacionada con alimentos funcionales en diferentes países.

País	Legislación	Regulación	Lineamientos
Japón	Acta de mejoramiento de la Nutrición, y el Acta de aprobación de los Alimentos Especiales Nutritivos y los FOSHU	Alimentos de Uso Específico para la Salud (FOSHU) autorizan el empleo de proclamos de salud	Asociación Japonesa de Alimentos para la Salud (JHFA) autorizada por el Ministerio de Salud y Bienestar que provee asesoramiento a la industria alimentaria y emite las licencias para los productos FOSHU
E.U.A.	El Acta de Educación y Etiquetado Nutricional (NLEA) y la ley para suplementos alimenticios Acta de Suplementos Dietéticos, Salud y Educación (DSHEA)	NLEA se encuentra publicada en el Registro Federal en la página <a href="http://www.access.gpo.gov/su_docs">Http://www.access.gpo.gov/su_docs</a>	Además del Registro federal los productores pueden obtener asesoramiento de la Oficina de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Oficina de Nutrientos Especiales en Washington
Canada	Estatuto primordial es el Acta y Regulaciones de los Alimentos y Medicamentos	El promover la salud y la prevención de enfermedades se encuentra bajo el Acta de Alimentos y Medicamentos	Lineamientos de Etiquetado Nutricional
Comunidad Europea	Propuestas para la dirección de proclamos de salud para los países miembros. Directiva No. 258/97 de Etiquetado	Adición de prebióticos	No aplica

Rodríguez H.N., 2001

En México los proclamos de salud en el etiquetado de alimentos no están permitidos. No obstante, en la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994 (Alimentos y Bebidas No Alcohólicas con Modificaciones en su Composición. Especificaciones Nutrimientales) se regula aquellos nutrimentos que se pueden declarar por su contenido en el alimento, por ejemplo: bajo en grasa, sodio, calorías, etc. En cierta forma esta norma permite proporcionar información en la etiqueta del producto que pueda ayudar al consumidor a vincular al alimento con la buena salud.

#### ***9.4 El caso de los alimentos funcionales en México***

Así como en el resto del mundo, en México también se observa que las principales causas de mortalidad son las enfermedades crónico degenerativas, también denominadas enfermedades no transmisibles. De acuerdo a las estadísticas de la secretaria de Salud para el año 1999 (tabla 17), el orden de importancia de enfermedades no transmisibles por número de defunciones son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes.

Tabla 18. Principales causas de mortalidad general en los Estados Unidos Mexicanos, 1999

No. de Orden	Causa	Defunciones	Tasa 1/
	Total	443,950	452.4
1	Enfermedades del corazón	69,278	70.6
	- Enfermedades isquémicas del corazón	44,070	44.9
2	Tumores malignos	53,662	54.7
3	Diabetes mellitus	45,632	46.5
4	Accidentes	35,690	36.4
	- Accidentes de tráfico de vehículos de motor	11,659	11.9
5	Enfermedades del hígado	27,040	27.6
	- Enfermedad alcohólica del hígado	13,417	13.7
6	Enfermedades cerebrovasculares	25,836	26.3
7	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	19,268	19.6
	- Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el período perinatal	10,042	10.2
8	Influenza y Neumonía	14,068	14.3
9	Agresiones (homicidio)	12,249	12.5
10	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	11,319	11.5
11	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	9,776	10.0
12	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	9,714	9.9
13	Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	7,840	8.0
14	Insuficiencia renal	7,807	8.0
15	Enfermedades infecciosas intestinales	5,622	5.7
16	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA)	4,204	4.3
17	Anemias	3,581	3.7
18	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidio)	3,339	3.4
19	Tuberculosis pulmonar	3,229	3.3
20	Septicemia	3,085	3.1
	Paro cardíaco	0	0.0
	Síntomas signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio no clasificados en otra parte	9,474	9.7
	Las demás causas	62,237	63.4

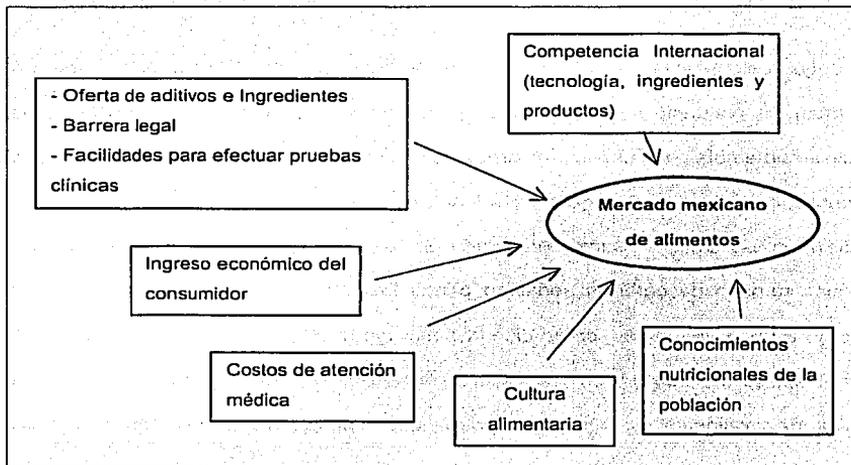
1/ Tasa por 100,000 habitantes. INEGI, SSA/DGEI, 1999. Secretaría de Salud, estadísticas vitales.

Las estadísticas de principales causas de mortalidad demuestran una prevalencia de enfermedades crónico degenerativas, especialmente enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes mellitus. Lo que hace patente una exploración avanzada de los factores involucrados en el desarrollo de estas patologías, y entre estos factores se puede citar a la dieta. Por lo tanto es necesario analizar el patrón alimentario y los componentes de la dieta mexicana para identificar aquellos componentes con posibles beneficios para prevenir o retardar el desarrollo de estas enfermedades.

Las altas cifras de defunciones por enfermedades crónico degenerativas y la gran diversidad de alimentos convierten a México en un mercado atractivo para la comercialización responsable de alimentos funcionales. Sin embargo existen varios factores que obstaculizan el desarrollo de alimentos funcionales en nuestro país. La industria alimentaria en México, debido al fenómeno de la globalización está cada vez más expuesta a la competencia internacional. De esta manera nuestro mercado ya no puede estar ajeno a las corrientes mundiales de comercio, ni al surgimiento de tecnologías productivas y mucho menos ajeno a las tendencias actuales de la alimentación y la nutrición. Uno de los nuevos conceptos que van tomando mayor repercusión en nuestro país es el de los alimentos funcionales (Garduño A., 2001).

Los factores económicos, sociales y culturales que caracterizan nuestro mercado, indudablemente van a restringir la presencia de nuevos productos funcionales de éxito, particularmente, los bajos ingresos de la mayoría de los consumidores y la falta de conocimientos elementales de nutrición (figura 17).

Figura 17. Algunos factores a considerar para el éxito de alimentos funcionales en el mercado mexicano.



Garduño A., 2001

En nuestro país, el factor socio-económico representa un factor restrictivo y determina los sectores de la sociedad que podrán adquirir este tipo de productos. En cuanto al nivel adquisitivo es importante tomar en cuenta lo siguiente: En un análisis de la definición de seguridad alimentaria de acuerdo a la Organización de Alimentación y Agricultura (FAO), se pone en manifiesto la situación alimenticia deficiente que se vive a lo largo del territorio nacional.

" existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer las

necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana"

Según estadísticas gubernamentales, en México cerca de 22 millones de personas (25% del total) se encuentran en estado de pobreza extrema, con una capacidad económica prácticamente nula para adquirir los productos de la canasta básica; otro 25% de la población es pobre, con capacidad adquisitiva apenas para poder sobrevivir. Todos ellos difícilmente tendrán acceso a un consumo alimentario de calidad, suponiendo que pudieran adquirir el volumen mínimo de calorías señalado por la FAO. Ya no hablemos de un consumo de acuerdo a las preferencias, como dice la definición de ese organismo internacional. (Torres F. Y Trápaga Y., 2001) Pero también se reconoce que la dieta promedio mexicana es equilibrada y valiosa, y es más recomendable que la de los países altamente industrializados, siempre y cuando se dé en condiciones de suficiencia y diversidad (Horwitz M., 1995). Por ejemplo, el predominio de cereales y leguminosas, el consumo abundante y variado de frutas y verduras, y la adición de pequeñas cantidades de alimentos de origen animal como ocurre en nuestra dieta tradicional es más recomendable que la típica dieta americana.

Más, poco a poco algunos productos que contienen ingredientes biológicamente activos, fabricados principalmente en los E.U., están siendo importados a México y comercializándose en cadenas de autoservicio, tiendas naturistas, etc. Este tipo de productos no están contemplados por la legislación mexicana ocasionando un vacío legal. Al no haber una legislación que contenga los elementos y lineamientos pertinentes para una producción, evaluación y comercialización adecuada de alimentos funcionales, se puede dar lugar a oportunismos y engaños por parte de los productores de alimentos. Además, por los factores

citados, la adquisición de estos productos estará evidentemente destinada a los estratos sociales con mayores recursos económicos.

Por lo mencionado anteriormente, existen en México aspectos a favor en contra y para la comercialización exitosa de productos de la categoría de alimentos funcionales. Lo cual indudablemente representará retos interesantes para los procesadores de alimentos. Favorablemente, se ha visto que en los últimos años los hábitos alimentarios de la población se han modificado sustancialmente. La cultura alimentaria está adoptando tendencias al cambio que se orientan a homogeneizar los patrones de consumo mediante la incorporación paulatina de nuevos componentes en la alimentación cotidiana (Rodríguez H.N., 20001)

Los alimentos comunes en nuestra dieta son medios prácticos y convenientes para hacer llegar a un mayor número de personas aquellos nutrimentos de los cuales se presentan deficiencias como es el caso de la sal fortificada con iodo o las tortillas de maíz fortificadas con calcio. Así mismo como estrategia de política alimentaria las autoridades gubernamentales podrían adicionar a los alimentos uno o varios compuestos biológicamente activos para prevenir o retardar los padecimientos que son más frecuentes en nuestro país, o simplemente para mejorar la salud global de sus habitantes. Por lo tanto, el diseño de productos alimenticios que aporten beneficios a la salud y que muestren proclamos de salud fundamentados con suficientes evidencias científicas ofrecen oportunidades interesantes para favorecer a la población mexicana siempre y cuando sean accesibles para la mayoría. De manera óptima, la futura industria de alimentos funcionales no estaría restringida a la elaboración de productos para segmentos definidos por su nivel adquisitivo.

De tal manera, paralelamente a los avances científicos en el estudio de componentes biológicamente activos y una mayor comprensión del papel de la dieta en el mantenimiento de la salud, se verán en los anaqueles de las tiendas de autoservicio un mayor número de nuevos productos alimentarios destinados a consumidores con una mayor conciencia de su alimentación y su bienestar físico. Requiriendo esfuerzos de estrecha colaboración entre los sectores científicos, industriales, gubernamentales y el público consumidor.

## CONCLUSIONES

Los flavonoides destacan principalmente por ser importantes metabolitos secundarios de las plantas que participan activamente en funciones fundamentales relacionados con la interacción de la planta con su entorno natural. Estos fitoquímicos existen en una gran variedad de estructuras químicas y se consideran ubicuos en el reino vegetal, al encontrarse en casi todas las plantas superiores, con excepción de las algas. En consecuencia, y después de un largo proceso histórico de selección de las plantas aptas para consumo humano, son constituyentes omnipresentes en los alimentos que conforman las dietas de las distintas culturas del mundo. En los últimos años han sido reconocidos como importantes constituyentes de la dieta, en particular por su posible participación en retardar o prevenir el comienzo de enfermedades crónicas degenerativas.

La asociación entre la ingesta de flavonoides y los efectos en la salud humana, ultimadamente puede ser examinada cuando se tenga el conocimiento detallado de los flavonoides contenidos en alimentos, bebidas y suplementos dietarios y se encuentre tabulado meticulosamente en bases de datos accesibles. Incluyendo la información suficientemente detallada de cada alimento o producto natural de donde se derivaron tales datos, así como la información estadística pertinente, para que se pueda identificar claramente y puede compararse fácilmente con otras tablas de composición de alimentos. Además que proporcione datos adicionales sobre los efectos en el contenido ocasionados por variedad, condiciones de cultivo y procesado, tanto a nivel doméstico como industrial. Es decir, obtener datos más profundos de los alimentos que ya han sido analizados en relación

a sus compuestos flavonoides y continuar la tarea de caracterizar los alimentos que componen las dietas individuales de los distintos grupos humanos. Lo último se refiere al fomento de la investigación de los productos vegetales regionales para identificar aquellos que son ricos en flavonoides, y otros compuestos con actividad biológica, y consecuentemente poder estimular su cultivo y consumo.

Una consideración sobre la actividad biológica reportada de los flavonoides es que se ha obtenido en la mayor parte por medio de estudios *in vitro* realizados con los compuestos aislados; siendo difícil relacionar las evidencias a situaciones *in vivo* y a la compleja matriz de alimentos y bebidas. Por lo que la importancia relativa de la actividad biológica *in vivo* de los flavonoides aportados por la dieta, aún no es comprendida por completo. Y para poder evaluar adecuadamente su potencial benéfico en el humano es importante conocer su cinética dentro del organismo (absorción, metabolismo, distribución y excreción). Siendo indispensable también que los compuestos o sus metabolitos activos lleguen a los sitios de acción en las concentraciones adecuadas para que se de el efecto fisiológico deseado.

Los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento muestran un efecto protector positivo de una dieta rica en flavonoides más marcada hacia enfermedades cardiovasculares y una relación mucho menos clara hacia distintos tipos de cáncer. Para seguir realizando estos estudios en otros grupos humanos y determinar su beneficio hacia otras enfermedades crónico degenerativas es esencial conocer a detalle los flavonoides específicos contenidos en mayor número de alimentos, sus cambios durante el procesado

doméstico e industrial y un detallado conocimiento de su absorción y metabolismo en el cuerpo humano.

Por lo anterior, se hace evidente que los flavonoides son una gran familia de fitoquímicos que continúan implicando retos interesantes para la investigación científica, ya que están relacionados en diversas ramas de la ciencia como la biología (ecología, fisiología vegetal, fitoquímica, botánica), tecnología de alimentos (análisis, química, manejo y procesamiento de frutas y verduras), medicina (nutrición, epidemiología, patología), etc.

Los recientes estudios epidemiológicos han proporcionado evidencias sobre los efectos benéficos de una dieta rica en frutas y verduras en contra de enfermedades crónico degenerativas, pero esto no puede ser atribuido exclusivamente a antioxidantes naturales como los flavonoides ya que en nuestros alimentos de origen vegetal existen otros fitoquímicos que pueden ser igual de importantes.

Como los alimentos de origen vegetal son una compleja mezcla de fitoquímicos, su estudio es una tarea muy complicada pues intervienen múltiples variables. Y por el momento, se desconoce en su totalidad el papel específico de cada uno de ellos y el efecto sinérgico potencial de varios fitoquímicos en el proceso preventivo de enfermedades crónico degenerativas. Sin embargo, la información reportada hasta el momento de la composición de estos compuestos en los alimentos y su actividad biológica han servido como lineamientos para una creciente industria alimentaria denominada de alimentos funcionales.

De esta forma se ha promovido el diseño y formulación de alimentos que pueden ser potencialmente benéficos para mantener la salud.

La formulación de alimentos con ingredientes biológicamente activos se está desarrollando principalmente en E.U.A, Europa y Japón. Esta nueva gama de productos se están dirigiendo a una población más conciente de la relación de la dieta con la salud y que procura mantener la salud por medio del cuidado propio. Por lo tanto las compañías productoras de alimentos están diseñando productos destinados a ayudar a prevenir o retardar el inicio de padecimientos específicos. Las tendencias de nutrición y salud generadas por estos productos, así como la influencia de empresas internacionales tendrán una repercusión en el mercado alimentario mexicano, donde habrá sucesivamente más productos que contengan ingredientes que promuevan el mantenimiento de la salud y el bienestar.

La situación económica predominante de la sociedad mexicana es un limitante para la producción y comercialización masiva de productos diseñados específicamente para contribuir o mejorar la salud. Sin embargo, a través de las instituciones de salud se puede promover el consumo de aquellos productos vegetales en su forma natural que sustentados con suficientes evidencias científicas de sus propiedades benéficas sean considerados como buenas fuentes de flavonoides y/ o de otros fitoquímicos con actividad biológica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrawal P.K. (ed) (1989), Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier, Amsterdam, Holanda.
2. Amelio D., Frank S. (1999), Botanicals a phytocosmetic desk reference, CRC Press, EUA.
3. Anderson J., Garner S. (2000), The soybean as a source of bioactive molecules, en Essentials of functional foods, Schimdl M.K., Labuza T.P. (eds), Aspen Publishers Inc., E.U.A.
4. Arti A., *et al.* (1998), Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system, Free Radical Biology and Medicine, 24 (9): 1355- 1363.
5. Aviram M. (1999), Antiatherogenicity of antioxidants against LDL oxidation, en Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease, Kumpulainen J.T. (ed), The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
6. Aviram M., Aviram R., Fuhrman B. (1999), Antiatherogenicity and antioxidative properties of polyphenolic flavonoids against LDL oxidation, en Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease, Kumpulainen J.T. (ed), The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
7. Barba Chávez J.M. (1997), Introducción al análisis de los productos naturales. Laboratorio de fitoquímica, Universidad Autonoma Metropolitana, México D.F.: 9, 13.
8. Beecher G.R. (1999), Flavonoids in foods, en Antioxidant food supplements in human health, Packer L., Hiramatsu M. (eds) Academic Press, E.U.A.
9. Berhow M.A. (1998), Flavonoid accumulation in tissue and cell culture, en Manthey J.A., Buslig B.S.(eds), Advances in Experimental Medicine and Biology, Flavonoids in the living system, 439, Plenum Press, Nueva York, USA
10. Berner L., O'Donnell J. (2001), en Functional foods from probiotics and prebiotics, Nash N.P., Food Technology, 55 (11): 47.
11. Bidlack W.R. (1998), Phytochemicals: A potential new health paradigm, Food Technology, 52 (9): 168.
12. Bidlack W.R. y Wang W. (1999), Designing functional foods to enhance health, en Phytochemicals as bioactive agents, Bidlack W.R. *et al.* (eds), Technomic Publishing Co., E.U.A.

13. Bloor S.J. (2001), Overview of methods for analysis and identification of flavonoids; en *Methods in enzymology: Flavonoids and other polyphenols*, Packer L. (ed), 335, Academic Press.
14. Breinholt V. (1999), Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids; en *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*, Kumpulainen J.T. (ed), The Royal Society of Chemistry, Reino Unido
15. Brouillard R. Y Dangles O. (1994), Flavonoids and flower colour, en *The flavonoids: Advances in Research since 1986*, Harborne J.B. (ed), 1<sup>er</sup> ed., Chapman and Hall, Londres, Reino Unido.
16. Caragay A.B. (1992), Cancer preventive foods and ingredients, *Food Technology*, 45 (4): 65-68.
17. Center for Disease Control (1999), Achievements in Public Health 1990- 1999: Safer and Healthier Foods, *MMWR Weekly* 48:905-913
18. Clarke R. *et al.* (1996), Estrogens, phytoestrogens and breast cancer, en *Dietary phytochemicals in cancer prevention and treatment*, American Institute of Cancer research (ed), Plenum Press, Nueva York, E.U.A.
19. Clifford M.N., (2000), Review: Anthocyanins- nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 : 1063-1012.
20. Crozier A. *et al.*, (1997), Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 590-595.
21. Chen J. Y Han C., (1999) The protective effect of tea on cancer: human evidence, en *Phytochemicals as bioactive agents*, Bidlack W.R. *et al.* (eds), Technomic Publishing Co., E.U.A.
22. Choi Y-S., *et al.* (2000), Concentration of phytoestrogens in soybeans and soybean products in Korea, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1709-1712.
23. Dillard C.J., German B. (2000), Review- Phytochemicals: nutraceuticals and human health, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1744-1756.
24. Dixon R.A. *et al.* (1998), Prospects for the metabolic engineering of bioactive flavonoids and related phenylpropanoid compounds, en Manthey J.A., Buslig B.S.(eds), *Advances in Experimental Medicine and Biology, Flavonoids in the living system*, 439, Plenum Press, Nueva York, E.U.A.
25. Felix D'Mello J.P. (1997), Toxic Compounds from Fruit and Vegetables, en Tomás-Barberan F.A. (ed), *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Proceedings of the

26. Fennema O. (1996), *Food Chemistry*, 3<sup>ra</sup> edición, Marcel Dekker, Nueva York, E.U.A.
27. Ferro-Luzzi A., Maiani G. (1999), Biomarkers of flavonoid intake in humans, en *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*, Kumpulainen J.T. (ed), The Royal Society of Chemistry, Reino Unido
28. Frei B. (1994), Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action, *The American Journal of Medicine*, Septiembre, 97 (suplemento 3A): 5S- 13S.
29. Frankel E.N. (1999), Natural phenolic antioxidants and their impact on health, en Packer L., Hiramatsu M. (eds), *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Academic Press, E.U.A.
30. Frankel E.N., Meyer A.S., (2000), Review- The problem of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925- 1941.
31. Garduño A. (2001), El desarrollo de alimentos funcionales: ¿tarea de romanos?, *Industria Alimentaria*, julio-agosto, 23 (4): 7-9.
32. Gordon M.H. (1996), Dietary antioxidants in disease prevention, *Natural Products*: 265-273.
33. Griffith J.Q., Krewson Ch.F. (1955), *Rutin and related flavonoids*, Mack Publishing Co., E.U.A.
34. Häkkinen S. *et al.* (1999), Quercetin content in berry products, en *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*, Kumpulainen J.T. (ed), The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
35. Häkkinen S., Törrönen A.R. (2000), Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium*, *Food Research International*, 33: 517-524.
36. Harborne J.B. (1984), *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 2da<sup>ed.</sup>, Chapman & Hall, Londres, Reino Unido.
37. Harborne J.B. (ed) (1990), *The Flavonoids advances since 1980*, Chapman & Hall, Londres, Reino Unido.
38. Harborne J.B., *Phytochemistry of Fruits and Vegetables: an ecological overview*, en *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Tomás-Barberán F.A. (ed), 1997, Oxford Science Publications, Oxford University Press, Reino Unido.
39. Harborne J.B., Baxter H. (eds) (1999), *The Handbook of the Natural Flavonoids*, John Wiley & Sons, Nueva York, E.U.A.

40. Hasler, C. M., (1998) Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Scientific Status Summary. Food Technology*, 52, (11): 63-70.
41. Hertog M., Hollman P.CH., Katan M.B. (1992), Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1591-1598.
42. Hertog M., Feskens, E., Peter C.H., *et al.* (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study, *The Lancet*, 342: 1007- 1011
43. Hertog M., Kromhout D., Aravanis C., *et al.* (1995), Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven country study, *Archives of Internal Medicine*, 155 (4): 381-386.
44. Hertog M. *et al.* (1997), Potentially anticarcinogenic secondary metabolites in fruits and vegetables, en *Phytochemistry of fruit and vegetables*, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Tomás-Barberan F.A. (ed), Oxford Science Publications, Oxford University Press, Reino Unido.
45. Hollman P. CH., Arts L. CW. (2000), Review: Flavonols, flavones and flavanol- nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, p. 1081- 1093.
46. Horwitz M., (1995), Alimentación y nutrición en México, en México a la hora del cambio, julio, Rubio I. (ed), Centro de Investigación para el Desarrollo A.C., Editorial Cal y Arena, México.
47. Libros en línea [Consulta, 20/23/02] <http://www.cidac.com.mx/mexico-cambio.html>
48. Hóvári J., Lugasi A. (1999), Dworschák E., Examination of flavonoid content in hungarian vegetables, en *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*, Kumpulainen J.T. (ed), The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
49. Ikan R. (1991), *Natural products- A laboratory guide*, 2<sup>da</sup> ed., Academic Press, California, E.U.A.
50. Justensen U. *et al.* (1998), Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high performance liquid chromatography with photo-diode array and mass espectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 799: 101-110.
51. Kanner J., Antioxidant potency and mode of action of flavonoids and phenolic compounds, en *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*, Kumpulainen J.T. (ed), 1999, The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.

52. Kaur, Ch. Y., Kapoor H.C. (2001), Antioxidants in fruit and vegetables- the millennium's health, *International Journal of Food Science and technology*, 36: 703- 725.
53. Lansgeth L. (2000), Antioxidants and their effect on health, en *Essentials of functional foods*, Schmidl M.K. y Labuza T.P. (ed), Aspen Publishers Inc., E.U.A.
54. Leake D.S. (1997), The possible role of antioxidants in fruit and vegetable in protecting against heart disease, en *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Tomás-Barberán F.A. (ed), Oxford Science Publications, Oxford University Press, Reino Unido.
55. Lean M.E.J., *et al.*, Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA, *Diabetes*, January 1999, Vol. 48, p. 176- 180.
56. López-García R. (2001), Modern herbal botanicals can make your products healthful, colorful, flavorful, and more, *Baking & Snacks*, Febrero, 23 (1): 76- 80.
57. Lozoya X. (1999), *La herbolaria en México*, Colección Tercer Milenio, CONACULTA, México, D.F.
58. Mabry T.J., Markham K.R. (1970), *The systematic identification of flavonoids*, Springer-Verlag, Nueva York, E.U.A.
59. Magnani L. *et al.* (2000), Spectrophotometric measurements of antioxidant properties of flavones and flavanols against superoxide anion, *Analytica Chimica Acta*, 411: 209-216.
60. Manach C., *et al.* (1999), Comparison of the bioavailability of quercetin and catequin in rats, *Free Radical Biology & Medicine*, 27 (11/12): 1259-1266.
61. Manthey J.A., Buslig B.S.(ed) (1998) *Advances in Experimental Medicine and Biology, Flavonoids in the Living System*, 439, American Chemical Society, Plenum Press, Nueva York, E.U.A.
62. Markham K.R. (1982), *Techniques of flavonoid identification*. Biological Techniques Series, Academic Press, Londres, Reino Unido.
63. McAnlis G.T. (1998), Dietary flavonoids protect low density lipoproteins from oxidative modification, en *Functional foods- The consumer, the product and the evidence*, Sadler M.J. (ed), The British Nutrition Foundation and The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.
64. Merken H.M., Beecher G.R. (2000), Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: a Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3): 577-599.

65. Merken H.M., Beecher G.R. (2000), Liquid chromatography method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones, *Journal of Chromatography A*, 897: 177-184.
66. Middleton E., Kandaswami Ch. (1994), The Impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, and inflammation and cancer, en *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, 1<sup>ra</sup> ed., Harborne J.B. (ed) Chapman and Hall, Londres, Inglaterra
67. Milner J.A. (1998), Do "Functional Foods" offer opportunities to optimize nutrition and health, *Scientific Status Summary, Food Technology*, 52 (11): 24.
68. Mota Reyes D. (1992), Estudios sobre producción fermentativa de naringinasa, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, tesis QFB, UNAM, México, D.F.
69. Nash N.P. (2001), Functional foods from probiotics and prebiotics, *Food Technology*, Noviembre, 55 (11): 47.
70. Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994 Dirección General de Bienes y Servicios, Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones Nutrimientales, Secretaría de Salud, México.  
www.ssa.gov.mx
71. Pietta P. Y Simonetti P. (1999), Dietary flavonoids and interaction with physiologic antioxidants, en *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Packer L. y Hiramatsu M. (ed) Academic Press, E.U.A.
72. Reyo A., Saval S. (1990), Los flavonoides en la tecnología de cítricos, *Tecnología Alimentaria*, 25 (4): 5-13.
73. Rice-Evans C., Miller N.J. (1995), Antioxidants- the case for fruit and vegetables in the diet, *British Food journal*, 97 (9): 35- 40.
74. Rice-Evans C. (1999), Screening of phenolics and flavonoid for antioxidant activity, en *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Packer L. y Hiramatsu M. (ed) Academic Press, E.U.A.
75. Rodríguez H.N. (2001), Alimentos Funcionales: Recomendaciones para su legislación en México, tesis Química de alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
76. Salonen J.T. (1999), Antioxidants, lipid peroxidation and cardiovascular diseases, en *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*, Kumpulainen J.T. (ed), The Royal Society of Chemistry, Reino Unido.

77. Schneeman, B., (2000), Linking Agricultural Production and Human Nutrition, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 3-9.
78. Secretaria de Salud, Estadísticas Vitales (1999), Capítulo: Mortalidad, Principales causas de Mortalidad General Estados Unidos Mexicanos, México, D.F. [Consulta, 31/03/2002] <http://www.ssa.gob.mx/unidades/dgied/sns/vitales/cuadro4.htm>
79. Sies H. (1985), Oxidative Stress: Introductory remarks, en *Oxidative Stress*, Sies H.: (ed), Academic Press, E.U.A.
80. Sirving K., Hertog M., Feskens E., *et al.*, Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and incidence of stroke: the Zutphen Study, marzo 1996, *Archives of Internal Medicine*, Vol. 156, no. 6, p.637-642.
81. Sloan E.A. (2002), The top 10 functional food trends: The next generation, *Food Technology*, 56 (4): 32- 57.
82. Tomás-Barberán F.A., (2000), Review: Flavanones, chalcones and dihydrochalcones- nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1073-1080.
83. Terao J. (1999), Dietary Flavonoids as Plasma Antioxidants on Lipid Peroxidation: Significance of Metabolic Conversion, en *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Packer L., Hiramatsu M. (ed), Academic Press, E.U.A.
84. Tomás-Barberán F.A. (2001), Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruit and vegetables, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 853-876.
85. Trichopoulos T., Li F.P., Hunter D.J. (1996), What causes cancer?, *Scientific American*, Septiembre: 80-87
86. Valencia Ortiz C. (1995), *Fundamentos de fitoquímica*, 1ª ed., México D.F.
87. Valverde, I.M., Periago, M.J., Ros G. (2000), Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51 (1): 5-17.
88. Vasconcellos J.A. (2000), *Alimentos Funcionales. Conceptos y Beneficios Para la Salud*, IFT- World of Food Science, Vol. 1, no.3, Departamento de Ciencias de Alimentos y Nutrición, Universidad Chapman, Orange, California, U.S.A. <http://www.worldfoodscience.org>
89. Vierheilig H. *et al.* (1998) Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi en *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Flavonoids in the Living System, Manthey J.A., Buslig B.S.(ed), 439, Plenum Press, Nueva York, E.U.A.

90. Wang H., Cao G., Prior R.L. (1997): Oxygen radical absorbing capacity of the antocyanins, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 304-309.
91. Wiseman Sh. *et al.*, (1999): The Food Industry: Tea antioxidants and cardiovascular disease, en *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Packer L., Hiramatsu M. (ed), Academic Press, E.U.A.
92. Wuguo D., Xingwang F., Jilan W. (1997), Flavonoids function as antioxidants by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron?, *Radiation and Physical Chemistry*, 50 (3): 271-276.
93. Yan-Hwa Chu *et al.* (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 561-566.

## FE DE ERRATAS

Página 44 debe decir "utilice" en vez de "utilize".

Página 49 debe decir "el secuestro de radicales".

Página 97 debe decir "coreanas" en vez de "koreanas".

Página 98 debe decir:

No cabe duda que gran parte de los alimentos a los que se les ha analizado su perfil de flavonoides son parte integral del patrón alimentario mexicano, tan solo basta revisar nuevamente la tabla 8 y 9 para confirmar esto. No obstante al gran número de alimentos que se han analizado, en comparación se queda enormemente corto considerando la vasta riqueza de diferentes frutas, verduras y otros productos vegetales que componen nuestra dieta.

Página 110 debe decir:

- antioxidantes preventivos que suprimen la formación de radicales.
- antioxidante secuestrantes de radicales libres que inhiben el inicio de reacciones en cadena e interceptan la propagación de estas.
- antioxidantes involucrados en procesos de reparación.