



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

*Instituto de la Grasa*

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES  
FRENTA A HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS DE  
ORIGEN ENDÓGENO Y EXÓGENO EN EL TRACTO  
INTESTINAL**

**Irene Carvajal Lérica**

**Sevilla,**

**de 2012**





**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

*Instituto de la Grasa*

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES  
FRENTA A HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS DE  
ORIGEN ENDÓGENO Y EXÓGENO EN EL TRACTO  
INTESTINAL**

Memoria que presenta  
**Lda. D<sup>a</sup>. Irene Carvajal Léri**  
para optar al Grado de Doctora en Biología  
dentro del Programa de Doctorado  
*Estudio Avanzados en Alimentos.*  
Departamento de Ingeniería Química  
Facultad de Química, Universidad de Sevilla  
Sevilla, de 2012



La tesis titulada "Actividad antioxidante de carotenoides frente a hidroperóxidos lipídicos de origen endógeno y exógeno en el tracto intestinal", presentada por la licenciada en Biología **D<sup>a</sup>. Irene Carvajal Lérída** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos del Departamento de Biotecnología de Alimentos (Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas), bajo la dirección de los Doctores **D. Antonio Pérez Gálvez** y **D. Manuel Jarén Galán**. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación.

Los directores del trabajo

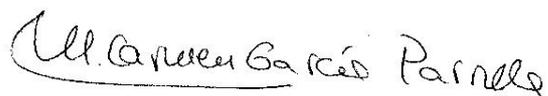


Fdo.: Antonio Pérez Gálvez



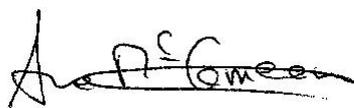
Fdo.: Manuel Jarén Galán

Conforme, el Tutor



Fdo.: María del Carmen García Parrilla

Conforme, la Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal



Fdo.: Ana María Cameán Fernández



ÍNDICE

---



INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	6
<b>HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (LOOHs) EXÓGENOS</b> .....	8
<b>HIDROPERÓXIDOS GENERADOS DURANTE EL RECORRIDO DE LOS</b> <b>ALIMENTOS POR EL TRACTO DIGESTIVO</b> .....	11
<b>Modelos de digestión <i>in vitro</i></b> .....	17
<b>HIDROPERÓXIDOS GENERADOS EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL POR</b> <b>CAUSAS ENDOGENAS</b> .....	19
<b>Enzima lipoxigenasa. Generalidades</b> .....	20
<b>Actividad de lipoxigenasa en animales</b> .....	22
<b>Medida de actividad lipoxigenasa</b> .....	24
<b>Medida espectrofotométrica global de hidroperóxidos</b> .....	24
<b>Medida de actividad por co-oxidación</b> .....	26
<b>Separación de los productos formados por lipoxigenasa y medida de actividad</b> .....	26
<b>ANTIOXIDANTES A NIVEL PRE-SISTÉMICO</b> .....	30
<b>Pigmentos carotenoides. Estructura</b> .....	32
<b>Presencia y distribución de carotenoides en la Naturaleza</b> .....	37
<b>Funciones y acciones biológicas de los carotenoides</b> .....	37
<b>Funciones biológicas</b> .....	38
Metabolismo de carotenoides con actividad de provitamina A .....	38
<b>Acciones biológicas de carotenoides no metabolizados</b> .....	38
<b>METABOLISMO DE ANTIOXIDANTES E HIDROPERÓXIDOS EN LA MUCOSA</b> <b>INTESTINAL</b> .....	47
<b>METABOLISMO OXIDATIVO NO ENZIMÁTICO DE CAROTENOIDES</b> .....	51
<b>CO-OXIDACIÓN DE CAROTENOIDES EN PRESENCIA DE LIPOXIGENASA.</b> <b>FORMACIÓN DE APO-CAROTENOIDES</b> .....	57
OBJETIVOS .....	61
MATERIALES Y MÉTODOS .....	64
<b>MATERIAS PRIMAS</b> .....	64
<b>Vegetales ricos en carotenoides</b> .....	64
<b>Extractos vegetales concentrados en carotenoides</b> .....	64
<b>Aceite de pescado</b> .....	64
<b>Tejido epitelial de ratón</b> .....	64
<b>Tejido epitelial de intestino de cerdo</b> .....	65
<b>Reactivos y disolventes</b> .....	65
<b>Disoluciones y tampones</b> .....	66
<b>MÉTODOS</b> .....	67
<b>Procedimiento de separación y purificación aplicado a extractos oleosos</b> <b>concentrados de licopeno, luteína libre y <math>\beta</math>-caroteno</b> .....	67
<b>Obtención de extractos directos (ED) de pigmentos desde una matriz vegetal</b> .....	69
<b>Obtención de extractos de pigmentos de digestatos (DED)</b> .....	69
<b>Cuantificación de carotenoides por HPLC</b> .....	70
<b>Proceso de digestión <i>in vitro</i></b> .....	70
<b>Medida de la capacidad antioxidante frente a LOOH de digestatos</b> .....	71
<b>Preparación de emulsiones de hidroperóxidos lipídicos</b> .....	74
<b>Determinación del contenido en LOOH</b> .....	74

Preparación de suspensiones Tween carotenoide .....	75
Preparación de las disoluciones de antioxidantes hidrofílicos .....	76
Absorción y transporte de LOOH a través de epitelio intestinal en presencia de antioxidantes hidrofílico y lipofílicos.....	76
Diseño experimental de sondeo .....	81
Diseño experimental de optimización.....	84
Preparación de la emulsión sustrato de ácido graso libre .....	88
Preparación de disoluciones de lipoxigenasa tipos I y V .....	88
Medida de la actividad de lipoxigenasa tipos I y V.....	88
Paralización química de la actividad de formación de hidroperóxidos .....	89
Cuantificación espectrofotométrica de hidroperóxidos .....	90
Correlación entre el seguimiento de la reacción de formación de hidroperóxidos por espectrofotometría UV-vis y HPLC .....	90
Identificación de los hidroperóxidos mayoritarios por HPLC-MS .....	91
Detección de hidroperóxidos por HPLC.....	91
Obtención de la fracción microsomal y citosólica de mucosa de epitelio intestinal de ratones APC <sup>Min</sup> (heterocigotos), ratones control (homocigotos) y cerdo.....	92
Determinación de la concentración de proteínas.....	92
Medida de actividad lipoxigenasa en las fracciones microsomal y citosólica.....	93
Cinética de degradación de pigmentos .....	93
Estudio cinético de la degradación de carotenoides .....	96
Análisis estadístico.....	96
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	98
<b>M</b> ODELO DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i> .....	98
<b>T</b> RANSPORTE DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS A TRAVÉS DE EPITELIO INTESTINAL .....	119
<b>M</b> EDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA DE SOJA (TIPOS <b>I</b> Y <b>V</b> ) .....	142
<b>P</b> ARALIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE HIDROPEROXIDACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LOS HIDROPERÓXIDOS .....	152
<b>M</b> EDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA DE TEJIDO ANIMAL .....	166
<b>C</b> UANTIFICACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS POR HPLC .....	186
<b>C</b> INÉTICA DE DEGRADACIÓN DE PIGMENTOS EN PRESENCIA DE SITUACIONES OXIDANTES.....	193
CONCLUSIONES .....	211
AGRADECIMIENTOS .....	215
BIBLIOGRAFÍA.....	218

## INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

La oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados presentes en los alimentos es la reacción que promueve la formación de hidroperóxidos lipídicos, compuestos que presentan un alto potencial oxidativo por su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ERO) de origen exógeno. Los hidroperóxidos lipídicos y sus productos de degradación, procedentes de la dieta, constituyen un grupo de compuestos que pueden contribuir al desequilibrio de las rutas metabólicas de la mucosa intestinal, la disfunción de los enterocitos y el desarrollo de diversas patologías intestinales que cursan con un proceso inflamatorio asociado.

El contenido de hidroperóxidos lipídicos en una dieta rica en grasas poli-insaturadas, en las que el procesamiento de los alimentos implica técnicas como la deshidratación, el cocinado y la fritura, convierte a este tipo de grasas en un potenciador de los procesos degenerativos, que están mediados por la generación de ERO que se acumulan en el tracto intestinal e incrementan el nivel oxidativo.

El intestino tiene como función principal la absorción de nutrientes y el actuar como barrera de defensa frente a patógenos y compuestos nocivos derivados de la dieta, así como frente a la acumulación de ERO exógenos. Para hacer frente a dicha acumulación de ERO exógenas y/o endógenas, y al consecuente incremento del estrés oxidativo, la mucosa intestinal utiliza mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para mantener el balance oxidativo tisular. La puesta en marcha de los mecanismos celulares tendentes a la neutralización del excedente oxidante se produce cuando los hidroperóxidos lipídicos, sus productos de degradación y las ERO ya han sido absorbidos y/o generados en el tejido.

Minimizar el impacto oxidativo de los hidroperóxidos y sus productos de degradación ingeridos en la dieta puede abordarse mediante dos estrategias distintas, neutralización durante el tránsito intestinal de los hidroperóxidos presentes y reforzamiento de la capacidad antioxidante tisular.

Una manera de paliar los efectos perjudiciales de las dietas ricas en grasas poli-insaturadas es suplementar la misma con la ingesta de frutas y verduras que proporcionan un cúmulo de compuestos antioxidantes de muy diversa naturaleza, entre ellos los pigmentos carotenoides. Durante el proceso digestivo, los carotenoides pueden desarrollar su actividad antioxidante frente a los hidroperóxidos lipídicos y ERO que se generen durante el tránsito intestinal para contribuir en la disminución de su concentración y su actividad. En esta situación, la actividad antioxidante de los

mencionados carotenoides se desarrollaría a nivel pre-sistémico, es decir, la disminución en la concentración de compuestos oxidantes exógenos es previa a la etapa de absorción intestinal de los nutrientes. Esta hipótesis de trabajo constituye uno de los principales objetivos a desarrollar en la presente tesis.

Los hidroperóxidos presentes en el tracto gastrointestinal procedentes de la dieta pueden ser absorbidos por la mucosa intestinal desplazando a nivel sistémico el potencial oxidante exógeno. Existe una fuerte controversia acerca de esta posibilidad de absorción. En algunos estudios no se detectó la presencia de hidroperóxidos lipídicos en el sistema linfático mientras que en otros trabajos sí se halló un transporte eficiente de estos compuestos. La causa de estas diferencias se basa en la concentración de glutatión en la mucosa intestinal que cuando es reducida limita la posibilidad de que los hidroperóxidos lipídicos sean metabolizados adecuadamente, incrementando la concentración de ERO en el sistema linfático.

El balance oxidativo intestinal también se puede modificar por una generación masiva de ERO endógenas. Principalmente las enzimas de la familia de la lipoxigenasa (LOX) y ciclooxigenasa (COX) son las responsables al desarrollar su actividad sobre ácidos grasos poli-insaturados, promoviendo la generación de hidroperóxidos lipídicos endógenos. La actividad exacerbada de enzimas LOX está relacionada con la aparición y/o desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal en la que la mucosa intestinal presenta un elevado contenido de ERO. La cuantificación de la actividad LOX sería una medida del estrés oxidativo del tejido e indirectamente del grado de afectación de la mucosa intestinal por patologías degenerativas. Sin embargo la relación entre actividad de LOX y daño tisular puede verse modulada por la presencia de antioxidantes procedentes de la dieta. Una alta actividad de LOX se relacionaría con una alta formación de hidroperóxidos y por tanto un alto nivel oxidante promovido endógenamente, sin embargo la presencia de carotenoides procedentes de la dieta y que están siendo absorbidos por la mucosa intestinal puede amortiguar el daño debido a la presencia de los hidroperóxidos.

El desarrollo de la actividad antioxidante por los carotenoides en la mucosa intestinal implica un déficit en la cantidad de antioxidantes (carotenoides) disponibles para su incorporación al metabolismo sistémico, ya que éstos desaparecen durante el proceso antioxidante. Por tanto no solo se trata de observar el modo en que los carotenoides se implican en la cadena de reacciones

enzimáticas que promueven las LOX, sino también qué consecuencias tiene dicha implicación en su disponibilidad y presencia en el pool de antioxidantes sistémicos presente en el organismo.

## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

---

## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

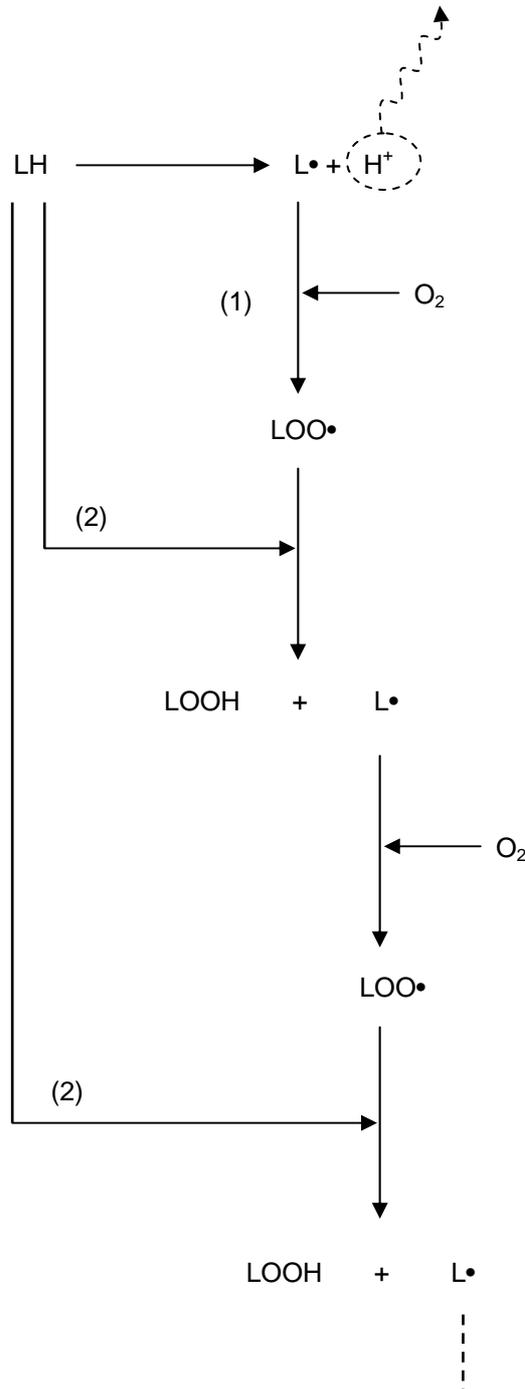
La oxidación lipídica puede progresar por tres vías paralelas dependiendo de la causa inductora de la reacción:

La *auto-oxidación* se desarrolla a través de un mecanismo de radicales libres (Figura 1) en el que mediante aporte energético externo, un átomo de hidrógeno adyacente a un doble enlace es sustraído del ácido graso, que es el sustrato (LH). El radical libre (L•) resultante se combina con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo (LOO•) que abstrae un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado para formar un hidroperóxido (LOOH) y otro radical libre, reacciones que se repiten en cadena, propagándose el proceso de oxidación en el entorno lipídico. Cualquier tipo de radiación favorece la aparición del proceso de auto-oxidación lipídica (O'Brien y Frazer, 1966; Kubow, 1990).

El proceso de oxidación lipídica por *catálisis no enzimática* se inicia mediante la generación de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo por parte de algún catalizador, especialmente ion hierro libre o hémico, y requiere la presencia de oxígeno. Los radicales hidroxilo, así como los radicales perhidroxilo y el oxígeno singulete, retiran un átomo de hidrógeno de un grupo metileno perteneciente a la cadena hidrocarbonada de la molécula lipídica, especialmente de ácidos grasos poli-insaturados del tipo linoleato, linolenato y araquidónico para formar los hidroperóxidos lipídicos (Lapidot y colaboradores, 2005; Kanner, 2007).

Finalmente, el proceso de oxidación lipídica por *catálisis enzimática* implica a enzimas tipo lipoxigenasa que pueden formar directamente hidroperóxidos de ácidos grasos poli-insaturados en presencia de oxígeno.

Los productos formados en todas las reacciones anteriores son los hidroperóxidos, que en presencia de iones metálicos o altas temperaturas, se escinden en radicales libres que, en presencia de oxígeno, podrían formar productos de oxidación secundaria tales como epoxi-hidroperóxidos, ceto-hidroperóxidos, y peróxidos cíclicos que se pueden descomponer en productos de bajo peso molecular o condensarse formando polímeros (Kubow, 1990). La descomposición final de los hidroperóxidos y sus productos de oxidación secundaria genera productos como aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos grasos cortos, ésteres, hidrocarburos, furanos y lactonas habiéndose identificado cientos de productos volátiles y no volátiles de descomposición, la mayoría de ellos aldehídos (Lapidot y colaboradores, 2005; Kanner, 2007).



**Figura 1.-** Estados de iniciación (1) y propagación (2) de la degradación auto-oxidativa de un ácido graso (LH).

### **Hidroperóxidos lipídicos (LOOH) exógenos**

La ingesta de alimentos ricos en grasas poli-insaturadas constituye una de las principales de fuentes de hidroperóxidos lipídicos al organismo *in vivo* (Aw y colaboradores, 1992). En la actualidad, las dietas centradas en el consumo de alimentos con una alta proporción de este tipo de grasas están muy extendidas por dos motivos concatenados:

- La tendencia, cada vez mayor, de consumir alimentos que las contengan con el fin de usarlas como método para reducir el incremento en los niveles de colesterol (Aw y colaboradores, 1992).
- Los hábitos alimenticios focalizados en el consumo de alimentos fritos, calentados o procesados para su almacenamiento.

En el caso de los pescados grasos y sus aceites, la alta concentración de ácidos grasos poli-insaturados C20-C22 encontrados provoca que dichos aceites se oxiden rápidamente tras su exposición al aire (Kubow, 1990). En otros alimentos grasos, el proceso tecnológico empleado, alimentos fritos y alimentos con gran superficie de exposición (como los alimentos en polvo), son la causa de la aparición de este tipo de compuestos.

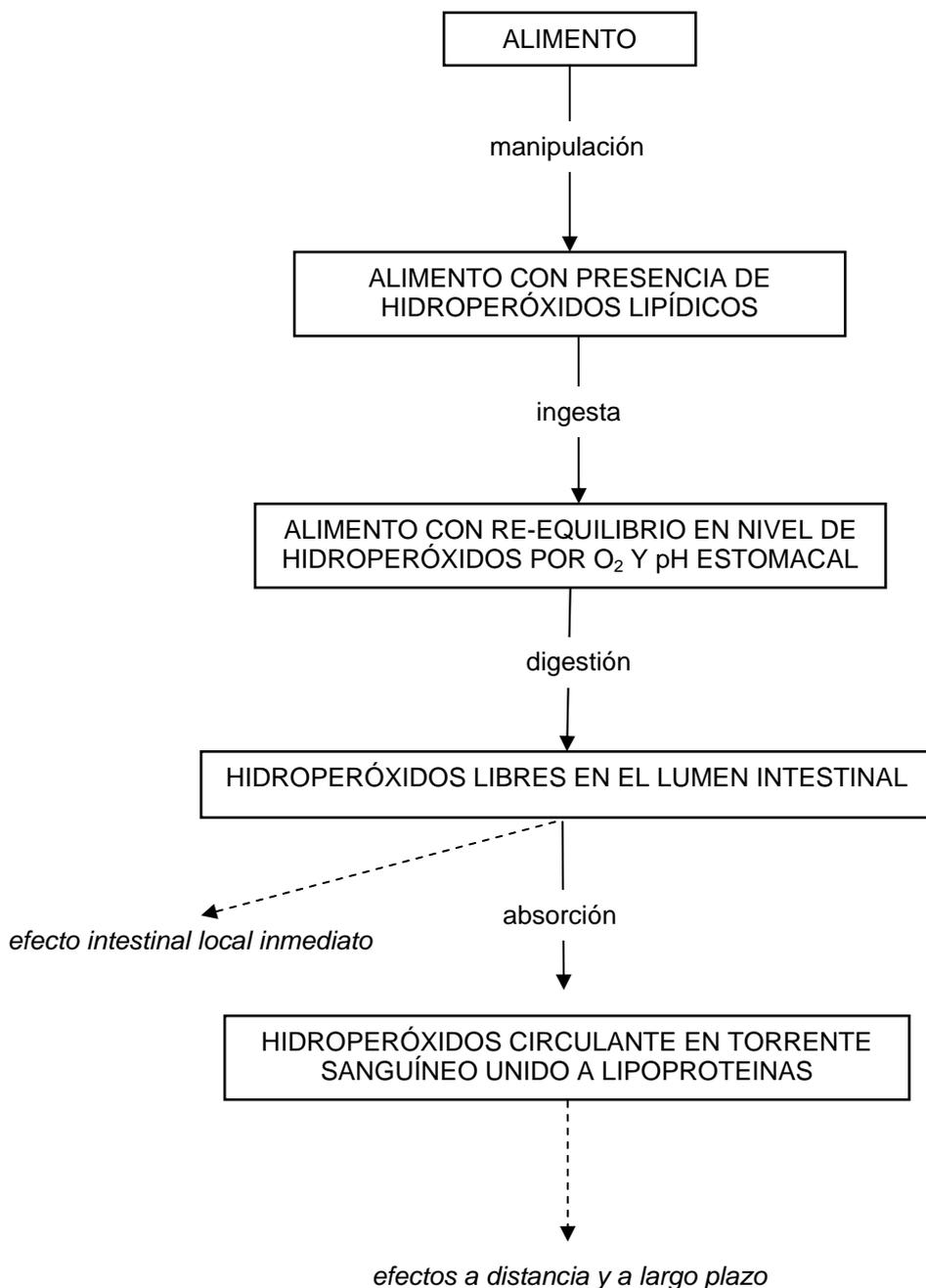
Kanner y Lapidot (2001) han encontrado que los niveles de hidroperóxidos lipídicos presentes en comida rápida basada en carne de pavo calentada son alrededor de 100 veces superiores que en la misma carne fresca.

Durante el almacenamiento, como etapa del procesado de los alimentos, la peroxidación lipídica es uno de los mecanismos principales de deterioro de la calidad en los alimentos envasados, especialmente en los productos cárnicos. Estos alimentos, ricos en catalizadores endógenos que aceleran la peroxidación lipídica, promueven la generación de compuestos citotóxicos y alteran los niveles de otros constituyentes (Kanner y Lapidot, 2001; Lapidot y colaboradores, 2005).

En estudios previos realizados en ratas se ha encontrado una relación causal entre la toxicidad *in vivo* de aceites poli-insaturados alimenticios y su contenido en hidroperóxidos lipídicos (Andrews y colaboradores, 1960; Aw y colaboradores, 1992). La oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados (AGPIs), las reacciones cruzadas entre los radicales libres de origen lipídico formados durante la

peroxidación lipídica, así como otros constituyentes que se puedan encontrar en los alimentos pueden generar compuestos citotóxicos, mutagénicos y aterogénicos (Gorelik y colaboradores, 2005; Kanner, 2007). Además, los radicales libres generados durante el proceso de peroxidación lipídica también co-oxidan vitaminas como la vitamina A y carotenoides, vitamina E y vitamina C, afectando de ese modo a las cualidades nutricionales de los alimentos (Gorelik y colaboradores, 2005).

Una alta ingesta de ácidos grasos poli-insaturados con elevado contenido en hidroperóxidos puede afectar la integridad intestinal mediante la inducción de estrés oxidativo en los tejidos, lo que puede iniciar procesos degenerativos locales que pueden a largo plazo afectar otros tejidos y órganos como respuesta del sistema inmunitario ante los daños causados por los hidroperóxidos (esquema 1) (Aw y colaboradores, 1992; Aw, 2005; Gorelik y colaboradores, 2005; Kanner, 2007).



**Esquema 1.-** Los alimentos ingeridos presentan distinta cantidad de compuestos oxidados en función de su manipulación. Éstos llegan al estómago, donde se dan reacciones de carácter pro- y antioxidante, lo que modifica la concentración previa de hidroperóxidos lipídicos en mayor o menor medida. Adicionalmente la protección ejercida por los antioxidantes alimentarios y el GSH se hace patente en distinta medida, lo que modifica el metabolismo de los hidroperóxidos lipídicos llevando a su acumulación en la mucosa intestinal o a su absorción.

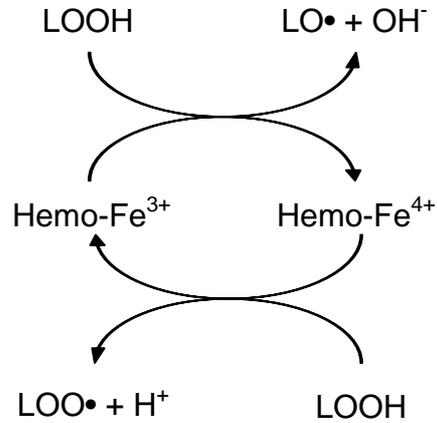
### **Hidroperóxidos generados durante el recorrido de los alimentos por el tracto digestivo**

Los hidroperóxidos lipídicos no solo se forman antes de la ingestión de los alimentos sino que también se generan a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, comenzando en la boca. La saliva juega distintos papeles en el proceso de peroxidación lipídica que se dará posteriormente en el fluido gástrico: puede tener efectos pro-oxidantes, antioxidantes, o no mostrar ningún efecto (Gorelik y colaboradores, 2007).

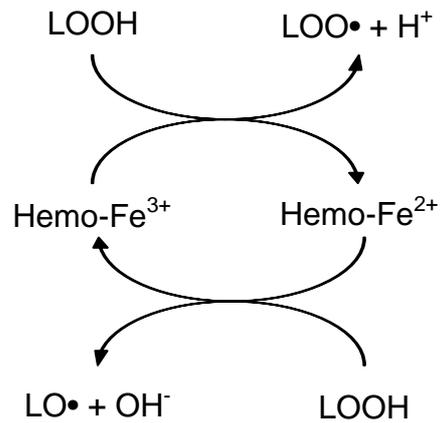
El bolo alimenticio se forma cuando los alimentos masticados entran en contacto con la secreción salivar, estimulada por la propia masticación. Durante el masticado, la saliva humedece y lubrica los alimentos que reducen su volumen y forman un bolo resbaladizo (Gorelik y colaboradores, 2007). La saliva está también implicada en el sistema inmunológico de defensa, que se basa en la protección suministrada por proteínas enzimáticas y en la secreción de inmunoglobulinas. La saliva actúa como un sistema antioxidante compuesto por varias moléculas entre las que algunas de las principales son el ácido úrico, el tiocianato y las enzimas de tipo peroxidasa, como la lactoperoxidasa, una hemo-proteína que presenta actividad pseudoperoxidasa e intensifica la peroxidación lipídica bajo condiciones gástricas. Las diferencias en el perfil de antioxidantes de la saliva están relacionadas con diferencias en condiciones fisiológicas tales como la edad, el estado de salud, ser o no una persona fumadora, o el tipo de alimentación seguida. Los ensayos desarrollados por Gorelik y colaboradores (2007) con muestras de saliva suministrados por donantes sanos muestran que la actividad lactoperoxidasa puede ser considerada como pH-dependiente. A pH 7 el efecto pro-oxidante es bastante débil, pero conforme baja el pH a 3 se acelera la descomposición de los LOOH por la actividad pseudoperoxidasa y también se incrementa el proceso de peroxidación lipídica, que actúa como una reacción en cadena. En este punto, hay discrepancias. Algunos autores consideran que la lactoperoxidasa actúa catalíticamente y no enzimáticamente, de manera similar a la mioglobina, y descomponen los hidroperóxidos lipídicos como se muestra en la Figura 2 (Reeder y Wilson, 1998). Sin embargo, otros autores sostienen que si los LOOH se atribuyen a fosfolípidos, el mecanismo de reacción propuesto sería el mostrado en la Figura 3 (Maiorino y colaboradores, 1994). Con las experiencias de Gorelik y colaboradores (2007) también se concluye con que otro componente de la saliva, el nitrito que se genera a partir del nitrato concentrado en la saliva por la acción de la flora de

la boca, inhibe significativamente la peroxidación lipídica, y la extensión de este efecto depende de la concentración.

Aunque el efecto parcialmente antioxidante de la saliva no puede proteger al organismo de determinados procesos deletéreos que se den posteriormente en el estómago (Gorelik y colaboradores, 2007), queda demostrado que es un componente más a la hora de modificar la concentración de LOOH en el tracto digestivo.



**Figura 2.-** Descomposición catalítica, mediada por hemo-proteínas (Hemo-Fe<sup>3+</sup>), de los hidroperóxidos lipídicos (LOOH) en radicales libres (LOO• y LO•).



**Figura 3.-** Descomposición catalítica, mediada por hemo-proteínas (Hemo-Fe<sup>3+</sup>), de los hidroperóxidos lipídicos atribuidos a fosfolípidos (LOOH) en radicales libres (LOO• y LO•).

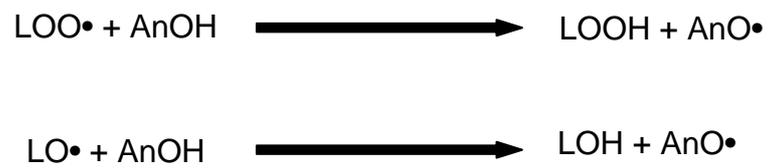
El estómago, que recibe LOOH de la dieta principalmente, se comporta como un biorreactor según algunos autores (Kanner y Lapidot, 2001). El pH ácido existente y la disgregación que experimentan los alimentos durante esta etapa del proceso digestivo generan un medio en el que aparecerá una competencia entre la oxidación de lípidos alimentarios y su protección mediante los antioxidantes, cuyo resultado global depende de la concentración y actividad de los componentes presentes en el sistema. El estómago, que recibe los alimentos masticados, actúa al menos durante el instante de la alimentación como un entorno aeróbico. En estas condiciones, el conjunto del estómago y sus fluidos son un sistema propicio que promueve la peroxidación lipídica, lo cual afecta a la concentración de vitaminas y promueve la generación de compuestos geno- y citotóxicos. Por otro lado, el pH ácido de los jugos gástricos amplifica la peroxidación lipídica catalizada por los iones de hierro hémico procedente de la dieta. De hecho, la actividad en el medio que constituye el estómago incrementa la cantidad de LOOH de 4 a 9 veces (Kanner y Lapidot, 2001; Gorelik y colaboradores, 2005; Kanner, 2007).

Lapidot y colaboradores (2005) demuestran que los fluidos gástricos a pH 3 aceleran la peroxidación lipídica, así como la co-oxidación de constituyentes alimentarios que llegan al estómago. Según sus estudios, la metmioglobina trabaja pro-oxidativamente cuando está presente a bajas concentraciones (1:30, aproximadamente) e incrementa la cantidad de hidroperóxidos de linoleato. Sin embargo, cuando su concentración es elevada (1:3 aproximadamente) se comporta como un antioxidante y descompone los hidroperóxidos haciendo que su concentración se mantenga a cero durante periodos largos de tiempo. La transición de antioxidante a pro-oxidante depende principalmente de la relación hidroperóxidos hemo-proteína, de modo que una reducción en la concentración de hidroperóxidos promueve el efecto antioxidante de la metmioglobina. Así mismo, los estudios de Gorelik y colaboradores (2005) demuestran que los fluidos gástricos humanos a pH 3 promueve la generación de hidroperóxidos y malondialdehído.

Los resultados de Gorelik y colaboradores (2007) están de acuerdo con otros hallazgos previos que indican que a pH bajo hemo-proteínas como la mioglobina o la lactoperoxidasa pueden iniciar la peroxidación de los lípidos mejor que a pH 7 (Maiorino y colaboradores, 1994; Kanner y Lapidot, 2001; Gorelik y colaboradores, 2005; Lapidot y colaboradores, 2005). Sin embargo, si hay antioxidantes presentes en el sistema de oxidación a concentraciones altas críticas, éstos pueden

interaccionar con los radicales que se están produciendo para dar paso a la formación de compuestos estables (Figura 4).

Compuestos antioxidantes que se pueden encontrar de manera natural en los alimentos, como nitrato/nitrito, y también como componentes de la saliva, ácido úrico y tiocianato, pueden proporcionar una protección parcial frente a la peroxidación lipídica bajo condiciones gástricas. En el estómago, las condiciones ácidas provocan la descomposición del nitrito en  $\text{NO}\bullet$  y  $\text{NO}_2\bullet$ , pero en presencia de agentes reductores tales como el ácido ascórbico o los polifenoles la reducción del nitrito a óxido nítrico (NO) se ve favorecida. Según Gorelik y colaboradores (2007), el efecto inhibitorio del nitrito se puede deber a esta conversión a NO, que puede modular la peroxidación lipídica mediante múltiples rutas de reacción, entre las cuales se incluyen las interacciones con el hierro hémico y compuestos no hémicos. Por tanto, y teniendo en cuenta que las frutas y verduras son fuente de nitrato/nitrito entre otros compuestos antioxidantes, la presencia de estos alimentos en el estómago incrementan la producción de NO además de incrementar el efecto antioxidante de la saliva.



**Figura 4.-** Generación de productos estables (LOOH y LOH) a partir de radicales (LOO• y LO•), por la presencia en altas concentraciones de compuestos antioxidantes (AnOH).

### Modelos de digestión *in vitro*

Los alimentos sufren alteraciones físico-químicas a lo largo del tracto gastrointestinal que, además de promover la generación de hidroperóxidos, pueden modificar la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en las matrices alimentarias. Para el estudio en detalle del efecto de la matriz alimentaria y el proceso digestivo sobre los compuestos antioxidantes se pueden desarrollar experiencias de digestión *in vitro*.

Existen modelos de digestión *in vitro* puestos a punto para la estimación de la digestibilidad de minerales como hierro y fósforo (Miller y colaboradores, 1981; Liu y colaboradores, 1998), colesterol (Fouad y colaboradores, 1991) y vitaminas hidrosolubles (Ekanayake y Nelson, 1986). Se trata de modelos gastrointestinales estáticos que simulan el tránsito a través del tracto digestivo humano, reproduciendo las condiciones fisiológicas de la digestión gástrica e intestinal. Son modelos simples, fáciles de aplicar a un amplio número de muestras y que permiten estimar el efecto, tanto de las condiciones de digestión como de otros factores ligados a la matriz alimentaria, en la bioaccesibilidad de un nutriente.

En el trabajo de Miller y colaboradores (1981), la fase gástrica consiste en homogeneizar una porción del alimento y acidificar el homogeneizado a pH 2 con HCl 1 M, añadiendo posteriormente una suspensión de pepsina porcina. El homogeneizado se incuba a 37 °C con agitación circular. A continuación, para efectuar la fase intestinal, el pH se eleva hasta 5,3 mediante la adición de bicarbonato sódico, junto con una suspensión de pancreatina y extracto biliar en solución de bicarbonato sódico. Nuevamente se eleva el pH, ahora hasta 7,5, y la mezcla se incuba durante 2 horas en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores.

Las condiciones experimentales de cualquier modelo de digestión no se alejan demasiado de las comentadas anteriormente, ya que se trata de reproducir las etapas y condiciones fisiológicas del proceso digestivo humano. Sí es posible encontrar adaptaciones del modelo anterior, pero se trata de cambios o modificaciones puntuales del modelo básico expuesto, en función del problema o aplicación que se pretende desarrollar. Los modelos de digestión *in vitro* tienen múltiples aplicaciones y pueden aportar conocimientos en áreas que incluyen desde el análisis de aspectos toxicológicos de posibles contaminantes en los alimentos (Oomen y colaboradores, 2003), el estudio de factores de la dieta que intervienen en la bioaccesibilidad de un nutriente o componente determinado, el efecto que las condiciones hepato-biliares diferentes o no habituales tienen en la bioaccesibilidad de compuestos lipídicos (Leo y colaboradores, 1995),

hasta el diseño de matrices alimentarias en las que el concepto de bioaccesibilidad es un criterio de selección de componentes de la matriz de igual importancia que otros como la estructura física, la estabilidad o la palatabilidad (Manzocco y Nicoli, 2002). Por ello, los modelos de digestión *in vitro* constituyen una herramienta analítica eficaz con los que realizar análisis sin recurrir a modelos de experimentación *in vivo*.

En el caso particular de pigmentos carotenoides, se ha aplicado la digestión *in vitro* para la estimación de la digestibilidad de estos compuestos desde los alimentos naturales que los contienen. El trabajo de Garrett y colaboradores (1999) constituye la primera aplicación de un modelo de digestión *in vitro* en combinación con un modelo de asimilación intestinal basado en la línea celular Caco-2, para determinar la bioaccesibilidad de carotenoides en alimentos. Tras aplicar el procedimiento experimental, con las etapas comentadas anteriormente, sobre alimentos infantiles elaborados a base de frutas y verduras, y pasta de tomate, determinaron que la omisión de la fase de digestión gástrica no modifica la eficiencia del proceso de micelarización obtenida en la fase de digestión intestinal y se concretaron las cantidades de sales biliares y suspensión de enzimas pancreáticas que proporcionan la mejor transferencia de carotenoides desde el alimento a las micelas, concluyendo que las cantidades adecuadas se corresponden con las concentraciones fisiológicas estimadas en estudios anteriores (Tso, 1994; Charman y colaboradores, 1997). Posteriormente, el método desarrollado por Garrett y colaboradores se ha aplicado y adaptado en otros estudios de digestibilidad y/o asimilación de carotenoides con ligeras modificaciones. En el trabajo de Hedrén y colaboradores (2002) se estudia la digestibilidad de carotenos en zanahorias, frescas o cocinadas, aplicando condiciones similares al método de Garrett en cuanto a concentración de enzimas digestivas y sales biliares, y manteniendo los tiempos de incubación, pero modificando las condiciones de separación de la fracción micelar. En los trabajos publicados por Breithaupt y colaboradores (2002b), y Zorn y colaboradores (2003) se elimina la fase de digestión gástrica y se sustituye el pool enzimático de pancreatina por lipasa pancreática y carboxil-éster lipasa que parece tener un efecto positivo en la micelarización y posterior proceso de asimilación de carotenoides (Chitchumroonchokchai y Failla, 2006). La incorporación de la enzima carboxil-éster lipasa junto con la lipasa pancreática en la fase de digestión intestinal es la principal modificación al método de Garrett y colaboradores, introducida en otros estudios como el de Granado-Lorencio y colaboradores (2007). En este último trabajo se aplica, antes de las dos fases de digestión (gástrica e intestinal), una primera etapa de simulación de la masticación incorporando una solución salivar con componentes orgánicos e inorgánicos, y  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1).

Los modelos de digestión *in vitro* se pueden adaptar a las diferentes condiciones de ensayo, resultando una herramienta útil en estudios en los que se busca reproducir el proceso fisiológico que sufre un compuesto tras su ingestión.

### **Hidroperóxidos generados en el tracto gastrointestinal por causas endógenas**

La presencia de lipoxigenasas en el tracto digestivo (O'Brien y Frazer, 1966) introduce una nueva línea de peroxidación lipídica de los alimentos durante el proceso digestivo, además de la que ha podido experimentar previamente como consecuencia de las operaciones de procesamiento y almacenamiento.

Todo lo anteriormente expuesto hace referencia a reacciones que se desarrollan a nivel del tracto gastrointestinal durante el proceso de digestión y debido fundamentalmente a los componentes presentes en los alimentos y el entorno físico-químico en el que se encuentran. El balance oxidativo intestinal también se puede modificar por una generación masiva de ERO endógenas. Principalmente las enzimas de la familia de la lipoxigenasa (LOX) y ciclooxigenasa (COX) son las responsables al desarrollar su actividad sobre ácidos grasos poli-insaturados, promoviendo la generación de hidroperóxidos lipídicos endógenos. La actividad exacerbada de enzimas LOX está relacionada con la aparición y/o desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal en la que la mucosa intestinal presenta un elevado contenido de ERO.

Situado el digestato en el lumen intestinal, su contenido en hidroperóxidos lipídicos potencialmente absorbibles ha dependido de los siguientes factores:

- Factores previos a la ingesta. Contenido en hidroperóxido inicial del alimento.
- Moduladores durante la ingesta. Presencia de antioxidantes.
- Factores fisiológicos. Actividad de lipoxigenasa intestinal.

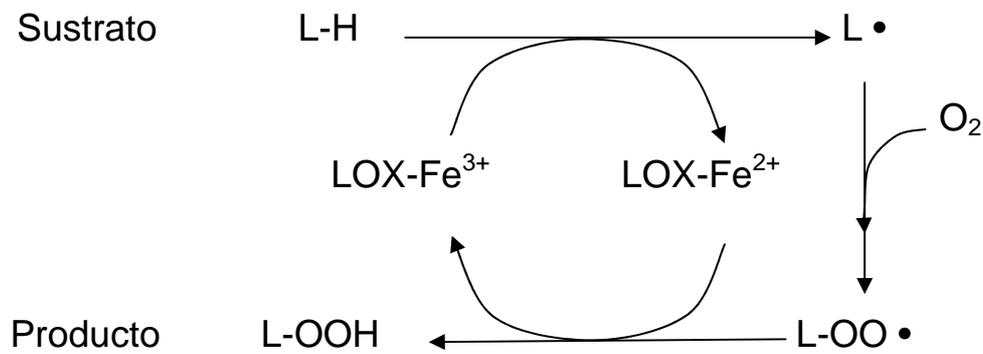
Conocer cómo influyen los modulares del nivel de oxidación de determinados compuestos presentes en los alimentos y cómo pueden afectar las enfermedades inflamatorias del epitelio intestinal que cursan con una alta **actividad de lipoxigenasa** serán los objetos fundamentales de la presente tesis. Debido a la naturaleza lipofílica de los hidroperóxidos, el estudio de modulación se centrará en los **pigmentos carotenoides** que constituyen un grupo de antioxidantes naturales presentes en vegetales y de naturaleza altamente lipofílica.

### Enzima lipoxigenasa. Generalidades

Las enzimas del tipo lipoxigenasa (LOX), linoleato:oxígeno oxidoreductasa (EC 1.13.11.12), forman una familia de dioxigenasas de ácidos grasos. Están constituidas por una sola cadena polipeptídica y su peso molecular es entre 75-80 kDa en animales y 94-104 kDa en vegetales. Estas proteínas tienen un dominio en barril  $\beta$  N-terminal y un largo dominio catalítico que contiene un único átomo de hierro no hémico (Brash, 1999; Pérez Gilabert y García Carmona, 2002; Funk, 2006). La enzima cataliza la dioxigenación regioespecífica y estereoespecífica de los ácidos grasos poli-insaturados (AGPIs) con un sistema (1Z, 4Z)-pentadieno. Se produce así el correspondiente hidroperóxido de ácido graso con conjugación Z, E-dieno (Figura 5). Cuando están aisladas, las enzimas tienen generalmente el átomo de hierro como ión ferroso (inactiva). La oxidación a férrico que supone la activación de la enzima, es necesaria para la catálisis.

Las lipoxigenasas son enzimas ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal. En animales, las distintas lipoxigenasas se nombran en función de su especificidad posicional para la dioxigenación del ácido araquidónico. Así, se ha descrito la presencia 15-, 12-, o 5-LOX que forman hidroperóxidos sobre los carbonos 15, 12 o 5 del ácido graso poli-insaturado, respectivamente. Sin embargo, en el reino vegetal, el ácido araquidónico es un AGPI minoritario y la acción de las lipoxigenasas se desarrolla principalmente sobre los ácidos linoleico y linolénico. De este modo, las lipoxigenasas se clasifican en función de la especificidad posicional para la oxigenación de dicho ácido graso. El linoleico en plantas se puede oxigenar para generar los conjugados hidroperoxi-octadecadienos (HPODEs). Esta oxigenación se puede producir tanto en el carbono 9 como en el 13, generándose 9- o 13- HPODE. Estos compuestos se pueden reducir a sus correspondientes hidroxi ácidos (9- o 13-HODE), o generar  $\alpha$ - y  $\gamma$ -cetoles, que pueden escindir-se formando aldehídos de cadena corta y oxo-ácidos, o progresar formando un grupo de compuestos estructuralmente similares a las prostaglandinas (Abián y colaboradores, 1991; Pérez Gilabert y García Carmona, 2002).

Los productos primarios formados por la reacción catalizada por las lipoxigenasas, son moléculas muy reactivas que se transforman rápidamente en varias familias de compuestos fisiológicamente activos conocidos como *oxilipinas*.



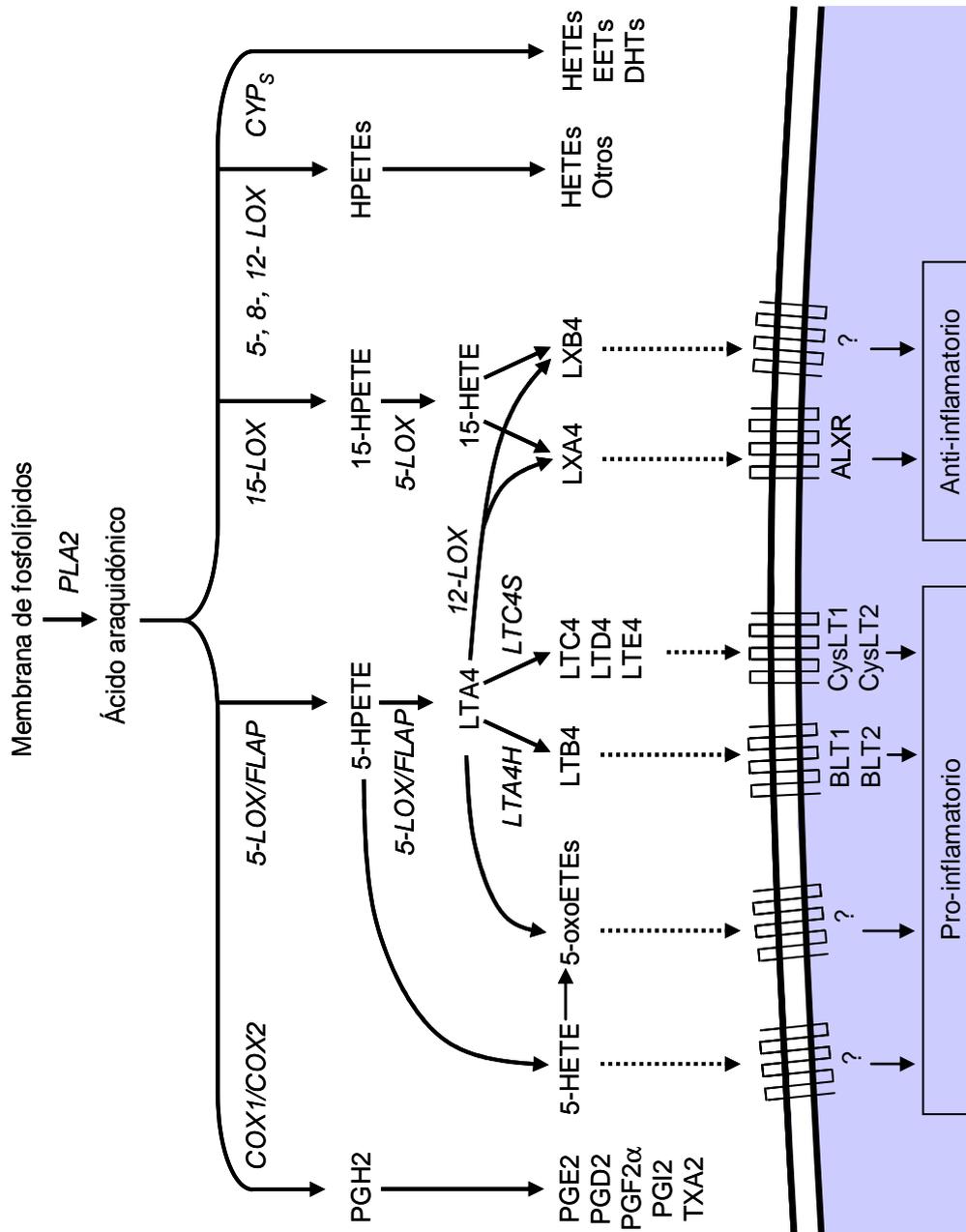
**Figura 5.-** Reacción de dioxigenación enzimática de ácidos grasos poli-insaturados por parte de lipoxigenasa.

### Actividad de lipoxigenasa en animales

En animales, el sustrato preferente es el ácido araquidónico, 20:4  $\omega$ 6, que es el principal precursor de eicosanoides en las células de mamíferos (Funk, 2001). El término eicosanoides (del griego *eicosa*, que significa 20) se aplica a un grupo de moléculas de constitución lipídica obtenidas de la oxigenación de los ácidos grasos esenciales de 20 átomos carbonos.

Los productos formados por la actuación de lipoxigenasa son los ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) y los ácidos hidropoxi-eicosatetraenoicos (HPETEs) que muestran numerosas actividades biológicas. Participan en un amplio rango de funciones, destacando su acción en los eventos inflamatorios, su actuación como mediadores para el sistema nervioso central y su intervención en la respuesta inmune, tanto en vertebrados como en invertebrados. Se conoce la existencia de tres LOXs (5-LOX, 12-LOX y 15-LOX) presentes en tejidos humanos, y que éstas y sus productos HETEs son importantes reguladores en la proliferación y apoptosis de líneas celulares cancerígenas.

En general actúan como señales moleculares discretas. La oxidación del ácido araquidónico, y otros AGPIs de cadena corta con estructura 1, 4-Z, Z-pentadieno (como linoleico y linolénico), por la actuación de LOX se convierten en una fuente de bio-reguladores altamente activos, particularmente leucotrienos y lipoxinas. La síntesis de tales productos es una de las funciones más firmemente establecidas de las lipoxigenasas (Schneider y colaboradores, 1997; Funk, 2006). Estos mediadores, o bio-reguladores, se sintetizan a través de la ruta de la 5-lipoxigenasa en una gran variedad de células implicadas en el sistema inmune (linfocitos B, granulocitos, monocitos, mastocitos y células dendríticas). En función del tipo celular, varias citoquinas son generadas para inducir la activación de la mencionada ruta (Uhl, 2002). Con la ruta de la 5-lipoxigenasa se producen potentes mediadores inflamatorios, como por ejemplo los de carácter pro-inflamatorios como leucotrieno B<sub>4</sub>, 5-HETE, ácido 5-oxo-eicosatetraenoico (5-oxoETEs) y cisteinil leucotrienos, o anti-inflamatorios como lipoxina A<sub>4</sub> y lipoxina B<sub>4</sub> (Chen y colaboradores, 2006) (Figura 6).



**Figura 6.-** Esquema general de las rutas de metabolización del ácido araquidónico. Para simplificar, solo se muestran las enzimas, receptores y metabolitos principales de la ruta de 5-LOX al detalle. Esta ruta contiene: 1) las 4 enzimas principales, 5-LOX, la enzima activadora de 5-LOX (FLAP), leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolasa (LTA<sub>4</sub>H), leucotrieno C<sub>4</sub> sintasa (LTC<sub>4</sub>S); 2) los grupos de metabolitos principales, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), cisteinil leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), lipoxinas A<sub>4</sub> y B<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>, LXB<sub>4</sub>), ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE) y ácidos 5-oxo-eicosatetraenoico (5-oxoETEs); y 3) sus respectivos receptores, receptores de LTB<sub>4</sub> (BLT1, BLT2), receptores de cisteinil leucotrienos (CysLT1, CysLT2), receptor de LXA<sub>4</sub> (ALXR). Los receptores de 5-HETE, 5-oxoETEs y LXB<sub>4</sub> no han sido identificados o bien caracterizados.

El metabolismo del ácido araquidónico juega un papel importante en la inflamación y en las enfermedades asociadas a la inflamación (Chen y colaboradores, 2006). La acumulación y activación de los leucocitos son la antesala de la mayoría de desórdenes inflamatorios. Muchos de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos, juegan un papel importante como mediadores locales ejerciendo un amplio rango de acciones relevantes en la hipersensibilidad inmune y la inflamación (Chiang y colaboradores, 2006).

#### Medida de actividad lipoxigenasa

La medida de actividad de lipoxigenasa supone la cuantificación del producto formado durante el tiempo en que tiene lugar la reacción enzimática. El producto formado, los hidroperóxidos de ácido graso, tienen como característica diferenciada frente a otros compuestos que su máximo de absorción, en la franja ultravioleta (UV) del espectro, se sitúa en 234 nm. La mayoría de los métodos directos de medida de actividad de lipoxigenasa están basados sólo en medidas espectrofotométricas, que se pueden acoplar a otras técnicas que permitan diferenciar el tipo de hidroperóxido formado.

#### Medida espectrofotométrica global de hidroperóxidos

La metodología más general y difundida en el análisis de actividad de lipoxigenasa en productos vegetales se basa en el método descrito por Theorell en 1942, aún vigente en numerosos estudios (Gökmen y colaboradores, 2002). Básicamente el método consiste en realizar un extracto enzimático del producto vegetal. Al tratarse de una enzima hidrosoluble, la extracción suele ser directa empleando tampón a un pH cercano al óptimo de actividad y sólo en algunos casos se emplean coadyuvantes tipo Tritón X-100 para realizar una extracción más selectiva y eliminar interferentes. El extracto enzimático obtenido se incuba con una disolución acuosa del sustrato que, dependiendo del tipo de lipoxigenasa, en algunos casos será ácido linoleico, ácido linolénico o ácido araquidónico. La medida de actividad se realiza midiendo el incremento de absorbancia a 234 nm que experimenta el medio de incubación tras un tiempo establecido de reacción. El método propuesto tiene como ventaja su rapidez y bajo costo en material y equipamiento y como desventaja la poca especificidad de la medida. El propio sustrato es un producto susceptible de auto-oxidarse

espontáneamente y de una manera más acelerada a medida que el pH desciende. Es necesario, sobre todo con lipoxigenasas que muestran su óptimo de actividad a valores de pH inferiores a 7, descontar de la actividad medida aquella que se produce por la propia auto-oxidación del sustrato (Mínguez-Mosquera y colaboradores, 1993). Por otro lado, la cantidad de hidroperóxido determinada es la suma de todos los isómeros posicionales formados (tanto enzimática como espontáneamente), por lo que no es posible discernir el tipo de lipoxigenasa implicada en la reacción. Para solventar los problemas aparejados al empleo de esta técnica, numerosos autores han incorporado modificaciones a la metodología general. Surrey, en 1964, utilizando semillas de soja emplea una variante de preparación de sustrato que le confiere mayor estabilidad frente a la auto-oxidación. Como sustrato se usa una disolución de ácido linoleico en tampón borato con Tween 20, y clarificado con NaOH (2 M). Una metodología similar es la usada por Mínguez-Mosquera y colaboradores (1993). La diferencia con las experiencias de Surrey radica en que en esta ocasión no se usa tampón borato para la preparación del sustrato, sino que la disolución de ácido linoleico se realiza directamente en agua desionizada con Tween 20. Gökmen y colaboradores (2002), utilizan una variante de los métodos anteriormente mencionados. El extracto se pone en contacto con el sustrato, previamente aireado, a 30 °C y la reacción se detiene a distintos tiempos con NaOH. Luaces y colaboradores (2007) utilizan una metodología similar aunque el protocolo de extracción de LOX a partir de aceitunas de la variedad *Hojiblanca* es más elaborado. LOX se extrae triturando las aceitunas en tampón fosfato con Tritón X-100, ácido etileno diamino tetracético, fenilmetilsulfonil fluoruro, benzamidina ácido  $\alpha$ -aminocaproico y polivinilpirrolidona. Mientras que lo habitual es iniciar la reacción adicionando el sustrato al extracto enzimático para evitar al máximo la posible auto-oxidación del sustrato fuera del tiempo de reacción, Serpen y Gökmen (2007) utilizan un sistema inverso con LOX purificada de soja tipo I ya que la reacción transcurre en un medio alcalino de tampón borato en el que la reacción de *aparente* hidropoxidación espontánea (auto-oxidación) tiene lugar de forma muy lenta y se minimiza notablemente la contribución de esta reacción al proceso total. Skorey y Gresser (1998) consiguen medir con el método espectrofotométrico la actividad específica de un tipo de lipoxigenasa concreta empleando una fuente determinada de una sola de las isoenzimas. De esta forma, logran determinar la actividad de 5-LOX humana obtenida a partir del

sistema de expresión del bacilovirus de células de insecto, y posteriormente purificada. A este extracto enzimático se le proporciona el sustrato en forma de vesículas portadoras de ácido araquidónico. La reacción se sigue espectrofotométricamente a 238 nm. La actividad se estima usando como coeficiente de extinción molar el valor  $23000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### Medida de actividad por co-oxidación

Existen métodos indirectos de medida de actividad de lipoxigenasa basados en la actividad oxidante de los productos de la reacción enzimática. Esta medida de actividad indirecta emplea carotenoides como sustrato sobre el que actuarán los hidroperóxidos formados por la actuación de lipoxigenasa y tiene como ventaja que la monitorización del progreso de la reacción se realiza en la zona visible del espectro donde absorben menos interferentes (Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera, 1997; Serpen y Gökmen, 2007). Básicamente la reacción consiste en que el hidroperóxido formado oxida el sistema polienoico del carotenoide dando lugar a una gran cantidad de intermediarios inestables que progresan hacia productos de escisión, todos ellos con un cromóforo de menor longitud y por lo tanto con absorbancia fuera del rango visible (Yamauchy y colaboradores, 1998).

Este sistema indirecto de medida de actividad se encuentra afectado por las mismas limitaciones que el método espectrofotométrico; el hidroperóxido formado proviene de dos fuentes paralelas, una y mayoritaria procedente de la actuación de la enzima sobre su sustrato específico y otra de la auto-oxidación del sustrato. Igual que en el método de medida espectrofotométrica de formación de hidroperóxidos, la decoloración de pigmentos carotenoides es inespecífica, es decir, todos los isómeros posicionales del hidroperóxido están simultáneamente co-oxidando al pigmento por lo que no es posible discernir el tipo de lipoxigenasa presente en el extracto.

#### Separación de los productos formados por lipoxigenasa y medida de actividad

Los métodos espectrofotométricos detallados anteriormente (medida de actividad de lipoxigenasa, formación de hidroperóxido o decoloración de pigmentos carotenoides), son inespecíficos en cuanto a los compuestos responsables, es decir, cualquier hidroperóxido del ácido graso está contabilizado dentro de la determinación, sin discriminar si aquel está formado por una u

otra variante de la enzima LOX o incluso si provienen de la auto-oxidación espontánea del ácido graso. Estas técnicas globales son empleadas generalmente en estudios en los que se pretende conocer las consecuencias de la presencia de hidroperóxidos, como en la formación de aromas o en la decoloración de pigmentos, en alimentos. Generalmente, son estudios que se centran en situaciones en donde se pierde la regulación metabólica, como ocurre durante el procesado de alimentos. En este caso entran la/las enzima/s y sustrato/s implicados en la peroxidación y otros compuestos a los que puede afectar la formación de los hidroperóxidos, y que de forma natural estarían compartimentados. En estas condiciones no importa ni el origen ni la naturaleza del hidroperóxido porque se está evaluando su capacidad oxidante y ésta no depende de su origen y estructura.

En sistemas metabólicamente controlados, lipoxigenasa actúa sobre su sustrato específico produciendo un tipo concreto de hidroperóxido que será el sustrato que progresará hacia la formación de un determinado compuesto con una actividad biológica concreta. Al ser condiciones reguladas, la formación espontánea de hidroperóxido está minimizada ya que el sustrato se encuentra en condiciones de ausencia de oxígeno molecular e inmerso en una matriz lipídica que lo protege de los posibles agentes oxidantes. Al medir externamente la actividad de una enzima concreta, necesariamente se imponen unas condiciones de medida en la que se promoverá la aparición de reacciones espontáneas y se hace necesario no solo conocer qué proporción de hidroperóxido está formado enzimáticamente, sino también qué tipo de hidroperóxido para establecer la ruta de formación de los subsiguientes productos de reacción.

En estas condiciones el sistema de medida de actividad debe permitir la separación previa de los isómeros posicionales del hidroperóxido del ácido graso y su posterior cuantificación. Los primeros estudios se realizaron empleando separación en columna cromatográfica de sílica gel (Pattee y Singleton, 1977), aunque actualmente la técnica más empleada de separación y cuantificación es mediante HPLC provisto de un detector de radiación ultravioleta-visible (UV-vis). Esta metodología es la que se ha empleado de forma más generalizada en aquellos estudios en los que se pretende seguir la ruta de formación de compuestos con actividad biológica que proceden de isómeros muy concretos, como es el caso de los leucotrienos, lipoxinas y el resto de compuestos implicados en la respuesta inflamatoria en animales. (Samuelsson, 1983; Iwahashi, 2000).

En la mayoría de esos estudios se suele usar como sustrato preferente el ácido araquidónico frente al linoleico usado en las formas vegetales. Para el estudio de los compuestos formados debido a la actividad de lipoxigenasa, Jakschik y colaboradores (1980) recurren al marcaje isotópico con  $^{14}\text{C}$ . Tras incubar un extracto de basófilos de rata con ácido araquidónico, se extraen los productos formados que están marcados y se analizan por cromatografía para determinar la presencia de derivados hidroxilados del ácido araquidónico. Jakobsson y colaboradores (1991) estudian la actividad LOX a través de la formación de leucotrienos. Los autores estudian los productos generados de la reacción entre linfocitos y leucocitos polimorfonucleares, con ácido araquidónico. Dicha reacción se deja transcurrir durante un periodo de tiempo a 37 °C y se detiene con la adición de metanol. El análisis de los compuestos formados se lleva a cabo mediante HPLC en fase reversa, con un sistema de elución isocrático y flujo constante con detección a las longitudes de onda de 270 y 234 nm. Por su parte, Ikawa y colaboradores (1999) estudian la actividad 15-LOX-1 en células humanas de tejido canceroso colorrectal. Tras recoger las muestras y preparar un homogeneizado con ellas, se ensaya la actividad LOX de las mismas en presencia de ácido araquidónico en etanol, en un medio de reacción compuesto por tampón Tris-HCl. Transcurrido el periodo de incubación, la reacción se acidifica usando HCl, se añade como patrón interno ácido 13(S)-hidroxi-octadecadienoico y se realiza un proceso de extracción con éter etílico. El extracto se lleva a sequedad y se resuspende en la mezcla metanol:agua (3:1) para finalmente analizar la muestra por HPLC en fase reversa con un sistema de elución isocrático a flujo constante. Se monitoriza la absorbancia a 235 nm.

Otra forma de estudiar la actividad LOX en células animales es utilizar fracciones sub-celulares donde se estima que pueda estar concentrada la mayor actividad LOX. Así, Shornick y Holtzman (1993) estudian la actividad de 12-LOX en microsomas extraídos a partir de cultivos celulares mediante un protocolo de centrifugación diferencial. Los ensayos de actividad LOX se llevan a cabo diluyendo la fracción sub-celular de trabajo en un volumen de tampón Tris-HCl que contiene, entre otros compuestos, ácido araquidónico. Tras un periodo de reacción a 37 °C se extraen los compuestos formados con un líquido de extracción constituido por 1 volumen de 2-propanol, que contiene un 1% de ácido acético, y 1 volumen de cloroformo y se analizan por HPLC en fase reversa, con un sistema de elución en gradiente, flujo constante, y monitorizando a 270 y 235 nm. Hong y colaboradores (2001) también realizan un proceso de centrifugación diferencial para separar las

fracciones microsomal y citosólica de las células obtenidas de mucosa de colon humano. La actividad LOX se ensaya exponiendo el extracto enzimático a su sustrato, ácido araquidónico a una concentración conocida, en tampón Tris-HCl. Después de detener la reacción con HCl, los compuestos formados durante el periodo de incubación se extraen con acetato de etilo en dos pasos sucesivos. El extracto se evapora y se resuspende en acetonitrilo para analizarlo por HPLC en fase reversa, con un sistema de elusión en gradiente y a flujo constante. Los productos se monitorizan a 230 nm.

Las alternativas existentes para la medida de actividad LOX responden a las numerosas necesidades existentes dependiendo del fin buscado en cada estudio. En el presente trabajo se necesita contar con un sistema de medida global que permita correlacionar cantidad total de hidroperóxido formado con niveles de inflamación alcanzado, a la vez que poder determinar la naturaleza y estructura de los compuestos formados para conocer la cantidad de precursores que generan los compuestos involucrados en la respuesta inmunitaria. Para ello se realizará un estudio de correlación entre cantidad total de hidroperóxido medido espectrofotométricamente y la suma de la cantidad de hidroperóxidos individuales cuantificados por HPLC.

### **Antioxidantes a nivel pre-sistémico**

Pese a que los lípidos y otros componentes de muchos de los alimentos que se consumen habitualmente se oxidan con facilidad, suponiendo esto una entrada incontrolada de hidroperóxidos en el organismo, también se incorporan con la dieta compuestos que actúan como antioxidantes. Estos compuestos antioxidantes presentes en los alimentos minimizan el impacto oxidativo de los hidroperóxidos y de sus productos de degradación neutralizándolos durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal, antes de que ambos compuestos sean absorbidos para ser difundidos por el organismo.

Aunque en la actualidad no hay suficientes evidencias que soporten el hecho de que el consumo de una megadosis de antioxidantes alimentarios tales como las vitaminas C y E, o carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, puedan prevenir las enfermedades crónicas, no hay duda de que todos estos compuestos son importantes a la hora de mantener un buen estado de salud (Gorelik y colaboradores, 2005). Una ingesta rica en frutas y verduras puede minimizar el impacto oxidativo de los hidroperóxidos lipídicos y sus productos de degradación provenientes de la dieta o formados *in situ* en el lumen intestinal por la actuación de lipoxigenasa, lo que aumenta el riesgo de padecer enfermedades de tipo cardiovascular, inflamatorio o cáncer (Kanner y Lapidot, 2001; Monnier, 2007). Los antioxidantes presentes en los alimentos mantienen los niveles de oxidación al mínimo, pero el procesamiento de los alimentos, el refinado, así como las operaciones para garantizar la preservación durante el almacenamiento de los mismos puede alterar la relación entre los antioxidantes y los oxidantes, pudiéndose dar situaciones de oxidación significativa (O'Brien y Frazer, 1966).

De la interacción entre compuestos antioxidantes y pro-oxidantes a lo largo del tracto gastrointestinal, antes de su absorción intestinal, se esperaría una disminución en la concentración de los compuestos oxidantes así como de su actividad. Este comportamiento ya se ha estudiado con el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E. Su carácter de agente antioxidante permite la prevención de las reacciones de peroxidación de lípidos, también relacionada con el enranciamiento de las grasas. Los estudios realizados con ratas por Bunyan y colaboradores (1968) concluyen con que los lípidos insaturados no llegan a ser peroxidados tras la incorporación al tejido adiposo en ratas con deficiencias de vitamina E, sino que los hidroperóxidos lipídicos existentes en dicho tejido provienen de la dieta (sobre todo

cuando ésta es rica en ácidos grasos poli-insaturados, según los estudios de Glavind y Sylvén en 1970) y no tienen una presencia efímera, sino que su vida media ronda los 6 días. Los resultados llevan a pensar que la vitamina E previene la acumulación de los hidroperóxidos lipídicos de origen exógeno en el tejido adiposo. Esto se debe a una disminución en su absorción a través del intestino, ya que se observa que el suplemento de vitamina E con la dieta provoca la reducción en la concentración de hidroperóxidos lipídicos en el tejido adiposo.

De igual manera, también ha sido objeto de estudio la interacción entre los compuestos oxidantes provenientes de la dieta y los polifenoles presentes en el vino tinto, como la catequina. La carne roja, alimento que exhibe procesos de auto-oxidación por los que se generan hidroperóxidos y malondialdehído entre otros, está compuesta por tejido muscular que contiene iones libres de hierro y mioglobina, catalizadores implicados en la peroxidación lipídica. Los trabajos experimentales desarrollados por Gorelik y colaboradores (2005) muestran que el consumo de 300 mL de vino tinto (cantidad que simula la cantidad de vino que se consumiría durante una comida) inhibe, a pH 3, tanto la peroxidación lipídica así como la co-oxidación de la vitamina E y el  $\beta$ -caroteno.

Los antioxidantes presentes en los vegetales que consumimos no solo previenen la formación de productos oxidados sino que además, en presencia de hemo-proteínas (como la metmioglobina presente en los alimentos cárnicos), estimulan la degradación de los LOOH e invierten la reacción pasándose de pro- a antioxidación. El balance entre estas dos reacciones generales que se dan en el estómago parece tener un importante impacto en nuestra salud. De hecho, de estos resultados se desgrana el papel crucial que tiene el consumo conjunto y equilibrado de carne roja y sus derivados (así como de otros alimentos grasos) junto con antioxidantes alimenticios que previenen la acumulación de LOOH dañinos y la co-oxidación de otros constituyentes alimenticios (Kanner y Lapidot, 2001).

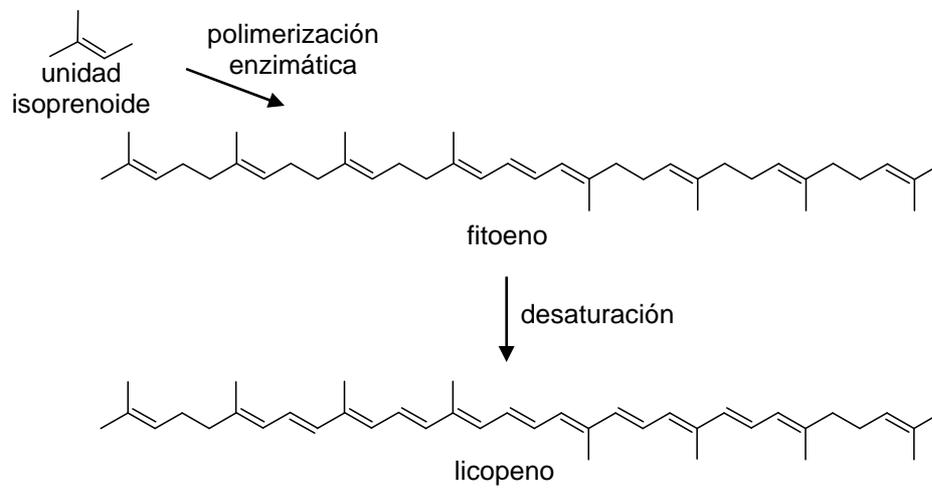
En cualquier caso, parece que la red de antioxidantes pre-sistémicos presentes o lo largo del tracto gastrointestinal podría, de manera indirecta, reducir el nivel de hidroperóxidos y compuestos citotóxicos así como incrementar el nivel de vitaminas y otros compuestos antioxidantes que lleguen al riego sanguíneo, pudiendo tener esto un efecto sinérgico con el nivel de antioxidantes en el plasma. Esto podría ayudar a explicar mejor la “paradoja francesa” y el efecto de la dieta

mediterránea y japonesa en las que están presentes productos con un alto contenido en antioxidantes que se consumen habitualmente, como carotenoides, polifenoles y otros (Kanner y Lapidot, 2001; Gorelik y colaboradores, 2005).

#### Pigmentos carotenoides. Estructura

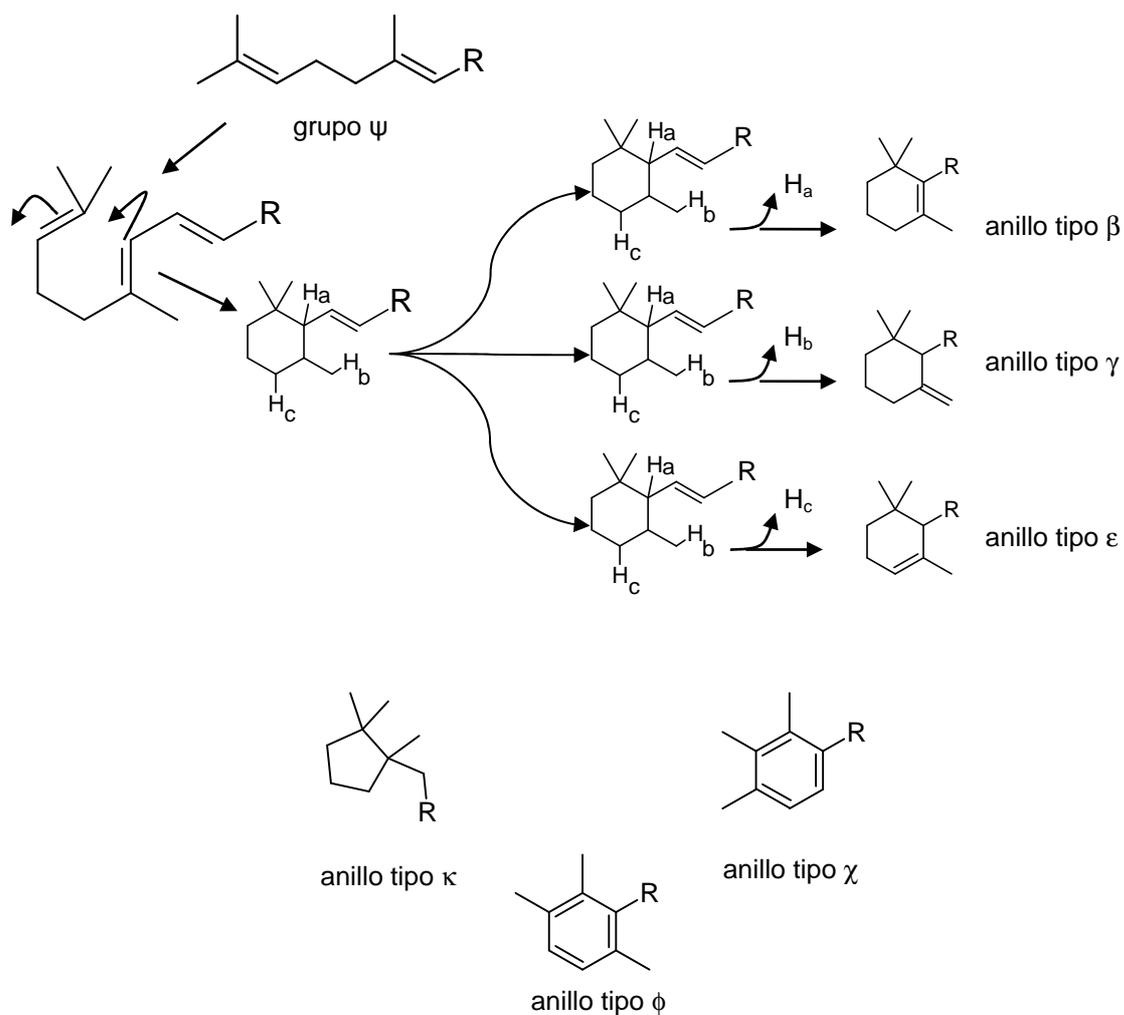
Los pigmentos vegetales se pueden agrupar en cinco grupos: tetrapirroles, carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, y compuestos N-heterocíclicos. De estos grupos destaca el de carotenoides debido a su amplia presencia y distribución, diversidad estructural y por las funciones y acciones biológicas que desempeñan. Estructuralmente, este grupo de pigmentos naturales se consideran derivados isoprenoides, ya que se generan mediante la ruta anabólica que utiliza como unidad básica a isopentenil pirofosfato (Bach, 1995). El sucesivo ensamblaje de esta unidad da lugar a geranil pirofosfato, farnesil pirofosfato y geranil-geranil pirofosfato. La unión de dos moléculas de geranil-geranil pirofosfato para dar lugar a fitoeno, en un proceso que consta de dos etapas, constituye el primer paso específico en la biosíntesis de carotenoides (Cunningham y Gantt, 1998). Este esqueleto estructural básico de 40 átomos de carbono (Figura 7) puede experimentar varias modificaciones estructurales, siguiendo diferentes rutas biosintéticas que introducen nuevas insaturaciones, ciclan uno o los dos extremos de la cadena, incorporan grupos funcionales oxigenados (hidroxilo, epóxido, ceto) e incluso producen reorganizaciones del grupo cíclico del extremo de la cadena, modificaciones estructurales que dan lugar a la amplia variedad de compuestos carotenoides descritos en la Naturaleza (Figuras 8 y 9).

En la estructura carotenoide se distinguen dos zonas bien diferenciadas. La cadena polienoica es la zona más representativa e importante de su estructura. Contiene un total de 22 átomos de carbono con 9 insaturaciones y 4 grupos metilos laterales. El sistema de dobles y simples enlaces alternados que forma la parte central de la molécula está conjugado y los electrones situados en orbitales enlazantes tipo  $\pi$ , están deslocalizados a lo largo de la cadena. Esta disposición convierte a los pigmentos carotenoides en un grupo de componentes peculiares, dando lugar a sus propiedades y comportamiento físico-químico (Britton, 1995). Los grupos colocados en los extremos de la cadena polienoica constituyen otra zona de la molécula.

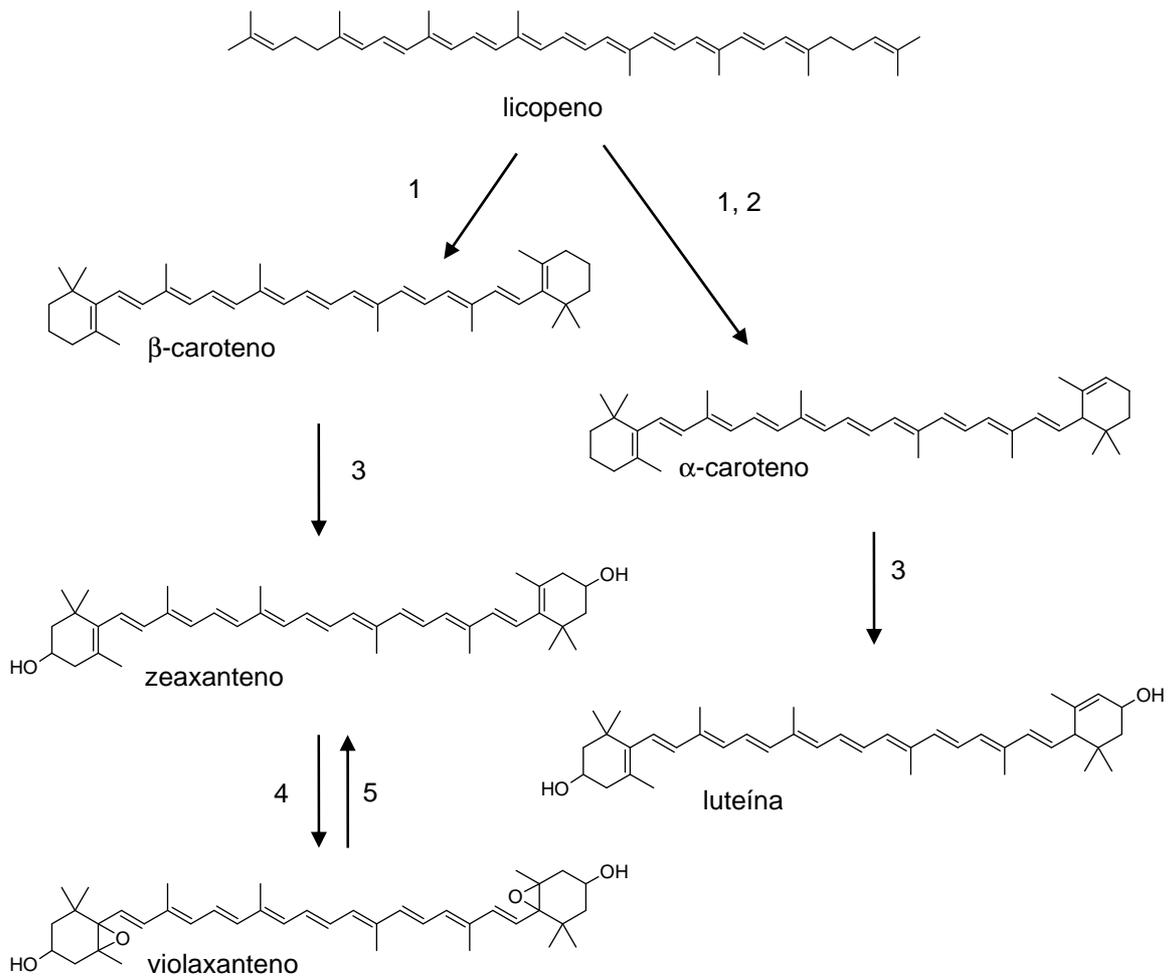


**Figura 7.-** Generación del esqueleto estructural básico, fitoeno, mediante la polimerización enzimática de la unidad isoprenoide, y su posterior conversión a licopeno por la introducción de insaturaciones.

Existen 7 grupos diferentes, y para su designación se utiliza una letra del alfabeto griego que aparece como prefijo a la palabra raíz *caroteno* (Figura 8). Generalmente, estos grupos incluyen grupos funcionales oxigenados cuya presencia distingue a las xantofilas de los carotenos (hidrocarburos exclusivamente). También es posible encontrar carotenoides con un número superior a 40 átomos de carbono (*homo*-carotenoides) o con un número inferior (*apo*-carotenoides si se han eliminado de los extremos, o *nor*-carotenoides si se han eliminado de la cadena). Todas estas particularidades y posibles combinaciones estructurales son el origen de la afirmación con la que comienza el siguiente apartado.



**Figura 8.-** Configuración de los diferentes grupos presentes a ambos lados de la cadena polienoica para conformar la estructura de carotenoides  $C_{40}$ .



**Figura 9.-** Generación de diferentes carotenos y xantofilas a partir de licopeno, mediante la participación de enzimas  $\beta$ -ciclase (1),  $\epsilon$ -ciclase (2), hidroxilase (3), epoxidase (4), de-epoxidase (5).

### Presencia y distribución de carotenoides en la Naturaleza

De todos los pigmentos naturales, los carotenoides son los más ampliamente distribuidos y por el conjunto de funciones y acciones que realizan, los más importantes. Este grupo de compuestos, hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas), son esenciales en la fotosíntesis oxigénica y también están implicados en la prevención o protección contra enfermedades coronarias y cáncer (Ames, 1983; Malone, 1991; Britton, 1995). Estas funciones no resultan tan obvias como sus colores, por los cuales los carotenoides son tan llamativos. El rango de colores de estos pigmentos va desde el rojo hasta el amarillo, y cuando se acomplejan con proteínas producen coloraciones verdes y azules. De esta forma una gran variedad de organismos debe su color principalmente a los carotenoides. Se pueden encontrar en todos los filos tanto del reino vegetal como animal aunque son únicamente sintetizados *de novo* en las plantas superiores y por organismos procariontes. La presencia de carotenoides en los animales se debe exclusivamente a su incorporación por la dieta, ya que no pueden sintetizarlos *de novo*, hecho de especial trascendencia si se tiene en cuenta que algunos carotenoides muestran actividad de provitamina A (Pfander, 1992). A pesar de su amplia distribución, y de que se han descrito más de 700 pigmentos carotenoides diferentes, lo normal es encontrar una mezcla común, más o menos compleja, de algunos de ellos. En los cloroplastos de las plantas superiores, la mezcla de pigmentos estaría formada generalmente, por  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxanteno, zeaxanteno, luteína, violaxanteno y neoxanteno. Algunos pigmentos menos frecuentes como rodoxanteno, y semi- $\beta$ -carotenona se han descrito en los cloroplastos de las hojas de algunos miembros de las cupresáceas y taxáceas (Goodwin y Britton, 1988).

### Funciones y acciones biológicas de los carotenoides

En este punto se comienza por distinguir las funciones biológicas de las acciones o actividades biológicas. Por función biológica se entiende aquel proceso en el que interviene un componente, y que resulta imprescindible para la vida de un organismo, mientras que las acciones o actividades biológicas son respuestas fisiológicas o farmacológicas que se observan después de la ingesta de alimentos o suplementos dietéticos ricos en determinados constituyentes.

### Funciones biológicas

Los carotenoides tienen como principal función biológica en los organismos fotosintéticos, la transferencia energética en la fotosíntesis y en la fotoprotección (Krinsky, 1994). En los mamíferos la principal y única función biológica de algunos carotenoides es su rol como precursores de la vitamina A, necesaria para la visión, el crecimiento, la diferenciación celular, y otros procesos fisiológicos (Olson, 1996).

### Metabolismo de carotenoides con actividad de provitamina A

No todos los carotenoides tienen los requerimientos estructurales para su conversión en vitamina A. Sólo aquellos que presentan al menos un anillo tipo  $\beta$ , sin funciones oxigenadas, junto con una cadena polienoica que contenga al menos 11 átomos de carbono son potenciales precursores de vitamina A. Así de los 700 carotenoides descritos, un 10% muestran actividad de provitamina A. Los más importantes, tanto por su alta actividad como por su presencia, son  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, y algunas xantofilas entre las que destacan  $\beta$ -criptoxanteno y algunos *apo*-carotenoides (Zechmeister, 1949; Bauernfeind, 1972). De todos,  $\beta$ -caroteno tiene la mayor actividad de provitamina A puesto que cada molécula de pigmento produce dos de retinal que es reducido a vitamina A (retinol).

El proceso metabólico de transformación de carotenoides con actividad de provitamina A en retinol tiene lugar mediante un proceso oxidativo de ruptura central de la molécula catalizado por la enzima  $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno 15,15'-monooxigenasa (EC 1.13.11.21). Esta enzima, inicialmente denominada  $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-15,15'-dioxigenasa, aunque descubierta hace 45 años, (Goodman y Huang, 1965; Olson y Hayaishi, 1965), no ha sido purificada hasta recientemente gracias a la clonación con éxito de cDNAs en diferentes especies incluyendo la humana (Yan y colaboradores, 2001).

### Acciones biológicas de carotenoides no metabolizados

Una de las primeras acciones descritas fue la caracterización de los carotenoides como *quenchers* muy eficaces de oxígeno singulete (Foote y Denny, 1968) y radicales peroxilos (Kennedy y Liebler, 1991). El mecanismo se basa en un proceso físico por el cual, el exceso energético de la

molécula de oxígeno es absorbido por el pigmento, devolviendo a la molécula de oxígeno a su estado energético basal. El pigmento, dispersa térmicamente el exceso energético adquirido, sin provocar daños a otras moléculas vecinas. La reiteración de este proceso termina destruyendo al pigmento mediante reacciones químicas que implican la adición del oxígeno singulete a la estructura del carotenoide dando lugar a endoperóxidos y derivados carbonílicos. Aunque una sola molécula de  $\beta$ -caroteno puede desactivar a 1000 moléculas de oxígeno singulete antes de ser oxidado, dicha oxidación irreversible tiene lugar, lo que pone límites a la efectividad como *quencher* del pigmento (Liebler, 1993). No obstante, el efecto positivo de la acción queda fuera de dudas y existe un enorme interés en el desarrollo de compuestos químicos de síntesis en los que se combinen la excelente eficiencia de los carotenoides como *quenchers* con la habilidad de los flavonoides de estabilizar a los radicales intermedios formados en este proceso. Es posible sintetizar componentes que resultan de la fusión de esos dos grupos de constituyentes originando carotenilflavonoides que presentan una mayor capacidad *quencher* y mejor estabilidad, con aplicaciones potenciales en cremas solares (Beutner y colaboradores, 2007).

Posiblemente, ninguna otra acción biológica de los carotenoides suscite mayor interés y controversia que la actividad/capacidad antioxidante. Para aclarar el concepto y dónde pueden surgir las dudas sobre la eficiencia de carotenoides como antioxidantes, se debe distinguir la actividad antioxidante, asociada a procesos oxidativos *in vitro* o formalmente químicos, de la capacidad antioxidante, asociada a procesos oxidativos *in vivo* que implica realmente una acción biológica.

El término actividad antioxidante se define como la constante de velocidad de la reacción entre un antioxidante y un radical libre. Este concepto se correlaciona con el proceso químico de reacción del par antioxidante/radical, la estructura de ambas sustancias y el mecanismo o mecanismos de reacción que tienen lugar. Los antioxidantes pueden reaccionar con los radicales principalmente mediante dos mecanismos, abstracción de hidrógeno, o transferencia electrónica, cesión que se realiza en ambos casos desde la especie antioxidante al radical. Los dos mecanismos pueden transcurrir en paralelo y el proceso dominante dependerá de la estructura del antioxidante y de las características del entorno de reacción, así como de la especie radicalaria. Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se pueden basar en uno u otro mecanismo, o incluso en

ambos. Para los carotenoides, los métodos de determinación de actividad antioxidante generalmente aplicados son el método de Terao (1989) y el método TRAP (Bartosz y colaboradores, 1998), métodos que utilizan radicales que reproducen los procesos de auto-oxidación lipídica. Los carotenoides muestran actividad antioxidante frente a radicales lipofílicos, que son ERO producidas durante la oxidación de lípidos. Cada pigmento carotenoide presentará una actividad antioxidante diferente en función de sus peculiaridades estructurales, que le permitirán reaccionar según alguno de los dos mecanismos de reacción posibles, transferencia electrónica, abstracción de hidrógeno, y un tercer proceso denominado reacciones de adición.

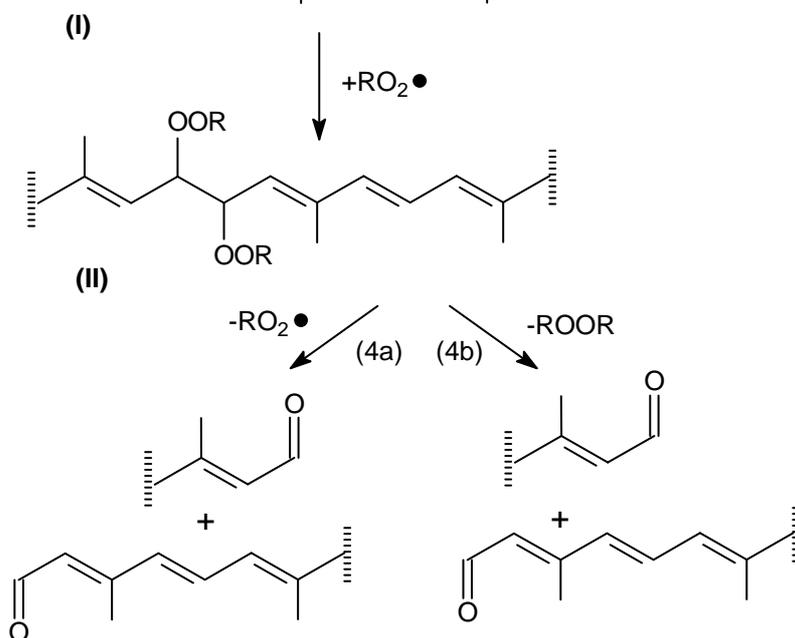
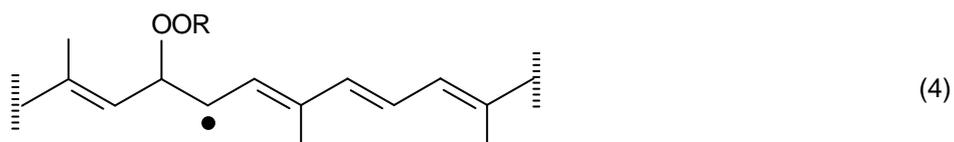
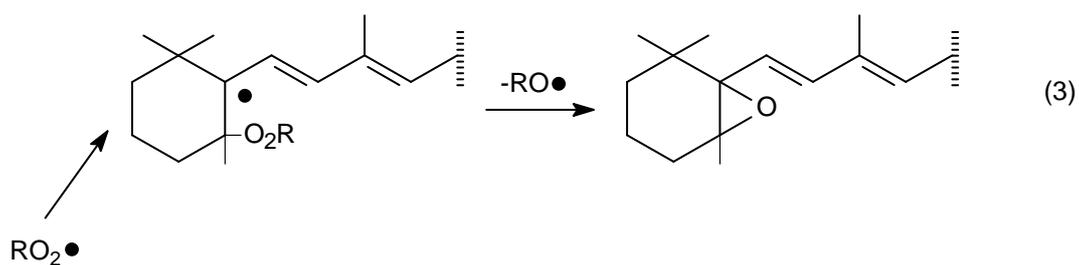
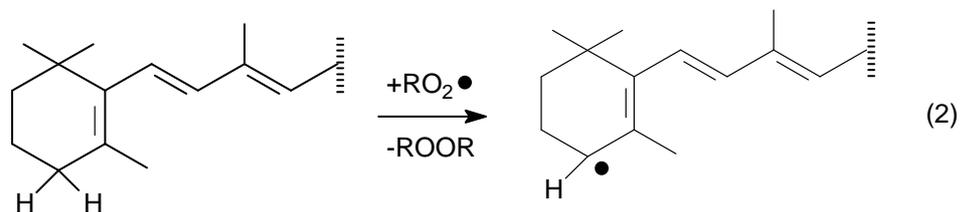
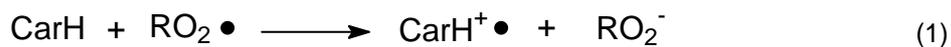
En el primer proceso, radicales como el triclorometil peroxilo (un radical que causa toxicidad en el hígado) y el radical dióxido de nitrógeno (un radical procedente del humo del tabaco) convierten a los carotenoides en radicales catiónicos que pueden reaccionar con sustratos biológicos y producir daño oxidativo (Everett y colaboradores, 1996; Miller y colaboradores, 1996). Este proceso tiene lugar, preferentemente, cuando el potencial rédox del radical es lo suficientemente alto para producir la transferencia electrónica (Everett y colaboradores, 1996).

En el caso de radicales formados durante los procesos de auto-oxidación lipídica la transferencia electrónica no es el mecanismo de reacción sino que ésta transcurre mediante la abstracción de hidrógeno y un tercer proceso, la adición radicalaria en la cadena polienoica. El proceso de adición implica que la oxidación tiene lugar mediante la doble adición de las especies radicalarias a la cadena polienoica, lo que genera un aducto bis-peroxilo que puede experimentar un proceso de rotura heterolítica u homolítica (Liebler, 1993; Ríos y colaboradores, 2008). En el proceso heterolítico no se regeneran radicales, mientras que la rotura homolítica produce dos nuevas especies reactivas lo que implica un proceso auto-oxidativo. Si la adición se produce en el anillo se genera el correspondiente epóxido 5, 6 y un radical lo que supone de nuevo un proceso auto-oxidativo. El otro proceso de reacción es el mecanismo de abstracción de hidrógeno que afecta a los átomos en posiciones alílicas a un doble enlace y por tanto más susceptibles de ser abstraídos por radicales peroxilo. Este proceso genera una especie reactiva que continúa la cadena de propagación radicalaria.

Aunque los mecanismos de reacción sean comunes, la velocidad a la que transcurren está determinada por la presencia de grupos funcionales por lo que las características estructurales de

cada carotenoide condicionarán su oxidación y por tanto la actividad antioxidante que presenta. En concreto resulta clave el radical intermedio caroteno-peroxilo, cuya estabilización por deslocalización electrónica es distinta en función de los grupos funcionales que se sitúan en los extremos de la cadena polienoica. Además dichos grupos pueden impedir el transcurso oxidativo a través de alguno de los mecanismos de reacción comentados y por tanto disminuir la tendencia a la auto-oxidación (Liebler, 1993; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2002).

En la Figura 10 se reproducen los mecanismos de reacción comentados anteriormente. Se puede observar cómo la posibilidad de que durante el desarrollo del proceso antioxidante, el compuesto carotenoide produzca nuevas especies radicalarias que incrementen el potencial oxidativo del entorno. Cuando la generación de especies radicalarias supera a la velocidad con que el antioxidante las elimina, se produce la auto-oxidación del mismo.



**Figura 10.-** Mecanismos de reacción de carotenoides con radicales libres. Proceso de transferencia electrónica (1); Abstracción de hidrógeno y auto-oxidación (2); adición en el anillo tipo  $\beta$ , auto-oxidación y efecto pro-oxidante (3); adición simple en la cadena, generación del aducto radicalario (I) y segunda adición, generando el aducto carotenoide-bis-peroxilo (II), (4); fragmentación homolítica (4a) y efecto pro-oxidante; fragmentación heterolítica y efecto anti-oxidante (4b).

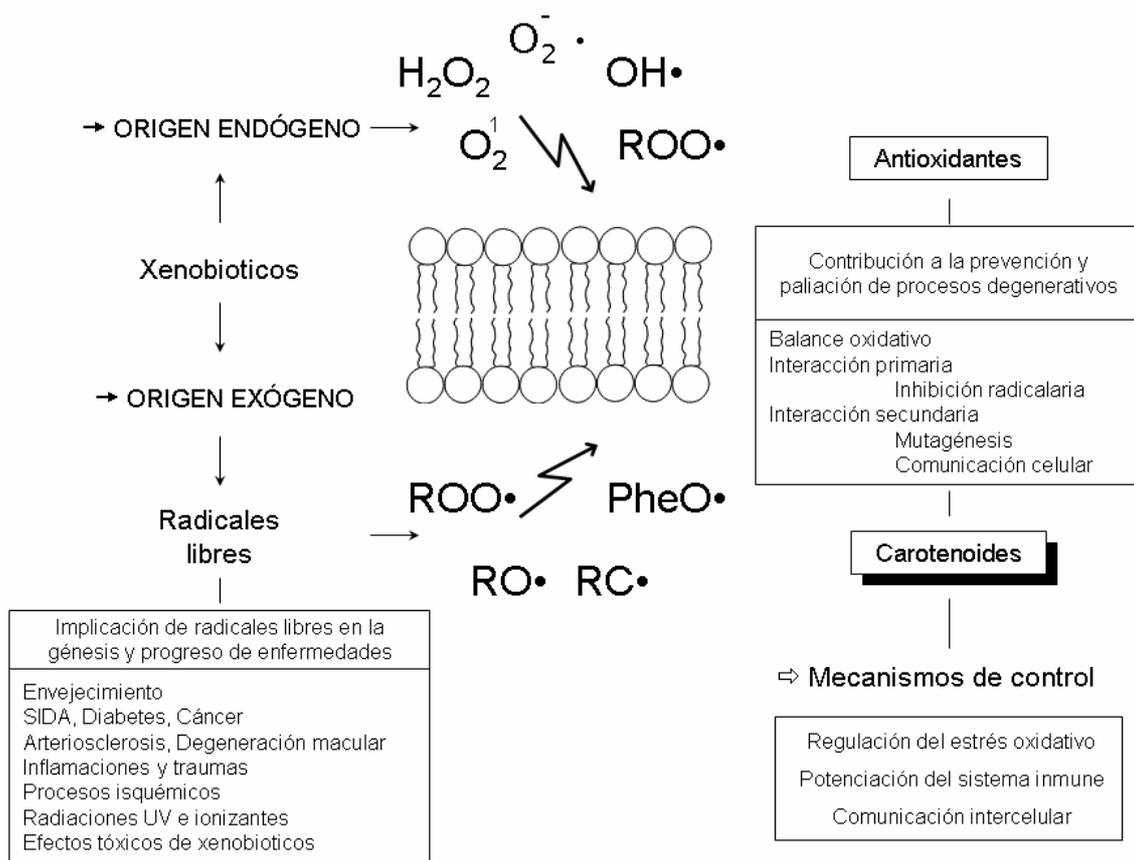
El concepto actividad antioxidante está más asociado a los procesos formalmente químicos que ocurren en la reacción del par antioxidante/radical. No cabe duda que las propiedades de estos procesos repercuten en la capacidad antioxidante, que es el segundo concepto a definir. Ésta se define como la cantidad de especies radicalarias que es eliminada o neutralizada del medio de reacción, por la acción de una determinada cantidad de antioxidante. Este concepto es el que se aplica a la acción de antioxidantes en tejidos y muestras biológicas como plasma, epitelio, cultivos celulares, etc. Los métodos de medida de capacidad antioxidante que se han aplicado a carotenoides son el método TEAC (Re y colaboradores, 1999), el método DPPH (Brand-Williams y colaboradores, 1995) y el método de oxidación *ex vivo* de lipo-proteínas de baja densidad (LDL). Estas medidas constituyen una aproximación (más o menos realista) a la capacidad antioxidante de carotenoides, su principal acción biológica. En los sistemas biológicos, los lípidos constituyen gran parte de la membrana celular y de otras estructuras sub-celulares. La oxidación lipídica tiene consecuencias negativas en la funcionalidad de la membrana y su integridad. Puesto que los carotenoides se alojan en esas mismas estructuras van a cortar la cadena de propagación radicalaria generada por la oxidación lipídica, por lo que estos compuestos, junto con los tocoferoles son denominados antioxidantes de membrana.

El efecto antioxidante de carotenoides *in vivo* se observa en LDL y membranas celulares donde ejercen su capacidad mediante los mecanismos de reacción anteriormente mencionados (Ringer y colaboradores, 1991). El hecho de que los carotenoides ejerzan esta capacidad en los sistemas biológicos es el principal apoyo a la teoría antioxidante sobre una ingesta elevada en alimentos ricos en carotenoides y un menor riesgo a desarrollar procesos degenerativos. Y aquí es donde surge la controversia, puesto que no todos los estudios de intervención apoyan esta hipótesis. Muchos de estos estudios arrojan resultados inconsistentes (Krinsky, 1994; Rock y colaboradores, 1996) debido al concurso de varios factores que determinan la falta de correlación. Algunos factores a mencionar son los niveles de asimilación de los antioxidantes presentes en la dieta, es decir, qué proporción de lo ingerido es asimilado y por tanto biodisponible, su posible biotransformación en otros compuestos de menor eficiencia antioxidante o la generación de nuevos radicales libres, tal y como se ha indicado en la exposición del concepto actividad antioxidante, la cantidad que se deposita en el tejido donde va a desarrollar su acción, y el marcador de estrés oxidativo utilizado para determinar la correlación. La

conjunción de estos factores propicia que se puedan encontrar resultados que apoyan la correlación (Upritchard y colaboradores, 2003) o todo lo contrario (Alpha tocopherol, beta carotene cancer prevention study group, 1994; Omenn y colaboradores, 1996).

Como se ha mencionado anteriormente, varios estudios epidemiológicos indican que el consumo de alimentos ricos en carotenoides está correlacionado con un menor riesgo a desarrollar procesos degenerativos, entre los que se encuentran algunos tipos de cáncer (Peto y colaboradores, 1981; Ziegler y colaboradores, 1996; Giovannucci, 2002; Mares-Perlman y colaboradores, 2002). La implicación de los carotenoides en limitar la aparición de esta enfermedad deriva de su interacción con tres marcadores biológicos relacionados con el cáncer: estrés oxidativo radicalario, actividad del sistema inmune, y modulación de la comunicación intercelular (Figura 11).

Si la iniciación y progresión de procesos cancerosos está relacionada con la presencia de radicales libres, resulta lógico suponer que la incorporación de antioxidantes como los carotenoides a nuestro organismo contribuirá positivamente a disminuir las posibilidades de aparición de este proceso degenerativo. Existen evidencias acerca de la implicación de radicales libres en la iniciación y progresión de la carcinogénesis. Las ERO actúan directamente como mutágenos al oxidar las bases del ADN y también son capaces de activar pre-carcinógenos convirtiéndolos en compuestos reactivos que modifican el ADN (Marnett, 1987). El descenso continuado en la defensa antioxidante que provoca la actividad de la ERO es otra evidencia de su implicación en la carcinogénesis ya que este efecto también ocurre por la actividad de auténticos carcinógenos (Cerutti, 1985; Kensler y Taffe, 1986). Consecuentemente, si los carotenoides intervienen como antioxidantes frenando la actividad de ERO, su acción puede disminuir el riesgo a desarrollar cáncer (Malone, 1991; Byers y Perry, 1992; Voorrips y colaboradores, 2000; Holick y colaboradores, 2002).



**Figura 11.-** Procesos degenerativos derivados de la actividad de radicales libres paliados por la bioactividad de compuestos antioxidantes como los carotenoides y otros posibles mecanismos de control.

De la capacidad antioxidante de carotenoides también resulta otro efecto beneficioso, la potenciación del sistema inmune. La radiación UV produce un incremento en la concentración de radicales libres que deteriora el sistema inmunológico, por lo que la intervención de antioxidantes naturales limita el efecto negativo y retrasa la aparición de marcadores sensibles a la disminución del sistema inmunológico. Los estudios de Fuller y colaboradores (1992) y Herraiz y colaboradores (1998) muestran el efecto de la ingesta de suplementos de  $\beta$ -caroteno en el sistema inmune de personas sometidas a radiación UV. El efecto positivo observado, resultado de un proceso antioxidante, se incrementa cuantitativamente en personas de mayor edad. Pero los carotenoides pueden modificar la función del sistema inmune mediante mecanismos no antioxidantes lo cual también tiene su trascendencia positiva, en el riesgo a desarrollar cáncer, debido al rol esencial que cumple el sistema inmunológico en la prevención de este proceso degenerativo. Se ha demostrado que la ingesta de suplementos de  $\beta$ -caroteno incrementa la actividad de células tipo NK, *natural-killers*, que reducen la posibilidad de formación de tumores (Santos y colaboradores, 1996). En este caso el mecanismo por el que  $\beta$ -caroteno modula la actividad celular no se conoce. También se ha sugerido que la regulación de la biosíntesis de la prostaglandina  $E_2$ , reconocido inmuno-supresor, se debe a la intervención de  $\beta$ -caroteno en la potenciación del sistema inmune (Halevy y Sklan, 1987). Se puede observar que la mayoría de los estudios realizados se centran exclusivamente en  $\beta$ -caroteno. La experimentación con otros carotenoides y su efecto en la función inmune son muy escasas y no han arrojado resultados concluyentes ni positivos (Hughes y colaboradores, 2000).

La mejora de la comunicación intercelular es el tercer marcador que correlaciona inversamente la concentración plasmática de carotenoides con la progresión del cáncer. En este caso el mecanismo de acción no se basa en la acción antioxidante ya que en diversos estudios realizados sobre el efecto inhibitor de carotenoides en la proliferación de células neoplásicas no se encontró correlación entre ese efecto y la capacidad antioxidante. De hecho, la adición de otros antioxidantes de membrana como  $\alpha$ -tocoferol no mostró efecto inhibitor alguno lo que parece corroborar la presencia de un mecanismo de acción diferente. En este caso el mecanismo de acción está ligado a la capacidad de los carotenoides de aumentar, o restablecer, la comunicación intercelular que tiene lugar a través de canales o poros denominados conexones. A través de estos poros las células intercambian diversas moléculas señalizadoras, entre ellas agentes antiproliferativos.

En las células cancerosas la comunicación intercelular está interrumpida debido a que la expresión génica de la proteína que forma parte estructural de esos poros o canales de comunicación, la conexina 43, está disminuida. A consecuencia de ello las células cancerosas se comunican poco con las células normales que la rodean, por lo que no reciben información de su entorno, lo que supone la pérdida de control de la proliferación sobre las células transformadas (Loewenstein, 1979). Por el contrario, si se restablece la comunicación intercelular entre las células normales y las cancerosas, se tendría la oportunidad de frenar su proliferación. En varios estudios se ha demostrado que los carotenoides incrementan la expresión del gen que codifica la conexina 43, lo que aumenta la comunicación intercelular con el tejido sano y disminuye la proliferación de células transformadas. El mecanismo de regulación de la expresión génica por mediación de los carotenoides se desconoce. La hipótesis más extendida es que los carotenoides, y particularmente algunos productos de su metabolismo, son capaces de activar una serie de receptores nucleares (RAR- $\alpha$  y RXR- $\alpha$ ) que activan la expresión génica.

#### **Metabolismo de antioxidantes e hidroperóxidos en la mucosa intestinal**

Hasta ahora, se ha expuesto la presencia de hidroperóxidos lipídicos alimentarios a lo largo del tracto digestivo y de cómo éstos están relacionados con procesos degenerativos como el cáncer y los desórdenes del sistema digestivo. Más allá de la amplia implicación de los hidroperóxidos lipídicos alimenticios en estos procesos patológicos, se conoce muy poco sobre su absorción, metabolismo en la mucosa intestinal y transporte. El intestino es el punto de absorción de nutrientes y una barrera de defensa crítica frente a los mutágenos, carcinógenos y oxidantes derivados de la dieta, incluyendo a los hidroperóxidos procedentes de la dieta y de los que se forman durante la digestión. Es también, por tanto, el tejido más expuesto a los daños que provoca la acción de los agentes tóxicos y pro-oxidantes. En circunstancias normales el epitelio intestinal se reemplaza completamente cada 24-48 horas, siendo esta alta tasa de reparación celular uno de los mecanismos de protección, pero si este proceso de regeneración es más lento de lo normal el tejido se puede afectar seriamente, disminuyendo la eficiencia de la protección frente a los hidroperóxidos (O'Brien y Frazer, 1966; Aw y colaboradores, 1992; Aw, 2005; Monnier, 2007).

La enfermedad inflamatoria intestinal activa se caracteriza por cursar con la generación de daño estructural en la mucosa intestinal. La causa de estos daños no está totalmente establecida, pero la infiltración masiva de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares contribuye a la producción de gran cantidad de metabolitos reactivos de oxígeno, tales como aniones superóxido y peróxido de hidrógeno entre otros, que se unen a los compuestos reactivos generados como consecuencia de la hidroperoxidación lipídica de los alimentos provenientes de la dieta. Para contrarrestar cualquier efecto dañino generado por la presencia de estas especies reactivas de oxígeno, la mucosa intestinal normal está equipada con un sistema de defensa que incluye enzimas como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, así como compuestos antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión (Kruidenier y colaboradores, 2003).

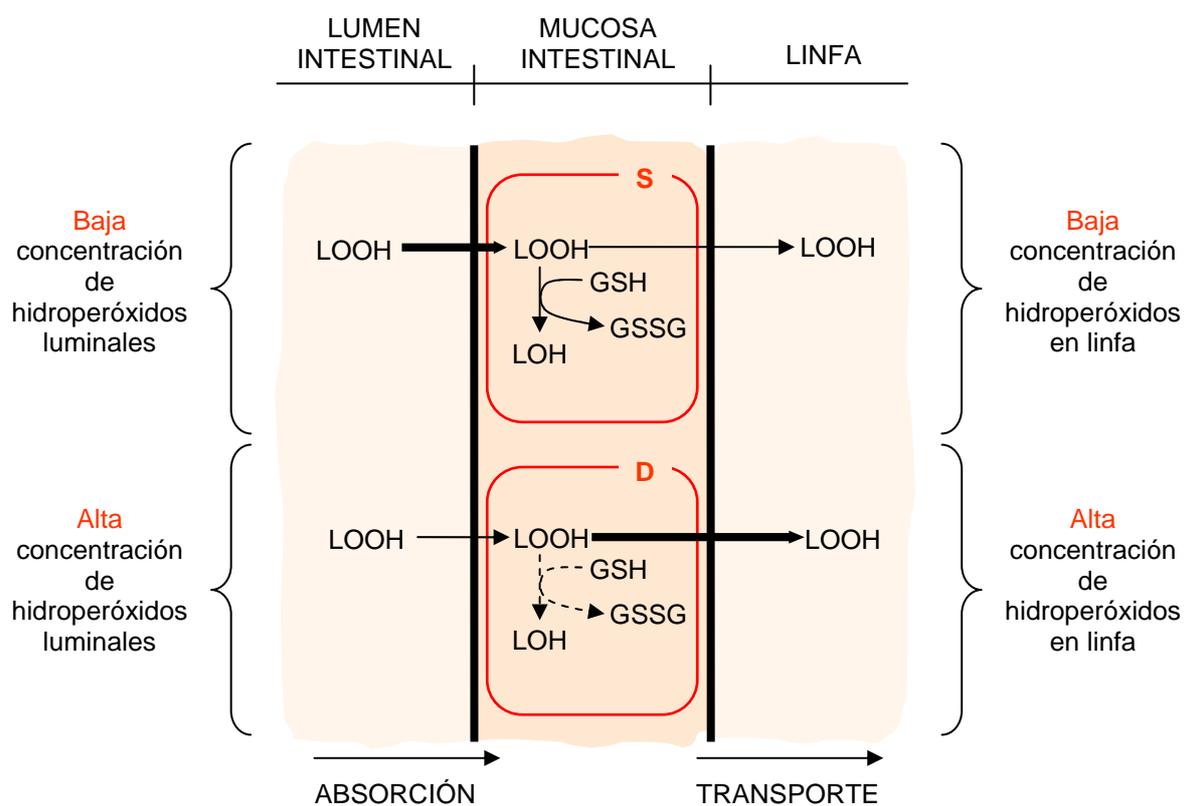
Considerando solo el proceso global de metabolismo de hidroperóxidos lipídicos por el intestino delgado, éste puede resumirse en la consecución de tres etapas. Estas son la fase absorbiva, es decir, la absorción de los hidroperóxidos lipídicos por el lumen intestinal; la fase metabólica, o degradación intracelular de los hidroperóxidos absorbidos; y la fase de transporte, es decir, la liberación de los hidroperóxidos y los productos metabólicos a la linfa, asociados a lipoproteínas. Estudios recientes se centran en la absorción y el transporte linfático de los hidroperóxidos de ácidos grasos, pero la controversia persiste en torno a si los lípidos peroxidados son absorbidos y procesados por el intestino delgado. Aunque distintos grupos de investigación han sido incapaces de medir hidroperóxidos lipídicos en la linfa, otros han encontrado cantidades apreciables de los mismos en este emplazamiento y otros tejidos tras la administración de ácidos grasos peroxidados a ratas. Los resultados implican al glutatión reducido (GSH) en la manipulación intestinal de los hidroperóxidos lipídicos y, además, sugieren que las aparentes discrepancias en las observaciones de diferentes estudios se explican por los distintos niveles de GSH en la mucosa bajo diversas condiciones experimentales. Debido a las funciones de GSH en la reducción de los hidroperóxidos lipídicos catalizada por la GSH-peroxidasa, el estatus de GSH en la mucosa podría alterar significativamente el destino metabólico de los hidroperóxidos lipídicos alimentarios (Aw y colaboradores, 1992; Aw, 2005).

El glutatión es un reductor y antioxidante que se encuentra de manera natural en las células. La función principal de GSH, a grandes rasgos, es la de detoxificar las especies reactivas de oxígeno de origen endógeno y exógeno para proteger a las células del estrés oxidativo, reduciendo la cantidad de

hidroperóxidos transportados del intestino a la linfa, y constituye el sustrato para las enzimas GSH-peroxidasa y GSH-transferasa. En situaciones normales, GSH es una molécula que se encuentra en grandes cantidades en la mucosa del tracto gastrointestinal cuyo equilibrio se mantiene por la síntesis *de novo* a partir de cisteína, por su regeneración desde glutatión disulfuro y por su incorporación al organismo desde fuentes exógenas a través de sistemas de transporte  $\text{Na}^+$  dependientes. En este aspecto, la introducción exógena de GSH proveniente de los alimentos afecta a su concentración incrementándola, aunque la presencia de productos de reacciones de oxidación derivados de la oxidación de alimentos puede afectarla en el sentido opuesto. El glutatión exógeno se transporta intacto a través del intestino delgado *in vivo* para suplementar el pool intracelular de glutatión, sugiriéndose que el glutatión luminal puede contribuir a mantener el balance tiol en la mucosa. El glutatión proveniente de los alimentos y el biliar son las fuentes mayoritarias de glutatión luminal (Aw, 2005; Kanner, 2007).

La actividad GSH peroxidasa está presente a lo largo del intestino delgado. En el metabolismo de los hidroperóxidos lipídicos por parte de la GSH peroxidasa, dos moléculas de GSH son oxidadas a glutatión disulfuro (GSSG). El incremento de GSSG celular supone la activación de la reducción de GSSG suministrando NADPH y el eflujo de GSSG desde las células. Cuando la tasa de reducción de hidroperóxidos es alta, el proceso está limitado por el suministro de NADPH y resulta en una reducción extensiva del pool GSH/GSSG (Kowalski y colaboradores, 1990).

En presencia de una alta concentración celular de GSH, los hidroperóxidos lipídicos absorbidos son eficientemente metabolizados y los compuestos resultantes son liberados, promoviéndose así una reducción intracelular que permite una mayor absorción luminal de hidroperóxidos lipídicos debido a la creación de un gradiente desde la zona extracelular a la intracelular, disminuyendo así su concentración luminal y atenuándose la salida de hidroperóxidos a la linfa. Este mecanismo GSH dependiente es altamente favorable para el catabolismo de hidroperóxidos y ofrece un sistema eficiente para la retirada rápida de los hidroperóxidos en el intestino delgado. En cambio, cuando la concentración celular de GSH es baja, la tasa de absorción luminal puede estar limitada por el decrecimiento intracelular del catabolismo de los hidroperóxidos debido a la saturación de los sistemas de detoxificación por GSH. Bajo estas condiciones de deficiencia en el catabolismo intracelular de los hidroperóxidos, se daña el proceso de absorción de los mismos por parte de la mucosa, lo cual incrementa la retención luminal de hidroperóxidos y promueve el transporte de los mismos hacia la linfa (Figura 12) (Aw y colaboradores, 1992; Aw, 2005; Kanner, 2007).



**Figura 12.-** Modelo de absorción y transporte linfático de los hidroperóxidos lipídicos luminales en las células intestinales con suficiencia o deficiencia de glutatión. Las abreviaturas son GSH y GSSG, para glutatión y glutatión disulfuro, respectivamente; S y D, para suficiencia y deficiencia de glutatión, respectivamente; LOOH y LOH, para hidroperóxido e hidróxido lipídico, respectivamente.

Aunque no se pueden descartar otras explicaciones, como la inhibición directa de la absorción bajo condiciones de deficiencia de GSH, esta interpretación basada en consideraciones metabólicas es razonable (Aw y colaboradores, 1992; Aw, 2005; Kanner, 2007).

Relacionado con lo anterior, los suplementos exógenos de GSH pueden ser usados para estimular el pool celular de GSH. Estudios previos han documentado que el GSH exógeno puede incrementar la concentración intestinal de GSH *in vitro* e *in vivo*. Esto se puede traducir en futuros estudios relacionados con el tema para promover el catabolismo intestinal de los hidroperóxidos lipídicos incrementando los sistemas antioxidantes celulares (Aw y colaboradores, 1992).

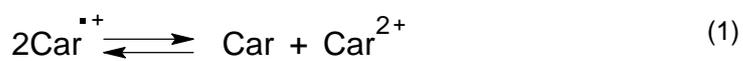
### **Metabolismo oxidativo no enzimático de carotenoides**

Frente a la relativa especificidad que presentan las reacciones enzimáticas de oxidación de carotenoides, comentadas con anterioridad, se presentan las reacciones de oxidación no enzimática mediadas por especies reactivas de diverso origen o propiciadas por las condiciones oxidativas del entorno, más inespecíficas. Estableciendo como mecanismo de reacción la transferencia electrónica, se originan radicales carotenoides iónicos, cuando reaccionan con especies radicalarias de elevado potencial oxidativo. Los radicales carotenoides catiónicos son fáciles de detectar debido a su intensa absorción en la región del infrarrojo cercano. Estos radicales en ausencia de otros reactantes experimentan un proceso de dismutación dando origen al carotenoide original y a una especie carotenoide radicalaria dicatiónica, o de pérdida de un protón (Liu y Kispert, 1999). También se ha descrito su reacción con aminoácidos y péptidos, porfirinas, oxígeno y con otros antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (El-Agamey y McGarvey, 2008). Estos últimos procesos son una evidencia del funcionamiento regenerativo de la red de antioxidantes no enzimáticos con la que cuenta nuestro organismo para mantener el balance del estrés oxidativo. En la Figura 13 se presentan las reacciones de regeneración de radicales carotenoides catiónicos mediante la intervención de otros carotenoides, tocoferol y ácido ascórbico, así como las reacciones de dismutación y transferencia con aminoácidos y porfirinas. Estos procesos también se han descrito para radicales carotenoides aniónicos (McVie y colaboradores, 1979; Conn y colaboradores, 1992).

Mediante la abstracción de hidrógeno, en posiciones alílicas o bis-alílicas, y la adición de radicales peroxilo a la cadena polienoica se producen radicales carotenoides neutros que



experimentan diversos procesos de degradación secundaria. Resulta interesante destacar en primer lugar a los productos de degradación de  $\beta$ -caroteno formados por la abstracción de uno o dos hidrógenos en las posiciones C4 y C4' y posterior la adición del radical óxido de nitrógeno, procedente del humo del tabaco, en esas posiciones (Rice-Evans y colaboradores, 1997).



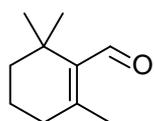
**Figura 13.-** Diferentes procesos de reacción del radical carotenoide catiónico; dismutación (1), regeneración con un aminoácido (TyroOH, 2), porfirina (POR, 3), ácido ascórbico

Otra vía de generación de radicales carotenoides neutros es la adición de ERO en posiciones de la cadena polienoica o, en su caso, de los anillos terminales originando un aducto radicalario. Esta especie puede experimentar diversas reacciones como la disociación iónica (El-Agamey y McGarvey, 2003) o la fragmentación hemolítica o heterolítica con la posibilidad de adición de ERO al aducto radicalario intermedio (proceso esquematizado en la Figura 10).

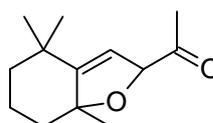
La diversidad de especies intermedias procedentes del metabolismo oxidativo no enzimático de carotenoides es bastante amplia y permite, por un lado, detectar ese tipo de especies en experimentos *ex vivo* o en muestras biológicas. Los radicales carotenoides iónicos tienen una vida media corta, son centro del ataque de nucleófilos y se regeneran con otras especies de naturaleza bien carotenoide bien antioxidante lipo- o hidrofílicas (Figura 10). Las reacciones en las que intervienen los radicales carotenoides iónicos formados no originan productos de fragmentación, exceptuando al proceso de asociación (Figura 10, reacción 1), el rastro de su presencia se deja notar en otras biomoléculas a las que hayan alterado oxidativamente mediante el intercambio de electrones. Los procesos de fragmentación sí generan especies más estables que pueden ser detectadas, al margen de los efectos que produzcan en las biomoléculas de su entorno. Los productos de fragmentación también se pueden asemejar estructuralmente a los retinoides mimetizando su actividad.

Los productos de fragmentación oxidativa de  $\beta$ -caroteno más ampliamente descritos son  $\beta$ -apocarotenales, con diferente longitud de la cadena polienoica (Handelman y colaboradores, 1991; Stratton y colaboradores, 1993; McClure y Liebler, 1995). Estos productos coinciden con los generados por el metabolismo enzimático que genera retinal. Además de aldehídos, se ha descrito la presencia de cetonas y epóxidos tras la oxidación *in vitro* de  $\beta$ -caroteno como por ejemplo  $\beta$ -ciclocitral, dihidroactinidiolido,  $\beta$ -ionona, 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona, y 5,8-endoperóxido-2,3-dihidro- $\beta$ -apocaroten-13-ona que junto a los  $\beta$ -apocarotenales aparecen sistemáticamente después de la oxidación de  $\beta$ -caroteno (Day y Erdman, 1963; Mader, 1964; Sommerburg y colaboradores, 2003; Ríos y colaboradores, 2008). La estructura de estos compuestos se detalla en la Figura 14. De forma específica, la oxidación de  $\beta$ -caroteno con oxígeno molecular genera 5,8-epoxi- $\beta$ -ionona,  $\beta$ -ionilidenacetaldehído, y 4-oxo- $\beta$ -ionilidenacetaldehído (Mordi y colaboradores, 1991; 1993). Esta serie

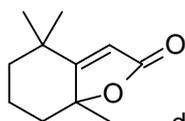
de productos tiene efectos biológicos negativos al desarrollar procesos de carácter pro-oxidante, como es la oxidación de biomoléculas de su entorno, la modulación de la actividad de la familia de enzimas proteína quinasa C, la estimulación de la actividad co-carcinogénica del citocromo P450 (Wang y colaboradores, 1999), y la oxidación ADN (Yeh y Hu, 2001), además de promover la apoptosis en varias líneas celulares humanas (Mo y Elson, 1999; Nara y colaboradores, 2001). En los procesos indicados se observa cómo la actividad de la mencionada serie de productos de oxidación de  $\beta$ -caroteno mimetiza la de aldehídos generados por la auto-oxidación de ácidos grasos, por ejemplo malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE). De hecho se ha observado cómo la actividad de los *apo*-carotenales es más potente que la mostrada por MDA y 4-HNE como por ejemplo en la inhibición de la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa (Siems y colaboradores, 2000). Los productos de degradación ejercen efectos beneficiosos en ciertos tipos de células cancerosas, inhibiendo su crecimiento o induciendo su diferenciación (Hu y colaboradores, 1998; Duitsman y colaboradores, 1999).



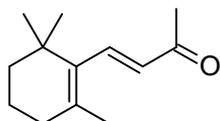
$\beta$ -ciclocitral



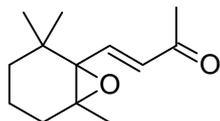
5,8-endoperoxido- $\beta$ -ionona



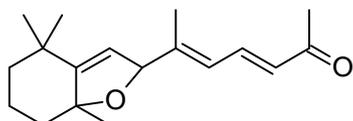
dihidroctiniodiolido



$\beta$ -ionona



5,6-epoxi- $\beta$ -ionona



5,8-endoperoxido-2,3-dihidro- $\beta$ -apocaroten-13-ona

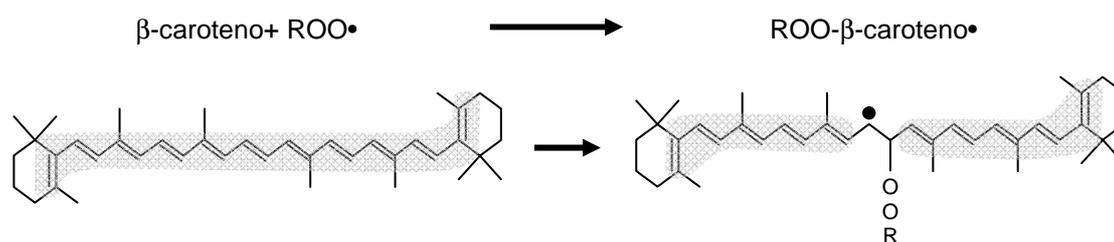
**Figura 14.-** Estructura de productos de fragmentación carotenoide detectados durante procesos de oxidación química o enzimática *in vitro* e *in vivo*.

### **Co-oxidación de carotenoides en presencia de lipoxigenasa. Formación de apo-carotenoides**

La co-oxidación de carotenoides mediada por ácidos grasos y lipoxigenasa constituye una fuente no específica de productos de ruptura de la molécula carotenoide. El pigmento es oxidado por las especies radicalarias generadas a partir del sustrato sobre el que la enzima ejerce su actividad. Algunos autores correlacionan la degradación de carotenoides por co-oxidación con la acción de un radical peroxi, generado por LOX, sobre el carotenoide para formar un radical carotenoide que posteriormente pasará a ser un radical peroxicarotenoide (Figura 15). La oxidación de  $\beta$ -caroteno en sistemas con lipoxigenasa ha sido estudiada, y algunos de los compuestos identificados fueron  $\beta$ -caroteno-5, 6-epóxido,  $\beta$ -apo-13-carotenona, cetonas,  $\beta$ -ionona y epóxido de  $\beta$ -ionona (Handelman y colaboradores, 1991; Yamauchi y colaboradores, 1993, 1998; Fleischmann y Zorn, 2008).

La oxidación de licopeno en presencia de lipoxigenasa intestinal produce derivados ceto y apo de licopeno con máximos de absorción en la zona del UV, a la vez que derivados aldehídicos y epóxidos con máximo de absorción en la zona del visible (dos Anjos Ferreira y colaboradores, 2004).

Experiencias de co-oxidación de  $\beta$ -caroteno y los radicales generados de la actividad LOX confirman que los compuestos generados a partir de incubaciones de  $\beta$ -caroteno con LOX y ácido linoleico son los mismos que los encontrados en las incubaciones con homogenados de mucosa gástrica humana. En concreto, tras 30 minutos de incubación del  $\beta$ -caroteno con un homogenado de mucosa gástrica humana, se generan  $\beta$ -apo-14', -12', -10', y -8'- carotenales,  $\beta$ -apo-13-carotenona, ácido retinoico y retinal, lo que confirma la presencia de una ruta de rotura excéntrica de carotenoides en este tejido humano. La adición de LOX al homogenado incrementa la producción de producto de rotura de carotenoides. Así, se podría decir que los hidroperóxidos, y sus derivados, generados en la mucosa son los que intervienen en la oxidación de  $\beta$ -caroteno para la formación de apo-carotenoides. Esta actividad de co-oxidación también explica que los carotenoides actúen como quenchers sobre los radicales peroxilos y participen en los sistemas de defensa celular (Yeum y colaboradores, 1995).



**Figura 15.-** Esquema de oxidación de  $\beta$ -caroteno mediada por un radical peroxilo. Generación del radical intermedio carotenoide y pérdida de la conjugación polienoica.

OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS

El objetivo general de trabajo es determinar la implicación de antioxidantes lipofílicos, presentes en matrices alimentarias, en los procesos oxidativos desencadenados por ERO de origen exógeno (procedentes de la dieta) y endógeno (formadas por enzimas LOX) generados a partir de hidroperóxidos lipídicos. Igualmente, se pretende descubrir nuevos focos de actividad antioxidante/no antioxidante (no explicados hasta el momento) durante el proceso digestivo y durante la asimilación de hidroperóxidos lipídicos, en los que los antioxidantes pueden contribuir a mantener el balance oxidativo de la mucosa intestinal. Este objetivo general se desarrolla en objetivos parciales.

### *1. Estudio de la capacidad antioxidante de pigmentos carotenoides en matrices alimenticias.*

Durante el proceso digestivo, carotenoides como  $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína pueden desarrollar su actividad antioxidante frente a las ERO de origen exógeno que se han incorporado a través de la dieta o se han generado a consecuencia de la digestión. Se aplicará un modelo bioquímico *in vitro* que mimetiza las condiciones químicas y enzimáticas que secuencialmente se producen durante la digestión, se pretende estimar la interacción entre los carotenoides y las ERO, y determinar si de dicha interacción se deriva un descenso en el contenido de ERO exógenas que permanezcan disponibles para su asimilación intestinal.

### *2. Estudio de la absorción y el transporte de hidroperóxidos lipídicos exógenos a través de la mucosa de epitelio intestinal, en presencia de antioxidantes luminales, mediante el uso de la técnica de asimilación ex vivo con celdas tipo Ussing.*

El consumo de grasas insaturadas implica la entrada en nuestro organismo de hidroperóxidos lipídicos que se pueden acumular dando origen a ERO que provocan un desequilibrio del estatus redox tisular ligado al inicio y progreso de procesos degenerativos. En el lumen digestivo, que es el sistema más expuesto a la acción directa de los hidroperóxidos, actúa el sistema de defensa antioxidante de nuestro organismo para evitar la generación de ERO. Para evaluar la absorción y transporte de hidroperóxidos en el epitelio intestinal, se empleará un sistema de celdas tipo Ussing que simula el transporte, a través de células enterocíticas, desde su cara apical a la basolateral. La cantidad de hidroperóxidos lipídicos encontrados en la cara basolateral de células epiteliales intestinales se determinará espectrofotométrica mediante una técnica colorimétrica y, a partir de los datos obtenidos, se obtendrá la velocidad de difusión y permeabilidad aparente a través del tejido. Factores como la presencia de

diversos antioxidantes luminales, la cantidad de hidroperóxidos en la cara apical o el estado fisiológico del tejido se tendrán en cuenta en el desarrollo del ensayo.

3. *Estudio de actividad LOX en epitelio intestinal.* La actividad de lipoxigenasa puede ser la causa de formación de hidroperóxidos lipídicos generadores de ERO con actividad oxidante a ambos lados del epitelio intestinal. Esta generación de un potencial oxidante endógeno es más acusada en tejidos afectados por procesos inflamatorios en el que la actividad LOX esté sobre-expresada. La determinación de la actividad LOX *in vitro* permitirá evaluar la capacidad de generar potencial oxidante en tejido epitelial sano frente a otro afectado por procesos inflamatorios. Se realizará un estudio secuencial que comenzará con el empleo de técnicas de HPLC para separar, identificar y cuantificar los hidroperóxidos que sirva de base para un seguimiento rutinario mediante análisis espectrofotométrico, técnica mucho más rápida y sencilla.

4. *Estudio de la cinética de degradación de  $\beta$ -caroteno, luteína y licopeno en situaciones de estrés oxidativo originado por lipoxigenasa.* En este objetivo se determinarán las consecuencias que tiene el estrés oxidativo de origen tisular con actividad LOX sobre-expresada sobre los carotenoides cuando éstos desarrollan su actividad antioxidante. Mediante un seguimiento espectrofotométrico se evaluará el descenso progresivo en la concentración de carotenoides y se establecerá la cinética de degradación de cada carotenoide, lo que marcará el nivel de implicación de cada uno de ellos en la actividad antioxidante y cómo se modifica la disponibilidad de estos compuestos para ser asimilados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materias primas

#### Vegetales ricos en carotenoides

Para la obtención de digestatos concentrados en compuestos carotenoides se parte de vegetales frescos y preparaciones envasadas, obtenidos del mercado local. Para la obtención de digestatos ricos en  $\beta$ -caroteno, se parte de tubérculos de zanahoria (*Daucus carota*). Para la obtención de digestatos ricos en licopeno, se aplica el proceso de digestión sobre tomate (*Lycopersicon esculentum*). Para la obtención de digestatos ricos en compuestos xantofílicos, destacando como componente mayoritario la luteína, la digestión se lleva a cabo sobre maíz dulce cocido en envase (*Zea mays*).

#### Extractos vegetales concentrados en carotenoides

Para la obtención de disoluciones stock de licopeno, luteína y  $\beta$ -caroteno se utilizaron oleorresina de licopeno, obtenida de concentrado de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y suministrada por Lycored (Beer-Sheva, Israel); luteína desesterificada obtenida de un concentrado de pétalos de marigold (*Tagetes erecta*) y suministrada por Kemin Foods (Des Moines, Iowa, EEUU);  $\beta$ -caroteno patrón en polvo suministrado por Fluka (St. Louis, MO, EEUU).

#### Aceite de pescado

Como fuente de lípidos poli-insaturados se utilizó aceite de sábalo atlántico (*Brevoortia tyrannus*) suministrado por Sigma (St. Louis, MO, EEUU).

#### Tejido epitelial de ratón

El gen APC (en inglés *adenomatous polyposis coli*) está relacionado con la capacidad de eliminación de tumores. Una de las hipótesis sobre el mecanismo de formación de adenomas postula la mutación de los alelos de este gen. El ratón (*Mus musculus*) APC<sup>Min</sup> es heterocigoto presentando una *mutación puntual terminadora* (en inglés *non-sense mutation*) que convierte un codón codificante en un codón de terminación. La mutación provoca la aparición de numerosos adenomas e inflamación

en el epitelio intestinal. Esta línea se utiliza como modelo para estudiar la asimilación y metabolismo de lípidos en condiciones inflamatorias y presencia de tejido adenomatoso. Los ratones APC<sup>Min</sup> fueron suministrados por Charles River Laboratories (Barcelona, España) cepa C57BL/6J-APC. Se adquieren tres machos heterocigotos para el gen APC<sup>Min</sup> y se cruzan con hembras C57BL/6J. Las camadas se genotipan para separar los animales heterocigotos (que presentan la mutación en el gen APC) de los homocigotos. Estos últimos se utilizan como grupo control. Para la obtención del epitelio intestinal, los ratones (grupos APC<sup>Min</sup> y control) se sacrifican mediante dislocación cervical, procediendo a la evisceración y disección del intestino delgado. Un segmento intestinal de cada individuo se limpia perfundiendo *tampón salino* (PBS) en su interior y posteriormente se everta, antes de congelarlo, a -80 °C.

#### Tejido epitelial de intestino de cerdo

Para la obtención de las fracciones sub-celulares, microsomal y citosólica, se utiliza intestino de cerdo obtenido inmediatamente después del sacrificio del animal en un matadero local. Las muestras de intestino se limpian perfundiendo *tampón salino* (PBS) en su interior y posteriormente se evertan, antes de congelarlo, para su almacenamiento a -80 °C.

#### Reactivos y disolventes

Se emplea hexano, acetona, metanol, éter etílico, éter de petróleo ligero (40-60 °C), etanol absoluto, cloroformo, tetrahidrofurano (THF) y acetonitrilo y ácido acético de calidad HPLC. El resto de reactivos y disolventes son de calidad analítica. Para la preparación de tampones se emplea agua destilada y en el caso de medios de reacción se utiliza agua desionizada de pureza Milli-Q (Millipore, Milford, MA, EEUU).

Los reactivos BHT, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol, al 99% de pureza, pepsina de mucosa gástrica de cerdo con una actividad de 920 U/mg de proteína, y extracto biliar porcino (contiene glicina y taurina, conjugados de ácido hiodeoxicólico y otras sales biliares), así como quercetina anhidro, taurocolato en sal sódica hidrato, ácido tánico, L- $\alpha$ -fosfatidilcolina tipo IV-S y DL- $\alpha$ -acetato de tocoferol fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Tween 20, monolaureato polioxietilen-sorbitan, fue suministrado por Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Lipoxigenasa de soja tipo V

con una actividad de 701000 U/mg (unidades Sigma de actividad de LOX), seroalbúmina bovina patrón y ácido araquidónico con pureza del 99,2% fueron suministrados por la misma compañía.

Pancreatina de páncreas porcino con 149 U/mg (amilasa, USP) de actividad amilasa fue suministrada por Fluka (St. Louis, MO, EEUU). La misma compañía suministró ácido linoleico con pureza superior al 99% y lipoxigenasa de soja tipo I con una actividad de 5,6 U/mg (unidades Fluka de actividad de LOX).

El 2,2'-azobis-(2-aminopropano) dihidroclorhídrico (AAPH) y 1,2-propandiol con pureza  $\geq 99,5\%$  fueron suministrados por Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

#### Disoluciones y tampones

**Disolución AAPH:** Compuesta por AAPH 80 mM, disuelto en una pequeña cantidad de agua, y llevada a volumen final con metanol.

**Disolución de conservación:** Compuesta por una disolución de sacarosa, 0,25 mM.

**Disolución salina:** Compuesta por NaCl, 140 mM; KCl, 5 mM; BHT, 150  $\mu$ M.

**Disolución sustrato:** Compuesta por ácido linoleico (LIN) 0,7 mM, y la misma cantidad en peso de Tween 20 que del LIN usado en la elaboración, todo disuelto en tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y con unas gotas de NaOH para clarificar.

**Jugo gástrico:** Disolución de pepsina, 0,035 g/mL; NaCl, 0,15 M; HCl, 0,02 M; pH 1,8.

**Jugo intestinal:** Disolución de pancreatina, 15 mg/mL; sales biliares, 1,5 mg/mL; NaCl, 0,15 M.

**Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :** compuesta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, pH 5,8.

**Tampón A:** Compuesto por HEPES 20 mM, sacarosa 250 mM y EDTA 1 mM, pH 7,4. La variante **Tampón A+DTT** adiciona a todo lo anterior ditioneitol 1 mM.

**Tampón de homogeneización:** compuesto por Tris-HCl (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), 100 mM; pH 7,4.

**Tampón de incubación:** Compuesto por  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM, KCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, llevado a pH 7,5.

**Tampón de lavado:** compuesto por 1,15% KCl; EDTA, 10 mM; pH 7,4.

**Tampón de suspensión:** Compuesto por 2 mM Tris-HCl, 0,05 M D-manitol, 5 mM EGTA; pH 7,1.

**Tampón fosfato salino:** Compuesto por 6,75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 16,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 115 mM NaCl, y 5 mM KCl, pH 6,4.

**Tampón Krebs-Henseleit:** compuesto por NaCl, 112,94 mM; KCl, 4,69 mM; D-glucosa, 12,1 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,2 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,91 mM;  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM; pH 7,74.

**Tampón PBS:** compuesto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6,75 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 16,5 mM; NaCl, 115 mM, KCl, 3 mM.

## **Métodos**

### Procedimiento de separación y purificación aplicado a extractos oleosos concentrados de licopeno, luteína libre y $\beta$ -caroteno

Para la obtención de disoluciones stock de los pigmentos mencionados (utilizadas en los experimentos de capacidad antioxidante de digestatos frente a LOOH, en la elaboración de emulsiones Tween carotenoide empleadas en la estimación del transporte de LOOH a través de epitelio intestinal y en la cinética de degradación de pigmentos por LOX) se aplicó el procedimiento siguiente. Se solubilizan 0,02 gramos de la oleoresina en 25 mL de éter etílico. La disolución se introduce en un embudo de decantación y se añaden 10 mL de KOH en metanol al 10% (p/v). La reacción de saponificación transcurre durante 1 hora, al objeto de eliminar la materia grasa. Finalizada la reacción se añaden 200 mL de disolución acuosa de NaCl (10%, p/v). Las fases, orgánica y acuosa, se separan desechándose la acuosa. La fase orgánica se lava con agua hasta neutralidad y dos veces con 200 mL de solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (2%, p/v). La fase orgánica se filtra a través de un lecho sólido de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evapora en rotavapor. El residuo se solubiliza con un volumen exacto de acetona (luteína y  $\beta$ -caroteno) o éter de petróleo ligero (licopeno). En cada uno de los casos se utiliza la expresión para el cálculo de la concentración que aparece reflejada en la Tabla 1.

**Tabla 1. Coeficientes de absorción específicos ( $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) utilizados para la determinación cuantitativa de la concentración carotenoide mediante medida espectrofotométrica<sup>1</sup>.**

Carotenoide	$E^{1\%}_{1\text{cm}}$	$\lambda$ (nm)	disolvente
$\beta$ -caroteno	2620 <sup>2</sup>	450	acetona
Licopeno	3450 <sup>3</sup>	472	éter de petróleo
luteína (libre o esterificada)	2340 <sup>2</sup>	446	acetona
extracto de <i>Capsicum annuum</i> L.	2654 <sup>4</sup>	456	acetona

<sup>1</sup>La concentración se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$c \text{ (g/mL)} = \frac{\text{unidades de absorbancia a } \lambda_{\text{max}}}{100 \times E^{1\%}_{1\text{cm}}}$$

<sup>2</sup>Mínguez-Mosquera, 1997. <sup>3</sup> Davies, 1976. <sup>4</sup> Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez, 1998.

#### Obtención de extractos directos (ED) de pigmentos desde una matriz vegetal

Para la extracción directa de pigmentos desde la matriz vegetal, se homogeneizan 10 g de la materia prima (zanahoria, tomate o maíz dulce cocido) con 40 mL de acetona y 20 mL de agua destilada. La homogenización se lleva a cabo en un homogeneizador Jauke & Kunkel ULTRA-TURRAX T25 de IKA-Labortechnik (Staufen, Alemania), durante 1 minuto. El resultado se pasa a través de un filtro de papel de 160 g/m<sup>2</sup> (Filtros Anovia; Barcelona, España) en un embudo cerámico adosado a un kitasato que se conecta a una bomba de vacío de Vacuubrand GMBH + CO KG (Wertheim, Alemania). La pasta obtenida tras el proceso de filtrado se re-extrae hasta su decoloración. El extracto obtenido se traslada a un embudo de decantación que contiene 60 mL de éter etílico. Para cuantificar, este sería el momento de añadir una cantidad exacta y conocida de  $\beta$ -apo-8'-carotenal como patrón interno. Se añaden 10 g de NaCl, 200 mL de agua destilada y se agita enérgicamente para disolver la sal. Tras la separación de las fases, se retira la fase acuosa (recuperando la pigmentación de ella, si fuese necesario) y se lava la orgánica con 200 mL de disolución acuosa de NaCl (10%, p/v), aplicando agitación leve. La fase acuosa se descarta y la orgánica se lava 2 veces con agua. La fase orgánica resultante se lava 2 veces con 200 mL de disolución acuosa de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2%, p/v). La fase orgánica se filtra a través de un lecho sólido de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora en rotavapor a una temperatura inferior a los 30 °C. El residuo se solubiliza en un volumen exacto de acetona HPLC y se almacena a -30 °C hasta su análisis.

#### Obtención de extractos de pigmentos de digestatos (DED)

Para la obtención de pigmentos desde el digestato, se lleva a cabo un proceso de extracción en embudo de decantación. Sobre 60 mL de éter etílico dispuestos en un embudo de decantación, se añaden 15 mL del digestato correspondiente. Se añade una cantidad exacta y conocida de  $\beta$ -apo-8'-carotenal, como patrón interno si se prevé la cuantificación. El contenido del embudo se lava con 200 mL de una disolución acuosa de NaCl (10%, p/v) y se agita. Tras la separación de las fases en el embudo, se desecha la fase acuosa y se realiza una recuperación de pigmentos de ella, si fuera necesario. Repetir este proceso una vez más. La fase orgánica resultante se lava 2 veces con 200 mL de disolución acuosa de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2%, p/v) y, tras retirar la fase acuosa, se filtra a través de un

lecho sólido de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evapora en rotavapor a una temperatura inferior a los 30 °C. El residuo se solubiliza en un volumen exacto de acetona HPLC. La muestra se almacena a -30 °C hasta su análisis.

#### Cuantificación de carotenoides por HPLC

El perfil carotenoide presente en los ED o en los DED se cuantifica mediante la aplicación del método de HPLC desarrollado por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1993). Se trata de un sistema de separación cromatográfica en fase reversa (columna  $\text{C}_{18}$  5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, modelo mediterranea SEA 18, Teknokroma, S. Coop. Ltda., Barcelona, España). El método emplea un gradiente binario acetona:agua en la proporción inicial de 75:25, a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. La cantidad de muestra inyectada es de 50  $\mu\text{L}$ . El cromatógrafo líquido utilizado es de la marca Jasco (JASCO Corporation, Tokio, Japón), equipado con una bomba de gradiente cuaternaria (JASCO PU-2089 Plus), interfaz de datos analógico/digital JASCO LC-NetII/ADC, inyector automático (JASCO AS-2055 Plus) y detector UV-vis de diodos en línea (JASCO MD2010 Plus). Los datos cromatográficos se gestionan mediante el software Chrompass (versión 1.8, JASCO Corporation, Tokio, Japón, 2003).

#### Proceso de digestión *in vitro*

Se utiliza el modelo de digestión *in vitro* descrito por Crews y colaboradores (1985) sobre el que se desarrollan algunas modificaciones. El proceso de digestión se desarrolla sobre 50 g de matriz vegetal (zanahoria, tomate o maíz dulce cocido) que se disgrega, en un robot de cocina, con 50 mL de *disolución salina* hasta conseguir una pasta. En un frasco de vidrio se ponen en contacto la pasta vegetal y 50 mL de *jugo gástrico*, comprobando que el pH esté por debajo de 3,5. Se inicia el proceso de digestión gástrica, que tiene lugar a 37 °C y 500 r.p.m. en un baño con agitador magnético múltiple y termostato de inmersión SBS, y a pH por debajo de 3,5. Transcurrida 1 hora de reacción, se detiene la digestión gástrica con la inmersión del frasco en hielo y con la basificación del bolo por la adición de una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  1M para llevar el pH entorno a 7,4. Continúa la digestión con la adición de 100 mL de *jugo intestinal*, en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Este proceso

tiene lugar durante 2 horas, periodo tras el cual se detiene con la inmersión del frasco en hielo. El resultado de la digestión se centrifuga a  $1000 \times g$  durante 1 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (modelo de centrifuga Avanti<sup>TM</sup> J-25, Beckman Coulter<sup>TM</sup>, Brea, CA, EEUU; rotor Beckman, modelo JA-25.50, Kildare, Irlanda). Se conserva el sobrenadante, que constituye el digestato con el que realizar futuras experiencias. Los digestatos se realizan por duplicado. En paralelo se realiza el digestato blanco, es decir, el mismo proceso de digestión en ausencia de la materia prima vegetal.

#### Medida de la capacidad antioxidante frente a LOOH de digestatos

El método utilizado para determinar la capacidad antioxidantes en los digestatos obtenidos y en disoluciones de  $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína en tetrahidrofurano (THF), a concentraciones conocidas, se basa en los ensayos de Vulcain y colaboradores (2005) sobre la utilización de AAPH como inductor de la peroxidación de LIN, con modificaciones. Se usa como modelo de antioxidante una disolución de quercetina en metanol a  $82\text{ }\mu\text{M}$ , de manera que  $25\text{ }\mu\text{L}$  de esta disolución llevados a los  $2050\text{ }\mu\text{L}$  del volumen de reacción suponen una concentración de quercetina en el volumen de reacción de  $1\text{ }\mu\text{M}$ .

En resumen el ensayo consiste en presentar a un volumen de reacción, en el que el AAPH induce la peroxidación de LIN, al supuesto antioxidante. Se determina espectrofotométricamente la estabilización en la formación de hidroperóxidos procedente de LIN o la disminución en la concentración de pigmento a lo largo del tiempo, como consecuencia de su co-oxidación.

La reacción se realiza por triplicado.  $2\text{ mL}$  de la *disolución sustrato* se incuban a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $250\text{ r.p.m.}$  en un termo agitador dotado de una sonda termométrica, durante 3 minutos. En ese instante se añaden  $25\text{ }\mu\text{L}$  de *disolución AAPH* o de *tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$* , según se trate del ensayo de reacción o de un blanco, y se empiezan a contar 20 minutos de reacción en las condiciones iniciales. A los 3,5 minutos, se añaden cantidades conocidas del supuesto antioxidante (digestato/digestato blanco, disolución de pigmento en THF o disolución de quercetina) o de *tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$* , según se trate de un ensayo de reacción o de un blanco. La absorbancia a  $234\text{ nm}$  se determina para seguir la formación de hidroperóxidos en intervalos de un minuto desde el instante 0 hasta el instante 20 minutos. El seguimiento espectrofotométrico se lleva a cabo en un espectrofotómetro de diodos en

línea HP-8452A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EEUU), provisto de un software de adquisición y gestión de datos cinéticos (UV-Visible ChemStation, versión A.02.05, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EEUU): Los datos de absorbancia obtenidos permiten calcular el área bajo los puntos representados a fin de comparar el efecto de los distintos compuestos antioxidantes. Dicha área se determina según Matthews y colaboradores (1990).

Los ensayos realizados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Experiencias realizadas para la determinación de la capacidad antioxidante de distintas muestras mediante los ensayos realizados con AAPH<sup>1</sup>.**

Sujeto de ensayo	Volumen de reacción
Quercetina	<b>Blanco L:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 25 $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	<b>Blanco A:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución AAPH</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	<b>Muestra Q:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución AAPH</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución quercetina</i>
Pigmentos en THF <sup>2</sup>	<b>Blanco L:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 25 $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	<b>Blanco A:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución AAPH</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	<b>Muestra P:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución AAPH</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución de pigmento en THF</i>
Digestatos	<b>Blanco L:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + (x) $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	<b>Blanco A:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución AAPH</i> + (x) $\mu\text{L}$ <i>tampón</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	<b>Control DB:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución AAPH</i> + (x) $\mu\text{L}$ <i>digestato blanco</i>
	<b>Muestra D:</b> 2 mL <i>disolución sustrato</i> + 25 $\mu\text{L}$ <i>disolución AAPH</i> + (x) $\mu\text{L}$ <i>digestato de matriz vegetal</i>

<sup>1</sup>2,2'-azobis-(2-aminopropano) dihidroclorhídrico.

<sup>2</sup>Tetrahidrofurano.

Los datos comparados son (A-L) frente a (Q-L), para quercetina; (A-L) frente a (P-L), para pigmentos en THF; (A-L) frente a (D-L), para observar la capacidad antioxidante de los digestatos desde un punto de vista químico, o (DB-L) frente a (D-L), para observar la capacidad antioxidante de los digestatos desde un punto de vista fisiológico. Tras los 20 minutos de reacción, los ensayos realizados con disoluciones de pigmentos o digestatos se extraen para estudiar por HPLC la concentración de pigmentos restantes tras la incubación. Esto permite determinar cuánto se degrada el pigmento en 20 minutos, ya que se conoce la concentración inicial de pigmento en la experiencia. Llegado al minuto 20, los tubos de ensayo en los que transcurre la reacción se introducen en hielo. El contenido se pasa a tubos falcon de 15 mL y se añade una cantidad conocida de una disolución de  $\beta$ -apo-8'-carotenal que se usa como patrón interno para determinar la cantidad de los pigmentos que quedan en el volumen de reacción. Inmediatamente se añaden 3 mL de una mezcla cloroformo:metanol (2:1) y 3 mL de hexano. Tras 1 minuto de agitación a media potencia en un VORTEX Genius3 de IKA (Staufen, Alemania), las muestras se centrifugan a  $4500 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  durante 5 minutos en una centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804R (Hamburgo, Alemania) con rotor basculante para tubos falcon de 15 mL A-4-44, de la misma compañía. Se recoge la fase orgánica resultante, se filtra a través de un filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  y se evapora bajo corriente de nitrógeno. El resultado se resuspende en acetona HPLC y se pinchan 50 mL. En el HPLC usando el método de cuantificación de carotenoides por HPLC (descrito anteriormente).

#### Preparación de emulsiones de hidroperóxidos lipídicos

Las emulsiones de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) se prepararon mediante sonicación durante 6 min de una mezcla de  $78 \mu\text{mol}$  de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de soja,  $80 \mu\text{mol}$  de aceite de pescado de sábalo atlántico y  $570 \mu\text{mol}$  de taurocolato sódico en 30 mL de *tampón fosfato salino*. La emulsión se prepara el día anterior al experimento y justo antes de comenzar se sonica durante 6 min.

#### Determinación del contenido en LOOH

La cantidad de LOOH en las emulsiones y en las muestras procedentes de los experimentos de transporte *ex vivo* (descritas en un siguiente apartado) se determina espectrofotométricamente

mediante la reacción rédox con iones ferrosos descrita por Morrow y Roberts, 1997 utilizando un kit de medidas suministrado por Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EEUU). Puesto que el método se basa en la determinación de iones férricos generados durante la reacción, la presencia de dichos iones en la muestra original es una potencial fuente de error en la medida. Este inconveniente se solventa extrayendo los LOOH de la muestra en cloroformo antes de la medida, disolvente en el que se realiza la determinación. Este procedimiento evita cualquier interferencia causada por iones férricos endógenos en el material o en la muestra, obteniendo una medida real y reproducible. La medida espectrofotométrica se realiza a 500 nm y la concentración de LOOH ( $\mu\text{M}$ ) se calcula con una curva de calibración obtenida mediante una emulsión de LOOH estándar incluida en el kit.

En el caso de las determinaciones de LOOH en los experimentos de transporte *ex vivo* cuando en la celda donante se adiciona una suspensión carotenoide, se debe tener en cuenta que éstos absorben a 500 nm. Para determinar la absorbancia residual del pigmento, una porción de la muestra se trata con trifenilfosfina para reducir los LOOH y eliminar el desarrollo de color debido a la transformación de iones ferrosos en iones férricos en la muestra. Por tanto la absorbancia de la muestra medida en esas condiciones representa la referencia basal debida a la suspensión carotenoide, valor que se sustrae a la absorbancia de la muestra determinada sin tratamiento con trifenilfosfina para calcular el contenido en LOOH.

#### Preparación de suspensiones Tween carotenoide

La suspensión Tween carotenoide se preparó según el procedimiento descrito por During y colaboradores (1998). Una alícuota de la disolución stock carotenoide se mezcla con 50  $\mu\text{L}$  de suspensión Tween 40 en acetona (20%, p/v) y se evaporan los disolventes bajo corriente de gas  $\text{N}_2$ . El residuo se disuelve en el volumen adecuado de *tampón de suspensión* y se agita en vórtex durante 1 minuto. La solución se prepara diariamente y se mantiene en cámara a 4 °C hasta su uso, momento en el que se vuelve a agitar en vórtex durante 1 minuto. La concentración final de pigmento en solución se determina aplicando el siguiente procedimiento. Se solubilizan en agua 1 mL de suspensión Tween y se añaden 8 mL de la mezcla N,N-dimetilformamida:hexano 1:1 (v/v). Para favorecer la separación de fases se añaden 5 mL de solución acuosa de NaCl (10%, p/v). La mezcla se agita durante 1 minuto en un agitador vórtex y se centrifuga a 3000 x g durante 5 minutos. Se retira

la fase orgánica y la fase acuosa se vuelve a extraer en las mismas condiciones. Las dos fases orgánicas se combinan y se procede a la determinación espectrofotométrica, evaporando el hexano y redisolviendo en el disolvente adecuado, a la  $\lambda_{\max}$  correspondiente (Tabla 1).

#### Preparación de las disoluciones de antioxidantes hidrofílicos

Las disoluciones de ácido tánico y quercetina se preparan disolviendo una cierta cantidad de esos compuestos en *tampón Krebs Henseleit*.

#### Absorción y transporte de LOOH a través de epitelio intestinal en presencia de antioxidantes hidrofílico y lipofílicos

Para abordar el estudio de la absorción y transporte de hidroperóxidos lipídicos se ha escogido un modelo experimental *ex vivo* que utiliza celdas tipo Ussing. Este método fue desarrollado hace unos 50 años por Hans H. Ussing con el fin de determinar el movimiento de los iones resultante del transporte activo, si se eliminan los gradientes osmótico y electroquímico. En concreto, el montaje diseñado les permitía determinar simultáneamente el transporte de iones de Na y la corriente eléctrica a través de piel de rana. El transporte neto de iones de Na se determinaba fijando a cero la diferencia de potencial a través de la piel tras aplicar un voltaje concreto, y la corriente que atravesaba el tejido en estas condiciones se registraba con un micro-amperímetro, concluyéndose con que la corriente a través de piel de rana era igual al transporte activo neto de iones de Na (Ussing y Zerahn, 1951).

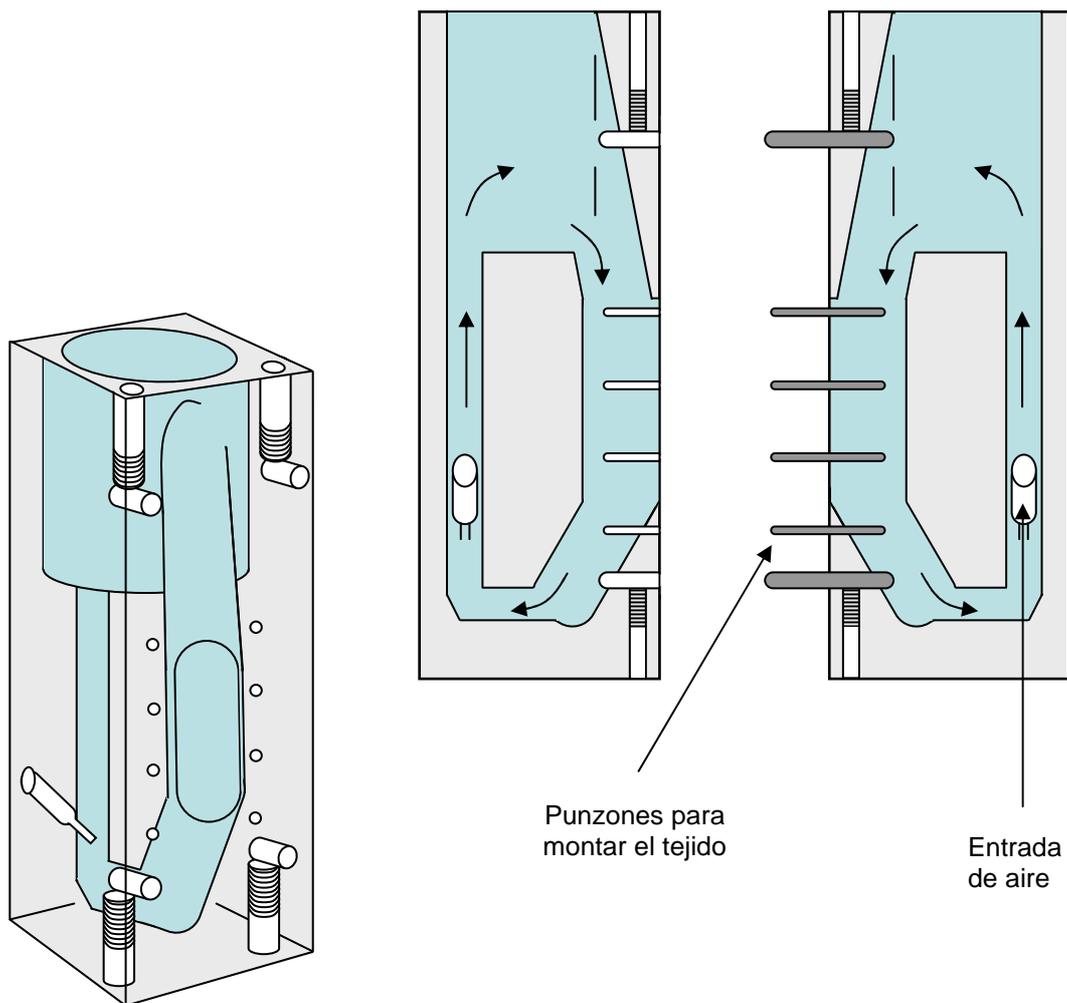
Las cámaras Ussing proporcionan un sistema fisiológico para medir el transporte de iones, nutrientes y medicamentos a través de varios tejidos epiteliales, prediciendo satisfactoriamente la permeabilidad intestinal humana *in vivo* para varios medicamentos. Así mismo, constituyen una herramienta útil en los estudios de bio-transformación *in vitro*, habiendo sido probadas con satisfacción en estudios de absorción (van de Kerkhof y colaboradores, 2006; Clarke, 2009).

En el diseño clásico de una cámara Ussing la sección de intestino abierta longitudinalmente separa las dos mitades de la cámara, quedando situado verticalmente de manera que el lado de la mucosa da hacia una de las mitades de la cámara mientras que el lado de la capa serosa se orienta hacia la otra mitad. De este modo se separan las disoluciones que independientemente bañan cada una de las mitades. La cámara mantiene la temperatura gracias a una corriente de agua que circula a

la temperatura deseada, y las tensiones de oxígeno y dióxido de carbono se mantienen en el tampón fisiológico inyectando gas en cada lado de la cámara. Para medir el voltaje transepitelial que desarrolla de manera espontánea el epitelio de trabajo, el sistema clásico dispone de unos electrodos y potenciómetros que se conectan por puentes salinos a cada mitad de la cámara, colocando los terminales muy próximos a los lados de mucosa y serosa del tejido. Los puentes salinos se usan tanto por convenio como para prevenir la exposición del epitelio a los efectos tóxicos de la plata presente en los electrodos de Ag-AgCl. Uno de los inconvenientes de este sistema es el riesgo de contaminaciones. Algunos medicamentos vehiculizados en DMSO pueden penetrar en las superficies de plástico suaves y los tubos de látex que conectan los reservorios. Para minimizar las contaminaciones, las cámaras acrílicas se ponen en remojo en agua jabonosa (10-15 min), se enjuagan y se remojan brevemente en una disolución acuosa de DMSO al 20% durante 5 min. Finalmente se enjuagan. Si se prepara el equipo para la medición de potencial, otro punto de contaminación son los puentes salinos de agar en los que quedan residuos de medicamentos, distorsionando así los efectos de los factores considerados en el diseño experimental (Clarke, 2009).

Los ensayos realizados en la presente tesis se llevan a cabo utilizando un nuevo tipo de celda de difusión (Figura 16) derivada de las cámaras Ussing. Estas nuevas celdas utilizan un material simple (es casi por completo de material acrílico) y permiten el desarrollo de un flujo laminar a través de la superficie del tejido. Además, el diseño da opción a que la celda sea manufacturada en un amplio rango de tamaños, lo que permite adecuar el área de superficie expuesta al tamaño del tejido utilizado. En este nuevo sistema, el tampón utilizado se airea gracias a la entrada de gas que genera una corriente circular del líquido en paralelo a la superficie del tejido; y la temperatura de la celda se mantiene al hacer circular agua a la temperatura deseada a través de dos bloques de aluminio que constituyen un dispositivo en el centro del cual se sitúa la celda. La temperatura se regula fácilmente y el montaje permite albergar grupos de hasta 6 celdas juntas, pudiéndose calentar las celdas al completo y no solo los fluidos de los reservorios (como ocurre con las cámaras Ussing clásicas). La limpieza de estas celdas acrílicas también es más fácil y se puede realizar por completo mediante sonicación en una solución limpiadora y un enjuagado posterior con agua. Una de las ventajas del nuevo diseño con respecto al clásico es que todo el bloque es del mismo material, por lo que no se corre el riesgo de perder compuestos por difusión a través de las juntas de las distintas piezas. Otra

ventaja es que la disolución de trabajo fluye en paralelo al tejido, y el volumen de burbujas puede ser graduado más fácilmente. Además, como la relación *superficie de tejido / volumen de fluido* en la celda es crítica para cuantificar permeabilidades bajas (Grass y Sweetana, 1988), las celdas del nuevo sistema alojan menos volumen y la apertura sobre la que se coloca el tejido es alargada, en vez de circular como ocurre en el sistema original. Este modelo de celdas es válido en los estudios de permeabilidad de tejidos porque no existen diferencias estadísticas en los resultados obtenidos al utilizar ambos modelos, es decir, el diseño clásico original y el desarrollado a partir de este posteriormente (Grass y Sweetana, 1988).



**Figura 16.-** Esquema de una celda de difusión: Diseño de Grass y Sweetana (1988). El tejido se monta entre las dos mitades acrílicas que constituyen la celda. El tampón es empujado por la corriente de aire que se suministra y fluye en la dirección de las flechas, en paralelo con el tejido.

Los ensayos de transporte *ex vivo* se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Deferme y colaboradores 2002. La especie seleccionada para la adquisición de epitelio intestinal es la rata (machos tipo Wistar), alimentadas con dieta estándar hasta alcanzar un peso de 300 g. Si se pretende obtener tejido con los niveles de glutatión intestinal disminuidos, se inyectan 500 mg de BSO (L-butionina-sulfoximina) disueltos en 1 mL de NaCl 0,9% en la cavidad intraperitoneal, 2 horas antes de proceder a la eutanasia del animal. La BSO disminuye la síntesis de GSH intestinal en un 50% del nivel basal (Aw y colaboradores, 1992). La toma del tejido se realiza tras la eutanasia del animal mediante asfixia con CO. De forma inmediata se procede a seccionar el abdomen y extraer el intestino delgado. El segmento distal del yeyuno (20 cm tomados a partir de la unión íleon-ciego) se corta y sumerge en *tampón Krebs Henseleit* helado e inmediatamente se coloca durante 20 min en solución helada que se burbujea continuamente con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). La muestra se divide en segmentos de 1,5 cm, de los que se elimina la capa serosa y se monta en la cámara de difusión vertical tipo Ussing (área de exposición del tejido 0,64 cm<sup>2</sup>, NaviCyteTM, Warner Instruments, Inc, Hamden, CT, EEUU). Las dos cámaras (zona apical y zona basolateral) se llenan con 9 mL de *tampón Krebs Henseleit*, 25 °C o 37 °C, que se burbujea continuamente con gas carbógeno, dejando transcurrir 15 min para equilibrar el tejido. La zona apical se complementa con las disoluciones y/o emulsiones de antioxidante hidrofílico o lipofílico tal y como se describe en la sección de diseño experimental. Las muestras (500 µL) se toman de la cámara basolateral, volumen que se reemplaza con *tampón Krebs Henseleit* para determinar su contenido en LOOH como se ha descrito anteriormente.

Una vez calculado el contenido en LOOH de la zona basolateral, se representan los datos de contenido, expresado en nmol, respecto al tiempo de ensayo, expresado en horas, para calcular la velocidad de difusión, dQ/dt expresada en nmol/h, a partir de la pendiente del ajuste lineal de los datos representados. Conocida la velocidad de difusión, la permeabilidad aparente, Papp expresada en cm/h, se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$P_{app} = dQ/dt \times (1/A) \times (1/C_0) \quad \text{Ecuación 1}$$

En la que A es el área de tejido expuesta, constante e igual a  $0,64 \text{ cm}^2$  y  $C_0$  es la concentración inicial de LOOH en la zona apical ( $\mu\text{M}$ ) que vendrá marcada en cada ensayo el diseño experimental. Para estimar si las condiciones experimentales del proceso de asimilación (temperatura, burbujeo del tampón con gas carbónico y tiempo de ensayo) generan la degradación oxidativa de LOOH colocados en la zona apical, lo cual implicaría errores en la estimación de la eficiencia de la asimilación, se realizaron ensayos con las condiciones experimentales indicadas pero colocando un trozo de parafilm en la zona donde se coloca el tejido. De forma regular se tomaron muestras de la cámara apical y se determinó su contenido en LOOH, concretando que éste se mantuvo en valores superiores al 95% respecto al contenido inicial.

#### Diseño experimental de sondeo

Investigaciones preliminares han puesto de manifiesto que los diseños experimentales de Placket-Burman proporcionan una estrategia efectiva para sondear los posibles factores clave que regulan un problema científico (Lochner y Matar, 1990; Rincón y colaboradores, 2003; Periago y colaboradores, 2007), por lo que representan una buena herramienta experimental debido al número mínimo de experimentos requeridos. Estos diseños experimentales están basados en las matrices de Hadamard, de forma que el número de experimentos a incluir en el diseño es un múltiplo de 4.

Para explorar o sondear los posibles efectos de 7 factores sobre el mecanismo de absorción y transporte *ex vivo* de LOOH a través de epitelio intestinal de rata Wistar, se utiliza un diseño experimental de Placket-Burman. La resolución inicial del diseño (III) se incrementa a IV mediante la estrategia *fold-over*, siguiendo el criterio de Box y Hunter (1961). De esta forma los efectos principales no están confundidos con las interacciones de segundo grado, si bien algunas interacciones de segundo grado están confundidas entre sí, de acuerdo con la estructura de confusión (alias) del diseño experimental generado.

En la Tabla 3 se muestran los factores estudiados (Factores críticos aparentes, FCA) y los rangos experimentales considerados en el diseño experimental de sondeo.

**Tabla 3. Factores críticos aparentes (FCA) y rangos experimentales considerados en el diseño experimental de sondeo utilizado para el estudio de la asimilación y transporte de LOOH a través de epitelio intestinal de rata Wistar utilizando el modelo de asimilación *ex vivo* de celdas Ussing.**

FCA	Símbolo		Niveles	
	Codificado	Real	-1	+1
Tipo de antioxidante (grupo lipofílico)	X <sub>1</sub>	OX <sub>I-T</sub>	β-caroteno	luteína
Concentración de antioxidante (grupo lipofílico), μM	X <sub>2</sub>	OX <sub>I-C</sub>	1	2,5
Tipo de antioxidante (grupo hidrofílico)	X <sub>3</sub>	OX <sub>II-T</sub>	quercetina	ácido tánico
Concentración de antioxidante (grupo lipofílico), μM	X <sub>4</sub>	OX <sub>II-C</sub>	1	2,5
Temperatura, °C	X <sub>5</sub>	T	25	37
Concentración de hidroperóxido, μM	X <sub>6</sub>	H <sub>-C</sub>	20	40
Nivel tisular de glutatión	X <sub>7</sub>	Ep <sub>ST</sub>	normal	bajo

La siguiente tabla muestra el diseño experimental de sondeo utilizado en el estudio:

Run	Trial	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$
12	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
3	2	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	3	-1	1	1	-1	-1	1	-1
11	4	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	5	1	1	1	-1	-1	-1	1
16	6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	7	-1	-1	1	1	-1	-1	1
13	8	-1	1	1	1	1	-1	-1
5	9	1	-1	-1	-1	-1	1	1
7	10	1	1	-1	1	-1	-1	-1
10	11	1	1	-1	-1	1	1	-1
15	12	-1	-1	1	-1	1	1	1
6	13	1	-1	1	-1	1	-1	-1
8	14	1	1	1	1	1	1	1
14	15	-1	1	-1	1	-1	1	1
1	16	-1	-1	-1	1	1	1	-1

### Diseño experimental de optimización

Sobre la base de los resultados obtenidos en la fase de sondeo, dos parámetros se seleccionan para la fase de optimización: la concentración de antioxidante hidrofílico ( $X_1$ ) y la concentración de hidroperóxido ( $X_2$ ). Se consideran como antioxidante los dos considerados en la fase de sondeo, quercetina y ácido tánico.

El proceso de optimización se lleva a cabo mediante un diseño experimental de Box Wilson o diseño experimental central compuesto rotatable (CCR) considerando como valor de  $\alpha$  para la rotabilidad del diseño 1,41. Al mismo tiempo se utiliza la metodología de respuesta en superficie (MRS) para establecer la relación entre los factores y las respuestas. Los aspectos teóricos y las implicaciones experimentales de la MRS han sido descritos con anterioridad (Cochran y Cox, 1965).

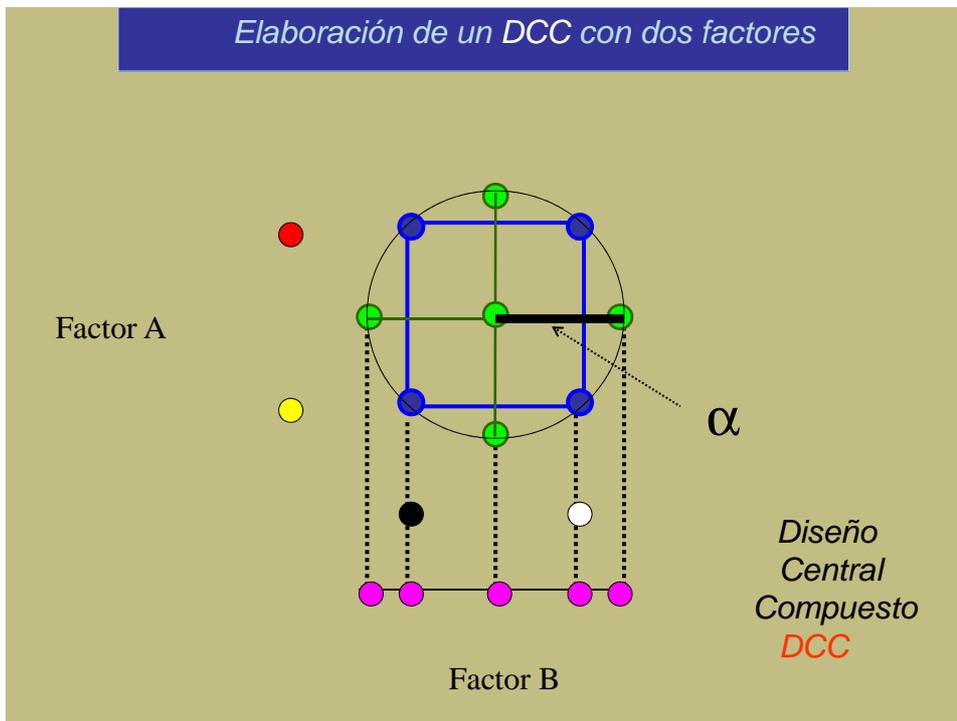
De esta forma se asume que la variabilidad de las respuestas consideradas puede ser explicada mediante una función  $f$  sobre la base de los efectos de los factores incluidos en el diseño de optimización. La función se obtiene mediante una aproximación a una función cuadrática, tal como

$$\xi_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 + \mathcal{E}$$

Donde  $\xi_i$  es la respuesta,  $b_0$  (punto central del sistema),  $b_i$  (coeficientes de los efectos lineales),  $b_{ii}$  (coeficientes de los efectos cuadráticos) y  $b_{ij}$  (coeficientes de los efectos de las interacciones) son los diferentes coeficientes constantes del modelo,  $X_i$  son los factores independientes codificados y  $\mathcal{E}$  es el error del modelo. En MRS es recomendable transformar las variables naturales en variables codificadas, las cuales son definidas como variables adimensionadas, con una media de 0 y la misma desviación típica (Myers y Montgomery, 1995).

La elaboración del DCC se realiza mediante la superposición del diseño factorial y el diseño estrella con un valor de  $\alpha$  preestablecido, de acuerdo a como se explica en la Figura 17.

De esta forma el diseño experimental de optimización considerado se ajusta a los parámetros y niveles presentados en la Tabla 4.



**Figura 17.-** Superposición del diseño factorial y diseño estrella utilizada en la elaboración del diseño central compuesto correspondiente a la fase de optimización.

**Tabla 4. Factores y rangos experimentales considerados en el diseño experimental de optimización utilizado para el estudio de la asimilación y transporte de LOOH a través de epitelio intestinal de rata Wistar utilizando el modelo de asimilación *ex vivo* de celdas Ussing.**

Factores	Símbolo		Niveles				
	Codificado	Real	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentración antioxidante (grupo hidrofílico), $\mu\text{M}$	$X_1$	$\text{OX}_{\text{IL-C}}$	0,76	2	5	8	9,24
Concentración hidroperóxido, $\mu\text{M}$	$X_2$	$\text{H}_{\text{-C}}$	15,9	20	30	40	44,1

La siguiente tabla muestra el diseño experimental de optimización utilizado en el estudio.

Run	Trial	$X_1$	$X_2$
10	1	0	0
6	2	+1,41	0
5	3	-1,41	0
7	4	0	-1,41
1	5	-1	-1
9	6	0	0
8	7	0	+1,41
3	8	+1	-1
4	9	+1	+1
2	10	-1	+1

Todos los experimentos fueron realizados en orden aleatorio (orden trial) porque la aleatorización ayuda a evitar al investigador la obtención de conclusiones equivocadas producidas por la existencia de fuentes de variabilidad ajenas al diseño experimental (Joglekar and May, 1987; Robinson, 2000).

Los programas estadísticos Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa) y Design-Expert (Stat-Ease, Inc., Minneapolis) fueron utilizados para generar los diseños, ajustar el modelo de la superficie obtenida a los datos experimentales obtenidos y la obtención de las figuras de la superficies obtenidas.

#### Preparación de la emulsión sustrato de ácido graso libre

Se prepara una emulsión de ácido graso (linoleico o araquidónico) pesando 0,1 gramos de ácido graso que se mezcla con idéntica cantidad de Tween 20. Se añade agua desionizada lentamente y con agitación suave de la disolución. Antes de aforar se añaden unas gotas de NaOH 2M a fin de eliminar la turbidez que se haya podido desarrollar durante la preparación. La emulsión se divide en alícuotas de 0,5 mL que se envasan bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y se conservan en tubos herméticamente cerrados a -30 °C.

#### Preparación de disoluciones de lipoxigenasa tipos I y V

Se prepara una disolución de 4 mg de lipoxigenasa comercial tipo I en 10 mL de agua desionizada. La disolución de lipoxigenasa comercial tipo V se obtiene disolviendo 10 µL del extracto comercial en 490 µL de agua desionizada. Las disoluciones obtenidas se mantienen en refrigeración a 4 °C y el plazo de utilización fue siempre inferior a 48 h. Una alícuota de cada uno de los extractos se desnaturaliza manteniéndola a 100 °C durante 10 min en tubos pirex herméticos en un baño seco digital (modelo ACCUBLOCK™, Labnet International Inc., Edison, NJ, EEUU).

#### Medida de la actividad de lipoxigenasa tipos I y V

Se emplea la metodología descrita por Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera (1997) y adaptada por Gökmen y colaboradores (2002). El método de cuantificación espectrofotométrica está basado en

el incremento de absorbancia a 234 nm debido a la formación de hidroperóxidos por la actividad de lipoxigenasa.

En la cubeta espectrofotométrica se adicionan cantidades crecientes de disolución de lipoxigenasa tipo I comprendidas en el rango entre 0 y 30  $\mu$ L, y posteriormente se adiciona tampón fosfato 50 mM a pH 8 para alcanzar un volumen final de 2,97 mL. La reacción se inicia al adicionar 30  $\mu$ L de emulsión de ácido graso libre. Para lipoxigenasa comercial tipo V el procedimiento empleado es análogo utilizando como medio de reacción tampón fosfato 50 mM a pH 6.

El progreso de la reacción de hidroperoxidación lipídica se monitoriza espectrofotométricamente, empleando un espectrofotómetro de diodos en línea HP-8452A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EEUU) provisto de un software para la adquisición y gestión de datos cinéticos (UV-Visible ChemStation, versión A.02.05, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EEUU, 95-96). Se determina el incremento de absorbancia a 234 nm (medidas a intervalos de 2 s) que experimenta el medio de reacción entre los segundos 20 y 55 de reacción con un tiempo total de 60 s. La pendiente de la recta ( $\Delta$ Abs/s) que relaciona el valor de absorbancia y tiempo de reacción estima la actividad de hidroperoxidación que ha mostrado la cantidad de extracto enzimático empleado. La linealidad en este parámetro garantiza la condición de saturación por sustrato. El uso de cantidades variables de extracto enzimático permite correlacionar la actividad alcanzada con la cantidad de enzima empleado, que nuevamente debe ser lineal para garantizar la saturación por sustrato. Ambas condiciones han sido siempre exigidas a la medida.

A cada una de las actividades alcanzadas en las reacciones enzimáticas se le resta la porción correspondiente a la *aparente* hidroperoxidación espontánea de los ácidos grasos poli-insaturados. La extensión de esta reacción se determina en paralelo a cada determinación de actividad enzimática empleando idénticas condiciones a las anteriormente descritas pero en presencia de extracto enzimático desnaturalizado.

#### Paralización química de la actividad de formación de hidroperóxidos

Tanto en la reacción enzimática como en la reacción de *aparente* hidroperoxidación espontánea el incremento en absorbancia a 234 nm progresa más allá del tiempo empleado para

monitorizar la reacción. Para los estudios de correlación entre medida espectrofotométrica y cuantificación de hidroperóxidos por HPLC se hace necesario paralizar la reacción de forma que se garantice que solo el hidroperóxido formado durante el seguimiento espectrofotométrico es el que se va a inyectar en sistema cromatográfico. El sistema empleado para paralizar la reacción de formación de hidroperóxidos, bien enzimático o bien espontáneo consistió en adicionar a los 3 mL de medio en el que está transcurriendo la reacción, de 150  $\mu$ L de disolución metanólica de hidróxido potásico al 20% (p/v).

#### Cuantificación espectrofotométrica de hidroperóxidos

La medida espectrofotométrica de actividad proporciona como resultado un valor expresado en  $\Delta$ Abs/s (UA/s). A partir de ese valor, y considerando que de  $(\Delta$ Abs/s)  $\times$  t (donde t es el tiempo de reacción en s) resulta un valor de incremento de absorbancia, se puede obtener la cantidad de hidroperóxidos formados en el periodo de reacción utilizando la siguiente expresión:

$$C = [(\Delta\text{Abs/s (UA/s)} \times t \text{ (s)}) / 25000] \text{ M}$$

en la que C es la concentración de hidroperóxidos (M), y  $25000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  es el coeficiente de extinción molar para hidroperóxidos a 234 nm. Puesto que el volumen de reacción es conocido (V) se puede calcular la cantidad de hidroperóxidos formada en el tiempo t.

$$\text{Cantidad de hidroperóxidos } (\mu\text{mol}) = [(\Delta\text{Abs/s (UA/s)} \times t \text{ (s)}) / 25000] \times 10^3 \times V$$

#### Correlación entre el seguimiento de la reacción de formación de hidroperóxidos por espectrofotometría UV-vis y HPLC

En un tubo tipo falcon de 50 mL se adicionan 11,8 mL de tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6 y 80  $\mu$ L de disolución de lipoxigenasa tipo V. La reacción se inicia al adicionar 120  $\mu$ L de emulsión de ácido graso libre. A distintos intervalos de tiempo (0, 5, 10, 20 y 60 min) se toman alícuotas de 2 mL y se detiene la actividad enzimática con 100  $\mu$ L de disolución metanólica de hidróxido potásico al 20%

(p/v). En paralelo a esta reacción se lleva a cabo otra en idénticas condiciones pero utilizando extracto enzimático desnaturalizado para monitorizar el proceso de *aparente* hidropoxidación espontánea. Las alícuotas se filtran a través de un filtro de nylon con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se almacenan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por HPLC-MS o HPLC.

#### Identificación de los hidroperóxidos mayoritarios por HPLC-MS

La identificación de hidroperóxidos por HPLC-MS se realiza con las siguientes condiciones experimentales. La fase eluyente está compuesta por metanol:acetonitrilo 1:1 (0,1% ácido fórmico), (A), y agua (0,1% ácido fórmico), (B). El gradiente de elución comienza con el 65% de A y a los 20 minutos se lleva a 100% de B en 15 minutos (lineal). El flujo es 0,2 mL/min. La separación se verifica en una columna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, modelo Gemini, Phenomenex Inc., Torrance, CA, EEUU). El análisis por EM se realiza *on-line* en modo *split post-column* del 50%. La interfase, *electrospray en modo negativo*, (capilar calentado, lente de enfoque, skimmer y octapolo) se optimiza con una disolución patrón de reserpina. Posteriormente, y a fin de conservar el aducto [M+fórmico-H] el capilar calentado se mantiene a baja temperatura (150-175  $^{\circ}\text{C}$ ). La tensión del sprayer se fija en 3 kV.

#### Detección de hidroperóxidos por HPLC

La cuantificación de hidroperóxidos combina la determinación espectrofotométrica de la actividad lipoxigenasa con la detección por HPLC de los picos de hidroperóxidos generados con dicha actividad. El cromatógrafo líquido utilizado es de la marca Jasco (JASCO Corporation, Tokio, Japón), equipado con una bomba de gradiente cuaternaria (JASCO PU-2089 Plus), interfaz de datos analógico/digital JASCO LC-NetII/ADC, inyector automático (JASCO AS-2055 Plus) y detector UV-vis de diodos en línea (JASCO MD2010 Plus). El método cromatográfico empleado consiste en la inyección de 50  $\mu\text{L}$  de muestra en una columna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, modelo Gemini, Phenomenex Inc., Torrance, CA, EEUU) utilizando como fase eluyente acetonitrilo:metanol, 1:1 (0,1% de ácido acético) y agua en la proporción 70:30 en modo isocrático a 0,6 mL/min. El espectro de absorbancia se monitoriza entre 190 y 350 nm obteniendo el cromatograma a 234 nm. Los datos

espectrofotométricos y cromatográficos se gestionan mediante el software Chrompass (versión 1.8, JASCO Corporation, Tokio, Japón, 2003).

Obtención de la fracción microsomal y citosólica de mucosa de epitelio intestinal de ratones APC<sup>Min</sup> (heterocigotos), ratones control (homocigotos) y cerdo

Se emplea la metodología descrita por Hong y colaboradores (2001). El epitelio intestinal se descongela sumergiéndolo en *tampón Krebs-Henseleit*. A continuación se raspa la mucosa intestinal con la arista de un portaobjeto para separar el epitelio de la capa muscular. Se pesa la mucosa y se añaden dos volúmenes de *tampón de homogeneización* (p/v). La suspensión se homogeneiza mediante un homogeneizador VWR (Barcelona, España), modelo VDI 12, y se centrifuga a  $9000 \times g$  durante 20 min a 4 °C (modelo de centrífuga Avanti<sup>TM</sup> J-25, Beckman Coulter<sup>TM</sup>, Brea, CA, EEUU; rotor Beckman, modelo JA-25.50, Kildare, Irlanda). Se recoge el sobrenadante y se desecha el pellet. El sobrenadante se centrifuga a  $103700 \times g$ , durante 90 min a 4 °C (modelo de ultracentrífuga Optima<sup>TM</sup> MAX, Beckman Coulter<sup>TM</sup>, Brea, CA, EEUU; rotor Beckman, modelo MLA-80, Brea, CA, EEUU). El sobrenadante constituye la fracción citosólica que se almacena a -80 °C. El pellet se resuspende en 1,3 volúmenes de *tampón de lavado* (p/v) y se homogeneiza con un Potter-Elvehjem. Se vuelve a centrifugar a  $103700 \times g$ , durante 60 min a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y el pellet, que constituye la fracción microsomal, se resuspende en 1,3 volúmenes de *disolución de conservación* (p/v), se homogeneiza con un Potter-Elvehjem y se almacena a -80 °C.

Determinación de la concentración de proteínas

Se utiliza el método del ácido bicinconínico (BCA) descrito por Smith y colaboradores (1985). Este ácido constituye el fundamento de un procedimiento analítico capaz de monitorizar iones  $\text{Cu}^+$  formados tras la reacción de proteínas con iones  $\text{Cu}^{2+}$  (medio alcalino). Los iones  $\text{Cu}^+$  originados, reaccionan con la sal disódica del ácido bicinconínico dando lugar a un compuesto de color violeta. El color producido es estable y su intensidad incrementa proporcionalmente con la concentración de proteínas existentes. El ácido bicinconínico utilizado se prepara según el siguiente protocolo: 100 volúmenes de reactivo A (solución acuosa al 1%  $\text{Na}_2\text{-BCA}$ , 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (monohidrato), 0,16% tartrato

sódico, 0,4% hidróxido sódico y 0,95%  $\text{NaHCO}_3$ , ajustada a pH 11,25 con disolución acuosa de hidróxido sódico 1 M) se mezcla con 2 volúmenes de reactivo B (solución acuosa al 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). El ensayo se realiza de la siguiente forma: 1 mL de ácido bicinconínico (BCA) se mezcla con 75  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y, a continuación se añade 25  $\mu\text{L}$  de la muestra que contiene proteínas. La reacción se lleva a cabo durante 10 minutos a 60 °C, y una vez finalizada, se determina el valor de absorbancia a 562 nm. Con la correspondiente recta de calibrado (elaborada previamente con seroalbúmina bovina en concentraciones de 0 ppm a 10 ppm) se determina la cantidad de proteínas expresada en mg de proteínas por mL de preparación.

#### Medida de actividad lipoxigenasa en las fracciones microsomal y citosólica

La actividad lipoxigenasa en las distintas fracciones sub-celulares se determina de igual forma que para las lipoxigenasas I y V comerciales. Se comienza por ensayar la actividad de lipoxigenasa en la fracción sub-celular utilizando cantidades crecientes de fracción (microsomal o citosólica) en un volumen de reacción de 3 mL con 30  $\mu\text{L}$  de disolución de ácido graso. Los datos de actividad obtenidos en las distintas fracciones se comparan con aquellos obtenidos en la reacción con lipoxigenasa V, al objeto de determinar qué cantidades de fracción utilizar en los ensayos de degradación de pigmentos.

#### Cinética de degradación de pigmentos

La experiencia que se describe a continuación se realiza usando disoluciones de pigmentos carotenoides ( $\beta$ -caroteno, luteína y licopeno) obtenidas a partir de disoluciones stock de pigmentos (obtenidas según el procedimiento anteriormente descrito). La composición de los sistemas de reacción se describe en la Tabla 5. De cada situación se realizan 3 réplicas y un blanco (de composición idéntica al sistema empleado exceptuando la presencia de pigmento) para las medidas espectrofotométricas. El volumen final de reacción es de 3 mL. La cantidad de enzima lipoxigenasa usada y de fracciones sub-celulares será tal que las actividades de los tres extractos sean aproximadas. La reacción se inicia al añadir 30  $\mu\text{L}$  de disolución de ácido graso al volumen de reacción.

Las disoluciones de pigmento se preparan teniendo en cuenta que cada replica es de 3 mL y que se busca una concentración de pigmento en torno a 3  $\mu\text{g/mL}$ . Por ejemplo, para un volumen de reacción de 3 mL se usan 2 mL de disolución Tween para emulsionar el pigmento en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6; 3 replicas con pigmento, de 3 mL cada una, en 7 situaciones distintas implica la preparación de 63 mL de disolución de pigmento. Se prepara dicha cantidad de disolución de pigmentos a la concentración deseada a partir de las disoluciones stock (determinando la concentración espectrofotométricamente y aplicando los coeficientes de extinción adecuados). Esta disolución se evapora, junto con 42 mL de disolución Tween (80  $\mu\text{L}$  de Tween en 5 mL de acetona) en el rotavapor a 30  $^{\circ}\text{C}$ . Resuspender en el mismo volumen (63 mL) con tampón fosfato sódico 50 mM, pH6. En paralelo se preparan los blancos siguiendo el mismo procedimiento descrito pero usando acetona en vez de disolución de pigmentos.

La monitorización de la reacción se realiza en las siguientes condiciones. Se toma como tiempo 0 el momento en que se añade el sustrato linoleico. A partir de entonces se determina la absorbancia máxima a 450 nm (muestras con  $\beta$ -caroteno), 448 nm (muestras con luteína) y 470 nm (muestras con licopeno). La reacción transcurre en estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. Las mediciones de absorbancia se repiten periódicamente hasta que el porcentaje de retención alcanzado esté en torno al 10%, o hasta que se pierda la forma del espectro. El porcentaje de retención se define como la relación entre la absorbancia en tiempo  $n$  respecto a la absorbancia en tiempo 0, por 100.

**Tabla 5. Descripción de la composición de los diferentes sistemas de reacción empleados para establecer la cinética de degradación de pigmentos carotenoides ( $\beta$ -caroteno, luteína y licopeno) en función de su entorno.**

Sistema	Descripción
1	Disolución de pigmento individual
2	Disolución de pigmento en presencia de ácido graso (linoleico o araquidónico en suspensión Tween cuya preparación se describe en apartados anteriores)
3	Disolución de pigmento en presencia de lipoxigenasa de soja tipo V y suspensión de ácido graso (linoleico o araquidónico)
4	Disolución de pigmento en presencia de fracciones sub-celulares (microsomal o citosólica, obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente)
5	Disolución de pigmento en presencia de fracciones sub-celulares (microsomal o citosólica y en presencia de ácido graso (linoleico o araquidónico)

### Estudio cinético de la degradación de carotenoides

El procedimiento descrito para el estudio de la cinética de degradación de pigmentos se basa en los estudios de Mínguez-Mosquera y Jarén-Galán (1995), Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera (1997) y Pérez-Gálvez y colaboradores (2000). Desde el punto de vista de la capacidad colorante, y tal y como se ha planteado la determinación espectrofotométrica en el apartado anterior (Cinética de degradación de pigmentos), el conjunto de reacciones de oxidación se convierten en una, en la que el reactante coloreado se transforma en un producto o productos de degradación, exentos de color o de menor capacidad colorante que el reactante inicial. Por ello, aunque la experiencia de oxidación de carotenoides implica varias reacciones de diferentes mecanismos y originando distintos productos de degradación, se diseña el estudio cinético asequible para dar respuesta al objetivo planteado. Los parámetros cinéticos, orden de reacción,  $n$ , y constante cinética,  $k$ , se determinan según el método integral. Este método utiliza un procedimiento de prueba y error, en el que el orden de reacción de la ecuación de velocidad (**Ecuación 2**) se supone inicialmente.

$$-\frac{d[\% \text{ Ret}]}{dt} = k \times [\% \text{ Ret}]^n \quad \text{Ecuación 2}$$

Supuesto el orden, se integra la Ecuación 2 obteniendo una expresión lineal que relaciona la concentración de pigmento (expresada en términos de porcentaje de retención) con el tiempo. Las constantes cinéticas se presentan en inverso del tiempo ( $\text{h}^{-1}$ ) en todos los casos.

### Análisis estadístico

El ajuste de los modelos de regresión se verifica mediante la determinación del coeficiente  $R^2$  ajustado ( $R^2_{\text{Adj}}$ ) y su significación estadística mediante la aplicación de la prueba de Fischer (F-test), fijando el nivel de significación  $p$  en valores inferiores a 0,05. El análisis de varianza se realiza aplicando el test de Duncan fijando el nivel de significación estadística  $p$  en valores inferiores a 0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

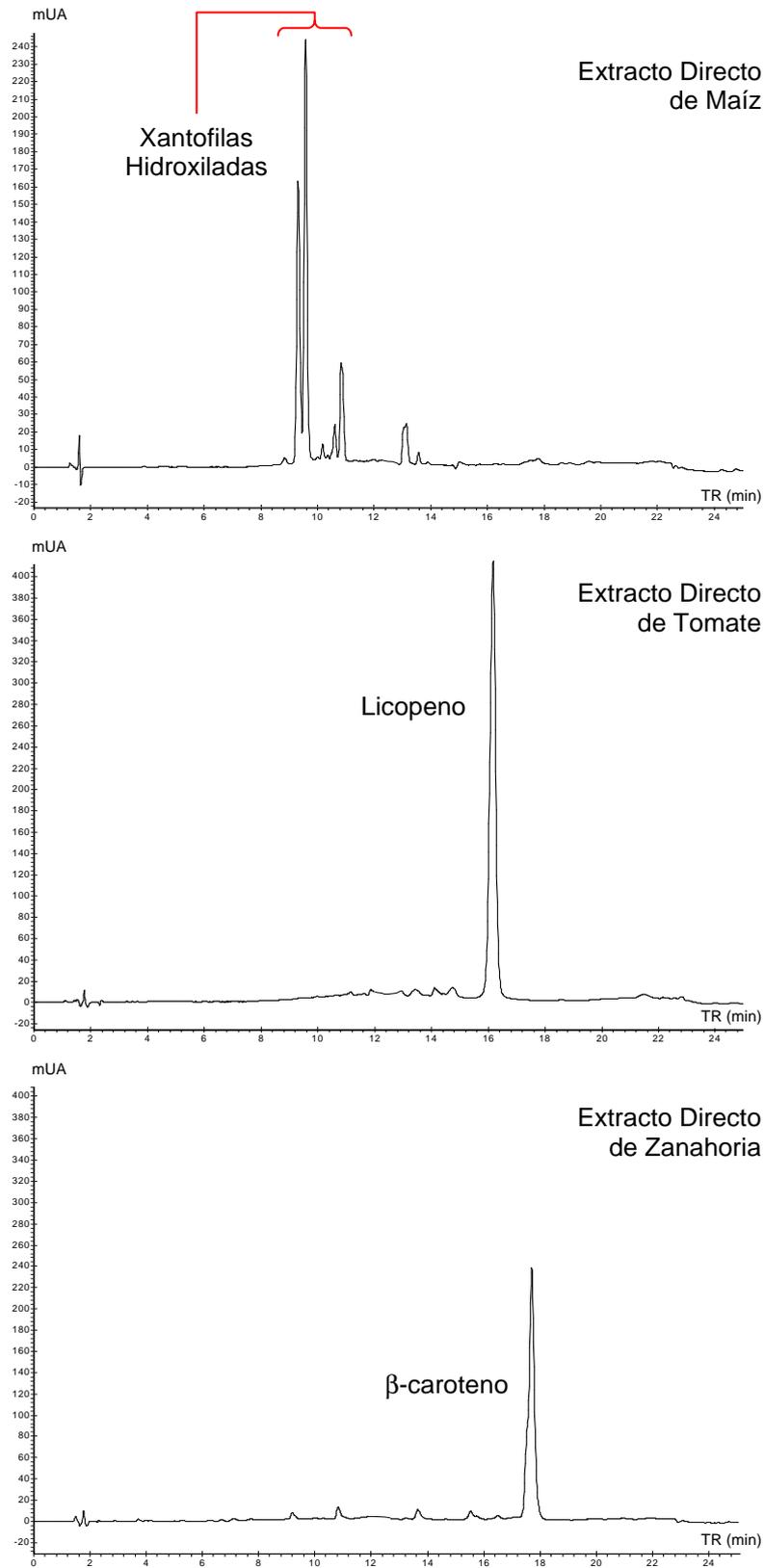
### Modelo de digestión *in vitro*

Con la ingesta se puede dar una entrada incontrolada de hidroperóxidos en el organismo pero también se incorporan compuestos antioxidantes presentes en los alimentos que minimizan el impacto oxidativo de los hidroperóxidos y sus productos de degradación, neutralizándolos durante el proceso digestivo. Estos antioxidantes alimentarios, de los que se van a destacar los compuestos carotenoides, son importantes a la hora de mantener un buen estado de salud (Gorelik y colaboradores, 2005). Por ello, una ingesta rica en frutas y verduras puede modular el impacto oxidativo de los hidroperóxidos (Kanner y Lapidot, 2001; Monnier, 2007).

En este contexto, se desarrolla un modelo de digestión *in vitro* sobre distintas matrices vegetales ricas en compuestos carotenoides para determinar la capacidad antioxidante de los digestatos obtenidos como resultado de dicho modelo experimental. Como objeto de estudio se seleccionaron alimentos ricos en  $\beta$ -caroteno, licopeno y pigmentos xantofílicos hidroxilados (luteína y zeaxanteno), ya que estos forman parte de los carotenoides mayoritarios encontrados en plasma sanguíneo humano (Epler y colaboradores, 1993). Se buscan alimentos que se encuentren fácilmente por medio de los distribuidores locales y que presenten, de manera mayoritaria, los pigmentos carotenoides seleccionados. Como fuente de  $\beta$ -caroteno y licopeno se seleccionan la zanahoria y el tomate, respectivamente, que se procesan en crudo; el maíz dulce envasado constituye la fuente de pigmentos xantofílicos hidroxilados (Heinonen y colaboradores, 1989; O'Neill y colaboradores, 2001). La última elección se hace en base a que, aunque otros alimentos de hoja verde contienen una mayor cantidad de luteína (perejil, espinaca, berro), estos presentan gran cantidad de pigmentos clorofílicos que pueden enmascarar los efectos de los pigmentos carotenoides.

El estudio comienza estableciendo el perfil carotenoides de cada una de las materias primas empleadas. Para ello se obtienen sus extractos directos (ED) de pigmentos a partir de 10 g de materia prima siguiendo la metodología anteriormente descrita.

Con el análisis cromatográfico de los extractos directos se confirma que las materias primas seleccionadas contienen los pigmentos carotenoides esperados en concentración suficiente para su seguimiento empleando las metodologías previstas. En la Figura 18 se observan los cromatogramas obtenidos al inyectar ZED, TED y MED (Extracto Directo de zanahoria, Tomate y Maíz dulce cocido, respectivamente) en el HPLC con el método de cuantificación de carotenoides.



**Figura 18.-** Estudio cromatográfico de pigmentos presentes en extracto directo de maíz dulce cocido, tomate y zanahoria. Se encuentran mayoritariamente xantofilas hidroxiladas, licopeno y  $\beta$ -caroteno en maíz, tomate y zanahoria, respectivamente.

Partiendo del modelo de Crew y colaboradores (1985), se desarrolla el proceso de digestión *in vitro* completo sobre las matrices vegetales seleccionadas. Esto conlleva la realización de una digestión gástrica seguida de otra digestión intestinal, la primera (en presencia de pepsina y ácido clorhídrico) a pH inferior a 3,5 y la segunda a pH en torno a 7,4 (en presencia de sales biliares y pancreatina).

El resultado del proceso de digestión lleva a la obtención de digestatos a partir de las matrices vegetales. También se realiza la digestión sobre una muestra en blanco de la que se obtiene el Digestato Blanco (DB). Para la obtención de DB se parte únicamente de 50 mL de *disolución salina*, eliminando los 50 g de matriz vegetal utilizados para los ensayos. DB se usa como muestra control para tener en cuenta que la oxidación de los lípidos alimentarios depende de las condiciones de acidez desarrolladas durante la digestión (Goupy y colaboradores, 2007). De esta manera también se están teniendo en cuenta las condiciones fisiológicas, que pueden modular la relación entre lípidos oxidados y antioxidantes.

Una vez obtenidos los distintos digestatos, se procede a la extracción de los pigmentos que en ellos se encuentran para estimar la concentración de los mismos en el digestato. Este proceso, descrito en el apartado de materiales y métodos, ofrece como resultado las muestras de Extracto Directo de Digestato de Zanahoria (DZED) y Extracto Directo de Digestato de Tomate (DTED). Para obtener el Extracto Directo de Digestato de Maíz (DMED), el proceso de extracción sufre modificaciones debido a que los pigmentos xantofílicos son más polares que los carotenoides. En estas condiciones la extracción se inicia añadiendo la muestra de digestato a un embudo de decantación que contiene 60 mL de éter y 60 mL de NN-dimetilformamida, y se añaden 50 g de NaCl (además de los 200 mL de disolución al 10%) para evitar que los pigmentos se desechen con la fase acuosa y queden retenidos en la fase orgánica. Descartada la fase acuosa se añaden otros 60 mL de éter y se vuelve a lavar con 200 mL de disolución NaCl al 10%, para retirar la fase acuosa. El resto del procedimiento transcurre como para los digestatos de las otras matrices vegetales. Con DZED, DTED y DMED se llevan a sequedad y se redisuelve en 1 mL de acetona para proceder a la determinación espectrofotométrica de la concentración de pigmentos. En cada uno de los casos se utiliza la expresión para el cálculo de la concentración que aparece reflejada en la Tabla 1. La concentración de pigmentos en los distintos digestatos se expone en la Tabla 6.

La determinación de la capacidad antioxidante de cada digestato se realiza empleando el método del AAPH. El procedimiento se pone a punto con una concentración de quercetina 1  $\mu\text{M}$  en el volumen de reacción. Esta concentración se establece en base a los ensayos previos de Vulcain y colaboradores (2005). El procedimiento, consistente en la incubación a 37 °C con agitación de la *disolución sustrato* en presencia de la *disolución AAPH* y del antioxidante, transcurre durante 20 minutos en los que se determina espectrofotométricamente la absorbancia para establecer la cantidad de hidroperóxidos presentes en el volumen de reacción. Los resultados de la puesta a punto del método se muestran en la Tabla 7. La *disolución sustrato* y la *disolución AAPH* se preparan diariamente para evitar la degradación de sus componentes. Los datos empiezan a tomarse a partir del minuto 5 debido a que la adición en el minuto 3,5 del último constituyente de la reacción provoca turbidez y se precisa de un tiempo de espera para la estabilización.

Los resultados del blanco L muestran que el ensayo tiene lugar con un pool inicial de hidroperóxidos lipídicos que se pueden haber generado por la manipulación de los reactivos. Observando los datos de absorbancia, la cantidad de hidroperóxidos lipídicos en el blanco de reacción L disminuye a lo largo del tiempo, pudiéndose deber esto al paso de dichos compuestos a otras formas oxidadas. Analizando los datos de absorbancia recogidos para el blanco A, se puede confirmar el carácter pro-oxidante del AAPH al aumentar significativamente la cantidad de hidroperóxidos en el tiempo tras la adición en el volumen de reacción de la *disolución AAPH*. Para terminar con la puesta a punto del método, los resultados también confirman el carácter antioxidante de la quercetina, como ya lo hicieran Rice-Evans y colaboradores (1997b), Vulcain y colaboradores (2005), o Boots y colaboradores (2008). Además, Pinelo y colaboradores (2004) observaron que la capacidad antioxidante de este miembro de la familia de los flavonoides puede variar en función de la temperatura, del solvente del medio en que se encuentre, del pH, de la presencia de oxígeno y de la intervención de agentes oxidantes o determinadas enzimas.

**Tabla 6. Concentración de  $\beta$ -caroteno, licopeno y pigmentos xantofílicos en los digestatos de zanahoria, tomate y maíz dulce cocido, respectivamente.**

DIGESTATOS	CONCENTRACIÓN <sup>1</sup>
Zanahoria	11,54
Tomate	3,67
Maíz Dulce Cocido	4,21

Valores medios (n=3).

<sup>1</sup>La concentración se expresa en  $\mu\text{M}$ . La transformación de g/mL a  $\mu\text{M}$  se realiza teniendo en cuenta los pesos moleculares de los pigmentos mayoritarios ( $\beta$ -caroteno y licopeno, 536,9 g/mol; pigmentos xantofílicos, luteína y zeaxanteno, 568,9 g/mol).

**Tabla 7. Capacidad antioxidante de quercetina. Datos de absorbancia a 234 nm obtenidos de los ensayos, realizados con quercetina y dos blancos de reacción, de capacidad antioxidante con AAPH<sup>1</sup>.**

Tiempo (min)	Absorbancia (234 nm)		
	L <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	Q <sup>4</sup>
5	0,773	1,308	1,296
6	0,745	1,368	1,316
7	0,721	1,421	1,322
8	0,780	1,485	1,352
9	0,741	1,555	1,393
10	0,649	1,579	1,419
11	0,617	1,696	1,445
12	0,615	1,670	1,478
13	0,581	1,717	1,479
14	0,597	1,762	1,496
15	0,667	1,812	1,572
16	0,647	1,851	1,551
17	0,582	1,906	1,567
18	0,587	1,946	1,589
19	0,582	1,986	1,641
20	0,589	2,051	1,596

Valores medios (n=3).

<sup>1</sup> 2,2'-azobis-(2-aminopropano) dihidroclorhídrico.

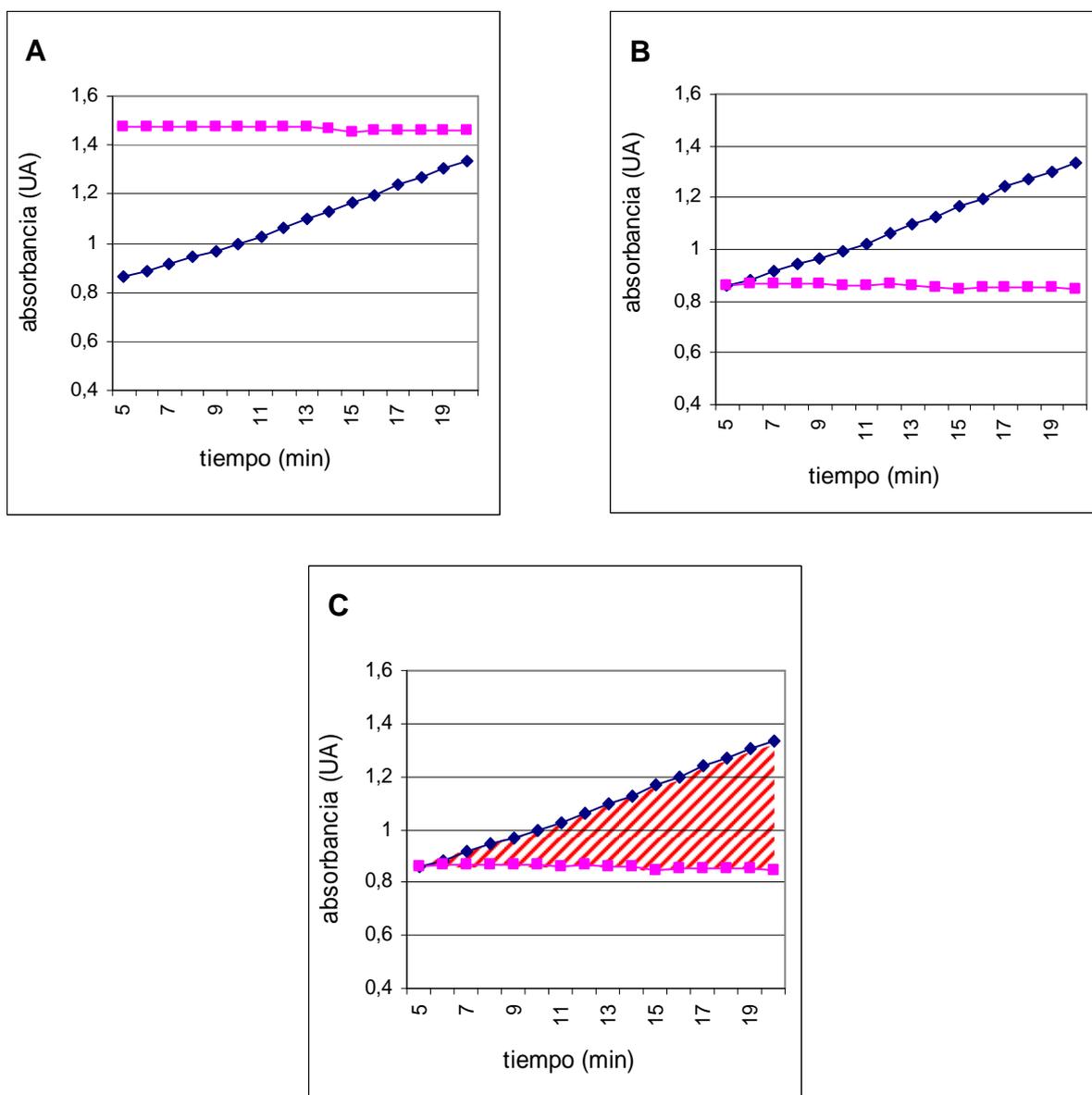
<sup>2</sup> **Blanco L:** 2 mL disolución sustrato + 25 µL tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 25 µL tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

<sup>3</sup> **Blanco A:** 2 mL disolución sustrato + 25 µL disolución AAPH + 25 µL tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

<sup>4</sup> **Muestra Q:** 2 mL disolución sustrato + 25 µL disolución AAPH + 25 µL disolución quercetina.

Con la puesta a punto del método, se ensayan el resto de situaciones expuestas en la Tabla 2. Para los ensayos con pigmentos patrón ( $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína, este último para representar el conjunto de pigmentos xantofílicos presentes en la matriz vegetal elegida) se usan disoluciones diluidas de los stocks obtenidos a partir de extractos oleosos concentrados ricos en estos pigmentos. Las disoluciones tienen una concentración tal que la concentración del pigmento en el volumen de reacción es de  $0,1 \mu\text{M}$ . Para los ensayos con digestatos, se usan cantidades crecientes de digestato ( $15, 25, 35, 45, \dots \mu\text{L}$ ) de manera que la concentración de pigmento proveniente de los digestatos en el volumen de reacción ronde  $0,1 \mu\text{M}$ .

Para poder comparar los resultados de los distintos ensayos obtenidos, se procesan matemáticamente los datos de absorbancia obtenidos de la siguiente forma. En primer lugar, solo se consideran los datos de absorbancia obtenidos a partir del minuto 5 de reacción. En segundo lugar, a los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos A, P, Q, DB y D se les substraen los obtenidos en los ensayos L (guardando la correspondencia, ya que cada bloque de ensayos tiene sus propios blancos; por ejemplo, a  $A_a$  y Q se les resta  $L_a$ , mientras que a  $A_b$  y P se les resta  $L_b$ ). De esta manera se está eliminando la influencia del pool inicial de hidroperóxidos. Posteriormente se enfrentan dos a dos los grupos de resultados como se expuso en el apartado Materiales y Métodos, y se procede al cálculo de las áreas obtenidas de representar las parejas de datos. Para ello, las parejas de datos se hacen coincidir en el instante 5 min. Este proceso se ejemplifica en la Figura 19. Como se observa en **A**, el ajuste de las rectas se hace necesario para que se genere un polígono del que posteriormente se calcula el área (**C**). Los valores de absorbancia en los ensayos con digestato como antioxidante son mayores debido a que con la adición del digestato se desarrolla cierta turbidez en la muestra. De ahí la necesidad del ajuste. En **B**, tras el ajuste de las rectas, se aprecia el poder antioxidante del digestato de maíz (línea de cuadrados de color rosa; (D-L)) frente a la situación en la que se carece de antioxidante (línea de rombos de color azul; (A-L)).



**Figura 19.-** Procesamiento de los datos de absorbancia obtenidos en los ensayos de determinación de capacidad antioxidante con el método del AAPH. Datos correspondientes a uno de los replicados usando 15  $\mu$ L de digestato de maíz dulce cocido. La línea de rombos de color azul se corresponde con los datos (A-L), mientras que los cuadrados de color rosa son los valores (D-L). En **A**, las parejas de datos no coinciden en el origen. Obteniendo la diferencia entre los datos de (D-L) y (A-L) en el minuto 5, y restando este valor a todos los datos del grupo (D-L), se llega a la figura **B**. El polígono rallado en rojo en **C** es del que se calcula el área para comparar la capacidad antioxidante de los distintos ensayos.

Para calcular el área del polígono encerrado entre las dos rectas (**C**) se calcula el área del polígono contenido entre la línea de rombos de azul y el eje de abscisas, y el área del polígono contenido entre la línea de cuadrados de color rosa y el mismo eje. La diferencia entre los dos valores de área obtenidos es el área del polígono entre las dos líneas. Las áreas bajo las líneas de puntos se calculan utilizando el sistema descrito por Matthews y colaboradores (1990). En base a esto, el área bajo una recta se calcula sumando las áreas bajo la gráfica entre cada pareja de puntos consecutivos. Si se tienen las medidas  $y_1$  e  $y_2$  en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ , entonces el área bajo la recta entre esos dos puntos es el producto de la diferencia entre los tiempos y la media de las dos medidas. Esto se conoce como la regla del trapecio porque es la forma de cada segmento del área encerrada bajo la recta.

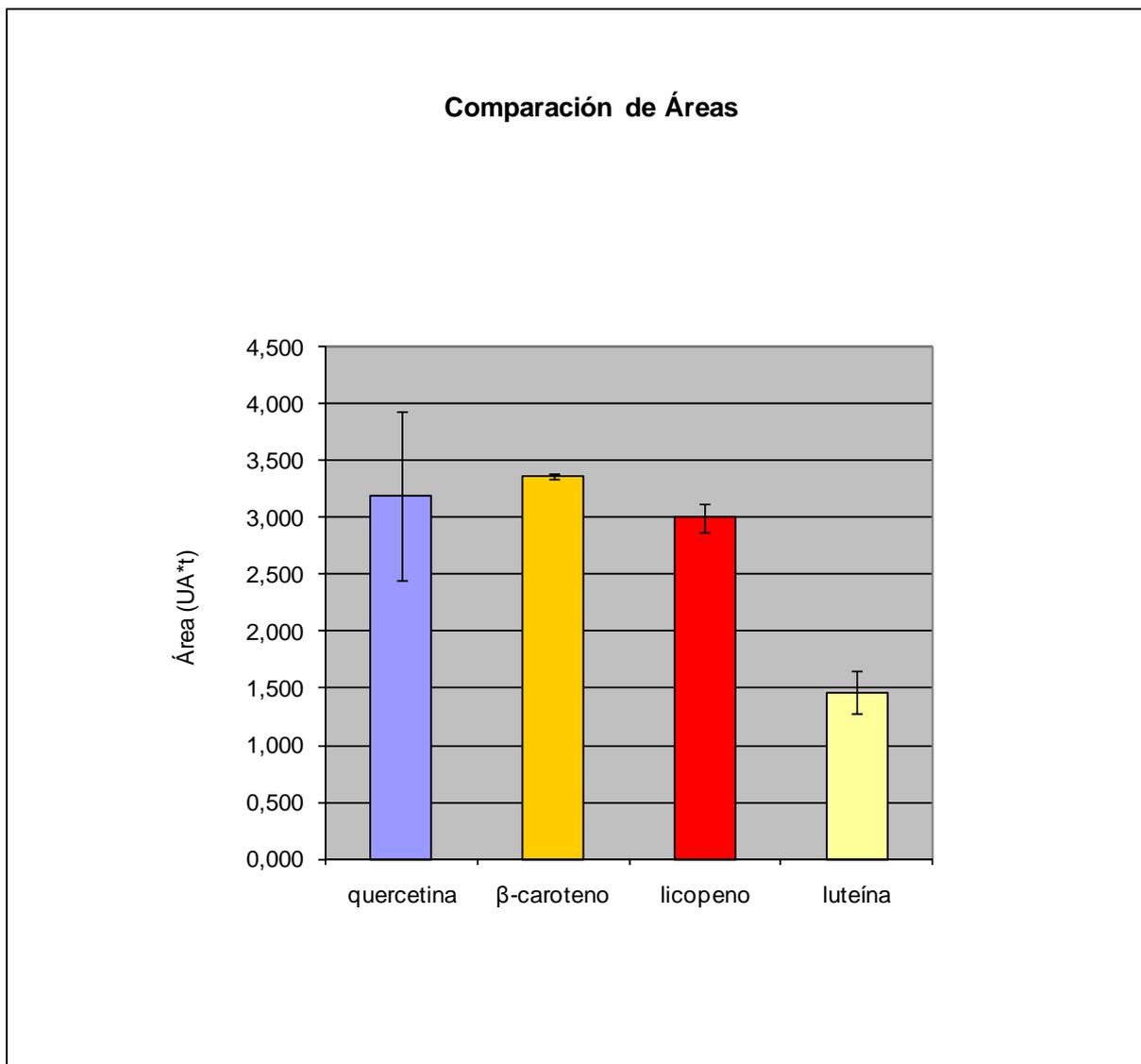
$$(t_2 - t_1) (y_1 + y_2) / 2$$

Si se tienen  $n + 1$  medidas  $y_i$  en los tiempos  $t_i$  ( $i = 0, \dots, n$ ), entonces el área encerrada bajo la recta (ABR) se calcula como:

$$ABR = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{i=n-1} (t_{i+1} - t_i) (y_i + y_{i+1})$$

El área obtenida se expresa en tiempo por unidades de absorbancia (UA\*t).

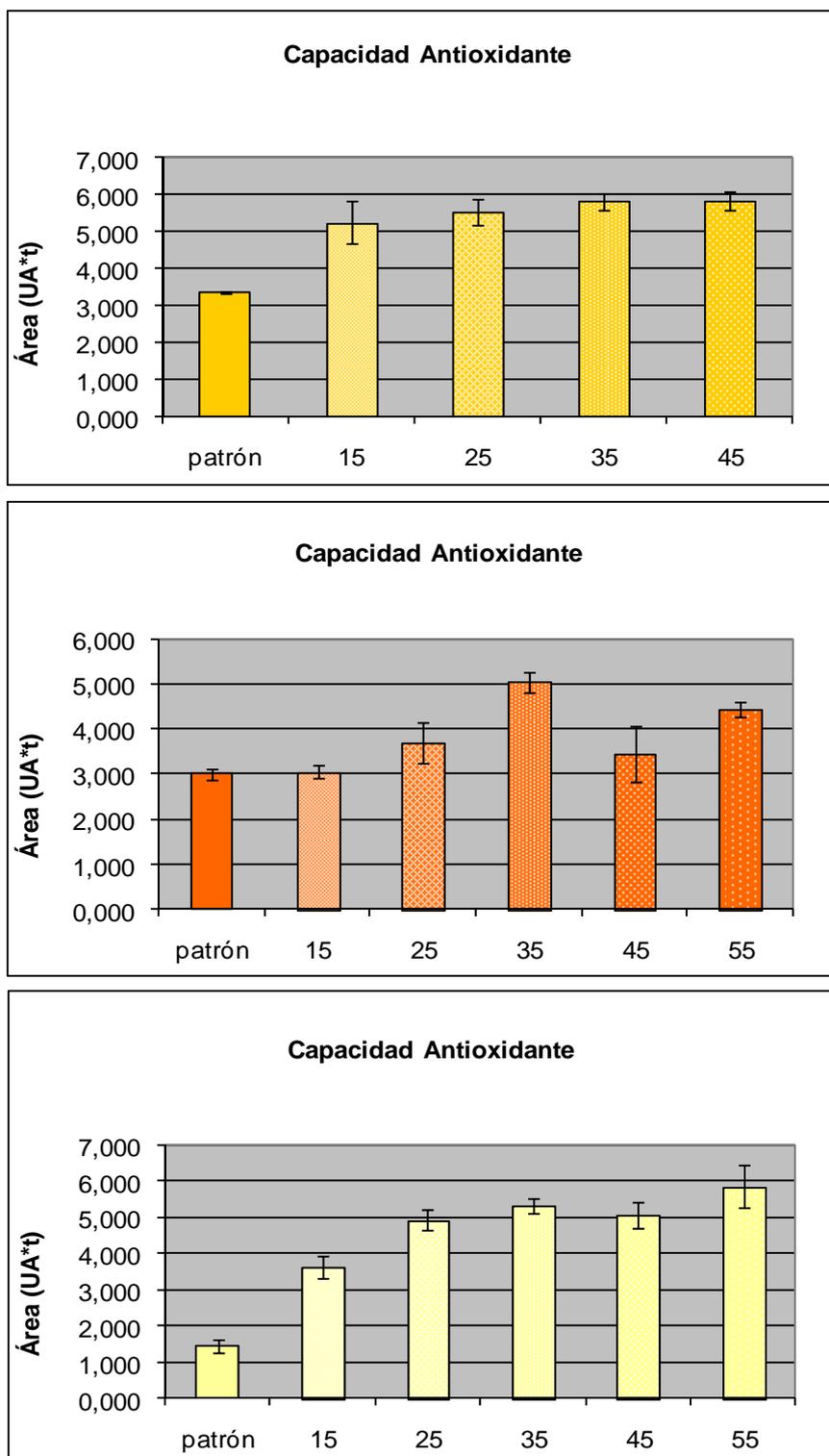
Realizados todos los ensayos, con los que se obtiene una extensa batería de valores de absorbancia asociados con la concentración de hidroperóxidos en el medio de reacción, procesados matemáticamente y calculadas las áreas pseudo-trianguulares encerradas entre las líneas de los ensayos sin y con antioxidante, se inician las comparaciones para extraer conclusiones. En primer lugar, se comparan los resultados obtenidos con quercetina con los obtenidos para los pigmentos patrón (Figura 20).



**Figura 20.-** Gráfico de barras para comparar las áreas que expresan la capacidad antioxidante de quercetina,  $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína. La concentración de quercetina en el volumen de reacción es 1  $\mu$ M, mientras que para los pigmentos carotenoides es de 0,1  $\mu$ M. Valores medios (n=3).

Como se observa en el gráfico de barras, para estar presentes en una concentración 10 veces inferior a la usada con quercetina, los pigmentos carotenoides utilizados en los ensayos desarrollan una capacidad antioxidante que en ningún caso es 10 veces inferior a la desarrollada por dicho compuesto fenólico. De hecho, en el caso de  $\beta$ -caroteno, la capacidad antioxidante excede a la desarrollada por la quercetina, resultados que están en contraposición con los trabajos de Vulcain y colaboradores (2005). En su trabajo los autores concluyen con que  $\beta$ -caroteno proporciona una inhibición pobre frente a la peroxidación, aún usándolo en concentraciones de hasta 5  $\mu$ M, y argumentan que esto puede estar relacionado tanto con la baja reactividad del pigmento con los radicales lipídicos como con la degradación competitiva que sufre el carotenoide por auto-oxidación y/o foto-oxidación. La diferencia entre los resultados expuestos por los autores y los mostrados en el presente trabajo de tesis pueden deberse al tipo de presentación del pigmento en el medio de reacción. En el trabajo que sirve de referencia para los ensayos realizados en esta tesis,  $\beta$ -caroteno se emulsiona en Tween 20 junto con el ácido linoleico que actúa de sustrato de reacción y, posteriormente, se inicia la peroxidación añadiendo el inductor AAPH. Sin embargo, el procedimiento usado en esta tesis difiere del original en que primero se inicia la peroxidación sobre el sustrato de ácido linoleico y luego se añade  $\beta$ -caroteno (antioxidante) disuelto en THF. El hecho de que Vulcain y colaboradores (2005) estén emulsionando el pigmento con Tween 20 puede ser el motivo por el cual los autores argumentan una baja reactividad del pigmento con los radicales, ya que el pigmento se encontraría en un entorno hidrofóbico propicio evitando su interacción con los hidroperóxidos.

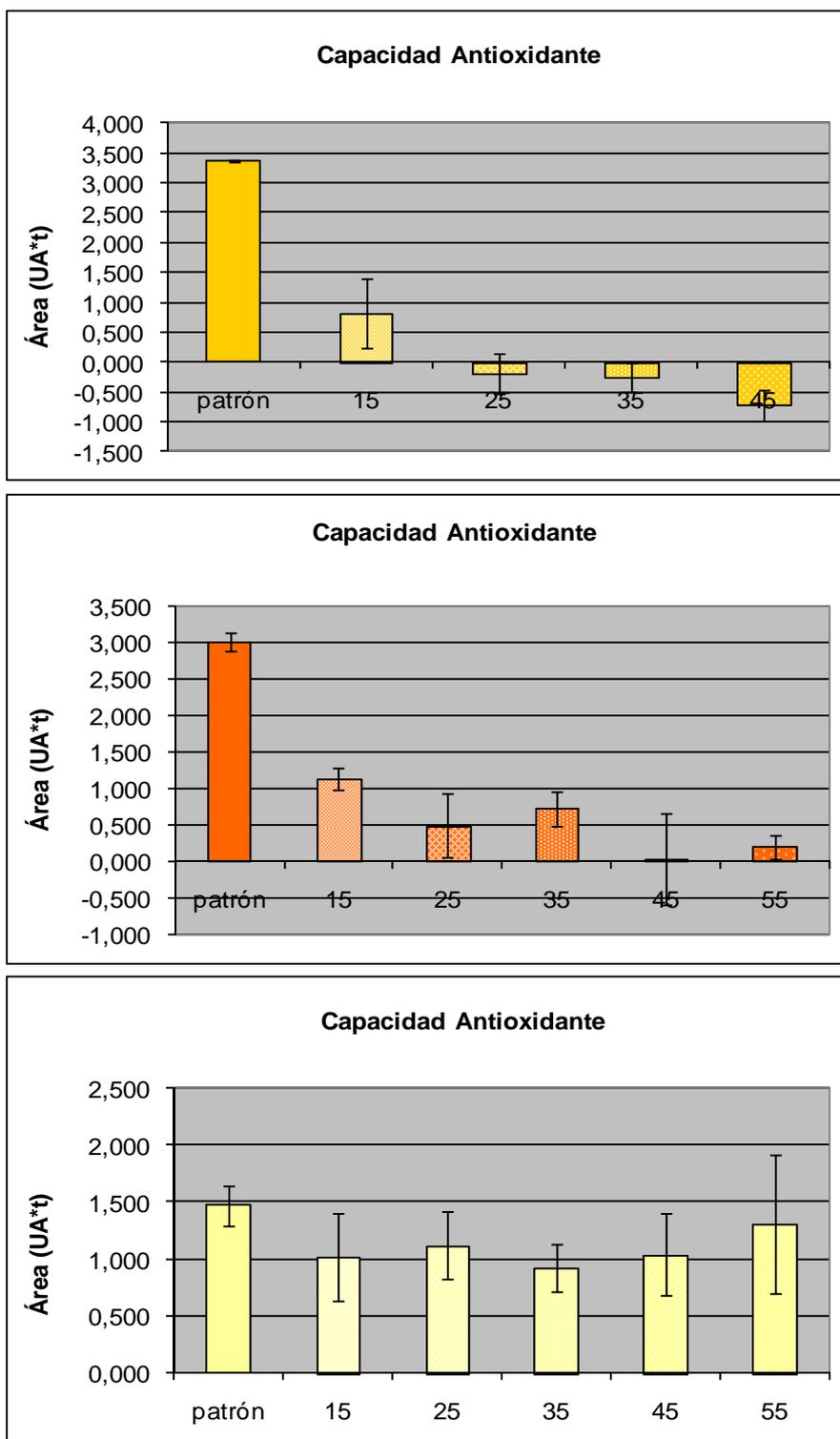
Con respecto a los ensayos donde se han utilizado los digestatos como antioxidante, los resultados se pueden abordar desde dos puntos de vista diferentes. Bajo el punto de vista químico, en el que se determina la capacidad antioxidante del digestato teniendo en cuenta todos sus componentes, se aprecia que la capacidad antioxidante excede en todos los casos a la desarrollada utilizando como antioxidante los pigmentos patrón ( $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína para comparar con digestato de zanahoria, tomate y maíz, respectivamente) y así se observa en la Figura 21.



**Figura 21.-** Comparativa de la capacidad antioxidante mostrada en disoluciones de pigmentos patrón y digestatos de matriz vegetal. Situación química. Los pigmentos patrón utilizados son  $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína, para comparar con los digestatos de zanahoria, tomate y maíz dulce cocido cuyas gráficas se muestran de arriba a abajo, respectivamente. Los pigmentos patrón se encuentran en concentración  $0,1 \mu\text{M}$  en el volumen de reacción. 15, 25, 35, ... hacen referencia a la cantidad de digestato utilizado para determinar la capacidad antioxidante.

Eso puede ser consecuencia del proceso de digestión al que se han sometido las matrices vegetales. Cuando se presenta el pigmento patrón en THF, éste queda en suspensión dentro de un entorno liposoluble y es más propenso a la auto-oxidación y/o foto-oxidación que si se encuentra dentro de micelas como las que se forman durante el proceso de digestión a través del tracto gastrointestinal. Por otra parte, en los gráficos de barras se observa cómo se produce un aumento en la capacidad antioxidante desarrollada al pasar de la menor a la mayor cantidad de digestato añadido al volumen de reacción, aunque esto suponga un cambio mínimo en la concentración de pigmento presente (los valores, en todos los casos, rondan  $0,1 \mu\text{M}$ ). De esto se deduce que la presencia de alimentos ricos en pigmentos carotenoides promueve la inhibición de los hidroperóxidos ya que, tras el proceso digestivo, se aprecia una notable capacidad antioxidante incluso comparando los resultados con los obtenidos con antioxidantes modelo como la quercetina (Figura 20).

Pero, ¿se debe esta capacidad antioxidante única y exclusivamente a la presencia de los pigmentos carotenoides? Con el análisis de los datos desde el punto de vista químico no se tiene en cuenta la presencia de otros componentes que forman parte del digestato junto con los carotenoides. Para tener en cuenta el efecto antioxidante de los pigmentos dentro del digestato, independientemente del resto de componentes, se estudian los datos desde el punto de vista fisiológico, haciendo que entre a tenerse en cuenta el Blanco del digestato tal y como se describió en el apartado de Materiales y Métodos. Y cuando esto se lleva a cabo, la realidad es bien distinta de lo observado en la figura anterior. Ahora los datos de las áreas, que expresan la capacidad antioxidante, alcanzan valores incluso negativos (Figura 22). Esto pone de manifiesto que la capacidad antioxidante no solo depende de la presencia de los pigmentos, sino que existen otros componentes del digestato que modulan la concentración de hidroperóxidos y que podrían proceder de la matriz vegetal que contiene a los pigmentos. Por tanto, es importante destacar que existen componentes fisiológicos en el digestato que hacen que el pigmento esté presente en el volumen de reacción de distinta manera que cuando se usan disoluciones con disolventes orgánicos.



**Figura 22.-** Comparativa de la capacidad antioxidante mostrada en disoluciones de pigmentos patrón y digestatos de matriz vegetal. Situación fisiológica. Los pigmentos patrón utilizados son  $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína, para comparar con los digestatos de zanahoria, tomate y maíz dulce cocido cuyas gráficas se muestran de arriba a abajo, respectivamente. Los pigmentos patrón se encuentran en concentración  $0,1 \mu\text{M}$  en el volumen de reacción. 15, 25, 35, ... hacen referencia a la cantidad de digestato utilizado para determinar la capacidad antioxidante.

La bibliografía recoge casos en los que la matriz alimentaria afecta a la biodisponibilidad, no solo de los carotenoides, sino también de otros compuestos presentes en los alimentos. Los estudios de Shen y colaboradores (2011) acerca de la biodisponibilidad de AGPIs contenidos en micro-encapsulados de aceite de pescado, cuya lipólisis depende de la elección de la matriz alimentaria que los contenga, y los de Kabak y Ozbey (2012), con el estudio de la bioaccesibilidad de aflatoxinas inoculadas en distintos alimentos, lo ponen de manifiesto.

Las matrices vegetales pueden afectar a varios parámetros de la fisiología intestinal como por ejemplo el pH, las fermentaciones, la excreción biliar, el tiempo de tránsito, los fluidos biológicos e incluso a la microbiota intestinal. Además, transportadores y enzimas implicados en la absorción pueden ser inducidos o inhibidos por la presencia de algunos micronutrientes o xenobióticos presentes en la matriz vegetal (Mukinda y colaboradores, 2010).

Dentro de la matriz se pueden dar interacciones entre los distintos componentes de los alimentos. Esto se puede observar en el hecho de que la bioaccesibilidad de carotenoides desde zanahoria esté promovida por la presencia de lípidos (como los presentes en el aceite de oliva cuando se usa para cocinar según Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2007), o en las interacciones que se observan entre los polifenoles y las proteínas, que son similares a las observadas entre antígeno y anticuerpo (Serra y colaboradores, 2010).

La digestibilidad de otros compuestos como el almidón depende, además de la presencia de otros constituyentes de la matriz como proteínas, lípidos y polisacáridos, de la propia morfología de los gránulos de almidón, de la relación amilosa/amilopectina y de la estructura molecular (Singh y colaboradores, 2010). Schweiggert y colaboradores (2012) también analizaron la relación de la morfología de los compuestos con su bioaccesibilidad desde los alimentos. En concreto, observaron que la forma física en que los carotenoides se encontraban en los cromoplastos (orgánulo que contiene a los carotenoides y que constituye otra de las barreras para su liberación desde las matrices vegetales según Jeffery y colaboradores, 2012) estaba altamente relacionada con la eficiencia de liberación desde las matrices alimentarias.

Otros factores, como el procesamiento de los alimentos, interfieren en la biodisponibilidad. Estudios de bioaccesibilidad en bebidas hechas con leche y zumo de frutas pone de manifiesto el hecho de que los tratamientos de alta presión combinados con la adición de lácteos modulan

positivamente la bioaccesibilidad de ciertos componentes bioactivos de los alimentos, de naturaleza principalmente lipofílica, como son el tocoferol, los carotenoides y el ácido ascórbico (Cilla y colaboradores, 2011; Cilla y colaboradores, 2012). Los productos lácteos constituyen una buena matriz para crear alimentos funcionales, pero no todos los lácteos tienen las mismas propiedades como matriz. Por ejemplo con yogur (más concretamente yogur bebido) se preparan alimentos enriquecidos con aceite de pescado (ricos en AGPIs) más estables que si se preparan con leche, quizás debido a la emulsión (Schram y colaboradores, 2007).

La importancia del estudio de la biodisponibilidad de carotenoides como  $\beta$ -caroteno, licopeno y luteína radica en que son antioxidantes naturales, y la capacidad antioxidante que presentan puede verse afectada por la bioaccesibilidad de dichos pigmentos desde la matriz vegetal que los contiene. Castenmiller y colaboradores (1999) examinaron el efecto de varios productos consistentes en espinaca procesada sobre la concentración de carotenoides encontrada en plasma y llegaron a la conclusión de que la biodisponibilidad de luteína desde espinaca era mayor que para  $\beta$ -caroteno, y que la disrupción enzimática de la matriz (de la estructura de la pared celular) incrementaba la biodisponibilidad de  $\beta$ -caroteno desde hojas crudas y picadas de espinaca aunque no tenía efecto sobre la biodisponibilidad de luteína.

El efecto barrera de las paredes celulares también se pone de manifiesto en otros estudios. La biodisponibilidad de licopeno es mayor en productos obtenidos a partir del tomate procesado que a partir de tomate fresco ya que la estructura de los alimentos puede afectar a la liberación del licopeno desde la matriz que constituye el tejido del tomate. En los alimentos procesados incrementa la biodisponibilidad porque se produce la rotura de las paredes celulares, lo que hace que el pigmento sea más accesible, y se anulan las interacciones que mantiene con la matriz. Por el contrario, la presencia de fibras como la pectina afecta negativamente a la absorción de los carotenoides en general ya que promueven condiciones de alta viscosidad (Shi y Le Maguer, 2000). Tydeman y colaboradores (2010) coinciden con estas observaciones en sus estudios de liberación de caroteno desde zanahoria, donde verifican que la ruptura celular es un requerimiento absoluto para la liberación del mencionado pigmento desde la matriz vegetal. Las paredes celulares intactas son

inaccesibles durante la digestión intestinal, por lo que la masticación o el procesamiento de los alimentos son necesarios.

La influencia del pigmento en la capacidad antioxidante también depende de las características intrínsecas del propio pigmento y de cómo se ve afectado por el proceso de digestión. Según Tyssandier y colaboradores (2003), el estómago inicia la transferencia de los carotenoides desde las matrices vegetales que los contienen hasta la fase grasa del alimento. Según los autores, licopeno es menos eficientemente transferido a micelas que, por ejemplo, luteína. La luteína es uno de los pigmentos mayoritarios encontrados en el digestato de maíz dulce cocido. Como se observa en la figura 22, el efecto de los pigmentos en la capacidad antioxidante es mayor en el digestato de maíz que en los obtenidos a partir de zanahoria o tomate. Esto puede estar relacionado con las características internas de las xantofilas hidroxiladas (entre ellas luteína) existentes y con cómo se comportan a lo largo del proceso de digestión. Resultados similares a los observados en las gráficas de la figura 22 se aprecian en la Tabla 8, donde se exponen los porcentajes de reducción de la concentración de pigmento en los distintos ensayos realizados. Los datos obtenidos son el resultado de la extracción de pigmentos a partir de los volúmenes de reacción procedentes de aplicar el método del AAPH, transcurridos los 20 min, y su posterior estudio cromatográfico (procedimiento descrito en el apartado Materiales y Métodos). Se puede observar como, mientras con los pigmentos patrón el porcentaje de degradación es bastante similar, con los digestatos el mayor porcentaje de reducción se da para el maíz, lo cual indica que la degradación de pigmentos en este digestato ha sido mayor y, por tanto, los pigmentos tienen más peso en la determinación de la capacidad antioxidante.

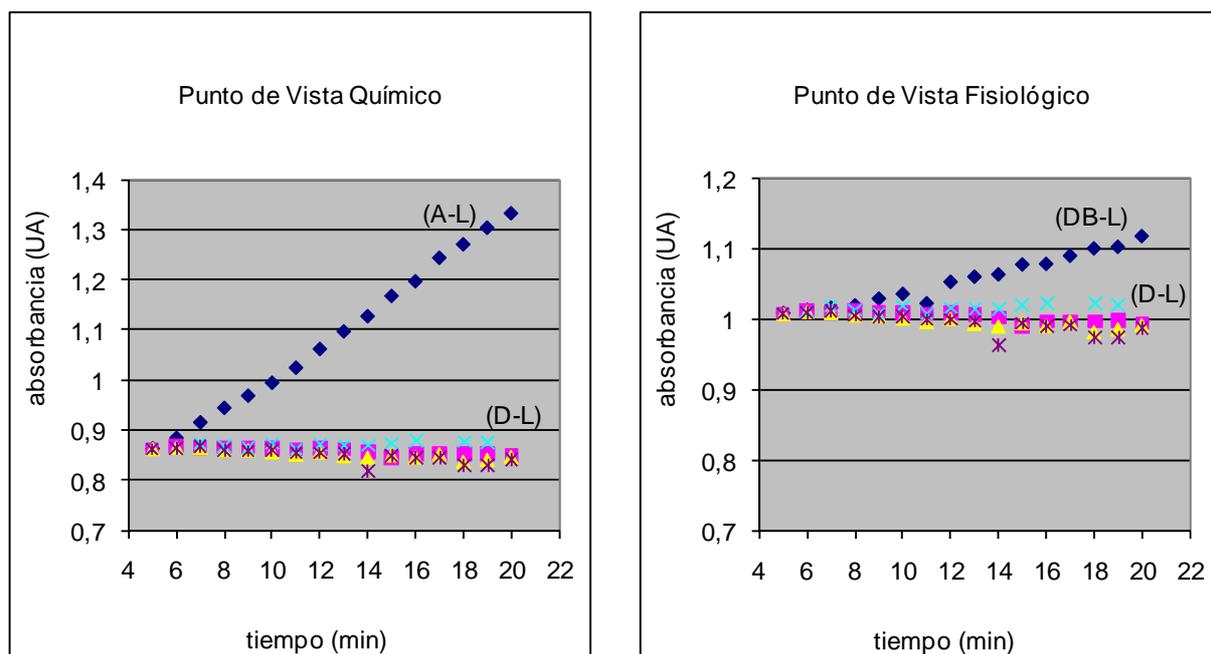
En la Figura 23 se muestran dos gráficas en las que se observan más diferencias en la capacidad antioxidante analizada desde el punto de vista químico y el fisiológico. Los datos hacen referencia al estudio de la capacidad antioxidante de 15  $\mu$ L de digestato de maíz dulce cocido.

Considerar los aspectos fisiológicos que intervienen en la capacidad antioxidante entra en contraposición con los ensayos de autores como Pinelo y colaboradores (2004), Lapidot y colaboradores (2005) y Vulcain y colaboradores (2005), que consisten en mezclar reactivos químicos sin tener en cuenta la procedencia natural o la matriz original que contiene a los antioxidantes utilizados, o el proceso fisiológico de digestión al que son sometidos antes de poder exponer su poder antioxidante.

**Tabla 8. Porcentajes de reducción en la concentración de pigmentos tras los ensayos de determinación de capacidad antioxidante.**

Antioxidante	Porcentaje de Reducción <sup>1</sup> (%)
Digestato de Zanahoria	15,684
Patrón $\beta$ -caroteno	97,070
Digestato de Tomate	28,171
Patrón Licopeno	93,100
Digestato de Maíz Dulce Cocido	89,608
Patrón Luteína	96,000

<sup>1</sup>Por estar todos los digestatos en concentraciones cercanas a 0,1  $\mu$ M, el porcentaje de reducción se expresa como la media de todos los ensayos realizados para cada digestato.



**Figura 23.-** Diferencias en el estudio de la capacidad antioxidante desde el punto de vista químico y fisiológico. Los datos de absorbancia se toman a 234 nm, longitud de onda para la detección de hidroperóxidos. (A-L), reacción correspondiente a sustrato linoleico en presencia de inductor de peroxidación (AAPH); (DB-L), reacción correspondiente a sustrato linoleico en presencia de AAPH y digestato blanco (sin matriz vegetal); (D-L), la misma reacción incluyendo un digestato como antioxidante. En todos los casos se resta el efecto del blanco L.

### Conclusión

La capacidad antioxidante no solo depende de la presencia de los pigmentos, sino que existen otros componentes del digestato que modulan la concentración de hidroperóxidos. A la visión química de los estudios de capacidad antioxidante realizados debe sumarse el aspecto fisiológico, dando importancia a la matriz que contiene a los supuestos compuestos antioxidantes, a los procesos fisiológicos que estos atraviesan antes de poder ser absorbidos por el organismo, y a otra serie de factores modulantes.

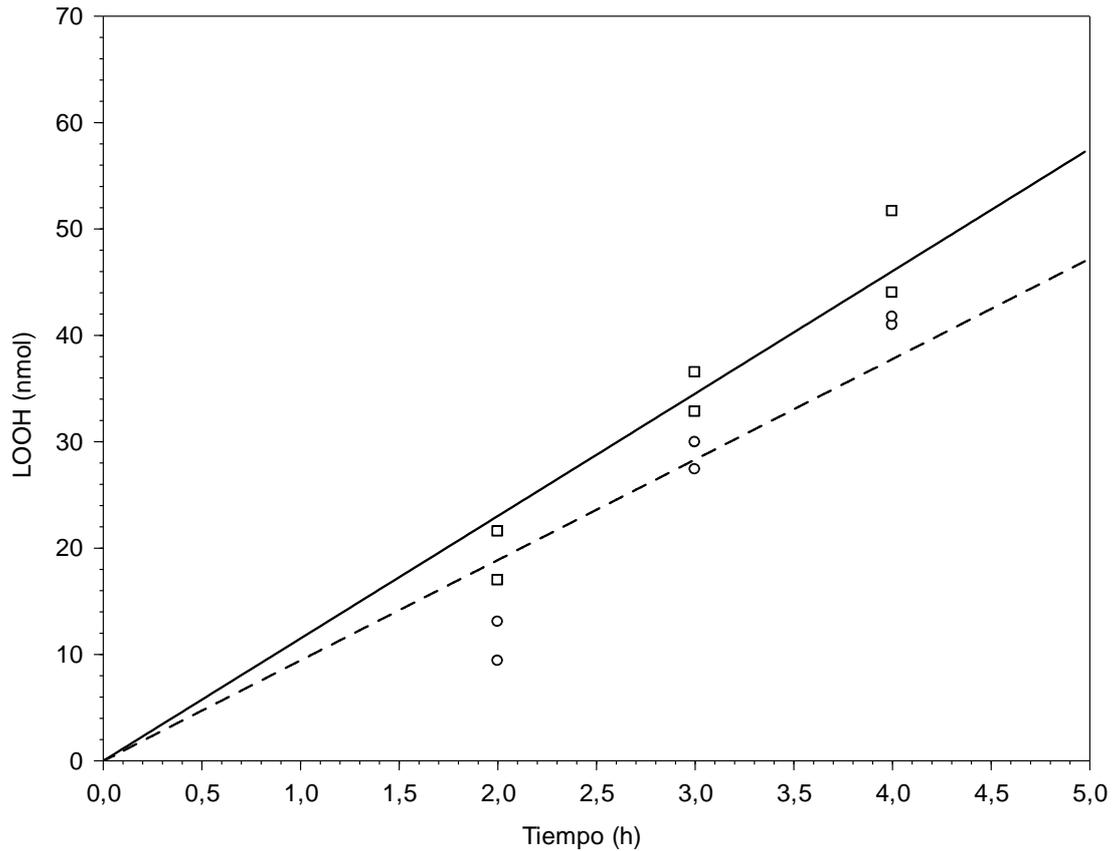
### **Transporte de hidroperóxidos lipídicos a través de epitelio intestinal**

El consumo de grasas insaturadas implica la entrada en nuestro organismo de hidroperóxidos lipídicos y su posible acumulación en diversos tejidos en los que pueden dar origen a ERO que provoquen un desequilibrio del estatus rédox tisular ligado al inicio y progreso de procesos degenerativos. El aparato digestivo, y más concretamente el intestino, es el tejido más expuesto a la acción directa de los hidroperóxidos así como el punto en el que se metabolizan adecuadamente para evitar la generación de ERO mediante el sistema de defensa antioxidante con el que cuenta nuestro organismo. La acumulación de hidroperóxidos en el lumen no suele alcanzar niveles tóxicos aunque ello no es necesario para observar modificaciones significativas en el epitelio intestinal y que éste experimente una alteración del balance rédox tisular. Se estima que un consumo de 85 gramos de grasa lleva aparejado la presencia de 1,4 mmol de hidroperóxidos lipídicos (Wolff y Nourooz-Zadeh, 1996) mientras que una concentración luminal de 0,2 a 10  $\mu\text{M}$  de hidroperóxidos puede desencadenar respuestas de estrés en las células del epitelio (Gotoh y colaboradores, 2002). Que los hidroperóxidos lipídicos tienen un impacto degradativo en la regeneración y los procesos celulares habituales del epitelio intestinal ha sido demostrado ampliamente en diversos estudios (Reddy, 1983; Hara y colaboradores, 1996). Sin embargo, existe una importante controversia acerca de cómo el intestino delgado gestiona los procesos que tienen lugar tras la acumulación de hidroperóxidos luminales, su asimilación, metabolismo y transporte. La controversia procede de los distintos métodos experimentales aplicados para estudiar los mencionados procesos y de la existencia del proceso de metabolismo y neutralización de hidroperóxidos lipídicos. Por ello, cuando se determina la presencia de hidroperóxidos lipídicos en el sistema linfático, ésta suele ser baja debido a la puesta en marcha del sistema de defensa antioxidante que los metaboliza adecuadamente (Mohr y colaboradores, 1999), lo que impide determinar los niveles de absorción en la mucosa y los factores que la delimitan.

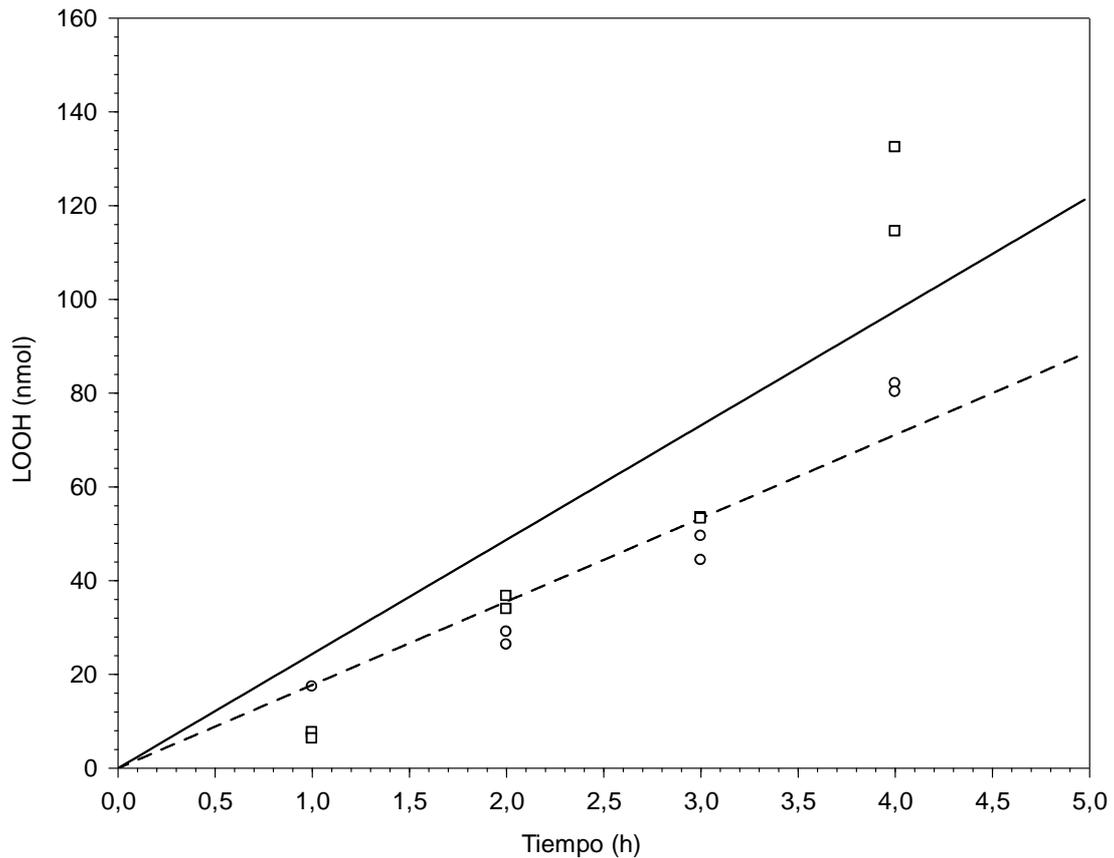
Sobre la base de un diseño experimental de Plackett-Burman y mejorando la resolución del diseño mediante una estrategia *fold-over*, se realizaron una serie de experimentos y se determinaron tres respuestas, la velocidad de difusión ( $dQ/dt$ ), la permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y el porcentaje de hidroperóxidos lipídicos que son eficientemente asimilados y transportados en la zona basolateral (%), considerando tres de los principales factores que afectan a la eficiencia de la asimilación de compuestos lipofílicos, su concentración, la temperatura del ensayo y la capacidad metabólica del tejido. Independientemente del mecanismo de asimilación que proceda para los LOOH, difusión simple o facilitada,

en ambos la concentración juega un papel relevante como parámetro indicador de la eficiencia de asimilación que se puede alcanzar. Si se trata del primer mecanismo de transporte, la difusión simple, ésta sigue la ley de Fick y por tanto en función del gradiente de concentración que se establezca entre el lumen y el epitelio intestinal se alcanzará una mayor velocidad de difusión. Si la asimilación de LOOH sigue la difusión facilitada, entonces la eficiencia del proceso estará limitada por la actividad de los transportadores que interiorizan los LOOH, actividad que se satura cuando el gradiente de concentración entre el lumen y el epitelio es elevado y es función también de la temperatura (Thurnhofer y Hauser, 1990; Compassi y colaboradores, 1997). El tercer factor considerado es la capacidad metabólica del tejido, y más concretamente los niveles de glutatión intestinal que incide significativamente en la valoración de las respuestas mencionadas (Aw y colaboradores, 1992). Se comprobó que las condiciones experimentales (temperatura, 25 o 37 °C, tiempo de ensayo, 4 horas, y burbujeo de gas carbógeno) no tienen efecto en la concentración de LOOH colocados en la zona apical, que se mantuvo en valores superiores al 95% respecto al contenido inicial.

En la Figura 24 se representa la acumulación de LOOH en la zona basolateral en función del tiempo para la concentración de 40  $\mu\text{M}$  en la celda donante a las temperaturas de 25 °C y 37 °C. La velocidad de difusión, obtenida a partir del ajuste lineal de los datos se incrementa al aumentar la temperatura del ensayo (9,442 nmol/h y 11,509 nmol/h para 25 °C y 37 °C, respectivamente, si bien estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas). Los correspondientes valores de permeabilidad aparente son, consecuentemente, distintos en función de la temperatura (0,369 cm/h y 0,450 cm/h para 25 °C y 37 °C, respectivamente). En términos de porcentaje y tomando como referencia la concentración de hidroperóxidos en la celda donante se alcanzaron valores del 12,92% y 14,95% para 25 °C y 37 °C, respectivamente. Para obtener una valoración más completa sobre los datos de transporte obtenidos, éstos se confrontan con los valores de los ensayos realizados en idénticas condiciones experimentales salvo que el tejido intestinal se obtuvo a partir de ratas tratadas con BSO, resultados que se representan en la Figura 25. La velocidad de difusión presenta un incremento en función de la temperatura (17,782 nmol/h y 24,383 nmol/h para 25 °C y 37 °C, respectivamente), y superiores a los obtenidos en los ensayos realizados con tejido sin tratar. Los valores de permeabilidad aparente son 0,695 cm/h y 0,953 cm/h alcanzando, en términos de porcentaje una acumulación de LOOH en la celda aceptora del 25,37% y 38,58% respecto a la concentración inicial para 25 °C y 37 °C, respectivamente.



**Figura 24.-** Evolución del contenido de LOOH en la zona basolateral durante el ensayo de asimilación con celdas Ussing utilizando epitelio intestinal de rata. La concentración de LOOH en la zona apical fue de 40  $\mu\text{M}$  en la zona apical. El ajuste lineal permite obtener la velocidad de difusión para la temperatura de ensayo de 25 °C (línea discontinua) o 37 °C (línea continua) que alcanzó valores de 9,442 nmol/h y 11,509 nmol/h, respectivamente.



**Figura 25.-** Evolución del contenido de LOOH en la zona basolateral durante el ensayo de asimilación con celdas Ussing utilizando epitelio intestinal de rata a la que previamente se administró BSO (L-butionina-sulfoximina) en la cavidad intraperitoneal y provocar un descenso del 50% en la concentración tisular de glutatión. La concentración de LOOH en la zona apical fue de 40  $\mu$ M en la zona apical. El ajuste lineal permite obtener la velocidad de difusión para la temperatura de ensayo de 25 °C (línea discontinua) o 37 °C (línea continua) que alcanzó valores de 17,782 nmol/h y 24,383 nmol/h, respectivamente.

Puesto que, aparentemente los factores controlados modifican las respuestas observadas se decide concretar el nivel de significación de cada uno de ellos en la asimilación y transporte de LOOH mediante el diseño experimental expuesto en la sección de Materiales y Métodos (Tabla 3). Además de los factores incluidos en los ensayos previos (temperatura, concentración de LOOH y nivel tisular de GSH; resultados expuestos en las Figuras 24 y 25) se incorporan al diseño los factores tipo de antioxidante (lipofílico o hidrofílico) y su concentración (1 o 2,5  $\mu\text{M}$ ). La inclusión de estos factores en el diseño experimental trata de responder a uno de los objetivos planteados en este trabajo, si existen mecanismos alternativos o complementarios a la actividad antioxidante por los que se disminuya el potencial oxidativo generado por LOOH.

En la Tabla 9 se exponen los resultados experimentales obtenidos para las respuestas que se determinaron en los ensayos: la velocidad de difusión,  $dQ/dt$ , que es la cantidad de LOOH que ha sido asimilada y transportada hacia la zona basolateral en función del tiempo (nmol/h); la permeabilidad aparente (cm/h) y el porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral.

**Tabla 9. Diseño experimental de Plackett-Burman  $2_{IV}^{7-3}$  utilizado para estudiar los efectos de 7 factores sobre las 3 respuestas estudiadas y resultados obtenidos durante los ensayos de absorción y transporte *ex vivo* de LOOH a través de epitelio intestinal de rata.**

Run	Trial	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	dQ/dt <sup>1</sup>	Papp <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>
12	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	26,3	2,06	71,5
3	2	-1	1	-1	-1	1	-1	1	13,1	1,02	37,5
4	3	-1	1	1	-1	-1	1	-1	10,2	0,40	13,7
11	4	1	-1	1	1	-1	1	-1	6,30	0,25	8,69
9	5	1	1	1	-1	-1	-1	1	9,99	0,78	33,0
16	6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	18,6	1,46	49,2
2	7	-1	-1	1	1	-1	-1	1	7,84	0,61	23,5
13	8	-1	1	1	1	1	-1	-1	12,2	0,95	33,0
5	9	1	-1	-1	-1	-1	1	1	18,7	0,73	27,4
7	10	1	1	-1	1	-1	-1	-1	20,4	1,59	56,9
10	11	1	1	-1	-1	1	1	-1	14,9	0,58	21,4
15	12	-1	-1	1	-1	1	1	1	24,6	0,96	38,3
6	13	1	-1	1	-1	1	-1	-1	11,2	0,87	31,1
8	14	1	1	1	1	1	1	1	21,5	0,84	34,8
14	15	-1	1	-1	1	-1	1	1	28,9	1,11	39,5
1	16	-1	-1	-1	1	1	1	-1	16,3	0,64	23,0

<sup>1</sup>: velocidad de difusión (nmol/h); <sup>2</sup>: Permeabilidad aparente (cm/h); <sup>3</sup>: porcentaje de LOOH medido en la celda aceptora.

Códigos de los factores considerados: X<sub>1</sub>: tipo de antioxidante, grupo lipofílico (β-caroteno o luteína); X<sub>2</sub>: concentración de antioxidante, grupo lipofílico (1 o 2,5 μM); X<sub>3</sub>: tipo de antioxidante, grupo hidrofílico (quercetina o ácido tánico); X<sub>4</sub>: concentración de antioxidante, grupo hidrofílico (1 o 2,5 μM); X<sub>5</sub>: temperatura (25 o 37° C); X<sub>6</sub>: concentración de LOOH (20 o 40 μM); X<sub>7</sub>: nivel tisular de GSH (tratamiento con BSO).

Estructura de confusión del diseño:

$$X_2 \times X_4 = X_3 \times X_5 = X_6 \times X_7$$

$$X_1 \times X_4 = X_3 \times X_6 = X_5 \times X_7$$

$$X_1 \times X_5 = X_2 \times X_6 = X_4 \times X_7$$

$$X_1 \times X_2 = X_3 \times X_7 = X_5 \times X_6$$

$$X_1 \times X_3 = X_2 \times X_7 = X_4 \times X_6$$

$$X_1 \times X_7 = X_2 \times X_3 = X_4 \times X_5$$

$$X_1 \times X_6 = X_2 \times X_5 = X_3 \times X_4$$

Considerando la respuesta de porcentaje de LOOH medido en la celda aceptora destaca que en la mayoría de los ensayos se obtuvieron valores destacables, con porcentajes superiores al 20% excepto en los ensayos 3 (13,7%) y 4 (8,69%), siendo el ensayo 1 en el que se obtuvo el mayor porcentaje de LOOH medido en la celda aceptora (71,5%). Con el uso de otros modelos experimentales (Bergan y Draper, 1970; Glavind, 1970) no se consiguió determinar la absorción y transporte de LOOH, debido probablemente a que los factores relevantes que modulan con el modelo la asimilación de LOOH, como la concentración de LOOH administrada y la capacidad metabólica del tejido, no se establecieron de forma adecuada. Con el modelo experimental propuesto de asimilación *ex vivo* sí se ha conseguido estimar la asimilación de LOOH, en la línea de otros estudios que sí observan una creciente acumulación de LOOH en el sistema linfático (Nakatsugawa y Kaneda, 1983; Aw y colaboradores, 1992). Para determinar qué factores de los estudiados resultan críticos para la absorción y transporte de LOOH a través del epitelio intestinal se presentan en la Tabla 10, los efectos, en términos de factores codificados, en cada respuesta considerada.

**Tabla 10. Efectos de los factores considerados en el diseño experimental de Plackett-Burman  $2^{7-3}_{IV}$  sobre cada una de las respuestas que se determinaron durante los ensayos de absorción y transporte *ex vivo* de LOOH a través de epitelio intestinal de rata (Wistar). Se muestran sólo aquellos efectos en los que  $p \leq 0,15$ .**

Factores	dQ/dt <sup>1</sup>	Papp <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>
X <sub>1</sub>			
X <sub>2</sub>			
X <sub>3</sub>	-6,68	-0,44	-13,76
X <sub>4</sub>			
X <sub>5</sub>			
X <sub>6</sub>		-0,48	-16,11
X <sub>7</sub>	5,09		

<sup>1</sup>: velocidad de difusión (nmol/h); <sup>2</sup>: Permeabilidad aparente (cm/h); <sup>3</sup>: porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral.

Códigos de los factores considerados: X<sub>1</sub>: tipo de antioxidante, grupo lipofílico ( $\beta$ -caroteno o luteína); X<sub>2</sub>: concentración de antioxidante, grupo lipofílico (1 o 2,5  $\mu$ M); X<sub>3</sub>: tipo de antioxidante, grupo hidrofílico (quercetina o ácido tánico); X<sub>4</sub>: concentración de antioxidante, grupo hidrofílico (1 o 2,5  $\mu$ M); X<sub>5</sub>: temperatura (25 o 37° C); X<sub>6</sub>: concentración de LOOH (20 o 40  $\mu$ M); X<sub>7</sub>: nivel tisular de GSH (tratamiento con BSO).

Solo se presentan los efectos en las respuestas de aquellos factores que presentaron un valor de significación estadística  $p \leq 0,15$ . Este criterio cuantitativo fue considerado sobre la base de los resultados obtenidos por otros autores (Rincón y colaboradores, 2003) debido a que este criterio convencional ha sido previamente utilizado con éxito para identificar factores clave en la fase de sondeo durante el desarrollo del método científico. Con este criterio los factores que tienen una incidencia significativa en una o varias de las respuestas consideradas son  $X_3$  (tipo de antioxidante del grupo hidrofílico),  $X_6$  (concentración de LOOH en la celda apical) y  $X_7$  (nivel tisular de GSH). De esta forma, como se expone en la Tabla 10, cuando se cambia quercetina por ácido tánico en el medio de la zona apical se producen descensos de 6,68 nmol/h de la velocidad de difusión, 0,44 cm/h en la permeabilidad aparente y del 13,8% en la porción de LOOH que aparece en la zona basolateral. Este efecto es independiente de la concentración de antioxidante del grupo hidrofílico utilizada (factor  $X_4$ ) que no produce cambios significativos en ninguna de las respuestas. El siguiente factor crítico es la concentración de LOOH depositada en la zona apical que también tiene un efecto negativo, pero sólo en las respuestas permeabilidad aparente (descenso de 0,48 cm/h) y porcentaje de LOOH transportado (16,1%) cuando se aumenta la concentración añadida de 20  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ . El último factor crítico que provoca una modificación significativa y positiva únicamente en la respuesta velocidad de difusión es el nivel tisular de GSH que produce un aumento de 5,09 nmol/h cuando el epitelio intestinal procede de las ratas a las que se inyectó BSO. El resto de factores considerados (antioxidantes de tipo lipofílico, su concentración, y temperatura) no produjeron efectos significativos en ninguna de las respuestas.

Desde el punto de vista de la interacción química entre antioxidantes y ERO son posibles varios procesos como el intercambio de electrones, la abstracción de átomos de hidrógeno, la adición del radical al antioxidante con la consecuente formación de aductos, la quelación de metales catalizadores de procesos oxidativos, y la reducción de especies radicalarias que originariamente eran antioxidantes. Sin embargo, ninguna de estas alternativas se puede contemplar en este estudio ya que la especie considerada, LOOH, no es formalmente un radical sino un generador potencial de ellos al descomponerse. Por tanto, los efectos significativos en las respuestas observadas que se han encontrado para el caso del grupo de antioxidantes hidrofílicos, y la ausencia de ellos cuando los

antioxidantes pertenecen al grupo lipófilo se deben basar en otro tipo de mecanismo no relacionado con la interacción química.

El epitelio gastrointestinal funciona como una barrera selectiva que permite la absorción de nutrientes, electrolitos y agua pero restringe el paso desde el lumen a la circulación sistémica a los compuestos potencialmente tóxicos. Esta selectividad del epitelio, la permeabilidad, está modulada por una serie de factores de naturaleza fisicoquímica, fisiológica, y bioquímica, entre los que destacan la polaridad, concentración y estado de agregación del compuesto a asimilar, la presencia de compuestos coadyuvantes e interferentes y también es dependiente del carácter de la matriz alimentaria que se ha ingerido (Deferme y colaboradores, 2008). Estos factores modifican por diversas causas y mecanismos la permeabilidad del tejido, mecanismos entre los que se encuentra la alteración de la zónula oclusiva (término latino *zonula occludens*, *tight junction* en inglés). La zónula oclusiva es el espacio intercelular entre los enterocitos, zona por la que se produce la asimilación paracelular, que permite la absorción de agua, iones, solutos y moléculas de diverso carácter (hidrófilo o lipófilo) y tamaño. La mayor o menor capacidad de asimilación a través del “poro” que conforma la zónula oclusiva depende de la funcionalidad de cuatro tipos de proteínas estructurales intermembrana: Ocludinas, claudinas, moléculas de adhesión entre uniones y tricelulinas (Furuse y colaboradores, 1993; 1998; Martin-Padura y colaboradores, 1998; Ikenouchi y colaboradores, 2005). Estas proteínas mantienen la estructura y funcionalidad del espacio intercelular, regulando el paso de las sustancias desde el lumen. Los factores extracelulares que modifican la permeabilidad en la zónula oclusiva son de diversa naturaleza incluyendo citoquinas y factores de crecimiento, patógenos, nutrientes y prebióticos, que modifican la expresión de las proteínas encargadas de mantener la estructura de la zónula oclusiva. Las evidencias sobre el efecto de diversos nutrientes en la alteración de la zónula oclusiva están de momento limitadas a la glutamina, el triptófano y las vitaminas A y D que disminuyen la permeabilidad de la membrana y mejoran su capacidad estructural (Rowe, 1997; Peng y colaboradores, 2004). Diferente es el efecto de otros componentes de los alimentos como los ácidos grasos poli-insaturados, que provocan un aumento en la permeabilidad de la membrana (Usami y colaboradores, 2001; 2003).

Otro grupo de componentes de los alimentos que también tiene un efecto en la permeabilidad de la zónula oclusiva es el de los flavonoides. Recientes estudios han demostrado que quercetina,

kaempferol, miricetina tienen un efecto protector de la integridad de la membrana y de los espacios intercelulares mediante mecanismos que implican una mejora en la expresión de las proteínas que estructuran dichos espacios o la neutralización de ERO. En este caso sólo se puede contemplar la primera actividad, que no implica un mecanismo de carácter antioxidante, y es la que se produce en aquellos experimentos en los que se añadió un antioxidante de naturaleza hidrofílica en la zona apical, ácido tánico en sustitución de quercetina, disminuyendo significativamente las tres respuestas medidas en este estudio (Tabla 10 factor X<sub>3</sub>). En este caso, el antioxidante añadido en la zona apical evita el efecto negativo que los LOOH tienen en la estructura de la membrana epitelial extendiéndose el efecto a las tres respuestas observadas (Tabla 10). Un segundo mecanismo de carácter no antioxidante y que puede estar implicado en este proceso de descenso en las respuestas es el que los flavonoides ejercen en la actividad y expresión génica de la glutamato-cisteína ligasa y, consecuentemente, en la cantidad de GSH tisular (Zheng y colaboradores, 2007; Giovannini y colaboradores, 2008). En concreto se ha demostrado que el tratamiento de células HepG2 con quercetina en concentración 0,1-10 µM durante 2-10 horas previene el descenso tisular de GSH tisular inducido por tert-butil hidroperóxido mediante la activación de las enzimas antioxidantes relacionadas con la producción y regeneración de GSH (Alía y colaboradores, 2003). De esta forma, los flavonoides contribuyen positivamente en mantener el metabolismo adecuado de los LOOH que lleva a cabo GSH sin que exista una implicación directa de carácter antioxidante.

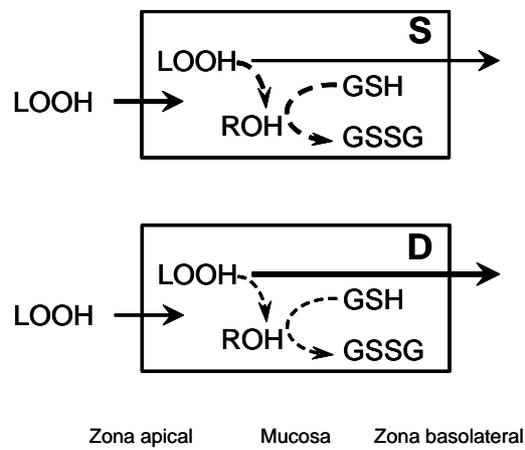
Hubiera sido esperable que el efecto protector se extendiera a los carotenoides que se han ensayado en el estudio (β-caroteno y luteína), pero no ha sido así, no al menos en términos de significación estadística (Tabla 10). Es posible que sus efectos sólo sean apreciables tras un periodo de tratamiento previo del tejido, durante el cual la membrana del epitelio se enriqueciera con estos compuestos y su efecto se hiciera palpable, o bien se trate de que los niveles de concentración considerados en el diseño experimental (Tabla 3) no haya sido la adecuada para observar el efecto, aunque según lo apreciado para los antioxidantes hidrofílicos es bastante probable que ésta no sea la causa. Solo se puede concluir entonces que la asimilación de LOOH desciende significativamente cuando en la zona apical se cambia quercetina por ácido tánico y que este efecto no es dependiente de la concentración utilizada.

El segundo factor que modifica significativamente las respuestas analizadas es la concentración de LOOH (Tabla 10 factor  $X_6$ ). Cuando se incrementa la concentración hasta 40  $\mu\text{M}$  en la zona apical la permeabilidad aparente y el porcentaje de LOOH medidos en la zona basolateral descienden significativamente. Estos descensos son indicativos de que el mecanismo de transporte implicado en la asimilación de LOOH se puede corresponder con la difusión facilitada. En este mecanismo, la asimilación se produce mediante la participación de transportadores de membrana, que son los encargados de interiorizar los componentes liberados de las micelas mixtas. Los resultados obtenidos con diferentes modelos experimentales, *in vitro* e *in vivo*, están proporcionando evidencias acerca de la existencia de transportadores que facilitan la absorción de compuestos lipofílicos como colesterol (libre o esterificado), triacilglicéridos y fosfolípidos (Compassi y colaboradores, 1995; Werder y colaboradores, 2001; von Bergmann y colaboradores, 2005). Alguno de los transportadores identificados son los receptores residuales tipo B, determinante de grupo 36 (CD36) y la proteína Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1).

La saturación de la velocidad de absorción es una de las primeras señales para argumentar la existencia de un mecanismo de difusión facilitada como se ha indicado anteriormente (During y colaboradores, 1998; 2002; Reboul y colaboradores, 2005). Cuando la concentración de componentes a asimilar es elevada, se produce una saturación por sustrato de los transportadores, descendiendo la eficiencia de la asimilación. Este planteamiento explica por qué la concentración de LOOH es un factor crítico para la permeabilidad aparente y el porcentaje de LOOH pero sería esperable que la velocidad de difusión también hubiera experimentado un descenso significativo, considerando que la permeabilidad aparente y la velocidad de difusión están relacionadas mediante una proporcionalidad directa, conforme a la ecuación que permite su estimación (Ecuación 1).

El tercer factor que resulta crítico y que afecta sólo a la velocidad de difusión de LOOH (Tabla 10 factor  $X_7$ ) es el nivel tisular de GSH. El tratamiento con BSO produce un descenso apreciable en los niveles de GSH en la mucosa intestinal por lo que la capacidad de procesar adecuadamente los LOOH absorbidos desde el lumen disminuye significativamente, y consecuentemente se produce un aumento en la velocidad de difusión (5,09 nmol/h factor  $X_7$ , Tabla 10). En una situación de insuficiencia de GSH intestinal, la velocidad de difusión de LOOH desde el lumen aumenta significativamente, pero no así las otras respuestas observadas (permeabilidad aparente y porcentaje

de LOOH en la zona basolateral). Un aumento de la velocidad de difusión no implica necesariamente que la cantidad asimilada y transportada incremente proporcionalmente. Este hecho se puso de manifiesto con los resultados obtenidos mediante otro modelo experimental descrito por Aw y colaboradores en 1992, que observaron como los LOOH se acumulan en el epitelio intestinal *in vivo* cuando los niveles de GSH son inferiores a los habituales. Como contrapartida a ello, la velocidad de transporte desde el epitelio intestinal hacia el sistema linfático también incrementa, y con ello los niveles de LOOH que aparecen en el interior del organismo, efecto que no se ha observado con el modelo experimental expuesto, ya que las respuestas permeabilidad aparente y porcentaje de LOOH no se modifican significativamente por este factor. Este resultado está en consonancia con el modelo propuesto para la asimilación, metabolismo y transporte de LOOH (Kowalski y colaboradores, 1990; Aw y Williams, 1992; Aw y colaboradores, 1992; Legrand y Aw, 2001) y representado en la Figura 26. En condiciones de suficiencia de GSH, el metabolismo intracelular de LOOH provoca un aumento de la asimilación de LOOH del lumen y un descenso en el transporte de LOOH hacia la zona basolateral. Por el contrario, en una situación de deficiencia de GSH tisular, la velocidad de difusión de LOOH hacia la zona basolateral incrementa al no existir un procesado eficiente de los LOOH en el interior de los enterocitos por lo que una vez interiorizados, se transportan fuera de la zona basolateral. Aunque con los datos obtenidos sí se observa un incremento significativo en la velocidad de difusión cuando el nivel de GSH tisular es deficiente, no se ha podido apreciar un incremento significativo en la permeabilidad aparente y en el porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral (Tabla 10, factor X<sub>7</sub>). Este hecho puede deberse a que el procedimiento utilizado por Aw y colaboradores (1992) consiste en un modelo experimental de perfusión *in vivo* con el epitelio intestinal íntegro en el que permanece intacto el sistema linfático por el que permanentemente se retiran LOOH, creando un gradiente favorable de concentración desde el epitelio intestinal hacia la linfa. En este estudio la zona basolateral no se renueva por lo que el gradiente de concentración disminuye a medida que se acumulan LOOH en dicha zona, lo que disminuye la eficiencia del transporte extracelular de LOOH.



**Figura 26.-** Mecanismo de asimilación, metabolismo y transporte de LOOH procedentes del lumen en células intestinales que presentan suficiencia (S) o deficiencia (D) de GSH tisular, propuesto por Aw y colaboradores (1992).

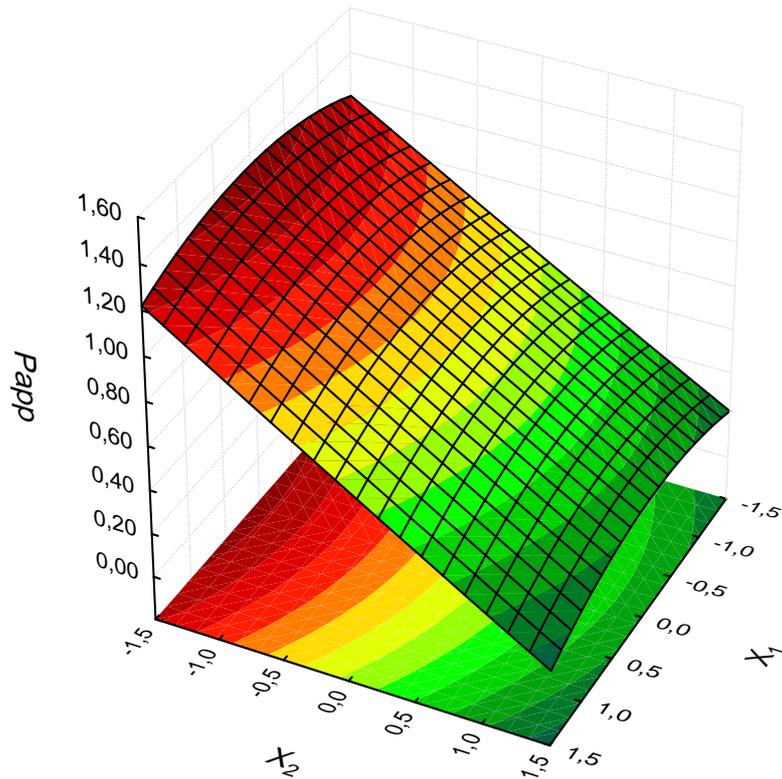
La fase de sondeo puso de manifiesto la existencia de tres factores significativos,  $X_3$  tipo de antioxidante hidrofílico (quercetina o ácido tánico),  $X_6$  concentración de LOOH y  $X_7$  nivel tisular de GSH de los cuales se seleccionaron dos, tipo de antioxidante hidrofílico y concentración de LOOH para realizar una fase de optimización con el objetivo de concretar las condiciones en las que estos dos factores modifican las respuestas analizadas. El hecho de descartar al factor  $X_7$ , nivel tisular de GSH de la fase de optimización se debe a la pretensión de esclarecer el rol de los otros dos factores escogidos, en las condiciones habituales de asimilación y transporte de LOOH. Si los antioxidantes hidrofílicos tienen un efecto en las respuestas determinadas en este ensayo incluso en condiciones operativas del metabolismo de LOOH mediante la actividad de GSH, como así apuntan los resultados obtenidos en la fase de sondeo, se dispondrá de un control positivo del aporte de los antioxidantes exógenos al trabajo que realiza GSH tisular en las gestión de los LOOH asimilados, es decir, una actividad antioxidante extra al sistema antioxidante endógeno con el que cuenta el tejido. En la Tabla 11, se presentan los efectos de los factores considerados en el diseño experimental de Box-Wilson descrito en la sección de Materiales y Métodos para quercetina. El conjunto de efectos de los dos factores considerados afecta a la velocidad de difusión (15,86) si bien en ningún caso los factores por separado tuvieron consecuencias significativas en la respuesta. El valor de  $R^2$  (0,54) está indicando que casi la mitad de esos efectos se deben a factores no considerados en el modelo experimental. En el caso de la permeabilidad aparente, también el conjunto de efectos de los dos factores afecta a la respuesta medida (0,83) y aquí sí aparece un efecto lineal y negativo de la concentración de LOOH (-0,69) en el valor de la permeabilidad aparente. Gráficamente este efecto se representa en la Figura 27. El resto de efectos por separado no resultan relevantes. En este caso los factores considerados sí logran explicar con mayor amplitud la variación de la permeabilidad aparente ( $R^2=0,86$ ). Los resultados obtenidos para la respuesta porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral siguen la misma tónica que la expuesta para la respuesta permeabilidad aparente. Así, el conjunto de los efectos para ambos factores afecta a la respuesta (28,13) y sólo el factor concentración de LOOH tiene un efecto lineal y negativo en la respuesta. Además, los factores considerados sí consiguen explicar en mayor medida la variabilidad en la respuesta ( $R^2=0,89$ ).

**Tabla 11. Efectos de los factores considerados en el diseño experimental de Box-Wilson para la optimización de los factores más influyentes identificados en la fase de sondeo, sobre cada una de las respuestas que se determinaron durante los ensayos de absorción y transporte *ex vivo* de LOOH a través de epitelio intestinal de rata (Wistar). Se muestran sólo aquellos efectos en los que  $p \leq 0,05$ . Resultados obtenidos en el caso de quercetina.**

Efectos	dQ/dt <sup>1</sup>	Papp <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>
Media	15,86	0,83	28,13
X <sub>1</sub> lineal			
X <sub>1</sub> cuadrático			
X <sub>2</sub> lineal		-0,69	-24,32
X <sub>2</sub> cuadrático			
X <sub>1</sub> × X <sub>2</sub>			
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,54</b>	<b>0,86</b>	<b>0,89</b>

<sup>1</sup>: velocidad de difusión (nmol/h); <sup>2</sup>: Permeabilidad aparente (cm/h); <sup>3</sup>: porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral.

Códigos de los factores considerados: X<sub>1</sub>: concentración de quercetina; X<sub>2</sub>: concentración de LOOH.



**Figura 27.-** Efectos de los factores  $X_1$  (Antioxidante hidrofílico, quercetina) y  $X_2$  (concentración de Hidroperóxidos) sobre la permeabilidad aparente (Papp).

En la Tabla 12, se presentan los efectos de los factores considerados en el diseño experimental de Box-Wilson descrito en la sección de Materiales y Métodos para ácido tánico. En este caso, los factores considerados no tuvieron ningún efecto significativo, ni en conjunto ni por separado, en las respuestas determinadas. El coeficiente  $R^2$  para cada una de ellas es muy bajo en el caso de la velocidad de difusión (0,21) y supera el 50% para las otras dos respuestas ( $R^2 = 0,60$  y  $R^2 = 0,56$ , para la permeabilidad aparente y el porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral, respectivamente). La variabilidad de los datos obtenidos con ácido tánico no queda suficientemente explicada por los factores considerados en el diseño experimental para ninguna de las respuestas consideradas.

Resulta llamativo que, si bien en la fase de sondeo se apreció que el cambio de quercetina por ácido tánico provocaba un descenso significativo en las respuestas estudiadas, lo que colocó a este factor (Tabla 10, factor  $X_3$ ) en la lista de factores a considerar en la fase de optimización, ahora los datos indiquen que quercetina es el flavonoide que tiene efectos significativos (Tabla 11) y no el polifenol ácido tánico. Este proceso de optimización ha puesto de manifiesto que quercetina y ácido tánico tienen efectos diferentes en las respuestas analizadas. Como ya se ha expuesto anteriormente, los flavonoides tienen un efecto positivo sobre la síntesis de GSH. Sin embargo, el efecto de los polifenoles es en principio contrario a los intereses sobre la actividad metabólica de GSH sobre LOOH ya que existen evidencias que indican que los polifenoles inhiben la glutatión reductasa (Zhang y colaboradores, 1994; 1997) mediante un proceso de inhibición competitiva con GSH. Este efecto restaría eficiencia a la actividad metabólica de GSH sobre los LOOH ya que la glutatión reductasa es la enzima encargada de regenerar la forma oxidada de glutatión a GSH. Sin embargo, los datos indican que la adición de ácido tánico no tiene efecto alguno sobre las respuestas implicadas en la difusión, asimilación y transporte de LOOH a través del epitelio intestinal, ni siquiera un efecto positivo, entendiendo como positivo a un incremento en los valores de los parámetros estimados que indicaran una mayor presencia de LOOH en la zona basolateral a consecuencia de la inhibición de la enzima glutatión reductasa, y por tanto de la capacidad metabólica de GSH. La actividad de glutatión reductasa es, cuantitativamente un mecanismo importante para mantener la cantidad de GSH tisular cuando su demanda para metabolizar LOOH es elevada (Aw y Rhoads, 1994), aunque diversos estudios han demostrado que las enzimas que participan en el ciclo rédox de

GSH no son las que limitan el catabolismo y eliminación de LOOH en el intestino sino que la eficiencia en la asimilación de LOOH y la disposición del antioxidante celular GSH son las variables que controlan el proceso (Kowalski y colaboradores, 1990; Aw y colaboradores, 1992; Aw y Williams, 1992). Consecuentemente un impacto negativo en la actividad de glutatión reductasa, ejercido por ácido tánico, no resulta relevante en la capacidad metabólica de GSH sobre LOOH, cuando el tejido presenta los niveles habituales de GSH. Solo aquellos factores que inciden en la concentración de GSH tisular son los que afectan significativamente a la asimilación y metabolismo de LOOH como es el caso de quercetina que produce un efecto positivo en la síntesis de GSH y por tanto contribuye a una mayor eficiencia en el control de los LOOH del lumen.

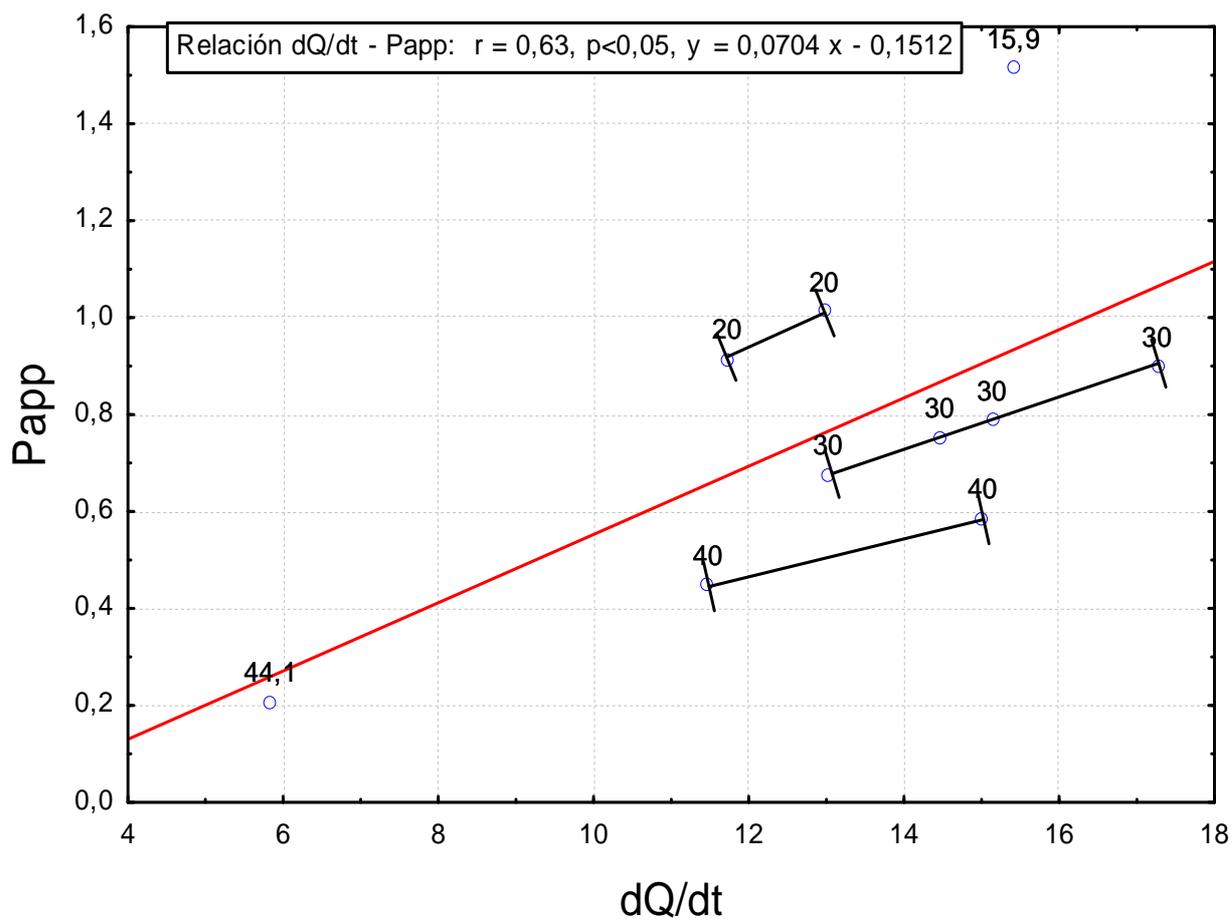
**Tabla 12. Efectos de los factores considerados en el diseño experimental de Box-Wilson para la optimización de los factores más influyentes identificados en la fase de sondeo, sobre cada una de las respuestas que se determinaron durante los ensayos de absorción y transporte *ex vivo* de LOOH a través de epitelio intestinal de rata (Wistar). Se muestran sólo aquellos efectos en los que  $p \leq 0,05$ . Resultados obtenidos en el caso de ácido tánico.**

Efectos	$dQ/dt^1$	$P_{app}^2$	% <sup>3</sup>
Media			
$X_1$ lineal			
$X_1$ cuadrático			
$X_2$ lineal			
$X_2$ cuadrático			
$X_1 \times X_2$			
$R^2$	0,21	0,60	0,56

<sup>1</sup>: velocidad de difusión (nmol/h); <sup>2</sup>: Permeabilidad aparente (cm/h); <sup>3</sup>: porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral.

Códigos de los factores considerados:  $X_1$ : concentración de quercetina;  $X_2$ : concentración de LOOH.

Tanto en la fase de sondeo como en la de optimización, se ha observado el hecho de que la concentración de LOOH (Tabla 10, factor  $X_6$ ; Tabla 11, factor  $X_2$ ) sólo afecta significativamente a la permeabilidad aparente y al porcentaje de LOOH medido en la zona basolateral, pero no a la velocidad de difusión, aunque existe una relación de proporcionalidad directa entre la primera y la última respuesta (Ecuación 1). En la Figura 28 se representan los valores experimentales de permeabilidad aparente frente a la velocidad de difusión obtenidos para el diseño experimental de optimización en el caso de quercetina. Se observa la proporcionalidad directa entre las dos variables siempre y cuando se agrupen los valores experimentales de los ensayos realizados con la misma concentración de LOOH. Además, cuando se consideran los valores en su conjunto (independientemente de la concentración) se observa una correlación significativa entre las dos variables ( $p = 0,0506$ ). ¿Cómo es posible entonces que el estudio estadístico arroje resultados significativos para la permeabilidad aparente y no para la velocidad de difusión? Esta falta de convergencia conjunta es posible interpretarla a partir de los valores de  $R^2$  en las Tablas 11 y 12, que para la velocidad de difusión fueron muy inferiores en comparación con los valores obtenidos para las otras dos respuestas consideradas (0,54 y 0,21 para quercetina y ácido tánico, respectivamente). Como ya se ha indicado anteriormente debe existir uno o varios factores en el diseño experimental que expliquen el resto de la variabilidad de los datos obtenidos para la velocidad de difusión. La representación del mecanismo de asimilación, metabolismo y transporte de LOOH propuesto en la Figura 28, evidencia la sucesión de acontecimientos y la complejidad de los elementos que participan en el proceso que se ha estudiado. Hay otro elemento que juega en contra del procedimiento experimental usado y es lo estacionario del mismo. En situación real, los LOOH que son asimilados y transportados hacia la linfa son movilizados hacia el hígado. Sin embargo, en el modelo de celdas Ussing, los LOOH se acumulan en la zona basolateral sin que exista una regeneración del búfer en el que la concentración de LOOH aumenta a medida que el experimento avanza. Este hecho puede crear un gradiente de concentración, desde la zona basolateral al interior del tejido que disminuya la eficiencia del transporte y altere los valores de velocidad de difusión que realmente serían esperables.



**Figura 28.-** Valores experimentales de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) frente a velocidad de difusión ( $dQ/dt$ ) obtenidos para el diseño experimental de optimización en el caso de quercetina.

### Conclusión

El modelo de estudio utilizado permite determinar que sólo aquellos factores que inciden en la concentración de GSH tisular son los que afectan significativamente a la asimilación y el metabolismo de hidroperóxidos, como es el caso de la quercetina, que produce un efecto positivo en la síntesis de GSH contribuyendo así a una mayor eficiencia en el control de los hidroperóxidos del lumen. Sin embargo, en contra del modelo experimental usado está lo estacionario del mismo ya que, en una situación real, los hidroperóxidos asimilados y transportados hacia la linfa son movilizados hacia el hígado mientras que en el modelo de celdas Ussing los hidroperóxidos se acumulan en la zona basolateral pudiendo esto disminuir la eficiencia del transporte. Aunque el modelo experimental *ex vivo* que utiliza celdas tipo Ussing permite medir el transporte de ciertos componentes a través del epitelio intestinal, los resultados obtenidos solo suponen aproximaciones a la situación real en que un tejido forma parte de un organismo vivo.

### **Medida de la actividad de lipoxigenasa de soja (tipos I y V)**

La actividad de lipoxigenasa se determina midiendo el incremento de absorbancia por segundo a 234 nm que experimenta una disolución en la que se encuentran presente la enzima y su sustrato debido a la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos poli-insaturados. Las lipoxigenasas son un conjunto de isoenzimas con distintos requerimientos en cuanto a entorno físico-químico y naturaleza del sustrato empleado para llevar a cabo la reacción. Aunque el objeto del estudio será poner a punto un método para medida de actividad de lipoxigenasa procedente de epitelio intestinal humano, previsiblemente LOX-5, todos los estudios previos de puesta a punto del método de medida de actividad, así como el método de paralización química de la actividad enzimática se realizarán con LOX de soja tipo I para después trasladarlo a la isoenzima aislada del intestino. La selección de LOX de soja tipo I se basa fundamentalmente en que es una enzima fácilmente accesible, con unos requerimientos muy simples para su medida de actividad y con un alto grado de reproducibilidad, aspecto bastante poco frecuente en LOX comerciales con otros pH óptimos debido a la inestabilidad del sustrato de la enzima fuera de pHs alcalinos.

Para la puesta a punto de la metodología de la medida de actividad se ensayaron tres concentraciones de disolución enzimática (0,04 mg/mL; 0,4 mg/mL y 4 mg/mL). Como medio de reacción se emplea tampón fosfato sódico 50 mM a pH 8, que es el indicado como óptimo en las especificaciones de las enzimas suministradas por el fabricante (Fluka St. Louis, MO, EEUU). Como sustrato se emplea una disolución de ácido linoleico de concentración 71,5 mM. La reacción tiene lugar cuando enzima y sustrato entran en contacto e instantáneamente se inicia la formación de hidroperóxidos. Para el seguimiento de la reacción se disponen todos los reactivos en una cubeta espectrofotométrica con un volumen final constante de 3 mL. El incremento en absorbancia a 234 nm, debido a la formación de hidroperóxidos, se monitoriza en el tiempo constantemente y se registra para expresar los resultados como concentración de hidroperóxidos formados por segundo en el volumen de reacción, datos que se correlacionarán con las diferentes cantidades de enzima empleadas, utilizando siempre una cantidad constante de sustrato. En la Tabla 13 se incluyen valores de actividad obtenidos con diferentes concentraciones enzimáticas y empleando diferentes cantidades de extracto enzimático en cada caso. El tiempo total de monitorización del incremento de absorbancia es de 120 segundos, midiendo el valor de absorbancia cada 2 segundos, aunque sólo

los datos entre 30 y 90 segundos se utilizan para el cálculo de la actividad enzimática. Aunque la reacción de hidropoxidación enzimática progresa más allá del periodo de reacción considerado, no es posible seguir midiendo su avance debido a que se alcanzan valores de absorbancia superiores a 2 unidades que hacen inviable el seguimiento espectrofotométrico.

En la Tabla 13 se puede observar como en ausencia de extracto enzimático activo aparece un cierto incremento en la absorbancia que se corresponde necesariamente con la formación espontánea de hidroperóxidos debido a la labilidad del sustrato. Este hecho obliga a que en el seguimiento de la reacción enzimática mediante técnica espectrofotométrica, sea necesario diferenciar entre el blanco de la medida instrumental y el blanco de la reacción. El blanco instrumental, *a priori*, debería realizarse con la mezcla de todos aquellos componentes que se encuentran en el medio de reacción y que no son los productos de ésta. Sería por tanto el medio de reacción junto con el extracto enzimático y el sustrato, en el instante antes de que dé comienzo la reacción, en definitiva, todos los componentes en el tiempo cero de la reacción. En la práctica empleando un espectrofotómetro de diodos mono haz no se puede realizar este planteamiento. Desde el momento en el que contactan enzima y sustrato comienza la reacción, por lo que en el intervalo de tiempo que transcurre entre la medida del blanco instrumental y el comienzo de la monitorización de la reacción ha transcurrido un intervalo de tiempo variable, en el que se han formado hidroperóxidos, y por tanto la reacción comienza a unos niveles de absorbancia superiores a los que debía tener y además diferentes en cada caso, dependiendo del tiempo que transcurra entre ambas medidas.

Para eliminar este inconveniente, el blanco instrumental se realiza sin la adición del sustrato. Podría haberse optado por realizar el blanco instrumental sin la adición del extracto enzimático, conteniendo el medio de reacción el sustrato, pero esta opción resulta menos fiable puesto que el sustrato es inestable por lo que se produciría la formación de hidroperóxidos en cantidades variables durante el intervalo de tiempo entre la medida del blanco instrumental y el comienzo de la monitorización de la reacción.

Una vez que comienza la reacción, y debido a la labilidad del sustrato, la formación de hidroperóxidos puede proceder de dos rutas paralelas, enzimática y *aparente* auto-oxidación espontánea. La ruta enzimática tiene mayor entidad en términos generales mientras que la

auto-oxidación, dependiendo de la actividad enzimática medida, puede llegar a tener una importante contribución al total de hidroperóxidos formados. Para cada ensayo enzimático hay que realizar previamente el ensayo de blanco de reacción, donde la reacción transcurre en idénticas condiciones a las del ensayo de actividad enzimática pero sin adición del extracto enzimático activo. El incremento de absorbancia medido en el ensayo de blanco de reacción y en estas condiciones se corresponde con la cantidad de hidroperóxidos formados de forma *aparentemente* espontánea por simple auto-oxidación del sustrato.

**Tabla 13. Actividad de la enzima lipoxigenasa de soja tipo I expresada en  $\mu$ moles de hidroperóxido por segundo, en función de la concentración enzimática, utilizando diferentes cantidades de extracto enzimático. Volumen final de reacción 3 mL, concentración de sustrato en el medio de reacción 1,19 mM.**

Concentración enzimática					
0,04 mg/mL		4 mg/mL		0,4 mg/mL	
$\mu$ L	actividad	$\mu$ L	actividad	$\mu$ L	actividad
0	$5,31 \times 10^{-6}$	0	$1,05 \times 10^{-4}$	0	$7,40 \times 10^{-6}$
10	$5,46 \times 10^{-6}$	10	-	5	$4,67 \times 10^{-4}$
20	$1,16 \times 10^{-5}$	20	-	10	$1,05 \times 10^{-3}$
30	$1,21 \times 10^{-5}$	30	-	15	$1,53 \times 10^{-3}$
40	$5,35 \times 10^{-6}$				
50	$6,96 \times 10^{-6}$				

Valores medios (n = 3).

- La saturación de la señal impide determinar el valor de absorbancia y por tanto estimar la actividad.

Teniendo en cuenta los resultados de actividad presentados en la Tabla 13 se considera como más adecuado utilizar una disolución enzimática a concentración 0,4 mg/mL ya que el extracto más diluido (0,04 mg/mL) no permite la determinación de la actividad, observándose datos erráticos, mientras que el extracto más concentrado produce una saturación de la señal que impide la medida de actividad. Para la concentración 0,4 mg/mL el incremento de absorbancia se produce de forma lineal en el tiempo lo que indica que la enzima está actuando en condiciones de saturación por sustrato. Por otro lado, también se observa linealidad entre el incremento de absorbancia medido y el volumen de extracto enzimático empleado, lo que nuevamente prueba las condiciones de saturación. Ambas verificaciones de saturación por sustrato se han realizado sistemáticamente en todas las determinaciones, garantizándose doblemente que todas las medidas están realizadas en condiciones comparables.

Tras poner a punto el método de medida de actividad con la enzima LOX de soja tipo I, se procedió a determinar la actividad de la enzima LOX de soja tipo V, utilizando inicialmente como medio de reacción tampón fosfato sódico, 50 mM a pH 6,1 que es el pH indicado como óptimo en las especificaciones suministradas por el fabricante (Sigma; St. Louis, MO, EEUU).

Durante la monitorización de la reacción, se observa que el tramo más lineal en el incremento de absorbancia durante el tiempo de reacción se produce entre los segundos 20 y 55 de reacción, por lo que el tiempo de reacción se reduce a 60 segundos y se toman los dos puntos extremos del tramo de máxima linealidad como referentes para el cálculo del incremento de absorbancia por segundo. El tiempo comprendido entre el inicio de la reacción y el segundo 20 se desprecia por ser un tramo en el que, debido a que la cubeta viene de una agitación severa para mezclar los componentes de la reacción, se observan oscilaciones en la medida de absorbancia. Se utilizaron tres concentraciones de la enzima: 0,036 mg/mL, 0,72 mg/mL y 0,072 mg/mL. Tanto el volumen de reacción empleado como la cantidad de sustrato y *modus operandi* son análogos a los expuestos en los ensayo de actividad LOX de soja tipo I. En la Tabla 14 se presentan los resultados de actividad obtenidos en función de la concentración del extracto enzimático y de la cantidad incorporada al medio de reacción. Para la disolución de 0,036 mg/mL se observa un muy leve cambio en la actividad al adicionar el extracto enzimático aunque los niveles alcanzados se sitúan en unos niveles prácticamente idénticos a los obtenidos en ausencia del extracto enzimático activo lo que claramente indica que al adicionarse

la enzima, los hidroperóxidos formados proceden mayoritariamente de la *aparente* hidroperoxidación espontánea del sustrato, y en menor medida de la actuación de LOX de soja tipo V. Se habla de *aparente* hidroperoxidación espontánea porque, en los volúmenes de reacción con ausencia de enzima activa, se observa una respuesta espectrofotométrica que puede deberse bien a la formación de hidroperóxidos generados a partir de la auto-oxidación del ácido graso usado como sustrato, o a la aparición de algún compuesto que absorbe a la misma longitud de onda que los hidroperóxidos. En el otro extremo se encuentra el extracto enzimático a concentración 0,72 mg/mL, en el que los incrementos de absorbancia durante el tiempo de medida superan las 2 unidades de absorbancia, lo que invalida los datos por haberse superado el umbral de saturación. Solo el dato de actividad correspondiente al uso de 10  $\mu$ L de extracto enzimático permite una medida espectrofotométrica válida, aunque el resultado encontrado es claramente erróneo, ya que no solo no muestra actividad el extracto sino que además se aprecia una reducción de la *aparente* hidroperoxidación espontánea del ácido linoleico. El sobre-exceso de enzima en el medio de reacción probablemente ha creado una situación muy diferente a la que sería esperable para el transcurso normal de la reacción.

De los dos extremos analizados se puede concluir, que para el extracto enzimático de concentración 0,036 mg/mL, el sustrato se encuentra en condiciones de saturación que su auto-oxidación enmascara la actuación de la enzima; en el otro extremo, al aumentar 20 veces la cantidad de enzima (0,72 mg/mL), la reacción se dispara hasta niveles espectrofotométricamente inalcanzables.

Al utilizar el extracto enzimático a concentración 0,072 mg/mL se obtiene, empleando una concentración de sustrato en el medio de reacción de 1,19 mM, una secuencia en incrementos de absorbancia lineal con el incremento en el volumen de extracto enzimático (relación con un coeficiente de determinación con error experimental  $R^2_{Adj.} = 0,944$ ; valor de significación estadística  $p < 0,01$ ). Este hecho, unido a que el incremento de absorbancia se produce de forma lineal en el tiempo, garantiza que la actividad de la enzima LOX de soja tipo V se está determinando en condiciones de saturación por sustrato. Al tratarse de una actividad en la que la contribución de la *aparente* hidroperoxidación espontánea es elevada, se realiza un ensayo con una menor cantidad de sustrato, con una concentración final de ácido linoleico en el medio de reacción de 0,715 mM

(adicionando 30  $\mu$ L de disolución sustrato, en vez de 50  $\mu$ L). Se aprecia un incremento de actividad directamente proporcional a la cantidad de extracto utilizada ( $R^2_{Adj.} = 0,990$ ;  $p < 0,01$ ) que permite medir correctamente y con una menor contribución de la reacción *aparentemente* espontánea, lo que fija unos márgenes de concentración de sustrato a utilizar en función de las necesidades experimentales (tipo de enzima y concentración de la misma) a desarrollar. Estos resultados permiten tomar como concentración óptima de trabajo la de la disolución de 0,072 mg/mL y una concentración de sustrato en el medio de reacción que podrá oscilar entre 1,19 y 0,715 mM que serán las empleadas para la puesta a punto del resto de parámetros.

**Tabla 14. Actividad de la enzima lipoxigenasa de soja tipo V, expresada en  $\mu$ moles de hidroperóxido por segundo, en función de la concentración enzimática, utilizando diferentes cantidades de extracto enzimático y concentración de sustrato.**

Volumen extracto enzimático ( $\mu$ L)	Actividad de cada concentración enzimática ( $\times 10^4$ )			
	Concentración extracto enzimático (mg/mL)			
	0,036 mg/mL	0,072 mg/mL	0,72 mg/mL	
	Concentración de sustrato en el medio de reacción (mM)			
	1,19	0,715	1,19	1,19
0	5,33	3,26	4,74	6,59
10	5,99	3,66	8,54	1,81
20	7,29	3,98	10,64	-
30	7,41	4,47	12,84	-
40	7,29		13,54	
50	7,37		18,84	
60	7,31			

Valores medios (n = 3).

- La saturación de la señal impide determinar el valor de absorbancia y por tanto estimar la actividad.

Aunque la enzima comercial LOX de soja tipo V presenta su óptimo de actividad declarado a pH 6,1, se ha considerado necesario estudiar el perfil de comportamiento de la enzima en función del pH del tampón de reacción. Se ha comprobado la actividad de la enzima LOX de soja tipo V en tampón fosfato sódico 50 mM en el rango de 5 a 8, con incrementos de 0,5 unidades de pH en presencia de 50  $\mu$ L de disolución sustrato. En la Tabla 15 se presentan los resultados obtenidos. Se aprecia que la *aparente* hidroperoxidación espontánea (valores de actividad obtenidos sin adición de sustrato enzimático activo) presenta un valor mínimo a pH 8. A este pH, cuando se utilizan cantidades crecientes de extracto enzimático, la formación de hidroperóxidos crece de forma directamente proporcional a la cantidad de extracto empleado, condición requerida para asegurar que la reacción transcurre bajo condiciones de saturación por sustrato. En algunos casos cuando se emplea como medio de reacción tampón entre pH 8 y 7, la absorbancia inicial de la reacción a tiempo cero es tan elevada que deja muy poco margen de medida de formación de hidroperóxidos ya que inmediatamente se superan las dos unidades de absorbancia. A valores de pH inferiores se aprecia que, aunque la *aparente* hidroperoxidación espontánea es superior, la absorbancia inicial del medio de reacción es menor, lo que permite realizar medidas de actividad de la enzima en un rango más amplio de concentración de extracto, lo que permite garantizar con más rotundidad la fiabilidad de la medida.

De los datos obtenidos se observa que la *aparente* hidroperoxidación espontánea decrece a medida que aumenta el pH del tampón de reacción, alcanzándose el mínimo a pH 8, pero como desventaja parece que cuando la enzima LOX de soja tipo V está presente, la absorbancia inicial del medio de reacción, cuando se adiciona el sustrato es muy elevada y deja muy poco margen operativo para el estudio de actividad. A pH 7 ocurre algo similar. Entre pH 5 y 6 la *aparente* hidroperoxidación espontánea tiende a aumentar pero los bajos niveles de absorbancia a tiempo 0 permiten un margen más amplio para el estudio de la reacción. Estos dos pH serán objeto de un estudio más detallado para afinar en el óptimo de actuación de la enzima.

**Tabla 15. Actividad de la enzima lipoxigenasa de soja V, expresada en  $\mu$ moles de hidroperóxido por segundo, para la concentración enzimática de 0,072 mg/mL, utilizando diferentes cantidades de extracto enzimático. Concentración de sustrato en el medio de reacción 1,19 mM.**

Actividad a diferentes valores de pH							
Cantidad extracto ( $\mu$ L)	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
0	$4,97 \times 10^{-4}$	$7,95 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,23 \times 10^{-4}$	$5,61 \times 10^{-4}$	$5,62 \times 10^{-4}$	$1,20 \times 10^{-5}$
10	$9,44 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-3}$	$1,45 \times 10^{-3}$	$1,65 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-3}$	$1,24 \times 10^{-3}$	$1,35 \times 10^{-3}$
20	$1,23 \times 10^{-3}$	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,66 \times 10^{-3}$	$1,84 \times 10^{-3}$	$2,37 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$2,91 \times 10^{-3}$
30	$1,46 \times 10^{-3}$	$1,42 \times 10^{-3}$	$1,88 \times 10^{-3}$	$2,12 \times 10^{-3}$	—	—	—
40	$1,51 \times 10^{-3}$	$1,33 \times 10^{-3}$	$1,95 \times 10^{-3}$	$2,73 \times 10^{-3}$	—	—	—
50	$1,40 \times 10^{-3}$	$1,29 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-3}$	—	—	—	—

Valores medios (n = 3).

— La saturación de la señal impide determinar el valor de absorbancia y, portanto, estimar la actividad.

### **Paralización de la reacción de hidroperoxidación y estabilización de los hidroperóxidos**

La reacción de formación de hidroperóxidos continúa más allá del tiempo establecido para la medida de actividad enzimática. Para cualquier estudio posterior, la cantidad de hidroperóxido existente será significativamente superior a aquella que se determine espectrofotométricamente. Para los estudios que se pretenden realizar relativos a correlacionar el procedimiento de cuantificación de hidroperóxidos por medida espectrofotométrica frente al método por HPLC, lo más sencillo sería realizar la reacción en la cubeta espectrofotométrica y medir el incremento de absorbancia que se ha producido en el tiempo de reacción establecido y simultáneamente tomar alícuotas de esta reacción correspondientes al punto inicial y final de la reacción para establecer la cantidad de hidroperóxido que se ha formado en el tiempo establecido para la reacción. Las muestras al comienzo y finalización de la reacción están distanciadas menos de 1 min, y cuando la medida es espectrofotométrica la determinación se realiza *in situ*, es decir se mide en tiempo real la absorbancia de la disolución. Con la determinación de hidroperóxido por HPLC, la medida no puede realizarse a tiempo real, ya que entre la determinación de la concentración de hidroperóxido al principio y final de la reacción va a transcurrir, además del tiempo de reacción (inferior a 1 min), el tiempo de análisis de la muestra inicial, en torno a 30 min. Durante este tiempo, la reacción enzimática y la reacción de *aparente* hidroperoxidación espontánea progresan, desconociéndose si lo hace bajo cinética de orden cero (por saturación con sustrato) o si por el contrario puede incluso darse la descomposición de parte del hidroperóxido formado. La cantidad de hidroperóxidos existente al final de la reacción monitorizada espectrofotométricamente muy probablemente no esté relacionada con la existente después de 30 min y no existen datos que permita contemplar la posibilidad de extrapolación ya que, como se ha comentado, se desconoce si la reacción sigue en condiciones de saturación o si aparece descomposición del producto formado. Por tanto es necesario contar con un procedimiento que permita paralizar la reacción y estabilizar el producto formado, para la reacción de *aparente* hidroperoxidación espontánea y la enzimática, y que nos garantice que la cantidad de hidroperóxido a cuantificar por HPLC es exactamente la misma que aquella que se monitoriza espectrofotométricamente.

El sistema de paralización de formación de hidroperóxidos debe cumplir una serie de requisitos. Debe paralizar la reacción enzimática y la *aparente* hidroperoxidación espontánea, debe

estabilizar el producto formado, es decir, protegerlo de la interacción con otros compuestos que generen su descomposición y, finalmente, el procedimiento seleccionando no debe introducir ningún compuesto que interfiera con la medida (espectrofotométrica y por HPLC) a 234 nm. El estudio de puesta a punto de un sistema de paralización de la formación y estabilización de los hidroperóxidos formados se realiza empleando LOX de soja tipo I. Los resultados obtenidos se trasladan posteriormente a los ensayos realizados con LOX de soja tipo V.

La primera alternativa que se plantea es la adición de un antioxidante en el punto final de la monitorización espectrofotométrica de la reacción. Todos los antioxidantes de naturaleza orgánica e hidrosolubles potencialmente aptos para el fin deseado, presentan la característica de contener en su estructura grupos funcionales con alta absorbancia en el rango del UV donde se determinan los hidroperóxidos, como el ácido ascórbico y los antioxidantes de naturaleza polifenólica, por lo que *ab initio* no se ha contemplado su uso ya que, aun paralizando la reacción y estabilizando muy eficazmente los hidroperóxidos generados, sería imposible observar y demostrar esta situación espectrofotométricamente.

Para cualquier antioxidante que se utilice se fijan una serie de parámetros previos. La reacción transcurre en la cubeta espectrofotométrica con un volumen final de reacción de 3 mL. La adición del agente estabilizante debe realizarse empleando un volumen muy reducido para que no se modifique de forma apreciable el volumen final de la reacción. Se fija que este volumen a adicionar debe ser inferior a 150  $\mu$ L, lo que supone una variación en volumen de reacción del 5%, y por supuesto, debe permitir la medida espectrofotométrica a 234 nm.

Seleccionando bisulfito ( $\text{NaSO}_3\text{H}$ ), las primeras experiencias se encaminan a determinar si puede emplearse en determinaciones espectrofotométricas en el rango UV de medida de hidroperóxidos. Se emplean distintos volúmenes de diferentes disoluciones de bisulfito en concentraciones crecientes en un volumen final de 3 mL con agua desionizada para determinar su absorbancia a 234 nm. Se fijó como límite de incremento de absorbancia máximo permitido 0,5 unidades, que posibilite un margen razonable para la medida correcta espectrofotométrica de la reacción de hidroperoxidación.

Los resultados encontrados indican que para alcanzar un incremento de absorbancia en torno a 0,5 es necesario que al medio de reacción se adicionen 75  $\mu\text{L}$  de bisulfito al 40%, lo que supone una concentración en el medio del 1%. Por debajo de este valor, se puede emplear bisulfito sin que se interfiera en la medida espectrofotométrica.

Al trasladar el estudio preliminar realizado con agua desionizada como medio de reacción al medio de la reacción enzimática real, es decir, tampón fosfato 50 mM a pH 8, éste reacciona con el bisulfito incrementándose los valores de absorbancia por encima de 2 unidades, lo que significa que el medio es completamente opaco a 234 nm y no hay posibilidad de monitorizar la reacción. Aunque todo el estudio de puesta a punto de la medida de actividad está realizado con el uso de tampón fosfato como medio de reacción, con el objetivo de encontrar un sistema de estabilización de la reacción, se plantea la posibilidad de sustituir ese tampón de trabajo por tampón borato con idéntica molaridad y pH. Se comprueba que este tampón no absorbe en la longitud de onda de trabajo y se observa que para un volumen final de 3 mL la adición de 20  $\mu\text{L}$  de bisulfito al 4% provoca un incremento de absorbancia en torno a 0,5 unidades.

Seleccionado el tampón borato, se comprueba la actividad de la enzima en este nuevo medio de reacción. Empleando idénticas condiciones a las descritas en la puesta a punto del método de medida de actividad para LOX de soja tipo I, se obtiene una actividad enzimática de  $1,72 \times 10^{-4}$   $\mu\text{moles/s}$ . Al repetir el ensayo añadiendo al medio de reacción 20  $\mu\text{L}$  de disolución bisulfito al 4%, no solo no se paraliza la reacción como sería lo deseable sino que aparece una mayor formación de hidropéroxido, probablemente generada por estimulación de la reacción de *aparente* hidroperoxidación espontánea. Se concluye que el empleo de bisulfito no es adecuado para estabilizar la reacción.

Por los resultados hallados durante la puesta a punto del método de medida de actividad de lipoxigenasa se ha establecido que la *aparente* hidroperoxidación espontánea de ácido linoleico es inferior en un medio básico por lo que un cambio sustancial del pH al final de la reacción podría contribuir a desnaturalizar la enzima, paralizando su actividad y disminuyendo la formación espontánea de hidropéroxidos, consiguiendo un efecto de paralización de la formación global de hidropéroxidos. Se utiliza una disolución de hidróxido sódico 2 M que no interfiere en la medida

espectrofotométrica y que permite retomar el uso de tampón fosfato. Se determina, mediante una experiencia escalada, que son necesarios 130  $\mu\text{L}$  de hidróxido sódico 2 M o 48  $\mu\text{L}$  de concentración 5 M para que 3 mL de tampón fosfato 50 mM a pH 8 pase a pH 12. Teniendo en cuenta estas proporciones se emplean cantidades crecientes en el medio donde transcurre la reacción enzimática. En la Tabla 16 se exponen los resultados de actividad enzimática obtenidos en condiciones normales de trabajo y paralizando la reacción.

**Tabla 16. Paralización de la actividad LOX de soja tipo I con disoluciones de hidróxido sódico 2 M y 5 M. Condiciones de reacción: 10  $\mu\text{L}$  de disolución LOX de soja tipo I en agua desionizada (0,4 mg/mL), 50  $\mu\text{L}$  de ácido linoleico (71,5 mM), medio de reacción tampón fosfato sódico 50 mM pH 8, volumen final 3 mL.**

Actividad nativa ( $\mu\text{moles/s}$ )	Volumen de NaOH 5 M empleado ( $\mu\text{L}$ )	Actividad residual ( $\mu\text{moles/s}$ )
$4,32 \times 10^{-4}$	48	$1,45 \times 10^{-4}$
$4,33 \times 10^{-4}$	50	$1,71 \times 10^{-4}$
$4,33 \times 10^{-4}$	60	$8,87 \times 10^{-5}$
$4,68 \times 10^{-4}$	100	$6,63 \times 10^{-5}$
Actividad nativa ( $\mu\text{moles/s}$ )	Volumen de NaOH 2 M empleado ( $\mu\text{L}$ )	Actividad residual ( $\mu\text{moles/s}$ )
$5,41 \times 10^{-4}$	130	$2,12 \times 10^{-4}$
$5,06 \times 10^{-4}$	200	$8,95 \times 10^{-6}$
$4,78 \times 10^{-4}$	300	$4,29 \times 10^{-6}$

Valores medios ( $n = 3$ ).

Sólo en condiciones muy drásticas, 100  $\mu\text{L}$  de hidróxido sódico 5 M o 300  $\mu\text{L}$  a concentración 2 M, se consigue disminuir la actividad en 1 y hasta 2 órdenes de magnitud, aunque se detecta un comportamiento errático de los datos. De esta forma, incrementos progresivos en la concentración de hidróxido sódico, entre 48 y 60  $\mu\text{L}$  para la concentración 5 M y entre 130 y 200  $\mu\text{L}$  para la concentración 2 M, se observa un descenso en la actividad.

Considerando estos resultados, el empleo de una sustancia que cambie drásticamente el pH del medio de reacción (a un entorno alcalino) es una buena alternativa para conseguir detener y estabilizar las reacciones de formación de hidroperóxido, sin embargo, una disolución de alta concentración en agua ha mostrado tener limitadas aplicaciones. Se optó por emplear una disolución, también fuertemente alcalina, pero en este caso en medio orgánico. Se preparó una disolución de hidróxido potásico en metanol al 20% (p/v) que se ensaya como disolución paralizante de la reacción de hidroperoxidación y estabilizante de los hidroperóxidos formados. Los fundamentos para emplear esta disolución son análogos a los utilizados en el caso de la disolución de hidróxido sódico, pero en este caso se cuenta además con el poder desnaturizante del disolvente orgánico, que puede contribuir a detener de forma más eficiente la actividad enzimática.

Para determinar el rango de concentración de hidróxido potásico en metanol necesaria para detener la reacción se ensayan cantidades crecientes, partiendo de 20  $\mu\text{L}$ , que se adicionan al medio en el que transcurre la reacción. Al añadir 90  $\mu\text{L}$  se observan los valores más bajos de actividad (Tabla 17) que prácticamente llegan a cero y suponen un descenso hasta casi un 0,6% de la actividad original formadora de hidroperóxidos.

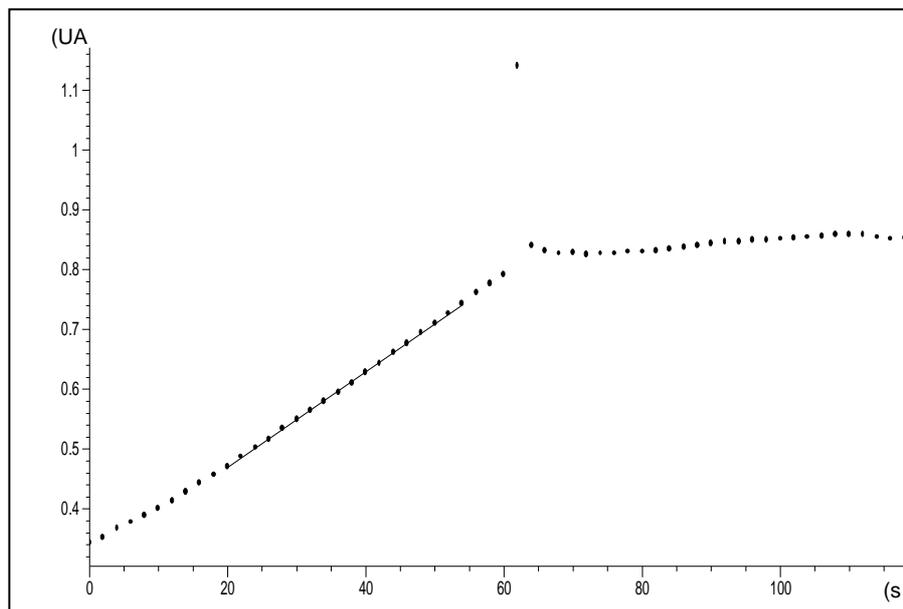
**Tabla 17. Paralización de la actividad LOX de soja tipo I con disolución metanólica de hidróxido potásico 20% (p/v). Condiciones de reacción 10  $\mu$ L de disolución LOX de soja tipo I en agua desionizada (0,4 mg/mL), 50  $\mu$ L de ácido linoleico (71,5 mM), medio de reacción tampón fosfato sódico 50 mM pH 8, volumen final 3 mL.**

Actividad nativa ( $\mu$ moles/s)	Volumen de KOH/MeOH ( $\mu$ L)	Actividad residual ( $\mu$ moles/s)	Actividad residual (%)
$2,72 \times 10^{-4}$	20	$2,57 \times 10^{-4}$	94,5
$3,56 \times 10^{-4}$	30	$2,67 \times 10^{-4}$	75,0
$2,42 \times 10^{-4}$	40	$1,57 \times 10^{-4}$	64,9
$2,47 \times 10^{-4}$	50	$9,22 \times 10^{-5}$	37,3
$3,31 \times 10^{-4}$	60	$8,79 \times 10^{-5}$	26,6
$3,21 \times 10^{-4}$	70	$3,55 \times 10^{-5}$	11,1
$3,00 \times 10^{-4}$	80	$1,82 \times 10^{-6}$	0,61
$2,72 \times 10^{-4}$	90	$1,77 \times 10^{-6}$	0,65

Valores medios (n = 3).

De los resultados obtenidos se deduce que el hidróxido potásico en metanol es idóneo para detener la reacción de hidropoxidación. La Figura 29 representa la monitorización de la reacción de hidropoxidación durante 2 minutos en la que se observa el cambio de tendencia en la reacción cuando se produce la adición de la disolución metanólica. En la puesta a punto del método se utiliza el primer minuto para establecer la actividad; por encima de este tiempo la reacción progresa aunque los valores no se tienen en cuenta para evitar errores fotométricos o por agotamiento del sustrato. En la Figura 29 se aprecia como durante el primer minuto el crecimiento en la concentración de hidropéroxidos es lineal con el tiempo, lo que se corresponde con una reacción que transcurre bajo cinética de orden cero por saturación con sustrato. En el segundo 60 de la reacción se produce la adición al medio de reacción de 90  $\mu\text{L}$  disolución metanólica de hidróxido potásico al 20% (p/v). Se produce un salto en la absorbancia por el cambio de composición en el medio de reacción pero desde el momento de la adición la línea pasa a ser prácticamente plana, ya que las oscilaciones observadas se deben a que la adición de la disolución estabilizadora se realiza durante la medida y no se puede realizar una correcta homogeneización. Esto implica que no existe formación ni química ni enzimática de nuevos compuestos que absorban a 234 nm. La horizontalidad de la línea pone de manifiesto también que no existe destrucción de los que previamente se habían formado. Se puede concluir que la disolución metanólica empleada es un eficaz paralizante de la formación de hidropéroxidos y estabilizante de los existentes.

Las condiciones ensayadas suponen una concentración de enzima y sustrato fijas en el medio de reacción, y para estas condiciones el uso de 90  $\mu\text{L}$  de disolución metanólica de hidróxido potásico al 20% (p/v) es suficiente para detener la reacción. Para garantizar que la reacción esté detenida más allá de posibles fluctuaciones en las concentraciones de enzima y sustrato en el medio de reacción, se repite la experiencia cambiando las concentraciones de enzima y sustrato manteniendo constante el volumen final (3 mL) y al que se adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de hidróxido potásico en metanol al 20% (p/v) en todos los casos para paralizar la reacción. Los datos de actividad obtenidos se presentan en la Tabla 18.



**Figura 29.-** Determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática en una disolución de LOX de soja tipo I. El volumen de reacción contiene LOX de soja tipo I en concentración 1,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y ácido linoleico en concentración 0,715 mM en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 8. En el segundo 60 se adicionan 90  $\mu\text{L}$  de hidróxido potásico en metanol al 20% (p/v).

**Tabla 18. Paralización de la actividad LOX de soja tipo I con 90  $\mu\text{L}$  de disolución metanólica de hidróxido potásico 20% (p/v) en condiciones cambiantes de concentración de enzima y sustrato. Volumen de reacción 3 mL.**

Disolución enzimática ( $\mu\text{L}$ ; 0,4 mg/mL)	Sustrato ( $\mu\text{L}$ ; 71,5 mM)	Actividad nativa ( $\mu\text{moles/s}$ )	Actividad residual ( $\mu\text{moles/s}$ )	Actividad residual (%)
10	30	$8,72 \times 10^{-5}$	$5,61 \times 10^{-6}$	6,43
15	30	$1,32 \times 10^{-4}$	$2,46 \times 10^{-6}$	1,86
20	30	$2,62 \times 10^{-4}$	$2,72 \times 10^{-6}$	1,04
10	40	$4,97 \times 10^{-5}$	$1,29 \times 10^{-6}$	2,60
15	40	$1,51 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-6}$	0,81
20	40	$2,32 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-6}$	0,57
10	50	$4,45 \times 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-6}$	7,17
15	50	$8,02 \times 10^{-5}$	$4,58 \times 10^{-6}$	5,71
20	50	$1,98 \times 10^{-4}$	$8,88 \times 10^{-6}$	4,48

Valores medios (n = 3).

Con el volumen de disolución metanólica empleado, las actividades residuales encontradas son bajas pero no despreciables, teniendo en cuenta además que con LOX de soja tipo I el pH del medio está en torno a 8, por lo que conseguir condiciones altamente alcalinas que estabilicen los hidroperóxidos formados no resulta complicado. Sin embargo con el resto de LOX cuyo pH óptimo de actividad se sitúa en torno a 6, como por ejemplo con LOX de soja tipo V, desplazar el pH hasta zonas más alcalinas resulta más complejo, por lo que se opta en emplear en todos los casos 150  $\mu$ L como volumen de disolución metanólica de hidróxido potásico (20% p/v) a adicionar al medio de reacción para paralizar la formación enzimática y no enzimática de hidroperóxidos y conseguir su estabilización en el medio.

LOX de soja tipo I se ha empleado como modelo para la puesta a punto del sistema de parálisis de la reacción y los resultados obtenidos serán aplicados finalmente a la actividad de LOX de soja tipo V cuyo pH óptimo se sitúa entre 6 y 6,5. LOX de soja tipo V es el análogo vegetal en cuanto a requerimientos y productos de reacción a la que se encuentra en el epitelio intestinal responsable del desencadenamiento de la cascada de reacciones que acompañan a la respuesta inflamatoria. Se emplea una disolución enzimática de LOX de soja tipo V comercial a concentración 0,072 mg/mL con una actividad declarada de 701000 UA/mg; las condiciones de reacción y medida fueron análogas a las descritas en la puesta a punto del método de medida de actividad de LOX de soja tipo I. Para comprobar que la reacción se paraliza y aún se cuenta con margen suficiente para cubrir oscilaciones en la actividad de la enzima se ensayan distintas concentraciones de enzima y sustrato en el medio de reacción. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19. Paralización de la actividad LOX de soja tipo V con 100  $\mu$ L disolución metanólica de hidróxido potásico 20% (p/v) en condiciones cambiantes de concentración de enzima y sustrato. Volumen de reacción 3 mL.**

Reacción a pH 6				
Disolución enzimática ( $\mu$ L; 0,072 mg/mL)	Sustrato ( $\mu$ L; 71,5 mM)	Actividad nativa ( $\mu$ moles/s)	Actividad residual ( $\mu$ moles/s)	Actividad residual (%)
10	30	$1,10 \times 10^{-3}$	$2,06 \times 10^{-5}$	1,87
20	30	$1,39 \times 10^{-3}$	$5,13 \times 10^{-5}$	3,69
30	30	$1,52 \times 10^{-3}$	$2,84 \times 10^{-5}$	1,87
10	50	$1,65 \times 10^{-3}$	$7,19 \times 10^{-6}$	0,44
20	50	$1,87 \times 10^{-3}$	$9,22 \times 10^{-6}$	0,49
30	50	$1,91 \times 10^{-3}$	$4,61 \times 10^{-5}$	2,41

Reacción a pH 6,5				
Disolución enzimática ( $\mu$ L; 0,072 mg/mL)	Sustrato ( $\mu$ L; 71,5 mM)	Actividad nativa ( $\mu$ moles/s)	Actividad residual ( $\mu$ moles/s)	Actividad residual (%)
10	30	$2,05 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-5}$	0,57
20	30	$2,05 \times 10^{-3}$	$5,11 \times 10^{-6}$	0,25
30	30	$1,81 \times 10^{-3}$	$5,57 \times 10^{-6}$	0,31
10	50	$1,64 \times 10^{-3}$	$2,84 \times 10^{-6}$	0,17
20	50	-	$7,21 \times 10^{-6}$	-
30	50	-	$8,50 \times 10^{-6}$	-

Valores medios (n = 3).

- La saturación de la señal impide determinar el valor de absorbancia y por tanto estimar la actividad.

El primer hecho a destacar al adicionar la disolución de potasa metanólica es que el medio de reacción se clarifica notablemente, probablemente debido a una mejor solubilización del sustrato, ácido linoleico, en un medio altamente alcalino. Tanto a pH 6 como 6,5 la adición de disolución metanólica de hidróxido potásico al 20% (p/v) reduce la actividad formadora de hidroperóxidos entre 2 y 3 órdenes de magnitud situando la actividad residual en menos de un 4% a pH 6 e inferior al 1% para pH 6,5. En la experiencia a pH 6,5, cuando se utilizan 50  $\mu\text{L}$  de ácido linoleico y cantidades de extracto enzimático por encima de 10  $\mu\text{L}$ , la actividad medida no resulta fiable ya que se sobrepasaron valores de absorbancia que saturan la señal en el primer minuto de reacción. Sin embargo, hay que destacar que incluso en condiciones de actividad elevada se consigue reducir la actividad formadora de hidroperóxidos a niveles similares a los obtenidos con concentraciones inferiores de enzima y sustrato. Se puede concluir que la disolución metanólica empleada es adecuada para detener la reacción enzimática tanto con LOX de soja tipo I como con la tipo V y que los posteriores estudios sobre los compuestos formados en el medio de reacción por actuación de la enzima LOX son sólo y exclusivamente aquellos que se forman durante el tiempo de actuación de la enzima.

### Conclusión

La actividad lipoxigenasa puede ser paralizada con la utilización de agentes químicos que, además, consiguen la estabilización de los hidroperóxidos formados durante la reacción y los debidos a la hidroperoxidación espontánea. El agente utilizado como paralizador la de actividad lipoxigenasa y estabilizador de los hidroperóxidos formados es una disolución de hidróxido potásico en metanol al 20% (p/v) que permitirá la posterior cuantificación cromatográfica de los hidroperóxidos.

### **Medida de la actividad de lipoxigenasa de tejido animal**

El método de medida de actividad lipoxigenasa, puesto a punto con las lipoxigenasas de soja tipos I y V, se emplea como base para medir la actividad LOX en tejido epitelial de intestino animal. El primer punto a resolver es la extracción de la enzima. Las primeras experiencias realizadas son de tipo cualitativo con extractos obtenidos a partir de una sección evertida de intestino de cerdo. El procedimiento inicialmente adoptado es estrictamente empírico. Al tratarse de una enzima de ubicación epitelial, se aplican procedimientos mecánicos tendentes a su extracción y solubilización. Sobre una placa de cristal se corta longitudinalmente la sección de intestino y se procede al raspado de la mucosa con un portaobjetos de microscopía. El raspado se resuspende en 25 mL de tampón fosfato 50 mM a pH 6,5 que constituye el tampón de extracción. La suspensión se sonica 20 minutos sin aplicar temperatura, y se centrifuga a  $3600 \times g$  durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante es la fracción donde se encuentra la actividad LOX.

La actividad LOX del extracto enzimático se determina haciendo reaccionar una cantidad concreta del extracto enzimático con una cantidad concreta de su sustrato específico en un medio de reacción que, inicialmente, presenta idénticas características a las del tampón de extracción. A la cubeta espectrofotométrica se adicionan distintas cantidades de extracto enzimático frente a una cantidad constante de 30  $\mu\text{L}$  de sustrato y tampón de reacción hasta alcanzar un volumen final constante de 3 mL. En el medio de reacción la concentración alcanzada de sustrato es de 0,715 mM. La adición de cantidades variables de extracto enzimático se efectúa para garantizar la condición de saturación por sustrato. La reacción se deja transcurrir durante 1 minuto y se toma el intervalo de tiempo comprendido entre los segundos 20 y 55 de la reacción para el cálculo del incremento de absorbancia, y consecuentemente de actividad enzimática, por segundo (Tabla 20). Se define como actividad enzimática específica la actividad que muestra el extracto enzimático por cada  $\mu\text{L}$  empleado, descontando previamente toda aquella actividad que no se deba a la actuación de la enzima, es decir, se resta a la actividad medida aquella que se debe a la propia auto-oxidación del ácido linoleico en ausencia de enzima activa y el resultado encontrado se divide por la cantidad de microlitros de extracto enzimático empleado. En condiciones de saturación por sustrato el valor de actividad específica debe ser aproximadamente el mismo, independientemente de la cantidad de

enzima empleada. Esta unidad independiza la medida del volumen de extracto empleado y permite comparaciones cuantitativas con otros extractos y otras condiciones de extracción.

En la práctica el cálculo de la actividad enzimática específica se realiza no empleando un solo valor sino una nube de puntos de actividad medida con distintas concentraciones de extracto enzimático y correlacionando linealmente los valores de actividad encontrados frente a los volúmenes de extracto enzimático empleados. De la recta obtenida, la pendiente es la *actividad enzimática específica media* y la ordenada en el origen la *cantidad de hidroperóxidos formados de forma aparentemente espontánea*. Con los datos de la Tabla 20, la *actividad enzimática específica media* del extracto de LOX del epitelio intestinal es  $17 \times 10^{-6} \mu\text{mol}/(\text{s} \times \mu\text{L de extracto enzimático})$  según la recta que presenta un valor de  $R^2_{\text{Adj.}} = 0,950$  ( $p < 0,01$ ), y una tasa de *aparente* hidroperoxidación espontánea de  $0,001296 \mu\text{mol}/\text{s}$ .

En la Tabla 21 se exponen los resultados de las pruebas de paralización de la formación de hidroperóxidos y su estabilización mediante la adición de la disolución metanólica de hidróxido potásico al 20% (p/v) en la mezcla de reacción en la que está actuando LOX de epitelio intestinal. De los datos se deduce que el extracto enzimático tiene una *actividad enzimática específica media* de  $13 \times 10^{-6} \mu\text{mol}/(\text{s} \times \mu\text{L de extracto enzimático})$  con un valor de  $R^2_{\text{Adj.}} = 0,943$  ( $p < 0,01$ ), ligeramente inferior al obtenido con los datos presentados en la Tabla 16. Tras la adición de la disolución metanólica, la *actividad enzimática específica media* cae en más de tres órdenes de magnitud, situándose prácticamente en torno a cero. Matemáticamente la *aparente* hidroperoxidación espontánea residual es ligeramente superior a la medida en los extractos enzimáticos, lo que provoca que la actividad específica residual adopte valores negativos y el porcentaje de actividad residual sea también negativo, lo que es coherente matemáticamente, pero sólo refleja que la reacción tanto espontánea como enzimática están paralizadas.

**Tabla 20. Actividad enzimática (AE) de LOX en el extracto enzimático de mucosa epitelial de intestino de cerdo. Concentración de sustrato 0,715 mM. Volumen de reacción 3 mL.**

Extracto enzimático ( $\mu\text{L}$ )	AE ( $\mu\text{moles/s}$ )
0	$1,29 \times 10^{-3}$
5	$1,36 \times 10^{-3}$
10	$1,51 \times 10^{-3}$
15	$1,54 \times 10^{-3}$
20	$1,62 \times 10^{-3}$

Valores medios ( $n = 3$ ).

**Tabla 21. Actividad enzimática (AE) de LOX en el extracto enzimático de mucosa epitelial de intestino de cerdo en ausencia (nativa) y presencia (residual) de 100  $\mu\text{L}$  de disolución metanólica de hidróxido potásico al 20% (p/v). Concentración de sustrato 0,715 mM, volumen de reacción 3 mL.**

Extracto enzimático ( $\mu\text{L}$ )	AE nativa ( $\mu\text{moles/s}$ )	AE residual ( $\mu\text{moles/s}$ )	Actividad residual (%)
0	$1,31 \times 10^{-3}$	$7,18 \times 10^{-6}$	0
5	$1,42 \times 10^{-3}$	$3,58 \times 10^{-6}$	0
10	$1,49 \times 10^{-3}$	$3,35 \times 10^{-6}$	0
15	$1,53 \times 10^{-3}$	$5,72 \times 10^{-6}$	0
20	$1,58 \times 10^{-3}$	$1,74 \times 10^{-6}$	0

Valores medios (n = 3).

Establecida la presencia de LOX en el epitelio intestinal se procedió a determinar la actividad del extracto a distintos valores de pH del tampón de reacción. Se empleó como base del estudio tampón fosfato sódico 50 mM y la finalidad fue encontrar cuál es el pH óptimo en el que se dé la mayor actividad enzimática o, en su defecto, ajustarlo para que, con la mayor fiabilidad posible, se obtengan valores de actividad aceptables.

El primer barrido de pH se realiza entre los valores 5 y 8. Se obtienen datos de actividad en  $\mu\text{moles/s}$  que muestran cantidades crecientes de extracto enzimático (0, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{L}$ ) en presencia de una concentración 0,715 mM con un volumen final de reacción de 3 mL en tampón fosfato 50 mM ajustado a distintos valores de pH. Los resultados obtenidos se representan frente a las cantidades de extracto utilizado en  $\mu\text{L}$  para calcular la *actividad enzimática específica media* en  $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \mu\text{L})$ , y el coeficiente de determinación con error experimental (Tabla 22). De los resultados obtenidos se observa que la situación en la que se obtiene una mayor actividad del extracto enzimático y una mejor reproducibilidad ( $R^2_{\text{Adj.}} = 0,995$ ;  $p < 0,01$ ) es en la que se utiliza el tampón de reacción a pH 5. Conjugando mayor actividad y mejor reproducibilidad, le siguen, en orden decreciente, las medidas realizadas a pH 6 porque, aun no siendo las que dan una mayor actividad, muestran un alto coeficiente de determinación con error experimental ( $R^2_{\text{Adj.}} = 0,980$ ;  $p < 0,01$ ). Con el fin de afinar aun más en el óptimo de actividad de la enzima se hace un estudio detallado de la *actividad enzimática específica media* en el entorno de pH 5 y 6. Los resultados se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 22. Actividad enzimática específica (AEE) del extracto de LOX de epitelio intestinal de intestino de cerdo a distintos valores de pH.**

	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
AEE ( $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \mu\text{L})$ )	$0,56 \times 10^{-4}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,19 \times 10^{-4}$	$0,03 \times 10^{-3}$
$R^2_{\text{Adj.}}$	0,995	0,980	0,944	0,121

Valores medios ( $n = 3$ ). Los valores del estadístico p son inferiores a 0,01 excepto para el experimento a pH 8 ( $p = 0,30$ ) y por tanto la determinación no resulta significativa.

**Tabla 23. Actividad enzimática específica (AEE) del extracto de LOX de epitelio intestinal de intestino de cerdo en los entornos de pH 5 y 6.**

	pH 5				
	pH 4,8	pH 4,9	pH 5	pH 5,1	pH 5,2
AEE ( $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \mu\text{L})$ )	$0,32 \times 10^{-4}$	$0,48 \times 10^{-4}$	$0,13 \times 10^{-4}$	$0,06 \times 10^{-4}$	$0,07 \times 10^{-4}$
$R^2_{\text{Adj.}}$	0,994	0,845	0,943	0,806	0,456

	pH 6				
	pH 5,8	pH 5,9	pH 6	pH 6,1	pH 6,2
AEE ( $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \mu\text{L})$ )	$0,24 \times 10^{-4}$	$0,19 \times 10^{-4}$	$0,14 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-4}$	$0,16 \times 10^{-4}$
$R^2_{\text{Adj.}}$	0,996	0,937	0,980	0,891	0,925

Valores medios ( $n = 3$ ). Los valores del estadístico  $p$  son inferiores a 0,01 excepto para el experimento a pH 5,2 ( $p = 0,13$ ) y por tanto la determinación no resulta significativa.

En el entorno de pH 5, hay una baja reproducibilidad y no se observa coherencia entre los datos obtenidos para pH 5 de la Tabla 22 y los representados en Tabla 23. Además, leves incrementos de pH ocasionan grandes cambios de actividad, lo que convierte a este entorno de medida en una zona poco favorable para el trabajo con el extracto enzimático obtenido del tejido epitelial. Sin embargo, dentro de esta zona de pH es donde se ha observado la mayor actividad medida y con coeficiente de determinación con error experimental muy elevado (a pH 4,8 la actividad es  $0,32 \times 10^{-4}$   $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \mu\text{L})$  con  $R^2_{\text{Adj.}} = 0,994$ ;  $p < 0,01$ ). Es por eso por lo que se emplea el tampón de reacción a pH 4,8 para ensayar la actividad de extractos enzimáticos realizados con tampones de extracción a distintas concentraciones (tampón fosfato sódico pH 6,5 a 50 mM, 100 mM, 150 mM y 200 mM) y el efecto del uso de detergentes no iónicos durante la extracción enzimática (Tween 20 y Tritón X-100).

Para analizar la implicación de la fuerza iónica del tampón de extracción en la cantidad de enzima extraído y consecuentemente en su actividad neta, se realizó un estudio empleando tampones de distinta molaridad a un pH fijo. Se emplearon tampones fosfato a pH 6,5 con las siguientes molaridades: 50, 100, 150, y 200 mM. Como material biológico se utilizó en cada tampón un determinado peso de muestra de tejido epitelial de intestino que se suspende en 1 mL de tampón de extracción. La mezcla se sonica 20 minutos sin usar temperatura y finalmente se centrifuga 5 minutos a  $3600 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante constituye el extracto enzimático.

De cada extracto se obtienen por triplicado los datos de actividad en  $\mu\text{moles}/\text{s}$  que muestran cantidades crecientes de extracto enzimático (0, 10, 20 y 30  $\mu\text{L}$ ) en presencia de una concentración 0,715 mM de sustrato con un volumen final de reacción de 3 mL en tampón fosfato 50 mM a pH 4,8. Los datos obtenidos se normalizan considerando la cantidad de tejido a partir del cual se obtiene el extracto ( $\mu\text{moles}/(\text{s} \times g)$ ) que se correlaciona linealmente frente a las cantidades de extracto utilizado en  $\mu\text{L}$ . El resultado es una recta de regresión, cuya pendiente es la actividad de la reacción expresada en  $\mu\text{moles}/(\text{s} \times g \times \mu\text{L})$ , con un coeficiente de determinación con error experimental que, junto con el valor de significación estadística ( $p$ ), indica el grado de fiabilidad de la medida (Tabla 24). Teniendo en cuenta los datos, se podría decir que el tampón de reacción con el que se obtiene una mayor respuesta de actividad

enzimática es el de concentración 100 mM. Sin embargo, y observando que no hay grandes diferencias entre los resultados obtenidos con las distintas concentraciones, se selecciona como tampón de extracción el de concentración 50 mM, con el que se alcanza el valor más alto de coeficiente de determinación con error experimental.

**Tabla 24. Actividad enzimática específica en función de la molaridad del tampón de extracción.**

	molaridad del tampón de extracción (tampón fosfato sódico pH 6,5)			
	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
AEE ( $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \text{g} \times \mu\text{L})$ )	$9,88 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^{-3}$	$1,26 \times 10^{-3}$
$R^2_{\text{Adj}}$	0,990	0,943	0,934	0,924

Valores medios ( $n = 3$ ). Los valores del estadístico  $p$  son inferiores a 0,01 en todos los casos.

Seleccionado el tampón de extracción, se ensaya el efecto del uso de Tween 20 y Tritón X-100, dos detergentes habituales para la extracción de enzimas con cierto grado de liposolubilidad o que se encuentren ancladas a membrana, durante el proceso de extracción. Se utiliza cada detergente a dos niveles de concentración (0,5% y 1%) disueltos en tampón de extracción, (fosfato 50 mM, pH 6,5). Se prepara también un extracto control libre de detergentes. El procedimiento operativo es análogo al descrito en el apartado anterior en el que se estableció la molaridad idónea del tampón de extracción. Los resultados se exponen en la Tabla 25 y se expresan como *actividad enzimática normalizada*, es decir actividad medida dividida por el peso de muestra empleado. No es posible concretar la *actividad enzimática específica* ya que no existe correlación entre la *actividad enzimática normalizada* y el peso de muestra empleado.

En los datos obtenidos de las experiencias con detergentes, independientemente de las cantidades y el tipo usado, se observa que el uso de los mismos no contribuye a la obtención de una mayor actividad consecuencia de una extracción más eficiente. Y no sólo eso sino que, además, conforme se incrementa la cantidad de extracto usado para determinar la actividad enzimática, menor es la misma. Las causas de este comportamiento se desconocen aunque claramente la presencia de estas dos sustancias ha complicado enormemente el curso de la reacción inicial. En cualquier caso se puede decir que ambos detergentes no son útiles a la hora de conseguir extractos en los que la actividad enzimática sea mayor a la que se obtiene en la experiencia control. Por tanto, se puede concluir con que el efecto de la molaridad del tampón de extracción es suficiente para romper las células por choque osmótico, lo que originaría la liberación enzimática.

**Tabla 25. Actividad normalizada de LOX en extractos enzimáticos obtenidos utilizando detergentes no iónicos (Tritón X-100 o Tween 20) a distintas concentraciones.**

Experiencia	μL de extracto usado	Actividad (μmoles/(s × g))
Tritón 0,5%	0	$3,70 \times 10^{-3}$
	10	$4,25 \times 10^{-3}$
	20	$2,39 \times 10^{-3}$
	30	$2,01 \times 10^{-3}$
Tritón 1%	0	$4,04 \times 10^{-3}$
	10	$10,40 \times 10^{-3}$
	20	$6,16 \times 10^{-3}$
	30	$4,32 \times 10^{-3}$
Tween 0,5%	0	$4,03 \times 10^{-2}$
	10	$7,26 \times 10^{-2}$
	20	$3,72 \times 10^{-2}$
	30	$2,39 \times 10^{-2}$
Tween 1%	0	$4,06 \times 10^{-2}$
	10	$4,37 \times 10^{-2}$
	20	$2,16 \times 10^{-2}$
	30	$1,23 \times 10^{-2}$
Control	0	$4,55 \times 10^{-2}$
	10	$11,46 \times 10^{-2}$
	20	$16,45 \times 10^{-2}$
	30	$33,82 \times 10^{-2}$

Valores medios (n = 3).

Todo el estudio de puesta a punto de pH de extracción y empleo de detergentes, se ha realizado al pH óptimo de actuación de la enzima para observar de forma más amplificada los posibles cambios en la actividad. Sin embargo, al tratarse de un estudio que se va a realizar sobre LOX de epitelio intestinal, las medidas se efectuarán al pH al que normalmente van a estar las muestras de tejido, en torno a 6.

Generalmente en la medida de actividad LOX, y de otras enzimas, obtenidas a partir de tejido se suele diferenciar la actividad en las distintas fracciones sub-celulares. De esta forma, lo más habitual es determinar la actividad en las fracciones microsomal y citosólica, que se suelen obtener del tejido a partir de un protocolo de centrifugación diferencial. Stohs y colaboradores en 1976 extraen la fracción microsomal de intestino de rata usando una disolución isotónica de cloruro potásico que contiene Tris-HCl 0,05 M a pH 7,8. El tejido se homogeniza en este tampón y se centrifuga a  $10000 \times g$  (20 min a  $4^\circ C$ ) para recuperar el sobrenadante que se centrifuga a  $105000 \times g$  durante 60 minutos. El pellet resultante es la fracción microsomal. Ponz de Leon y colaboradores en 1985 también extraen la fracción microsomal de muestras de intestino. Tras raspar la mucosa y homogeneizarla en tampón fosfato 0,154 mM a pH 6, la centrifugan a  $20000 \times g$  y el sobrenadante resultante se ultracentrífuga a  $100000 \times g$ , representando el sedimento la fracción microsomal. En 1993, Shornick y Holtzman extraen la fracción microsomal a partir de un cultivo celular para ensayar actividad de 12-LOX. Tras homogeneizar la suspensión celular, la mezcla se centrifuga a  $400 \times g$  y el sobrenadante se centrifuga a  $12000 \times g$  20 min. Descartado el pellet, se ultracentrífuga a  $100000 \times g$  durante 60 min, obteniendo un pellet que constituye la fracción microsomal.

La metodología adoptada para el estudio de la actividad LOX en las fracciones citosólica y microsomal es una modificación de los métodos de Pind y Kuksis, 1987, y de Rosenberg y Kappas, 1989. Inicialmente se preparan dos disoluciones tampón que se designan tampón A y tampón B. El tampón A está constituido por fosfato potásico 0,1 M y pH 7,4, que contiene sacarosa 0,25 M, glicerina (20%, v:v) e inhibidor de tripsina (5 mg/mL). El tampón B es un tampón 50 mM de Tris-HCl a pH 7,4, que contiene 1 mM de EGTA, 4 mM de  $MgCl_2$  y 1 mM de DTT. La muestra de intestino se tiene inicialmente congelada y para su descongelación se sumerge en tampón A, sin el inhibidor de tripsina. Todas las operaciones se realizan en baño de hielo y con los reactivos a temperaturas

cercanas a 0 °C para provocar una muy lenta descongelación. Una vez descongelado, se raspa la superficie de la mucosa epitelial y se homogeneiza en, aproximadamente, 5 volúmenes de tampón A con el inhibidor de tripsina. La homogeneización del tejido se realiza en un homogeneizador Potter-Elvehjem efectuando 7 golpes de pistón. Se completa el homogeneizado sonicando en 3 pulsos de 1 s. A partir de aquí se inicia la centrifugación diferencial. La primera centrifugación es a  $9000 \times g$  durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se ultracentrífuga a  $103700 \times g$  durante 90 min a 4 °C y el resultado conforma la fracción citosólica (sobrenadante) y la fracción microsomal (pellet) que se lava con 1 volumen de tampón B y se vuelve a centrifugar a  $103700 \times g$  durante 60 min a 4 °C. El pellet resultante se resuspende con el Potter-Elvehjem en un volumen suficiente de tampón B para que la concentración de proteínas esté en el entorno de 5 mg/mL. La concentración de proteínas de las dos fracciones se determina por el método del ácido bicinonínico descrito por Smith y colaboradores (1985).

Se determina según la metodología previamente puesta a punto la actividad LOX de los extractos obtenidos y se compara con la que se alcanza al emplear LOX de soja tipo V a concentración 0,072 mg/mL. Los resultados, al conocerse aquí la cantidad de proteína existente en cada volumen de extracto enzimático empleado, se refieren en este caso, a dicho valor para establecer la *actividad enzimática específica* (Tabla 26). Según los datos presentados en la Tabla 26, se puede concretar que cada miligramo de proteína LOX de soja tipo V presenta una *actividad enzimática específica* un orden de magnitud superior a los valores que presentan las fracciones microsomal y citosólica de epitelio intestinal. Lógicamente el grado de purificación en el preparado comercial es significativamente superior que las fracciones sub-celulares, donde no todas las proteínas existentes tienen actividad del tipo lipoxigenasa.

**Tabla 26. Actividad enzimática relativa a la cantidad de proteína en LOX de soja tipo V y en las fracciones microsomal y citosólica de tejido epitelial de intestino de cerdo.**

	LOX de soja tipo V	microsomal	citosólica
concentración proteica (mg/mL)	0,072 mg/mL	6,12 mg/mL	8,85 mg/mL
AEE ( $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \text{mg})$ )	$7,66 \times 10^{-2}$	$4,74 \times 10^{-3}$	$2,80 \times 10^{-3}$
$R^2_{\text{Adj.}}$	0,990	0,993	0,978

Valores medios ( $n = 3$ ). Los valores del estadístico p son inferiores a 0,05 en todos los casos.

Pese a haber concretado que el método de extracción de fracción microsomal y citosólica mencionado es válido para determinar actividad LOX, la utilización de inhibidor de tripsina supone una complicación en el procedimiento de extracción, ya que se debe añadir al final del proceso de preparación del tampón A. Para evitar su utilización, se modifica el procedimiento de extracción de las fracciones microsomal y citosólica, usando también un método de centrifugación diferencial basado en el trabajo de Hong y colaboradores, 2001. Este procedimiento es el que se mantiene como definitivo, y es el que se describe para la obtención de las fracciones microsomal y citosólica de mucosa de epitelio intestinal en el apartado Materiales y Métodos. A las fracciones obtenidas con este procedimiento de extracción se les determina la concentración de proteínas por el método del ácido bicinonínico. Con estas fracciones también se determina la actividad que muestran por miligramo de proteína y se compara con los valores obtenidos empleando disolución LOX de soja tipo V a concentración 0,072 mg/mL (Tabla 27).

Con el procedimiento de extracción utilizado, la actividad LOX de las fracciones presenta valores diferentes a los expuestos en la Tabla 26. La actividad alcanzada en la fracción microsomal con el procedimiento definitivo de extracción está en el mismo rango de magnitud que en la fracción microsomal del protocolo anterior. Sin embargo, la actividad de la fracción citosólica en este segundo procedimiento es inferior a la obtenida con el primer protocolo. En cualquier caso, con ambos procedimientos se obtiene actividad de lipoxigenasa en ambas fracciones sub-celulares. El hecho de que los valores de actividad obtenidos sean diferentes o no, no es tan trascendente como el hecho de poder medir actividad lipoxigenasa en distintas fracciones sub-celulares. La existencia de actividad lipoxigenasa en el epitelio intestinal, y su consecuente determinación, puede justificar la implicación de enzimas tipo lipoxigenasa en los procesos de daño hidropoxidativo de la mucosa intestinal.

**Tabla 27. Actividad enzimática relativa a la cantidad de proteína en LOX de soja tipo V y en las fracciones microsomal y citosólica de tejido epitelial de intestino de cerdo obtenidas mediante el procedimiento de Hong y colaboradores (2001).**

	LOX de soja tipo V	microsomal	citosólica
concentración proteica (mg/mL)	0,072 mg/mL	4,47 mg/mL	8,81 mg/mL
AEE ( $\mu\text{moles}/(\text{s} \times \text{mg})$ )	$6,23 \times 10^{-2}$	$4,95 \times 10^{-3}$	$6,21 \times 10^{-4}$
$R^2_{\text{Adj.}}$	0,976	0,974	0,932

Valores medios (n = 3). Los valores del estadístico p son inferiores a 0,05 en todos los casos.

Utilizando el procedimiento de extracción descrito se han aislado las fracciones microsomal y citosólica de mucosa del epitelio intestinal de ratones APC<sup>Min</sup> que desarrollan una inflamación crónica intestinal congénita por ser heterocigotos respecto a este carácter frente a una población sana de ratones control, en los que no se manifiesta la enfermedad. En la Tabla 28 se representan los valores de actividad de LOX, expresada en  $\Delta$   $\mu$ moles de hidroperóxidos/(mg proteína  $\times$  seg), para las fracciones microsomal y citosólica de la mucosa intestinal de ambos grupo de población.

Se puede apreciar que la actividad LOX en la fracción citosólica siempre es menor que en la microsomal, ya se trate de los ratones afectados por el proceso inflamatorio o de ratones sanos. En el caso de los ratones afectados, la actividad LOX en la fracción citosólica es un 6,17% de la actividad LOX que se puede observar en la fracción microsomal. Por otra parte, en los ratones control la actividad LOX de la fracción citosólica representa un 19,88% de la determinada en la fracción microsomal. El hecho de que la actividad LOX sea mayor en la fracción microsomal que en la citosólica es una pauta que también se puede observar con las muestras cuyos datos se exponen en las Tablas 26 y 27. Esta reiteración de resultados reafirma el hecho de que la actividad LOX dependa del anclaje de la enzima a la membrana.

Si lo que se compara son las actividades de los ratones afectados frente a los controles, se observan tendencias distintas entre las fracciones microsomal y citosólica. La actividad lipoxigenasa en la fracción citosólica es menor en los ratones afectados por el proceso inflamatorio crónico que en los ratones controles. Como se observa en la Tabla 28, la actividad LOX en la fracción citosólica correspondiente a los ratones afectados es un 76,68% de la actividad medida en los ratones control. Sin embargo, la actividad LOX en la fracción microsomal de los ratones afectados es más del doble (247,15%) de la encontrada en el grupo control. Se debe tener en cuenta que los ratones APC<sup>Min</sup> desarrollan enfermedades de tipo inflamatorio intestinal, por lo que es de esperar que la actividad lipoxigenasa esté amplificada como respuesta al proceso inflamatorio en curso; en este caso la actividad de lipoxigenasa está unida a la membrana citoplasmática de las células del epitelio, probablemente para actuar como iniciador de la respuesta inflamatoria a nivel intra- y extracelular.

**Tabla 28. Actividad LOX en epitelio intestinal de ratón (*mus musculus*) tipo APC<sup>Min</sup> o control, distinguiendo fracción microsomal o citosólica. Se muestra el porcentaje de la actividad LOX citosólica frente a la microsomal.**

	Actividad LOX en fracción sub-celular <sup>a</sup>		
	Microsomal	citosólica	% <sup>c</sup>
APC <sup>Min</sup>	0,02773±0.0337 <sup>b</sup>	0,00171±0,0010	6,17
Control	0,01122±0.0052 <sup>b</sup>	0,00223±0,0008	19,88
% <sup>d</sup>	247,15	76,68	

<sup>a</sup> Valores medios ± desviación estándar expresados en  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido / (mg proteína x seg).

<sup>b</sup> Diferencias significativas (n = 15; test de Duncan; p < 0,05).

<sup>c</sup> Porcentaje de la actividad citosólica respecto a la microsomal en los ratones APC<sup>Min</sup> y control.

<sup>d</sup> Porcentaje de la actividad en los ratones APC<sup>Min</sup> respecto a la de los ratones control.

### Conclusión

La determinación de la actividad lipoxigenasa en el epitelio intestinal puede justificar la implicación de enzimas tipo lipoxigenasa en los procesos de estrés oxidativo en la mucosa intestinal. Que la actividad lipoxigenasa sea mayor en la fracción microsomal que en la citosólica ratifica el hecho de que la actividad enzimática depende del anclaje de la enzima a la membrana.

### **Cuantificación de hidroperóxidos por HPLC**

El sistema espectrofotométrico de cuantificación de hidroperóxidos muestra numerosas ventajas como la rapidez y sencillez de la determinación, y su bajo coste. En un corto periodo de tiempo es posible analizar numerosas muestras. Sin embargo, tiene dos desventajas relativamente importantes en función del objeto de la medida. En primer lugar, se trata de un método inespecífico, es decir, todo hidroperóxido que se forme será medido, sin poder discernir directamente su origen (enzimático o químico) o incluso si realmente se trata de hidroperóxidos o simplemente de un compuesto que paralelamente se está formando y que también absorbe a 234 nm (razón fundamental por la que se incluye un blanco enzimático de reacción y se tiene en cuenta al realizar la operación de cálculo). En segundo lugar, presenta una limitación operativa; al tratarse de un método espectrofotométrico no se puede superar la barrera de 2 unidades de absorbancia para evitar salir del rango de medida del aparato. La reacción de hidropoxidación es un proceso relativamente rápido, con componentes que presentan un elevado coeficiente de extinción ( $25000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , para los hidroperóxidos a 234 nm), razones por las que rápidamente se alcanza el techo de medida aunque en el medio de reacción exista poca cantidad de producto formado. La simple *aparente* hidropoxidación espontánea del ácido linoleico a pH 6 alcanza valores medios de 0,03 UA/s, lo que implica que en 5 min la absorbancia inicial habrá incrementado en ca. 1 unidad lo que disminuye la fiabilidad del seguimiento espectrofotométrico de la reacción cuando, cuantitativamente, sólo se habrán formado en dicho tiempo teóricamente 0,1  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxidos. La posibilidad de diluir el medio de reacción para permitir su seguimiento espectrofotométrico cambiaría las condiciones de reacción ya que, estadísticamente, reduce la interacción enzima-sustrato.

Es necesario contar con un procedimiento analítico alternativo que permita eliminar alguna de las limitaciones del método espectrofotométrico. Por ello se desarrolla un sistema de separación/detección de hidroperóxidos por HPLC. En paralelo se realiza la determinación de la *actividad enzimática específica* de la enzima LOX de soja tipo V (0,072 mg/mL) y utilizando como sustrato ácido linoleico (0,715 mM). Una alícuota de las muestras utilizadas para esa determinación se analizaba por HPLC. En la Tabla 29 se exponen los datos obtenidos de *actividad enzimática específica* y *actividad enzimática específica media*.

La pendiente de la recta obtenida es el incremento en nmoles de hidroperóxidos que se producen en el medio de reacción por cada segundo de reacción y cada ng de enzima presente ( $0,0401 \Delta\text{nmol/s} \times \text{ng}$ ), con una ordenada en el origen de  $0,3547 \Delta\text{nmol/s}$  y  $R^2_{\text{Adj.}} = 0,995$ . En términos de actividad enzimática, en los 60 s de reacción en la cubeta y por cada ng de enzima se produce un aparente incremento de la concentración de hidroperóxido de  $23,686 \Delta\text{nmoles}$  los que solo  $2,406$  nmoles pueden ser atribuidos sin ningún género de dudas a la actuación de la enzima LOX.

El procedimiento de HPLC se desarrolló con un doble objetivo. En primer lugar identificar mediante espectrometría de masas la señal debida a los hidroperóxidos. Por ello se selecciona la fase móvil adecuada, teniendo en cuenta que el ión molecular desprotonado de hidroperóxido es de naturaleza inestable y termolábil. En medio ácido (fórmico al 0,1%) se favorece la formación de *clústeres* entre el ión hidroperóxido y el ácido fórmico, aducto anteriormente mencionado. Además el ácido fórmico es volátil por lo que se favorece la formación de iones en disolución y su paso a la corriente gaseosa. En la Figura 30A se representa el espectro de masas del pico cromatográfico correspondiente a hidroperóxidos, indicando los iones representativos. Se aprecia la presencia mayoritaria del aducto con fórmico del ión molecular desprotonado, es decir el ión a  $m/z$  357  $[\text{M}+\text{fórmico}-\text{H}]^-$  (pico base del espectro). Este hecho se debe a que en la zona de desolvatación de los *clústeres* (zona del capilar calentado) se mantiene la temperatura moderadamente baja ( $150-175$  °C) por lo que se puede observar la aparición mayoritaria de dicho aducto. La Figura 30B representa el cromatograma. Indicar que la velocidad de flujo, para el sistema HPLC acoplado a MS fue inferior a la indicada en la sección de Materiales y Métodos ( $0,2$  mL/min).

**Tabla 29. Parámetros cinéticos y cálculo de la actividad enzimática específica de la reacción de hidropoxidación mediada por LOX de soja tipo V.**

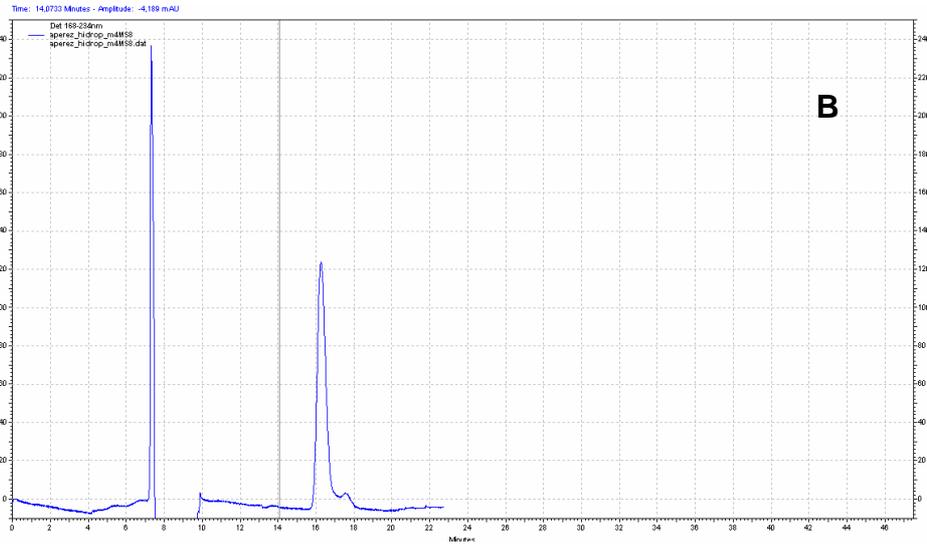
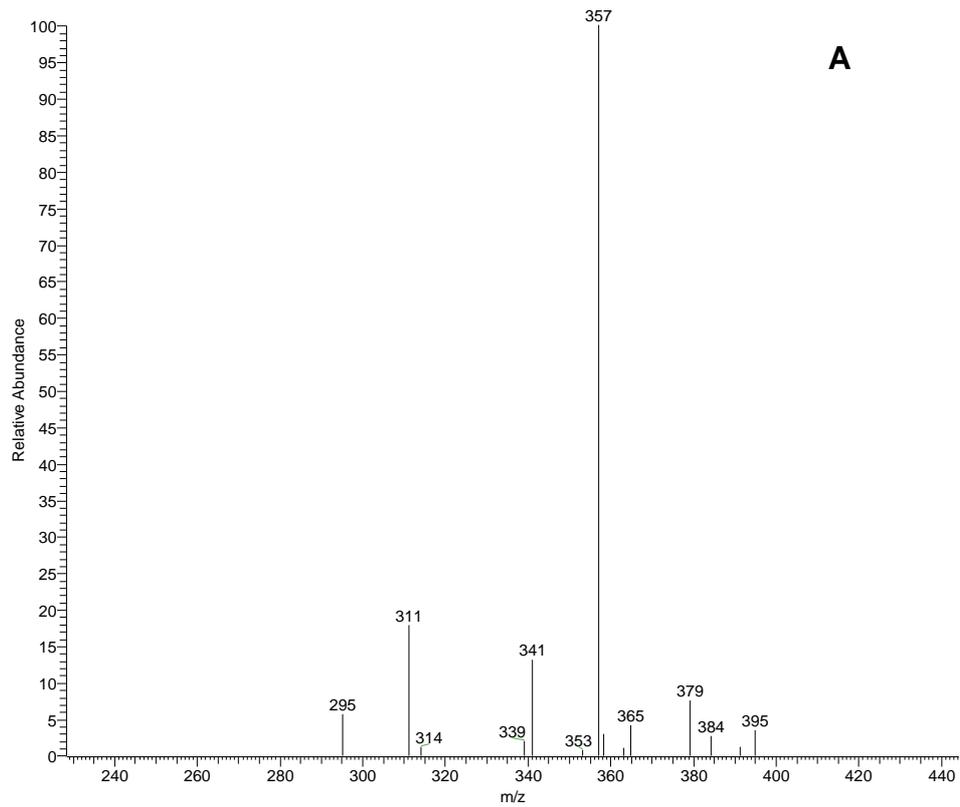
Parámetros cinéticos de la reacción		
ng de enzima	$\Delta$ UA/s	Actividad $\Delta$ nmol/s
0	0,00294	0,3528
0,72	0,00321	0,3852
1,44	0,00346	0,4146
2,16	0,00366	0,4392

Actividad enzimática específica		
<sup>a</sup> Pendiente $\Delta$ nmol/ng $\times$ s	Ordenada $\Delta$ nmol/s	$R^2_{Adj.}$
0,0401	0,3547	0,995

Valores medios (n = 3).

<sup>a</sup> Los valores del estadístico p son inferiores a 0,01 en todos los casos.



**Figura 30.-** Espectro de masas de la señal cromatográfica debida a hidroperóxidos del ácido linoleico (**A**). Pico base del espectro:  $m/z$  357 [M+fórmico-H];  $m/z$  379 [M+fórmico+Na-H];  $m/z$  311 [M-H]. El cromatograma correspondiente al análisis HPLC-MS se representa en la figura **B**.

Los parámetros de *actividad enzimática específica* nos permiten conocer la cantidad de hidroperóxidos que se formarían con cualquier cantidad de enzima, siempre que se encuentre por debajo de la concentración que garantiza la saturación por sustrato, y para cualquier tiempo de reacción. Empleando una concentración fija de extracto enzimático (1,44 ng) y una concentración fija de sustrato (0,715 mM) para un volumen final de reacción fijo de 3mL con tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6, se repitieron reacciones idénticas en todos los casos fijando como punto final los siguientes tiempos, 0, 5, 10, 20 y 60 min momento en el que se paraliza la reacción mediante adición de disolución metanólica de hidróxido potásico al 20% (p/v) y se calcula la cantidad teórica de hidroperóxidos que se han formado. Una alícuota de 0,05 mL, conteniendo en cada reacción un contenido teórico en hidroperóxidos previamente calculado (Tabla 30), se inyecta en el sistema cromatográfico. El área correspondiente a hidroperóxidos se integra en cada cromatograma (Tabla 30).

El volumen inyectado es una alícuota del medio de reacción; en todo el volumen de reacción y para el tiempo máximo de reacción se habrían formado 1,48  $\mu$ moles de hidroperóxidos, cuando inicialmente en la cubeta existían 2,25  $\mu$ moles de sustrato, lo que indica que aun con un tiempo de reacción tan dilatado sigue quedando sustrato sin reaccionar, lo que indica que la linealidad con el tiempo en la formación del producto de la reacción enzimática (condición siempre exigida a las determinaciones espectrofotométricas) puede ir mucho más allá de tiempo de seguimiento espectrofotométrico establecido.

Al igual que lo detectado en el método espectrofotométrico, existe una *aparente* formación de hidroperóxido de origen no enzimático que tiene que ser descontada para cada tiempo de reacción para atribuir a la enzima su verdadera actividad. En el sistema de separación por HPLC la *aparente* cantidad de hidroperóxidos formados no enzimáticamente puede atribuirse sin confusión a hidroperóxidos ya que su espectro UV y MS coincide con lo representado en la Figura 30A, por lo que se puede asegurar que parte del incremento de absorbancia que se produce en el método espectrofotométrico en ausencia de enzima activa se debe a la hidroperoxidación espontánea del ácido linoleico, aunque dado que en este punto hay diferencias cuantitativas entre ambos métodos, probablemente también intervengan otros factores.

**Tabla 30. Correlación entre datos espectrofotométricos y cromatográficos para la cuantificación de hidroperóxidos por HPLC.**

Datos de hidroperóxidos a distintos tiempos por extrapolación de los datos espectrofotométricos y respuesta en HPLC

Tiempo de reacción (min)	$\mu$ moles teóricos inyectados en HPLC	Área HPLC de hidroperóxidos (UA)*
0	0	1,3
5	0,0020619	118,1
10	0,0041238	185,1
20	0,0082476	331
60	0,0247428	748

Reacción en ausencia de extracto enzimático activo

Tiempo de reacción (min)	Área HPLC de hidroperóxidos*
60	53.9

Correlación entre datos espectrofotométricos y área de pico por HPLC

<sup>a</sup> Pendiente ( $\mu$ moles/UA)	Ordenada ( $\mu$ moles)	$R^2_{Adj.}$
$3,410 \times 10^{-05}$	-0,0016	0,981

Valores medios (n = 3).

<sup>a</sup> Los valores del estadístico p son inferiores a 0,01 en todos los casos.

Puesto que al calcular el contenido de hidroperóxidos por cuantificación espectrofotométrica se emplea la recta de *actividad enzimática específica* (Tabla 29), el contenido en hidroperóxidos no enzimáticos está incluido en la cuantificación, por lo que en el método de HPLC no se descuenta tampoco está fracción y se correlaciona todo el hidroperóxido medido espectrofotométricamente con todas la áreas de pico correspondientes a hidroperóxidos.

Los valores que se obtienen de la regresión lineal de ambas poblaciones de datos nos dan una pendiente que permite cuantificar el contenido en hidroperóxidos de una muestra a partir del área con un grado de fiabilidad elevado ( $R^2_{Adj.} = 0,981$ ; Tabla 30). La ordenada en el origen, teóricamente debería ser 0, aunque el valor que adopta no lo es, siendo incluso negativo, lo que hace pensar en que se trata de un artefacto matemático formado al no haber obtenido una correlación de coeficiente 1.

El sistema cromatográfico empleado permite actualmente cuantificar la totalidad de hidroperóxidos formados y en el futuro, al tratarse de un sistema isocrático en el que no varían las condiciones de elución de los compuestos, se podría conseguir un seguimiento cuantitativo de cada uno de los isómeros posicionales (que presentan idéntico coeficiente de extinción) en función de la isoenzima empleada.

### Conclusión

Además de observar la correlación entre la medida espectrofotométrica y la estimación por HPLC de la cantidad de LOOH formados durante la actividad lipoxigenasa, con el análisis cromatográfico se verifica la existencia de la hidropoxidación espontánea.

### **Cinética de degradación de pigmentos en presencia de situaciones oxidantes**

La cinética de degradación de pigmentos ha constituido un eje fundamental en la actividad científica de los investigadores que trabajan con pigmentos carotenoides. Las particularidades estructurales de estos pigmentos, la fotoinestabilidad que presentan, su capacidad de interacción con múltiples sustancias oxidantes, los efectos que de ello se derivan, y la dificultad en determinar los productos de degradación que se generan son algunos de los alicientes que despiertan el interés y que se concretan con estudios cinéticos. La mayor parte de la literatura referente a la cinética de degradación de pigmentos hace referencia a procesos que tienen lugar bien en su entorno natural (estabilidad del color de frutos) o en productos procesados en los que todavía se mantiene parte de su ambiente natural (productos vegetales deshidratados o procesados mecánicamente) o en aceites vegetales (Jarén-Galán y colaboradores, 1999; Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera, 1999; Pérez-Gálvez y colaboradores, 2000). En estas variantes los pigmentos carotenoides permanecen en su microentorno lipofílico o bien están disueltos en él. Sin embargo, menor es el número de estudios que hacen referencia a la cinética de degradación de carotenoides en entornos hidrofílicos. Mínguez-Mosquera y Jarén-Galán, 1995, realizan un estudio cinético de la decoloración de  $\beta$ -caroteno, capsanteno y capsanteno diesterificado, en emulsión, utilizando Tween 20. Las reacciones se producen en un entorno hidrofílico y la degradación carotenoides sigue un modelo cinético de primer orden. Las variables intensidad lumínica y temperatura inciden en el proceso degradativo, incrementando la velocidad de degradación y como mecanismo del proceso oxidativo se postula la pérdida de la conjugación polienoica como paso previo a la fragmentación carotenoide. Ese mecanismo es idéntico para todos los carotenoides incluidos en el estudio, independientemente de las condiciones de reacción, aunque los parámetros cinéticos se modulan significativamente por las particularidades estructurales de cada pigmento y las condiciones de reacción. En el estudio se aprecia que la velocidad de degradación de  $\beta$ -caroteno es superior a la de los cetocarotenoides. En un estudio posterior (Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera, 1997) se realiza el estudio con los mismos carotenoides pero incorporando lipoxigenasa y sustrato de ácido linoleico para estudiar la co-oxidación carotenoide debida al proceso enzimático. En el estudio se consideran distintas condiciones de intensidad lumínica y temperatura. Los datos cinéticos conducen a similares conclusiones que las

obtenidas en el primer estudio. La oxidación de carotenoides se puede explicar mediante la pérdida de la conjugación polienoica.

Las fuentes de compuestos pro-oxidantes, las condiciones ambientales, el medio de reacción y las diferencias en la estructura del pigmento son factores que modifican los parámetros cinéticos de la reacción y, consecuentemente, los parámetros termodinámicos pero no la ruta de reacción. En el presente estudio se realiza el análisis cinético de la degradación de carotenoides en medio acuoso y en presencia de fracciones sub-celulares que presentan actividad oxidativa tipo LOX. Los carotenoides empleados son  $\beta$ -caroteno, luteína y licopeno, en diferentes situaciones de oxidación según se expuso en la Tabla 5.

La enzima lipoxigenasa al actuar sobre su sustrato específico genera la formación de hidroperóxidos que actúan como oxidantes de los pigmentos carotenoides que se encuentren en el entorno. Generalmente el entorno carotenoide suele ser altamente lipofílico, pero durante situaciones de pérdida de integridad celular los carotenoides pueden dispersarse en forma de pequeñas vesiculitas emulsionadas en un entorno hidrofílico. Durante la digestión y tránsito intestinal, los alimentos pierden su integridad, dispersándose sus componentes y formando, en el caso de los compuestos lipofílicos, emulsiones estabilizadas por la presencia de sales biliares. En el caso de una exaltación de la actividad LOX en procesos inflamatorios del epitelio intestinal, se plantea el estudio de la posible capacidad modulante que puedan tener los pigmentos carotenoides sobre los productos de la reacción de LOX.

La reacción de co-oxidación de pigmentos carotenoides es distinta y siempre posterior a la reacción de formación de hidroperóxidos, por lo tanto, *a priori*, se desconoce si el óptimo de actuación de la enzima para la formación de hidroperóxidos concuerda o no con el óptimo para la co-oxidación de pigmentos. Para evitar que la actividad variable de la enzima en función del pH, y por tanto la mayor o menor presencia de hidroperóxidos, enmascaren la implicación del pH del medio en la reacción de co-oxidación, se realiza un primer estudio para conocer la influencia de las características físico-químicas en la reacción de co-oxidación. Se emplea como fuente de hidroperóxidos sólo aquellos que de forma espontánea se generan a partir del ácido linoleico en ausencia de cualquier actividad enzimática en distintas condiciones de pH.

En la Tabla 31 se muestran los valores de la constante de velocidad de degradación y de los coeficientes  $R^2_{Adj}$ , en función de las condiciones experimentales impuestas. Se incluyen los parámetros correspondientes a los ajustes cinéticos bajo los modelos de orden 0 y 1. El coeficiente de correlación en todas las reacciones estudiadas permite afirmar que tanto el modelo de orden 0 como 1 explican de forma matemáticamente aceptable la evolución de la degradación con el tiempo.

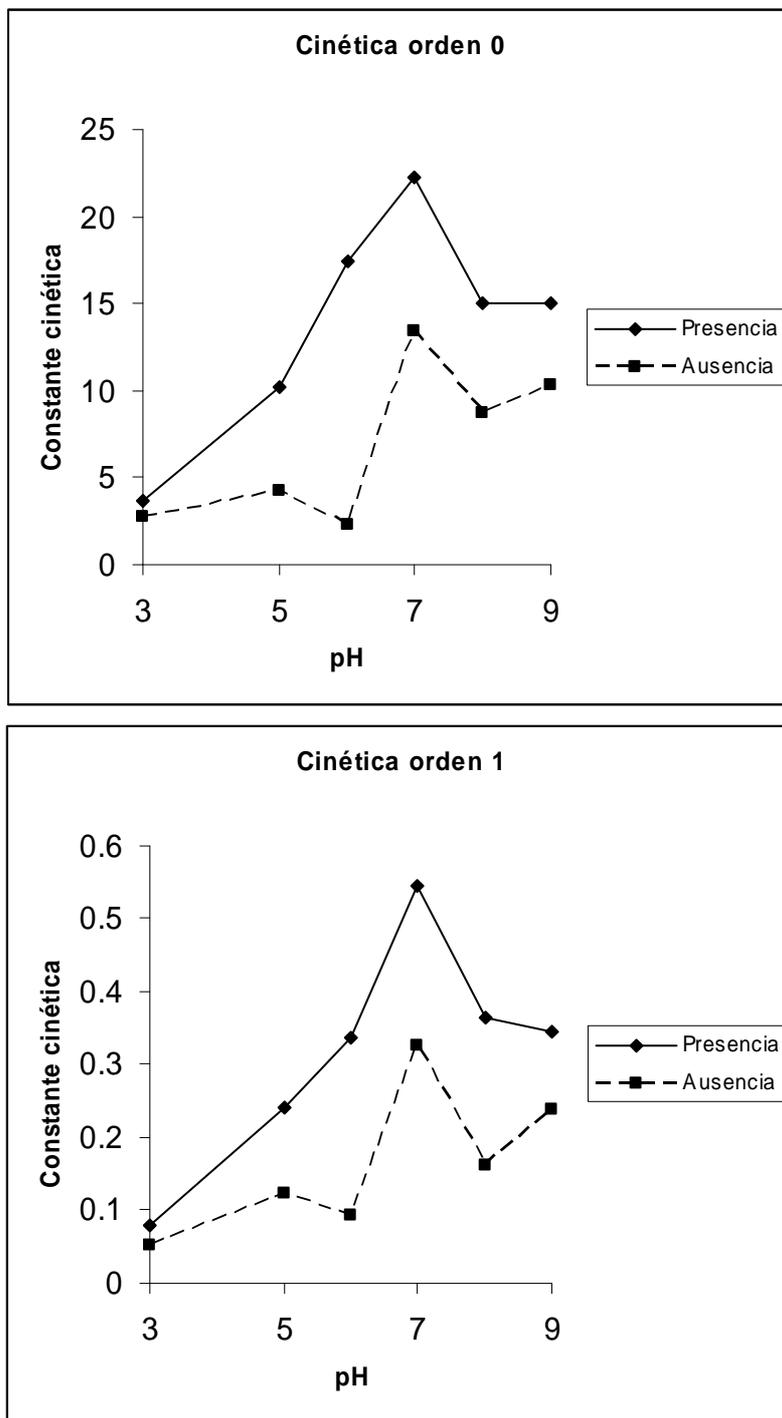
Como era de prever, el ácido linoleico experimenta una hidroperoxidación espontánea a todos los pH estudiados. Esta reacción ya se había detectado durante el desarrollo del método espectrofotométrico, y se denominó *aparente* hidroperoxidación espontánea. En el método de medida de actividad por HPLC, se observó que en ausencia de enzima, en el plazo de 60 min se producía una formación de hidroperóxidos que era del orden de un 10% de la que se obtenía en presencia de la enzima. Con los resultados ahora encontrados, se confirma con una tercera técnica que existe la reacción de hidroperoxidación espontánea ya que se exalta la co-oxidación de pigmentos en presencia de ácido linoleico, que sólo puede afectar a la estabilidad de los pigmentos carotenoides si con anterioridad experimenta una hidroperoxidación espontánea de su sistema de dienos conjugados. En la Figura 31 se puede apreciar como a pH 7 se alcanzaron los valores significativamente superiores de velocidad de degradación, tanto en presencia como ausencia de ácido linoleico. La reacción de co-oxidación de pigmentos carotenoides presenta un óptimo de pH distinto, aunque cercano al de actividad de las enzimas lipoxigenasa empleadas en este estudio.

**Tabla 31. Constantes de velocidad de degradación de una disolución de  $\beta$ -caroteno en medio acuoso a diferentes valores de pH y en presencia y ausencia de ácido linoleico.**

pH	Ácido linoleico				Ausencia de ácido linoleico			
	Orden 0		Orden 1		Orden 0		Orden 1	
	k	R <sup>2</sup> <sub>Adj.</sub>	k	R <sup>2</sup> <sub>Adj.</sub>	k	R <sup>2</sup> <sub>Adj.</sub>	k	R <sup>2</sup> <sub>Adj.</sub>
3	3,72	0,956	0,079	0,988	2,76	0,990	0,053	0,994
5	10,2	0,950	0,240	0,989	4,27	0,966	0,122	0,947
6	17,4	0,914	0,337	0,853	2,26	0,809	0,094	0,978
7	22,2	0,977	0,544	0,950	13,4	0,968	0,326	0,973
8	15,0	0,963	0,364	0,982	8,73	0,990	0,162	0,971
9	15,0	0,990	0,344	0,910	10,3	0,993	0,238	0,925

Valores medios (n=3).

Concentración  $\beta$ -caroteno en el medio de reacción 5  $\mu$ M. Concentración de ácido linoleico en el medio de reacción 0,715 mM. Reacción llevada a cabo en oscuridad a 35 °C y empleando como medio de reacción tampón fosfato sódico 50 mM a diferentes valores de pH.



**Figura 31.-** Evolución de la constante cinética de degradación de  $\beta$ -caroteno (orden 0 y 1) en función del pH del medio de reacción y presencia o ausencia de ácido linoleico.

La presencia de ácido linoleico en el medio de reacción incrementa notablemente la velocidad de degradación  $\beta$ -caroteno, a todos los pH estudiados y bajo ambos modelos cinéticos la presencia de ácido linoleico duplica la velocidad de degradación del pigmento excepto a pH 7 en donde llega a multiplicarse por 3-4 la constante cinética.

Los dos modelos cinéticos empleados explican matemáticamente el progreso de la reacción de forma aceptable, aunque formalmente uno u otro tienen implicaciones distintas. En el modelo de orden 0 la velocidad de la reacción transcurre al margen de la concentración de pigmento en el medio, mientras que bajo el modelo de orden 1 la velocidad de la reacción depende de la concentración del pigmento. En ninguno de los dos modelos interviene la concentración de la especie oxidante. Para conocer la implicación de la concentración de ácido linoleico en la velocidad de la reacción, se realiza un estudio de oxidación de  $\beta$ -caroteno en presencia de diferentes concentraciones de ácido linoleico. La Tabla 32 muestra los resultados. La degradación de  $\beta$ -caroteno transcurre a velocidad similar, independientemente de la concentración de ácido linoleico. Los resultados indican que el aumento de pro-oxidante en el medio no incrementa la constante de velocidad de reacción y que ésta, con la menor de las concentraciones, ya ha alcanzado su máximo. Con la concentración mínima de ácido linoleico la velocidad de la reacción de degradación se hace por tanto ya independiente de su concentración.

**Tabla 32. Constantes de velocidad de degradación de una disolución de  $\beta$ -caroteno en presencia de distintas concentraciones de ácido linoleico.**

Concentración ácido linoleico	Orden 0		Orden 1	
	k	$R^2_{Adj.}$	k	$R^2_{Adj.}$
0,715 mM	11,7	0,914	0,337	0,853
1,788 mM	16,0	0,984	0,283	0,940
3,575 mM	14,8	0,981	0,244	0,948
7,150 mM	14,2	0,986	0,229	0,953

Valores medios (n=3).

Concentración  $\beta$ -caroteno en el medio de reacción 5  $\mu$ M. Reacción llevada a cabo en oscuridad a 35 °C y empleando como medio de reacción tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6.

El estudio cinético de oxidación de carotenoides en presencia de fracciones sub-celulares empleando tejido epitelial de intestino animal se realizó en diferentes situaciones experimentales (expuestas en la Tabla 5). El planteamiento del estudio va encaminado a conocer como el potencial oxidante creado en el medio por actuación de LOX puede ser amortiguado por la presencia de pigmentos carotenoides que retiran, a costa de su oxidación, los hidroperóxidos generados espontánea y enzimáticamente y que serían los responsables de la puesta en marcha de la cascada de reacciones que culminan con la respuesta inflamatoria. El estudio se realiza con desarrollo factorial multivariable, combinando diferentes fuentes posibles de LOX, distintos sustratos y pigmentos carotenoides, y todos combinados permitirán conocer los factores que pueden afectar a la degradación de los pigmentos carotenoides en presencia de LOX. Los distintos extractos enzimáticos se preparan de forma que todos alcanzan una actividad LOX similar. Se emplean extractos de LOX de soja tipo V en concentración 0,72  $\mu\text{g/mL}$ , extracto de fracción citosólica con una concentración proteica de 58,7  $\mu\text{g/mL}$  y de fracción microsomal con una concentración proteica de 14,9  $\mu\text{g/mL}$ . Estos datos son consistentes con los presentados en la Tabla 28, en cuanto a que la actividad tipo LOX de la fracción microsomal es significativamente superior a la que presenta la fracción citosólica. Tomando como referencia la concentración de LOX de soja tipo V el 4,8% de la fracción microsomal presenta actividad tipo LOX mientras que el 1,2% de la fracción citosólica presenta actividad tipo LOX.

En las Tablas 33 y 34 se exponen los datos de las constantes cinéticas de degradación para cada pigmento y en cada situación. En todos los casos, la reacción parece ajustarse matemáticamente mejor al modelo de orden 1. En la Tabla 33 se puede observar como en ausencia de enzima y sustrato, la constante de velocidad de degradación de licopeno es la menor, seguida de la de  $\beta$ -caroteno y finalmente de la correspondiente a luteína, pigmento más hidrofílico de todos los empleados y que probablemente se encuentre más expuesto al medio externo mientras que los otros dos, absolutamente lipofílicos se encuentren más resguardados dentro de las micelas donde se encuentran emulsionados. La adición al medio de la fracción citosólica protege a todos los pigmentos de su degradación, excepto a licopeno que no modifica su constante de velocidad de degradación. Con la fracción microsomal, todas las constantes de velocidad disminuyen, incluida la de licopeno.

Por tanto de los resultados encontrados se puede deducir que las fracciones subcelulares, en ausencia de cualquier sustrato adicionado, actúan protegiendo a los pigmentos carotenoides de su degradación.

Cuando en el medio de reacción está presente el sustrato (Tabla 34), las constantes de degradación de  $\beta$ -caroteno se duplican, sin que existan grandes diferencias entre la presencia ácido linoleico o ácido araquidónico. Con luteína y licopeno, la presencia de ácido linoleico no modifica la constante de velocidad de degradación del pigmento, pero el ácido araquidónico sí las incrementa significativamente sólo en el caso de licopeno. La presencia de LOX de soja tipo V no incrementa las constantes de velocidad, dejándolas prácticamente iguales a la encontradas en ausencia de la enzima, lo que hace pensar que las tasas de auto-oxidación de los pigmentos en las condiciones experimentales empleadas, así como la inducida por la presencia de un sustrato con capacidad de formar en el medio hidroperóxidos de forma espontánea, sitúa los niveles oxidantes del medio por encima de los que impondría lipoxigenasa. Las fracciones sub-celulares, y muy especialmente la fracción microsomal, disminuyen notablemente la destrucción de los pigmentos carotenoides con ambos sustratos. Se puede concluir por tanto que, aun existiendo actividad de lipoxigenasa en dichas fracciones y teniendo capacidad de formar hidroperóxidos, la presencia de estos extractos no solo no potencia la destrucción de pigmentos sino que los protege frente al ambiente oxidante del medio.

**Tabla 33. Constante cinética de la reacción de oxidación/co-oxidación de  $\beta$ -caroteno, luteína y licopeno en ausencia de cualquier fuente de enzima LOX y sustrato y en presencia de distintas fuentes de LOX sin adición externa de sustrato.**

	Condiciones enzimáticas	k	R <sup>2</sup> <sub>Adj.</sub>
$\beta$ -Caroteno	Ausencia enzima-sustrato	0,097	0,992
	LOX de soja tipo V	0,176	0,980
	F. citosólica	0,037	0,964
	F. microsomal	0,009	0,988
Luteína	Ausencia enzima-sustrato	0,305	0,958
	LOX de soja tipo V	0,277	0,985
	F. citosólica	0,037	0,952
	F. microsomal	0,010	0,961
Licopeno	Ausencia enzima-sustrato	0,003	0,972
	LOX de soja tipo V	0,004	0,925
	F. citosólica	0,003	0,979
	F. microsomal	0,001	0,972

Valores medios (n=3). Los valores del estadístico p son inferiores a 0,01. Concentración de pigmento en el medio de reacción 5  $\mu$ M. Reacción llevada a cabo en oscuridad a 37 °C y empleando como medio de reacción tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6.

**Tabla 34. Constante cinética de la reacción de oxidación/co-oxidación de  $\beta$ -caroteno, luteína y licopeno en presencia de distintas fuentes de lipoxigenasa y distintos sustratos.**

		Ácido linoleico		Ácido araquidónico	
		k	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	k	R <sup>2</sup> <sub>Adj.</sub>
$\beta$ -Caroteno	Condiciones enzimáticas				
	Sustrato	0,176	0,992	0,200	0,990
	LOX de soja tipo V y sustrato	0,171	0,992	0,192	0,991
	F. citosólica y sustrato	0,065	0,889	0,046	0,968
	F. microsomal y sustrato	0,014	0,988	0,035	0,993
Luteína	Sustrato	0,288	0,997	0,303	0,991
	LOX de soja tipo V y sustrato	0,293	0,990	0,259	0,986
	F. citosólica y sustrato	0,211	0,966	0,034	0,968
	F. microsomal y sustrato	0,053	0,962	0,012	0,963
Licopeno	Sustrato	0,003	0,995	0,016	0,985
	LOX de soja tipo V y sustrato	0,004	0,925	0,016	0,977
	F. citosólica y sustrato	0,003	0,930	0,015	0,974
	F. microsomal y sustrato	0,001	0,976	0,007	0,970

Valores medios (n=3). Los valores del estadístico p son inferiores a 0,01.

Concentración de sustrato en el medio de reacción: ácido linoleico 0,715 mM; ácido araquidónico 0,715 mM. Concentración de pigmento en el medio de reacción 5  $\mu$ M. Reacción llevada a cabo en oscuridad a 37 °C y empleando como medio de reacción tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6.

Parece por tanto que los pigmentos no actúan como secuestrantes del potencial oxidante generado en el medio, sino todo lo contrario, utilizan sustancias que acompañan a las fracciones subcelulares para protegerse de su auto-oxidación. Las experiencias de co-oxidación con distintas fuentes de LOX se han realizado a distintos tiempos de tratamiento, en todos los casos muy superiores a los empleados para la medida de actividad enzimática tanto por el método espectrofotométrico como por el método de HPLC. Se plantea la duda si realmente LOX está activa durante todo el tiempo empleado para la experiencia de co-oxidación y para ello se ha realizado una incubación de LOX en idénticas condiciones a las empleadas para la co-oxidación y periódicamente se han tomado alícuotas y se ha medido la *actividad enzimática específica*. Los valores encontrados a los distintos tiempos de incubación se muestran en la Tabla 35.

**Tabla 35. Actividad enzimática específica (AEE) de las fracciones microsomal y citosólica ( $\mu\text{moles de hidroperóxido formado/ s} \times \text{mg proteína}$ ) en función del tiempo de incubación.**

Tiempo transcurrido (horas)	AEE ( $\mu\text{mol}/(\text{s} \times \text{mg})$ )	
	Fracción microsomal	Fracción citosólica
0	$31,00 \times 10^{-3}$	$171,52 \times 10^{-4}$
4,25	$17,21 \times 10^{-3}$	$56,60 \times 10^{-4}$
20,75	$15,26 \times 10^{-3}$	$15,06 \times 10^{-4}$
28,25	$17,09 \times 10^{-3}$	$-6,55 \times 10^{-4}$
44,75	$11,15 \times 10^{-3}$	$7,91 \times 10^{-4}$
52,25	$13,96 \times 10^{-3}$	$15,98 \times 10^{-4}$
68,75	$10,15 \times 10^{-3}$	$-0,273 \times 10^{-4}$
92,75	$8,72 \times 10^{-3}$	$5,07 \times 10^{-4}$
116,75	$5,20 \times 10^{-3}$	$-3,76 \times 10^{-4}$
124,25	$5,15 \times 10^{-3}$	$3,44 \times 10^{-4}$

Valores medios (n=3).

Concentración de sustrato en el medio de reacción: ácido linoleico 0,715 mM. Reacción llevada a cabo en oscuridad a 37 °C y empleando como medio de reacción tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6.

La actividad enzimática de la fracción microsomal desciende progresivamente con el tiempo de incubación, por lo que la enzima está presente durante la experiencia de co-oxidación y en presencia de su sustrato, pero el hidroperóxido que genera, por alguna razón, no hace diana en el carotenoide presente en el medio, que en vez de degradarse por la presencia de este compuesto, se protege a costa de algún otro compuesto que acompañe a la fracción sub-celular. En el caso de la fracción citosólica, con mucha menor actividad de entrada, en 24 h pasa a tener actividad virtualmente 0, que oscila con el tiempo entre valores positivos y negativos, debido a que solo se está midiendo el ruido de la reacción.

La actividad LOX de las fracciones sub-celulares empleadas no se manifiesta en una co-oxidación de pigmentos carotenoides, probablemente por la presencia de compuestos con alta capacidad antioxidante que amortiguan la capacidad oxidante generada.

### Conclusión

Del estudio de las cinéticas de degradación de pigmentos carotenoides se concluye con que en el metabolismo de los pigmentos influyen las características intrínsecas de los mismos. Esto se observa más notoriamente en la comparación entre luteína, una xantofila hidroxilada, y licopeno, un hidrocarburo de estructura lineal, que son el pigmento de más rápida degradación y el más estable, respectivamente. Por otro lado, la actividad lipoxigenasa y la co-oxidación de pigmentos son procesos relacionados pero independientes, que no tienen por qué darse de manera consecutiva, ya que se pueden determinar hidroperóxidos formados por dicha actividad sin que a partir de estos se generen productos de degradación avanzada directamente responsables de la co-oxidación de pigmentos.

CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

*Primera.* De los estudios de capacidad antioxidante sobre digestatos de matrices vegetales ricas en carotenoides, se concluye con que la capacidad antioxidante no solo depende de la presencia de los pigmentos, sino que existen otros componentes del digestato que modulan la concentración de hidroperóxidos. A la visión química de los estudios de capacidad antioxidante realizados debe sumarse el aspecto fisiológico, dando importancia a la matriz que contiene a los supuestos compuestos antioxidantes, a los procesos fisiológicos que estos atraviesan antes de poder ser absorbidos por el organismo, y a otra serie de factores que modulan la capacidad antioxidante de los carotenoides.

*Segunda.* En cuanto al transporte y la absorción de los hidroperóxidos, el modelo de estudio utilizado permite determinar que sólo aquellos factores que inciden en la concentración de GSH tisular son los que afectan significativamente a la asimilación y el metabolismo de hidtroperóxidos, como es el caso de la quercetina, que produce un efecto positivo en la síntesis de GSH contribuyendo así a una mayor eficiencia en el control de los hidroperóxidos del lumen. Sin embargo, en contra del modelo experimental usado está lo estacionario del mismo ya que, en una situación real, los hidroperóxidos asimilados y transportados hacia la linfa son movilizados hacia el hígado mientras que en el modelo de celdas Ussing los hidroperóxidos se acumulan en la zona basolateral pudiendo esto disminuir la eficiencia del transporte. Aunque el modelo experimental ex vivo que utiliza celdas tipo Ussing permite medir el transporte de ciertos componentes a través del epitelio intestinal, los resultados obtenidos solo suponen aproximaciones a la situación real en que un tejido forma parte de un organismo vivo.

*Tercera.* En lo referente a la cantidad de hidroperóxidos formados durante la actividad lipoxigenasa, destaca la correlación entre la medida espectrofotométrica y la estimación por HPLC. Con el análisis cromatográfico se verifica además la existencia de la hidroperoxidación espontánea. Sin embargo, la determinación espectrofotométrica es una técnica cuya aplicación es más rápida que la detección cromatográfica.

*Cuarta.* La actividad lipoxigenasa, que queda patente mediante el análisis espectrofotométrico, cromatográfico y a través de la co-oxidación de pigmentos, puede ser paralizada con la utilización de agentes químicos que, además, consiguen la estabilización de los hidroperóxidos formados durante la reacción y los debidos a la hidroperoxidación espontánea. El agente utilizado como paralizador la de actividad lipoxigenasa y estabilizador de los hidroperóxidos formados es una disolución de hidróxido potásico en metanol al 20% (p/v).

*Quinta.* La determinación de la actividad lipoxigenasa en el epitelio intestinal puede justificar la implicación de enzimas tipo lipoxigenasa en los procesos de estrés oxidativo en la mucosa intestinal. Que la actividad lipoxigenasa sea mayor en la fracción microsomal que en la citosólica ratifica el hecho de que la actividad enzimática depende del anclaje de la enzima a la membrana.

*Sexta.* Las cinéticas de degradación de licopeno,  $\beta$ -caroteno y luteína (de más a menos estable) muestran que en el metabolismo de los pigmentos influyen las características intrínsecas de los mismos. Por ejemplo, que la luteína sea el pigmento de más rápida degradación puede deberse a que es una xantofila con dos grupos hidroxilos, mientras que el compuesto más estable es el licopeno que es un caroteno de estructura lineal con dobles enlaces conjugados, lo que promueve la existencia de electrones deslocalizados, confiriendo mayor estabilidad frente a la degradación.

*Séptima.* La actividad lipoxigenasa y la co-oxidación de pigmentos son procesos relacionados pero independientes. Estos dos procesos no tienen por qué darse de manera consecutiva, ya que se pueden determinar hidroperóxidos formados por dicha actividad sin que a partir de estos se generen productos de degradación avanzada directamente responsables de la co-oxidación de pigmentos. Además, las fracciones sub-celulares usadas no son extractos purificados y se obtienen a partir de epitelio intestinal sano, lo que hace pensar que hay un equilibrio oxidante-antioxidante establecido y, por tanto, la actividad lipoxigenasa está controlada.

## AGRADECIMIENTOS

---



**AGRADECIMIENTOS**

A la Profesora María Isabel Mínguez Mosquera, directora del Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos, que me ofreció la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo para recibir la formación adecuada en la carrera investigadora.

A los doctores D. Antonio Pérez Gálvez y D. Manuel Jarén Galán, por su inestimable apoyo a la hora de realizar este trabajo y por sus consejos para la vida y el día a día.

A la doctora Dña. María del Carmen García Parrilla por su labor como tutora de este trabajo.

A mis compañeros del Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos, por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A D. José J. Ríos por su colaboración en la identificación de hidroperóxidos por MS y la puesta a punto del método cromatográfico de detección.

A Dña. Itziar Benito Latasa, responsable del Animalario de la Facultad de Medicina, Hospital Virgen Macarena, por su labor en el mantenimiento y cuidado de la línea de experimentación animal utilizada en el presente estudio y la toma de biopsias de tejido intestinal.

Al Dr. Rafael Guillén Bejarano, Jefe del Departamento de Biotecnología de Alimentos y a la Dirección del Instituto de la Grasa, por su labor como responsables y gestores de la investigación del centro.

A los proyectos de investigación AGL2007-61146/ALI y AGR-03025 que apoyan económicamente la experimentación. Al programa de formación de investigadores predoctorales de la Junta de Andalucía adscritos a Proyectos de Excelencia.

A todos mis compañeros del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa, agradeciendo vuestros consejos, vuestro apoyo y los buenos momentos que pasamos juntos, así como a todos aquellos que me hayan ofrecido una sonrisa por los pasillos.

Y por último, aunque no menos importante:

A quienes me quieren, que me han acompañado en este periplo desde aquí o desde el extranjero, a quienes me han aguantado en mis frustraciones, a quien se ha enclaustrado conmigo cada fin de semana, y a quienes se sientan partícipes de este trabajo en lo personal.



## BIBLIOGRAFÍA

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

Abián J, Pagés M, Gelpí E. Use of methyl oxime derivatives to enhance structural information in thermospray high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Analysis of linoleic acid lipoxygenase metabolites in maize embryos. *Journal of Chromatography*, 1991, 554, 155-173.

Alía M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212, 2006, 110-118.

Alpha tocopherol, beta carotene cancer prevention study group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine*, 1994, 330, 1029-1035.

Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, 1983, 221, 1256-1264.

Andrews JS, Griffith WH, Mead JF, Stein RA. Toxicity of air-oxidized soybean oil. *Journal of Nutrition*, 1960, 70, 199-210.

Aw TY, Rhoads CA. Glucose regulation of hydroperoxide metabolism in rat intestinal cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994, 94, 2426-2434.

Aw TY, Williams MW. Intestinal absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids in rats: Effect of exogenous GSH. *American Journal of Physiology*, 1992, 263, G665-G672.

Aw TY, Williams MW, Gray L. Absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids by rat small intestine *in vivo*: Role of mucosal GSH. *American Journal of Physiology*, 1992, 262, G99-G106.

Aw TY. Intestinal glutathione: Determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 204, 320-328.

Bach TJ. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. Review. *Lipids*, 1995, 30, 191-202.

Bartosz G, Janaszewska A, Ertel D, Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, 46, 519-528.

Bauernfeind JC. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1972, 20, 456-473.

Bergan JG, Draper HH. Absorption and metabolism of 1-<sup>14</sup>C-methyl linoleate hydroperoxide. *Lipids*, 1970, 5 (12), 976-982.

Beutner S, Frixel S, Ernst H, Hoffmann T, Hernandez-Blanco I, Hundsdoerfer C, Kiesendahl N, Kock S, Martin HD, Mayer B, Noack P, Pérez-Gálvez A, Kock G, Scherrers R, Schrader W, Sell S, Stahl W. Carotenylflavonoids, a novel group of potent, dual-functional antioxidants. *Archives of Organic Chemistry*, 2007, 7, 279-295.

Boots A, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 2008, 585, 325-337.

Box GEP, Hunter JS. The 2k-p fractional factorial designs: part I. *Techometrics*, 1961, 3, 311-351.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1995, 28, 25-30.

Brash AR. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (34), 23679-23682.

Breithaupt DE, Bamedi A, Wirt U. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002b, 132, 721-728.

Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. Review. *The FASEB Journal*, 1995, 9, 1551-1558.

Bunyan J, Green J, Murrell A, Diplock AT, Cawthorne MA. On postulated peroxidation of unsaturated lipids in the tissue of vitamin-deficient rats. *British Journal of Nutrition*, 1968, 22, 97-110.

Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annual Review of Nutrition*, 1992, 12, 139-159.

Castenmiller JJM, West CL, Linssen JPH, van het Hof KH, Voragen AGJ. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of  $\beta$ -carotene and to lesser extent of lutein in humans. *The Journal of Nutrition*, 1999, 129, 349-355.

Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 1985, 227, 375-381.

Charman WN, Porter CJ, Mithani S, Dressen JB. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, 86, 269-282.

Chen X, Soo S, Yang CS, Li N, Sun Z. Five-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*, 2006, 6, 519-532.

Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, Drazen JM, Hay DWP, Rovati GE, Shimizu T, Yokomizo T, Brink C. The lipoxin receptor ALX: Potent ligand-specific and stereoselective actions *in vivo*. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58, 463-487.

Chitchumroonchokchai Ch, Failla M. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of xanthophylls by Caco-2 human intestinal cells. *The Journal of Nutrition*, 2006, 136, 588-594.

Cilla A, Alegría A, de Ancos B, Sánchez-Moreno C, Cano MP, Plaza L, Clemente G, Lagarda Mj, Barberá R. Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 7282-7290.

Cilla A, Lagarda MJ, Alegría A, de Ancos B, Cano MP, Sánchez-Moreno C, Plaza L, Barberá R. Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Research International*, 2011, 44, 3030-3038.

Clarke LL. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009, 296, G1151-g1166.

Cochran WG, Cox GM. En: *Diseños Experimentales*, páginas 372-407. Ed. Trillas. México, D.F. (Mexico). 1965.

Compassi S, Werder M, Boffelli D, Weber FE, Hauser H, Schultess G. Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry*, 1995, 34, 16473-16482.

Compassi S, Werder M, Weber FE, Boffelli D, Hauser H, Schulthess G. Comparison of cholesterol and sitosterol uptake in different brush border membrane models. *Biochemistry*, 1997, 36, 6643-6652.

Conn PF, Lambert C, Land EJ, Schalch W, Truscott TG. Carotene-oxygen radical interactions. *Free Radical Research*, 1992, 16, 401–408.

Crews HM, Burrell JA, McWeeny DJ. Comparison of trace element solubility from food items treated separately and in combination. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 1985, 180, 405-410.

Cunningham FX, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49, 557-583.

Davies BH. Carotenoids. En: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, volumen. 2, capítulo 19. Ed.: Goodwin TW. Academic Press, Londres (Reino Unido), 1976.

Day WC, Erdman JG. Ionene: a thermal degradation product of  $\beta$ -carotene. *Science*, 1963, 141, 808.

Deferme S, Annaert P, Augustijns P. In vitro screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. En *Drug absorption studies. In situ, in vitro and in silico models*. Ed.: Ehrhardt C y Kim KJ. Springer, New York (EEUU), 2008.

Deferme S, Mols R, Van Driessche W, Augustijns P. Apricot extract inhibits the P-gp-mediated efflux of talinolol. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2002, 91, 2539-2548.

dos Anjos Ferreira AL, Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Tang G. Enzymatic and oxidative metabolites of lycopene. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004, 15, 493-502.

Duitsman PK, Barua AB, Becker B, Olson JA. Effects of epoxy-carotenoids,  $\beta$ -carotene, and retinoic acid on the differentiation and viability of the leukemia cell line NB4 *in vitro*. *International*

Journal for Vitamin and Nutrition Research, 1999, 69, 303-308.

During A, Algaugh G, Smith JC. Characterization of  $\beta$ -carotene 15-15'-dioxygenase activity in TC7 clone of human intestinal cell line Caco-2. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 249, 467-474.

During A, Hussain MM, Morel DW, Harrison EH. Carotenoid uptake and secretion by Caco-2 cells:  $\beta$ -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. Journal of Lipid Research, 2002, 43, 1086-1095.

Ekanayake A, Nelson PE. An in vitro method for estimating biologically available vitamin B6 in processed foods. The British Journal of Nutrition, 1986, 55, 235-244.

El-Agamey A, McGarvey DJ. Carotenoid radicals and radical ions. En: Carotenoids. Volume 4: Natural functions, páginas: 119-154. Eds.: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Birkhäuser Verlag, Basel (Suiza). 2008.

El-Agamey A, McGarvey DJ. Evidence for a lack of reactivity of carotenoid addition radicals towards oxygen: a laser flash photolysis study of the reactions of carotenoids with acylperoxyl radicals in polar and non-polar solvents. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125 (11), 3330-3340.

Epler KS, Ziegler RG, Craft NE. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. Journal of Chromatography, 1993, 619, 37-48.

Everett SA, Dennis F, Patel KB, Maddix S, Kundu SC, Willson RL. Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant  $\beta$ -carotene. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271, 3988-3994.

Fleischmann P, Zorn H. Enzymic pathways for formation of carotenoid cleavage products. En: Carotenoids, volumen 4, páginas: 341-366. Eds.: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Birkhäuser Verlag, Basel (Suiza). 2008.

Foote CS, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -carotene. Journal of the American Chemical Society, 1968, 90, 6233-6235.

Fouad MF, Farrell PG, Marshall WD, van de Voort FR. In vitro model for lipase-catalyzed lipophile release from fats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39, 150-153.

Fuller CJ, Faulkner H, Bendich A, Parker RS, Roe DA. Effect of  $\beta$ -carotene supplementation on photosuppression of delayed-type hypersensitivity in normal young men. The American Journal of Clinical Nutrition, 1992, 56, 684-690.

Funk CD. Lipoxygenase pathways as mediators of early inflammatory events in atherosclerosis. Journal of the American Heart Association, 2006, 26, 1204-1206.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. Science, 2001, 294, 1871-1875.

Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localized in gap: Tight junctions with no sequence similarity to occluding. Journal of Cell Biology, 1998, 141, 1539-1550.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: A novel integral membrane protein localized in gap tight junctions. Journal of Cell Biology, 1993, 123, 1777-1788.

Garret DA, Failla ML, Sarama RJ. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47, 4301-4309.

Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B, Blázquez-García S. In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 2007, 102, 641-648.

Giovannini C, Scazzocchio B, Matarrese P, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Casciani S, Dessi MR, Straface E, Malorni W, Masella R. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: Protective effects of phenolic compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 2008, 118-128.

Giovannucci E. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 2002, 227, 852- 859.

Glavind J, Sylvén C. Intestinal absorption and lymphatic transport of methyl linoleate hydroperoxide and hydroxyoctadecadienoate in the rat. *Acta Chemica Scandinavica*, 1970, 3723-3728.

Goodman DS, Huang HS. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science*, 1965, 149, 879-880.

Goodwin TW, Britton G. Distribution and analysis of carotenoids. En: *Plant pigments*, páginas: 61-132. Ed.: Goodwin TW. Academic Press, San Diego (EEUU), 1988.

Gökmen V, Bahçeci S, Acar J. Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method. *European Food Research and Technology*, 2002, 215, 42-45.

Gorelik S, Kohen R, Ligumsky M, Kanner J. Saliva plays a dual role in oxidation process in stomach medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 458, 236-243.

Gorelik S, Lapidot T, Shaham I, Granit R, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J: Lipid peroxidation and couple vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: Health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 3397-3402.

Gotoh Y, Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Rhoads CA, Aw TY. Lipid peroxide-induced redox imbalance differentially mediates CaCo-2 cell proliferation and growth arrest. *Cell Proliferation*, 2002, 35 (4), 221–235.

Goupy P, Vulcain E, Caris-Veyrat C, Dangles O. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and Synergism. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 43, 933-946.

Grass GM, Sweetana SA. *In Vitro* measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. *Pharmaceutical Research*, 1988, 5 (6), 372-376.

Halevy O, Sklan D. Inhibition of arachidonic acid oxidation by  $\beta$ -carotene, retinol and  $\alpha$ -tocopherol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, 918, 304-307.

Handelman GJ, van Kuijk FJGM, Chatterjee A, Krinsky NI. Characterization of products formed during the autoxidation of  $\beta$ -carotene. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991, 10, 427-437.

Hara H, Miyashita K, Ito S, Kasai T. Oxidized ethyl linoleate induces mucosal hypertrophy of the large intestine and affects cecal fermentation of dietary fiber in rats. *Journal of Nutrition*, 1996, 126, 800-806.

Hedrén E, Diaz V, Svanberg U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 56, 425-430.

Heinonen MI, Ollilainen V, Linkola EK, Varo PT, Koivistoinen PE. Carotenoids in finish food: Vegetables, fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, 37, 655-659.

Herraiz LA, Hsieh WC, Parker RS, Swanson JE, Bendich A, Roe DA. Effect of UV exposure and  $\beta$ -carotene supplementation on delayed-type hypersensitivity response in healthy older men. *Journal of the American College of Nutrition*, 1998, 17, 617-624.

Holick CN, Michaud DS, Stolzenberg-Solomon R, Mayne ST, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Dietary carotenoids, serum  $\beta$ -carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. *American Journal of Epidemiology*, 2002, 156, 536-547.

Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA, Yang CS. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 62, 1175-1183.

Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 2007, 407-412.

Hu X, White KM, Jacobsen NE, Mangelsdorf DJ, Canfield LM. Inhibition of growth and cholesterol synthesis in breast cancer cells by oxidation products of  $\beta$ -carotene. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1998, 9, 567-574.

Hughes DA, Wright AJA, Finglas PM, Polley AC, Bailey AL, Astley SB, Southon S. Effects of lycopene and lutein supplementation on the expression of functionally associated surface molecules on blood monocytes from healthy male non-smokers. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 182 (1), S11-S15.

Ikawa H, Kamitami H, Calvo BF, Foley JF, Eling TE. Expression of 15-lipoxygenase-1 in human colorectal cancer. *Cancer Research*, 1999, 59, 360-366.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 2005, 171, 939-945.

Iwahashi H. High-performance liquid chromatographic determination of linoleic acid peroxide-derived radicals using electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 2000, 904, 197-202.

Jakobsson PJ, Odlander B, Steinhilber D, Rosén A, Claesson HE. Human B lymphocytes possess 5-lipoxygenase activity and convert arachidonic acid to leucotriene B<sub>4</sub>. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 178 (1), 302-308.

Jakschik B, Sun FF, Lee LH, Steinhoff MM. Calcium stimulation of a novel lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1980, 95 (1), 103-110.

Jarén-Galán M, Mínguez-Mosquera MI. Quantitative and qualitative changes associated with heat treatments in carotenoid content of paprika oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 4379-4383.

Jarén-Galán M, Mínguez-Mosquera MI. B-carotene and capsanthin co-oxidation by lipoxygenase. Kinetic and thermodynamic aspects of the reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 4814-4820.

Jarén-Galán M, Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI. Prediction of decoloration in paprika oleoresins. Application to studies of stability in thermodynamically compensated systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 945-951.

Jeffery J, Holzenburg A, King S. Physical barriers to carotenoid bioaccessibility. Ultrastructure survey of chromoplast and cell wall morphology in nine carotenoid-containing fruits and vegetables. , 2012, 92, 2594-2602.

Joglekar AM, May AT. Product excellence through design of experiments. Cereal World, 1987, 32, 857-868.

Kabak B, Ozbey F. Assessment of bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an *in vitro* digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. Journal of Food Composition and Analysis, 2012, 27, 21-31.

Kanner J, Lapidot T. The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. Free Radical Biology and Medicine, 2001, 31, 1388-1395.

Kanner J. Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. , 2007, 51, 1094-1101.

Kennedy TA, Liebler DC. Peroxyl radical oxidation of  $\beta$ -carotene: Formation of  $\beta$ -carotene epoxides. Chemical Research in Toxicology, 1991, 4, 290-295.

Kensler TW, Taffe BG. Free radicals in tumor promotion. Advances in Free Radical Biology and Medicine, 1986, 2, 347-387.

Kowalski D, Feeley RM, Jones DP. Use of exogenous glutathione for metabolism of peroxidized methyl linoleate in rat small intestine. The Journal of Nutrition, 1990, 120, 1115-1121.

Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. Pure and Applied Chemistry, 1994, 66, 1003-1010.

Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CBHW, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: Semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *Journal of Pathology*, 2003, 201, 28-36.

Kubow S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science and Technology*, 1990, 67-71.

Lapidot T, Granit R, Kanner J. Lipid hydroperoxidase activity of myoglobin and phenolic antioxidants in simulated gastric fluid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 3391-3396.

LeGrand TS, Aw TY. Intestinal absorption of lipid hydroperoxides. En: *Intestinal Lipids Metabolism*, páginas:351-366. Eds.: Mansbach C, Kuksis A, Tso P. Plenum Publishing Corporation, Nueva York (EEUU). 2001.

Leo MA, Ahmed S, Aleynik SI, Siegel JH, Kasmin F, Lieber CS. Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions. *Journal of Hepatology*, 1995, 23, 550-556.

Liebler DC. Antioxidant reactions of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 669, 20-31.

Liu D, Kispert LD. Electrochemical aspects of carotenoids. *Recent Research Developments in Electrochemistry*, 1999, 2, 139-157.

Liu J, Ledoux DR, Veum TL. In vitro prediction of phosphorous availability in feed ingredients for swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 2678-2681.

Lochner RH, Matar JE. Designing for quality. An introduction to the best of Taguchi and Western methods of statistical experimental design. En: *Two-level experiments: fractional factorial designs*. Eds.: Chapman and Hall, Londres (Inglaterra). 1990.

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. Review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, 560, 1-65.

Luaces P, Sanz C, Prez AG. Termal stability of lipoxygenase and hydroperoxide lyase from olive fruit and repercusión on olive oil aroma biosíntesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55 (15), 6309-6313.

Mader I.  $\beta$ -Carotene: thermal degradation. *Science*, 1964, 144, 533-534.

Maiorino M, Ursini F, Cadenas E. Reactivity of metmyoglobin towards phospholipid hydroperoxides. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, 16 (5), 661-667.

Malone WF. Studies evaluating antioxidants and  $\beta$ -carotene as chemopreventives. Review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 53 (1), 305S-313S.

Manzocco L, Nicoli MC. Food design: from the methodological approach to the case study of low-calorie syrups. *Trends in Food Science and Technology*, 2002, 13, 422-429.

Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1981, 34, 2248-2256.

Mares-Perlman JA, Millen AE, Ficek TL, Hankinson SE. The body evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132, 518S-524S.

Marnett L. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis*, 1987, 8, 1365-1373.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel

member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *Journal of Cell Biology*, 1998, 142, 117-127.

Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *British Medical Journal*, 1990, 300, 230-235.

McClure TD, Liebler DC. A rapid method for profiling the products of antioxidant reactions by negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 1995, 8, 128–135.

McVie J, Sinclair RS, Tait D, Truscott TG, Land EJ. Electron transfer reactions involving porphyrins and carotenoids. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transaction 1*, 1979, 75, 2869–2872.

Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 1996, 383, 240-242.

Mínguez-Mosquera MI, Jarén-Galán M, Garrido-Fernández, J. Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochemistry*, 1993, 32 (5), 1103-1108.

Mínguez-Mosquera MI, Jarén-Galán M. Kinetics of decolouring of carotenoid Pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1995, 67, 153-161.

Mínguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41, 1616-1620.

Mínguez-Mosquera MI, Pérez-Gálvez A. Color quality in paprika oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 5124-5127.

Mínguez-Mosquera MI. Cuantificación de pigmentos. En: Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos, páginas:159-162. Ed.: Mínguez-Mosquera MI. Secretariado de publicaciones de la Universidad de Sevilla (España), 1997.

Mo H, Elson CE. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. *The Journal of Nutrition* 1999, 129, 804-813.

Mohr, D, Umeda, Y, Redgrave, TG, Stocker, R. Antioxidant defenses in rat intestine and mesenteric lymph. *Redox Report*, 1999, 4 (3), 79-87.

Monnier VM. Dietary advanced lipoxidation products as risk factors for human health – a call for data. , 2007, 51, 1091-1093.

Mordi RC, Walton JC, Burton GW, Hughes L, Ingold KU, Lindsay DA, Moffatt DJ. Oxidative degradation of  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron*, 1993, 49, 911-928.

Mordi RC, Walton JC, Burton GW, Hughes L, Ingold KU, Lindsay DA. Exploratory study of  $\beta$ -carotene autoxidation. *Tetrahedron Letters*, 1991, 32, 4203-4206.

Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Progress in Lipid Research*, 1997, 36(1), 1-21.

Mukinda JT, Syce JA, Fisher D, Meyer M. Effect of the plant matrix on the uptake of luteolin derivatives-containing *Artemisia afra* aqueous-extract in Caco-2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 130, 439-449.

Myers RH, Montgomery DC. Introduction to response surface methodology. En Response Surface Methodology. Process and Product Optimization using Designed Experiments, páginas: 1-16. Eds.: Box GEP, Montgomery DW. John Wiley & Sons Inc., Nueva York (EEUU). 1995.

Nakatsugawa K, Kaneda T. Absorption and metabolism of methyl linoleate hydroperoxides in rats. Journal of Japan Oil Chemists' Society, 1983, 32, 361-366.

Nara E, Hayashi H, Kotake M, Miyashita K, Nagao A. Acyclic carotenoids and their oxidation mixtures inhibit the growth of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Nutrition and Cancer, 2001, 39, 273-283.

O'Brien PJ, Frazer AC. The effect of lipids peroxides on the biochemical constituents of the cell. Proceedings of the Nutrition Society, 1966, 25, 9-18.

Olson JA, Hayaishi O. The enzymatic cleavage of  $\beta$ -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1965, 54, 1364-1370.

Olson JA. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. Review. The Journal of Nutrition, 1996, 126 (4), 1208S-1212S.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. The New England Journal of Medicine, 1996, 334, 1150-1155.

Oomen AG, Tolls J, Sips AJ, Groten JP. In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, 44, 116-124.

O'Neill ME, Carroll Y, Corridan B, Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Van den Berg H, Hinger I, Rousell AM, Chopra M, Southon S, Thurnham DI. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 2001, 85, 499-507.

Pattee HE, Singleton JA. Isolation of isomeric hydroperoxides from the peanut lipoxygenase-linoleic acid reaction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1977, 54, 183-185.

Peng X, Yan H, You Z, Wang P, Wang S. Effects of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned patients. *Burns*, 2004, 30, 135-139.

Pérez Gilabert M, García Carmona F. Chromatographic analysis of lipoxygenase products. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 465, 319-335.

Pérez-Gálvez A, Jarén-Galán M, Mínguez-Mosquera MI. Effect of high-temperature degradative processes on ketocarotenoids present in Paprika oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 2966-2971.

Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI. Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1569, 31-34.

Periago MJ, Rincón F, Jacob K, García-Alonso J, Ros, G. Detection of Key factors in the extraction and quantification of lycopene from tomato and tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 8825-8829.

Peto R, Doll R, Buckely JD, Sporn MB. Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates? Review. *Nature*, 1981, 290, 201-208.

Pfander H. Carotenoids: an overview. En: Carotenoids. Methods in enzymology, volumen 213, páginas: 3-8. Ed.: Packer L. Academic Press, San Diego (EEUU), 1992.

Pind S, Kuksis A. Isolation of purified brush-border membranes from rat jejunum containing a  $Ca^{2+}$  -independent phospholipase  $A_2$  activity. Biochimica et Biophysica Acta, 1987, 901, 78-87.

Pinelo M, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. Food Chemistry, 2004, 88, 201-207.

Ponz de Leon M, Carubbi F, di Donato P, Carulli N. Cholesterol esterase activity of human intestinal mucosa. Digestive Diseases and Sciences, 1985, 30 (11), 1053-1064.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice- Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26, 1231-1237.

Reboul E, Abou L, Mikail C, Ghiringhelli O, André M, Portugal H, Jourdeuil-Rahmani D, Amiot MJ, Lairon D, Borel P. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). Biochemical Journal, 2005, 387, 455-461.

Reddy BS. Dietary fat and colon cancer. En: Experimental Colon Carcinogenesis, páginas 225-239. Ed.: Antrup H y Williams GM. CRC Press, Boca Ratón (EEUU), 1983.

Reeder BJ, Wilson MT. Mechanism of reaction of myoglobin with the lipid hydroperoxide hydroperoxyoctadienoic acid. Biochemica Journal, 1998, 330, 1317-1323.

Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM, Holloway DE. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? Free Radical Research, 1997, 26, 381-398.

Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 1997b, 2 (4), 152-159.

Rincón F, Martínez B, Delgado JM. Detection of factors influencing nitrite determination in meat. *Meat Science*, 2003, 65, 1421-1427.

Ringer T, DeLoof M, Winterrowd G, Francom S, Gaylor S, Ryan J, Sanders M, Hughes G. Beta-carotene's effects on serum lipoproteins and immunologic indices in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 53, 688-694.

Ríos JJ, Fernández-García E, Mínguez-Mosquera MI, Pérez-Gálvez A. Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry*, 2008, 106, 1145-1153.

Robison GK. Plan a single experiment. En *Practical strategies for experimenting*, páginas: 113-140. Eds.: J Wiley & Sons. West Sussex (Inglaterra). 2000.

Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 1996, 96, 693-702.

Rosenberg DW, Kappas A. Characterization of heme oxygenase in the small intestinal epithelium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 274 (2), 471-480.

Rowe A. Retinoid X receptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1997, 29, 275-278.

Samuelsson B. Leukotrienes: Mediators of Immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 1983, 220, 568-575.

Santos MS, Meydani SN, Leka L, Wu D, Fotouhi N, Meydani M, Hennekens CH, Gaziano JM. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by  $\beta$ -carotene supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1996, 64, 772-777.

Schneider C, Schreier P, Herderich M. Análisis of lipoxygenase-derived fatty acid hydroperoxides by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Lipids*, 1997, 32 (3), 331-336.

Schram LB, Nielsen CJ, Porsgaard T, Nielsen NS, Holm R, Mu H. Food matrices affect the bioavailability of (n-3) polyunsaturated fatty acids in a single meal study in humans. *Food Research International*, 2007, 40, 1062-1068.

Schweiggert RM, Mezger D, Schimpf F, Steingass CB, Carle R. Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya and tomato. *Food Chemistry*, 2012, 135, 2736-2742.

Serpen A, Gökmen V. Effects of  $\beta$ -carotene on soybean lipoxygenase activity: Kinetic studies. *European Food Research and Technology*, 2007, 224, 743-748.

Serra A, Macià A, Romero MP, Valls J, Bladé C, Arola L, Motilva MJ. Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in *in vitro* and *in vivo* models. *British Journal of Nutrition*, 2010, 103, 944-952.

Shen Z, Apriani C, Weerakkody R, Sanguansri L, Augustin MA. Food matrix effects on *in vitro* digestion of microencapsulated tuna oil powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 8442-8449.

Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 200, 40 (1), 1-42.

Shornick LP, Holtzman MJ. A cryptic, microsomal-type arachidonate 12-lipoxygenase is tonically inactivated by oxidation-reduction conditions in cultured epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (1), 371-376.

Siems WG, Sommerburg O, Hurst JS, van Kuijk FJGM. Carotenoid oxidative degradation products inhibit Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Free Radical Research*, 2000, 33, 427-435.

Singh J, Dartois A, Kaur L. Starch digestibility in food matrix: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 2010, 21, 168-180.

Skorey KI, Gresser MJ. Calcium is not required for 5-lipoxygenase activity at high phosphatidyl choline vesicles concentrations. *Biochemistry*, 1998, 37, 8027-8034.

Smith PK, Kronhn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150, 76-85.

Sommerburg O, Langhans CD, Arnhold J, Leichsenring M, Salerno C, Crifò C, Hoffmann GF, Debatin KM, Siems WG.  $\beta$ -Carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid—a model for neutrophil-derived degradation. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, 35, 1480-1490.

Stohs SJ, Grafström RC, Burke MD, Moldéus PW, Orrenius SG. The isolation of rat intestinal microsomes with stable cytochrome P-450 and their metabolism of benzo ( $\alpha$ ) pyrene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1976, 177, 105-116.

Stratton SP, Schaefer WH, Liebler DC. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of  $\beta$ -carotene. *Chemical Research in Toxicology*, 1993, 6, 542–547.

Surrey K. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiology*, 1964, 65-70.

Terao J. Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 1989, 24, 659-661.

Thurnhofer H, Hauser H. Uptake of cholesterol by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry*, 1990, 29, 2142-2148.

Tso P. Intestinal lipid absorption. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*, volumen 2, páginas: 1867-1908. Eds.: Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH. Raven Press, New York (EEUU), 1994.

Tydeman EA, Parker ML, Wickham MJ, Rich GT, Faulks RM, Gidley MJ, Fillery-Travis A, Waldron KW. Effect of carrot (*Daucus carota*) microstructure on carotene bioaccessibility in the upper gastrointestinal tract. 1. *In vitro* simulations of carrot digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, 9847-9854.

Tyssandier V, Reboul E, Dumas JF, Bouteloup-Demange C, Armand M, Marcand J, Sallas M, Borel P. Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2003, 284, G913-G923.

Uhl J, Klan N, Rose M, Entian KD, Werz O. The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (6), 4374-4379.

Upritchard JE, Schuurman RWC, Wiersma A, Tijburg LBM, Coolen SAJ, Rijken PJ, Wiseman SA. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, non-smoking adult. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, 78, 985-992.

Usami M, Komurasaki T, Hanada A, Kinoshita K, Ohata A. Effect of gamma-linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition*, 2003, 19, 150-156.

Usami M, Muraki K, Iwamoto M, Ohata A, Matsushita E, Miki A. Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on tight junction permeability in intestinal monolayer cells. *Clinical Nutrition* 2001, 20, 351-359.

Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1951, 23 (2-3), 110-127.

van de Kerkhof E, Ungell ALB, Sjöberg ÅK, de Jager MH, Hilgendorf C, de Graaf IAM, Groothuis GMM. Innovative methods to study human intestinal drug metabolism in Vitro: Precision-cut slices compared with Ussing chamber preparation. *Drug Metabolism and Disposition*, 2006, 34 (11), 1893-1902.

von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *The American Journal of Cardiology*, 2005, 96, 10D-14D.

Voorrips LE, Goldbohm RA, Verhoeven DT, van Poppel GA, Sturmans F, Hermus RJ, van den Brandt PA. Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Causes and Control*, 2000, 11, 101-115.

Vulcain E, Goupy P, Caris-Veyrat C, Dangles O. Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: Action in the aqueous vs. lipid phase. *Free Radical Research*, 2005, 39 (5), 547-563.

Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell RM. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given  $\beta$ -carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91, 60-66.

Werder M, Han CH, Wehrli E, Bimmler D, Schulthess G, Hauser H. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry*, 2001, 40, 11643-11650.

Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Hypothesis: UK consumption of dietary lipid hydroperoxides - a possible contributory factor to atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1996, 119, 261-263.

Yamauchi R, Miyake N, Inoue H, Kato K. Products formed by peroxy radical oxidation of  $\beta$ -carotene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41, 708-713.

Yamauchi R, Tsuchihashi K, Kato K. Oxidation products of  $\beta$ -carotene during the peroxidation of methyl linoleate in the bulk phase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1998, 62 (7), 1301-1306.

Yan W, Jang GF, Haeseller F, Esumi N, Chang J, Kerrigan M, Campochiaro M, Campochiaro P, Palczewski K, Zack DJ. Cloning and characterization of a human  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-15, 15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics*, 2001, 72, 193-202.

Yeh SL, Hu ML. Induction of oxidative DNA damage in human foreskin fibroblast Hs68 cells by oxidized  $\beta$ -carotene and lycopene. *Free Radical Research*, 2001, 35, 203-213.

Yeum KJ, Lee-Kim YC, Yoon S, Lee KY, Park IS, Lee KS, Kim BS, Tang G, Russell RM, Krinsky NI. Similar metabolites formed from  $\beta$ -carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase, or linoleic acid hydroperoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 321 (1), 167-174.

Zechmeister L. Stereoisomeric provitamins A. *Vitamins and hormones*, 1949, 7, 57-81.

Zhang K, Nagaratnam P. Das Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochemical Pharmacology*, 1994, 47 (1), 2063-2068.

Zhang K, Yang EB, Tang WY, Wong KP, Mack P. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 1997, 54 (9), 1047-1053.

Zheng S, Yumei F, Chen A. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 2007, 444-453.

Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes and Control*, 1996, 7, 15

Zorn H, Breithaupt DE, Takenberg M, Schwack W, Berger RG. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32, 623-628.