





UNIVERSITAT  ROVIRA I VIRGILI

 **D** Departament de Bioquímica i Biotecnologia  
**B** Facultat de Química de Tarragona

# ABSORCIÓN *IN VIVO* DE OLIGÓMEROS DE EPICATEQUINA

**Bernardino García Ramírez**  
**Tarragona, 2005**







**MEMORIA PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA.**

PROGRAMA DE DOCTORADO DE "NUTRICIÓN Y METABOLISMO", BIENIO 1999–2001.

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA.  
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI.  
TARRAGONA**

**Presentada por:  
Bernardino García Ramírez**

La directora de Tesis:

**Dra. M<sup>a</sup> Cinta Bladé i Segarra**  
*Catedràtica d'Escola Universitària*

El interesado:

**Bernardino García Ramírez**





**Dra. M<sup>a</sup> Cinta Bladé i Segarra**, Catedrática d'Escola Universitària y Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili,

HAGO CONSTAR,

que el presente trabajo, con título **Absorción *in vivo* de oligómeros de epicatequina**, que presenta el Sr. **Bernardino García Ramírez** para optar al Grado de Doctor en Bioquímica por la Universitat Rovira i Virgili, ha sido realizado bajo mi dirección, y que todos los resultados obtenidos son fruto de los experimentos llevados a cabo por este doctorando.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación.

Dra. M<sup>a</sup> Cinta Bladé i Segarra

Tarragona, 28 de enero de 2005.





*"De todas las cosas que ha hecho Dios,  
no hay nada más valioso ni mejor que el vino".*  
Platón

"La bota de vino" por  
Antonio Carrillo Bernal



**E**sta tesis doctoral no sería hoy en día una realidad sin la ayuda desinteresada y el trabajo de muchas personas, a las que quiero agradecer sinceramente su colaboración, y al mismo tiempo dedicar con gran orgullo este trabajo. Agradezco de todo corazón la ayuda y amistad que todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biotecnología me han ofrecido en todo momento, y en especial a todos los componentes del equipo de investigación de vino y salud. Asimismo, querría destacar especialmente el trabajo realizado por mi directora de tesis, la Dra. Cinta Bladé, a la que agradezco que me haya brindado la oportunidad de trabajar con ella, de compartir sus conocimientos científicos y su amistad. Gracias Cinta por haber confiado en mí.

Agradezco a los Drs. Fernando Zamora y Sergio Castellón la ayuda que me prestaron en los instantes iniciales de esta tesis doctoral. Asimismo, quiero agradecer los consejos y la ayuda recibida por parte del Dr. Xavier Remesar.

Doy también las gracias a Inma Rafecas y Paulina Savall por su paciencia y por haberme permitido utilizar el cromatógrafo líquido con detector de radiactividad para el análisis de mis muestras. Del mismo modo, quiero agradecer el excelente trabajo realizado por la Dra. Carmen Crespo que puso a mi disposición su sabiduría y pericia en el análisis de muchas muestras mediante espectrometría de masas.

Agradezco a nuestro técnico de laboratorio Santiago Moreno su ayuda a la hora de canular y sacrificar a los animales de experimentación, así como sus consejos sobre algunas de las técnicas de laboratorio utilizadas. También doy las gracias al Dr. Santi Garcia que me enseñó como pedir la bibliografía a otros autores. Gracias Santi por aquella página web que tanto tiempo y trabajo me ahorró.

A los amigos y compañeros que he conocido en estos años y con los que he compartido trabajo y amistad, tanto dentro como fuera del laboratorio, les agradezco la paciencia que han tenido conmigo. Gracias Montse por tu ayuda con las células, gracias Vanesa por tu carácter desenfadado (y por los nicanores y hojaldres), gracias Ramón y Cristina por las largas charlas sobre ciencia y sociedad, y gracias Angel, Josep y Cesc por haberse convertido en algo más que simples amigos.

Por último, quisiera agradecer a mi familia y en particular a mis padres todo el apoyo que me han dado, ya que su sacrificio diario ha hecho posible que hoy en día yo pueda estar donde estoy.

A mi mujer Sònia, le agradezco la paciencia que tiene conmigo, su ayuda y su constante apoyo. Gracias por ser como eres.



A mis padres  
y a Sònia.





## ÍNDICE

*"Noé, agricultor, comenzó a labrar la tierra  
y plantó una viña".*  
Génesis, capítulo 9 versículo 20



## **1. Introducción**

<b>1.1 La relación del vino con la salud</b>	pág. 29
<b>1.2 Los compuestos fenólicos</b>	pág. 36
1.2.1 Clasificación de los compuestos fenólicos	pág. 38
1.2.1.1 No flavonoides	pág. 38
1.2.1.2 Flavonoides	pág. 40
1.2.2 Flavanoles	pág. 42
1.2.2.1 Monómeros o flavan-3-oles	pág. 42
1.2.2.2 Prodanidinas diméricas o dímeros	pág. 43
1.2.2.3 Procianidinas oligoméricas	pág. 44
1.2.2.4 Polímeros o taninos condensados	pág. 45
1.2.3 Compuestos fenólicos presentes en el vino	pág. 46
<b>1.3 Efectos fisiológicos asociados a los compuestos fenólicos</b>	pág. 49
1.3.1 Interacciones con proteínas	pág. 50
1.3.2 Formación de complejos con iones metálicos	pág. 52
1.3.3 Actividad antioxidante y eliminadora de radicales libres	pág. 53
1.3.4 Efectos sobre el metabolismo glucídico, lipídico y mineral	pág. 56
1.3.5 Efectos sobre la fluidez de la membrana	pág. 57
1.3.6 Efectos antiinflamatorio y antihistamínico	pág. 58
1.3.7 Efectos cardioprotector y cardiovascular	pág. 58
1.3.8 Efectos antivírico, antibacteriano y antifúngico	pág. 61
1.3.9 Efectos sobre el tracto gastrointestinal	pág. 61
1.3.10 Efecto antimutagénico. Cáncer	pág. 62
<b>1.4 Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos</b>	pág. 62
1.4.1 Fuentes de compuestos fenólicos en la dieta	pág. 63
1.4.2 Absorción de los compuestos fenólicos	pág. 67
1.4.3 Metabolismo de la microflora intestinal	pág. 70
1.4.4 Metabolismo de los compuestos fenólicos	pág. 74
<b>1.5 Análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos fenólicos</b>	pág. 78
1.5.1 Métodos convencionales	pág. 79
1.5.1.1 Ensayos colorimétricos basados en reacciones redox y reacciones de formación de complejos	pág. 79
1.5.1.2 Ensayos colorimétricos basados en los grupos funcionales	pág. 80
1.5.2 Métodos basados en efectos biológicos: precipitación con proteínas	pág. 85
1.5.3 Métodos cromatográficos	pág. 85
1.5.3.1 Cromatografía de gases	pág. 85
1.5.3.2 Cromatografía en capa fina	pág. 85
1.5.3.3 Cromatografía líquida de alta resolución	pág. 86
<b>1.6 Bibliografía</b>	pág. 92

## **2. Síntesis de procianidinas radiactivas**

<b>2.1 Introducción</b>	pág. 129
2.1.1 Biosíntesis de las procianidinas	pág. 129
2.1.2 Reactividad de los compuestos fenólicos	pág. 135
<b>2.2 Obtención de procianidinas radiactivas</b>	pág. 153
2.2.1 Síntesis de oligómeros de epicatequina	pág. 153
2.2.2 Caracterización de los compuestos sintetizados	pág. 161
2.2.3 Marcaje radiactivos de los oligómeros de epicatequina	pág. 179
<b>2.3 Bibliografía</b>	pág. 184

### **3. Digestión y absorción de los oligómeros de epicatequina**

<b>3.1 Introducción</b>	pág. 209
3.1.1 Absorción de las procianidinas	pág. 209
3.1.2 Digestión de las procianidinas	pág. 211
3.1.3 Metabolismo de las procianidinas: degradación	pág. 213
3.1.4 Metabolismo de las procianidinas: conjugación	pág. 214
3.1.5 Excreción de las procianidinas	pág. 215
<b>3.2 Estudio de la biodisponibilidad de oligómeros y polímeros de epicatequina</b>	pág. 217
3.2.1 Digestión ácida y básica de los oligómeros de epicatequina sintetizados	pág. 217
3.2.2 Estudio de la absorción <i>in vivo</i> en la rata de los oligómeros de epicatequina sintetizados sin marcaje radiactivo	pág. 223
3.2.3 Estudio de la absorción <i>in vivo</i> en la rata de los oligómeros radiactivos de epicatequina	pág. 231
<b>3.3 Bibliografía</b>	pág. 237
<b>Conclusiones</b>	pág. 251

## **PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS**

*"el vino es la más sana e higiénica de las bebidas".*  
Louis Pasteur



## **PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS**

La presente tesis doctoral, cuyo título es ABSORCIÓN *IN VIVO* DE OLIGÓMEROS DE EPICATEQUINA, ha sido realizada íntegramente en el laboratorio de investigación que el Departamento de Bioquímica y Biotecnología posee en la Facultad de Química de la Universitat Rovira i Virgili.

Este trabajo de investigación se origina debido al creciente interés suscitado en los últimos años sobre la relación existente entre consumo moderado de vino y salud. Actualmente se acepta que el consumo moderado de alcohol reduce la mortalidad en individuos de mediana y tercera edad mediante diferentes causas, siendo este efecto más remarcable cuando solamente se consideran las enfermedades cardiovasculares. Determinados autores consideran que el principio activo es el alcohol y que, en consecuencia, todas las bebidas alcohólicas son iguales de beneficiosas para la salud. No obstante, hay autores que consideran que el vino, y en especial el vino tinto, es una bebida alcohólica más saludable, ya que además de poseer alcohol, es un alimento rico en compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos del vino provienen de la semilla y de la piel de la uva, del metabolismo de las levaduras y de las maderas de las tinajas, siendo el vino tinto mucho más rico en este tipo de compuestos que el vino blanco, debido principalmente al proceso de obtención del mismo. Los vinos tintos poseen un contenido total en compuestos fenólicos que oscila entre 1000–4000 mg/L, mientras que el valor típico de un vino blanco suele ser menor de 250 mg/L. Además, aparte de ser una de las bebidas más ricas en compuestos fenólicos, el vino ofrece la ventaja de poseer una matriz hidroalcohólica que solubiliza y hace más biodisponible a este tipo de compuestos que los que están presentes en otros alimentos, como puede ser el caso de frutas y verduras.

El vino contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales se clasifican en diferentes grupos. Se ha establecido que los compuestos fenólicos del vino que ejercen un efecto protector sobre el aparato circulatorio son las procianidinas, sustancias con una gran cantidad de propiedades fisiológicas que pueden mejorar la salud de la población. En nuestro grupo de investigación se ha comprobado como las procianidinas, además de poseer un efecto antioxidante y antígenotóxico, ejercen un efecto protector sobre hepatomas sometidos a estrés oxidativo y modifican la expresión génica de diferentes enzimas antioxidantes (como Cu,Zn-superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa). Asimismo, la ingesta de estos compuestos provoca una disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos libres, lipoproteínas asociadas a Apo B y colesterol-LDL, mientras que provoca un ligero aumento de los niveles plasmáticos de colesterol-HDL. Además, las procianidinas ejercen un efecto beneficioso en situación de diabetes, ya que ejercen un efecto antihiper glucémico mediante una vía insulino métrica.

Para protagonizar un efecto real *in vivo*, las procianidinas deben ser absorbidas de la dieta y dirigidas hacia los órganos diana. La mayoría de los estudios realizados sobre absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos se han llevado a cabo con quercetina y catequinas presentes en el té, el chocolate, el cacao, pero se conoce poco sobre los procesos de absorción, transporte sanguíneo, distribución tisular, metabolismo y excreción de las procianidinas existentes en el vino.

Según algunos datos bibliográficos, parece evidente que las proteínas que intervienen en el transporte sanguíneo y en el proceso de absorción intestinal dependen de la estructura específica de cada procianidina concreta. Los principales problemas que condicionan esta falta de conocimiento sobre este tema se deben básicamente a problemas metodológicos, debido a que el proceso de extracción de las procianidinas y su posterior cuantificación condicionan la necesidad de una elevada concentración de estos compuestos en los sistemas biológicos.

Como consecuencia de estos antecedentes, el grupo de investigación de Vino y Salud del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili se planteó el

estudio de la absorción de oligómeros de procianidinas presentes en el vino, así como la estabilidad de éstos durante el proceso digestivo y el metabolismo de los mismos.

Numerosos trabajos científicos han demostrado la absorción tanto en ratas como en humanos de monómeros (catequina, epicatequina y quercetina entre otros), mientras que los trabajos realizados sobre la absorción de procianidinas con un grado de condensación mayor son escasos. En este sentido, la utilización de un extracto de procianidinas extraído de las semillas de las uvas (compuesto por monómeros como ácido gálico, catequina, epicatequina, dímeros, trímeros y algún tetrámero) permitiría el estudio de la absorción de una mezcla heterogénea de procianidinas. Sin embargo, el aumento del grado de polimerización en las procianidinas provoca un aumento del número de estructuras isoméricas, que junto a los problemas metodológicos comentados anteriormente provocan una disminución en la concentración plasmática de estos compuestos, comportando esto una mayor dificultad para detectarlos. Es por esta razón que el objetivo prioritario del equipo de investigación se basó en la obtención de oligómeros de procianidinas presentes en el vino marcados radiactivamente que hicieran posible el estudio de la absorción de estos compuestos y que permitiesen su detección plasmática a niveles sensiblemente bajos. Además, para eliminar complejidad en la muestra, los oligómeros sintetizados solamente constarían de unidades monoméricas de epicatequina enlazadas entre sí por algún reactivo que reaccionara con ésta para dar lugar a estructuras de un grado de condensación superior. De esta manera, podrían solucionarse una serie de problemas metodológicos existentes que hacen realmente complicado el estudio del proceso de absorción de este tipo de compuestos.

Analizando la estructura de los oligómeros de procianidinas existentes en el vino tinto, el proceso de formación de los mismos y la reactividad de las procianidinas monoméricas, como es el caso de la epicatequina, se comprobó que era factible la simulación a escala de laboratorio de un proceso de envejecimiento similar al que se da en los vinos. Durante este proceso de simulación, se consiguió que la epicatequina reaccionara con acetaldehído para formar diversos oligómeros de epicatequina de un amplio grado de polimerización. La puesta en marcha de esta reacción de polimerización, el estudio de las condiciones óptimas y de los parámetros que permitan controlarla, la caracterización de los compuestos formados y el marcaje radiactivo de los mismos son un pilar básico de esta tesis doctoral.

Paralelamente, y a medida que se sintetizan los oligómeros de epicatequina, se estudia la estabilidad de los mismos en unas condiciones de pH determinadas cuyo propósito es el de simular *in vitro* el proceso de digestión gástrica que se lleva a cabo en el estómago y, por otra parte, simular el proceso de digestión intestinal a pH básico que tiene lugar en el intestino delgado. Finalmente, se lleva a cabo el estudio del proceso de absorción *in vivo* en ratas de los oligómeros de epicatequina sintetizados (tanto con marca radiactiva como sin ella), demostrándose que se absorben dímeros de epicatequina.







# 1. INTRODUCCIÓN

*"el vino es cosa admirablemente apropiada para el hombre, tanto en el estado de salud como en el de enfermedad, si se le administra oportunamente y con justa medida, según la constitución individual".*  
Hipócrates



## 1.1 La relación del vino con la salud

En los países del sur de Europa es común el consumo de vino durante las comidas. Francia, España, Portugal, Italia, Grecia y Turquía son zonas de clima mediterráneo donde se produce vino, de ahí que sea algo habitual el consumo de este producto. En España, el cultivo de la vid está perfectamente implantado desde hace años, hecho que la convierte en uno de los grandes productores mundiales junto a Francia. Las particulares características de la orografía española hacen que haya zonas en las cuales el vino adquiere un elevado grado de calidad de manera que se pueden clasificar los diferentes tipos de vino en diferentes denominaciones de origen (DO). Ejemplos de estas últimas son DO Rioja, DO Ribera del Duero, DO Navarra, DO Valdepeñas, entre otras muchas. Cataluña posee un suelo especialmente rico para la producción de vino existiendo diferentes DO como Terra Alta, Priorato, Penedés, etc. (Schwarzwälder, 1998).

Se cree que el cultivo de la vid podría tener alrededor de 8000 años de historia. Recientemente se ha descubierto un jarrón de barro encontrado en las montañas de Zagros, en Irán, de 5500 años de antigüedad en cuyo fondo se han encontrado restos de vino. Hasta el momento, es el documento arqueológico más antiguo que se conoce de la historia del vino.

El vino está unido a la historia del hombre desde sus orígenes. Se sitúa el descubrimiento o el desarrollo de la viticultura al sur del Cáucaso, desde donde se extendió a Siria, Egipto y Mesopotamia. Durante el tercer milenio A. C., en Egipto se utilizó el vino con fines sacramentales. Sin embargo, el consumo general de éste no se produjo hasta 2000 años después, cuando el vino entró a formar parte de la vida moderna y ha sido en los últimos decenios cuando la producción de vino se ha extendido por todos los continentes (Soleas, 1997).

El vino llega a España desde las antiguas civilizaciones mediterráneas (fenicios y griegos). Aún hoy se pueden degustar vinos semejantes a aquellos que se producían entonces: el retsina, elaborado en Ática, al que se le añade durante la fermentación resina del pino Aleppo, o el vermut, similar al vino que tomaban los romanos, al que se le añaden hierbas aromáticas (Soleas, 1997).

En este repaso a lo largo de la historia del vino, podemos comprobar que éste es un producto antiquísimo, hecho por el cual no es extraño que haya sido estudiado a fondo, sobre todo durante el siglo XX. Ya en 1933, Dognac realizó su tesis doctoral en medicina sobre un exhaustivo estudio acerca de la longevidad en diversas regiones de Francia (Masquelier, 1987). Dognac era un habitante del Médoc (región francesa donde es habitual el consumo de vino) y comenzó confrontando las clases de edad superior a 60 años de su región con las de la estadística general de toda Francia para el año 1929. Las cifras, referidas a 100.000 habitantes eran elocuentes, como se muestra en la tabla 1.

EDAD (años)	Francia completa	Médoc
60 - 64	4661	6259
65 - 69	3644	5000
70 - 79	4559	6500
80 y más	1053	1981

Tabla 1. Número de habitantes del Médoc (según diferentes edades) frente al número de habitantes totales de Francia referidos a 100.000 habitantes. Adaptado de Masquelier, 1987.

Dognac también comparó las regiones de Gironde (donde se consume vino habitualmente) y Calvados (región donde la sidra es la bebida habitual). Los resultados de esta comparación confirmaban que los índices más elevados de personas centenarias se encontraban en las regiones donde se cultivaban viñedos, tal y como se muestra en la tabla 2.

EDAD (años)	Girona	Calvados	Diferencia
60 - 69	12922	8290	4632
70 - 79	6622	4382	2240
80 - 89	1930	722	1208
90 - 100	154	0	154

Tabla 2. Comparación del número de habitantes (según diferentes edades y referidos a 100.000 habitantes) de las regiones de Girona y Calvados. Adaptado de Masquelier, 1987.

En 1986, Baspeyras retomó las cifras de Dognac y las sometió a la prueba estadística del  $\chi^2$  obteniendo una diferencia muy significativa entre los dos grupos.

El fisiólogo británico St-Leger y sus colaboradores A. L. Cochrane y F. Moore publican en 1979 en el LANCET los resultados de una encuesta realizada en 18 países desarrollados sobre los factores asociados a la mortalidad cardiaca. Este trabajo científico se basó en los índices de mortalidad publicados por la Organización Mundial de la Salud que tomaba en cuenta 16 parámetros y alcanzaba a decenas de millones de habitantes. La conclusión que se desprendía de esta vasta empresa era la existencia de una correlación inversa entre la mortalidad por infarto de miocardio y el consumo habitual de vino, como puede apreciarse en la figura 1 (Bourzeix, 1979; Masquelier, 1987).

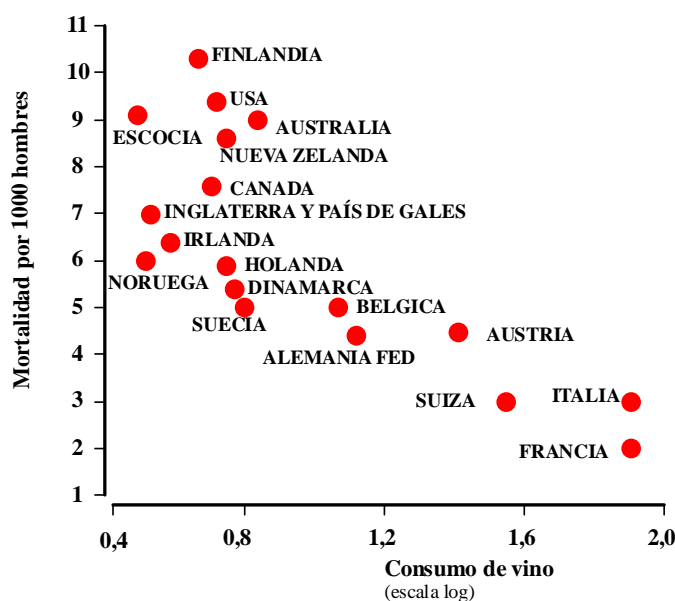


Figura 1. Consumo de vino y mortalidad por países (Adaptado de Bourzeix, 1979)

En la figura 1 y en la tabla 3 se aprecia que países consumidores de vino como Francia e Italia están situados al final de una lista de 18 países industrializados en cuanto a mortalidad por incidencia cardiovascular. Finlandia, que se caracteriza por poseer una dieta rica en grasas igual que Francia pero donde no es frecuente el consumo de vino durante las comidas, posee el nivel más elevado en cuanto a enfermedades coronarias.

Países	Mortalidad por 1000 hombres	Consumo de vino en escala logarítmica de 10
Francia	2.0	2.00
Italia	3.0	1.90
Suiza	3.0	1.50
Austria	4.5	1.40
Alemania	4.5	1.20
Bélgica	5.0	0.90
Suecia	5.0	0.80
Dinamarca	5.6	0.70
Holanda	5.9	0.65
Noruega	6.3	0.45
Irlanda	6.6	0.55
Inglaterra y Gales	7.0	0.50
Canadá	7.8	0.65
Nueva Zelanda	8.8	0.70
Australia	9.0	0.85
Escocia	9.0	0.50
Estados Unidos	9.2	0.70
Finlandia	10.3	0.60

Tabla 3. Relación entre el consumo de vino y la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular en hombres de edades comprendidas entre 55 y 64 años. Adaptado con modificaciones de Schwitters (1995).

Ante estos datos, St-Leger (1979) formuló la siguiente afirmación: "el vino contiene un componente que ejerce un efecto protector frente al infarto de miocardio".

El interés por el estudio del vino aumenta notablemente tras una investigación realizada por la Organización Mundial de la Salud en 1989 llamada proyecto Mónica. Este trabajo confirmó que las tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Francia eran mucho menores que en otros países industrializados como USA y Reino Unido. A esta situación se le denominó paradoja francesa. Ésta se refiere a un estudio realizado en Burdeos (Francia) en el que se tomaba una muestra de sujetos con una dieta rica en grasas (mantequilla, quesos grasos, etc.) y con un riesgo muy elevado de enfermedades cardiovasculares, infartos de miocardio, etc. Se comprobó que esa población tenía un bajo índice de enfermedades cardiovasculares, bajo índice de colesterol en sangre y muy poca cantidad de ataques cardíacos. Otros factores como el hábito de fumar o la presión arterial, no explicaban esta diferencia.

La explicación a estos resultados se buscó en la dieta de los franceses, de tipo mediterránea, especialmente rica en frutas, verduras y vino. Las investigaciones realizadas le atribuyen un papel clave al consumo del vino en la dieta de la población francesa, por su alto contenido en compuestos polifenólicos que actúan como antioxidantes naturales (Criqui, 1994; Renaud, 1992; Renaud, 1994; St. Leger, 1979). Estas consideraciones pueden apreciarse en la figura 2. En los últimos 12 años han aparecido numerosos trabajos científicos que muestran que beber vino, cava y/o cerveza moderadamente es beneficioso para la salud, en especial para la enfermedad coronaria reduciendo en un 50% el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Gaziano, 1993; Weise, 1995; Groenbaek, 1995; Artalejo, 1996; Curhan, 1996; Duncan, 1996; Folts, 1996; Orgogozo, 1997; Plumb, 1998; Lorimier, 2000; Martínez-Valverde, 2000; Kuchta, 2001; Lugasi, 2003; López-Vélez, 2003).

Un ensayo clínico realizado en Dinamarca sobre una población de 13000 personas, cuyos resultados fueron publicados en British Medical Journal en 1995, dejaba claro que las personas que consumían vino moderadamente reducían sensiblemente el riesgo cardiovascular, así como las posibilidades de sufrir otras enfermedades mortales (Groenbaeck, 1995).

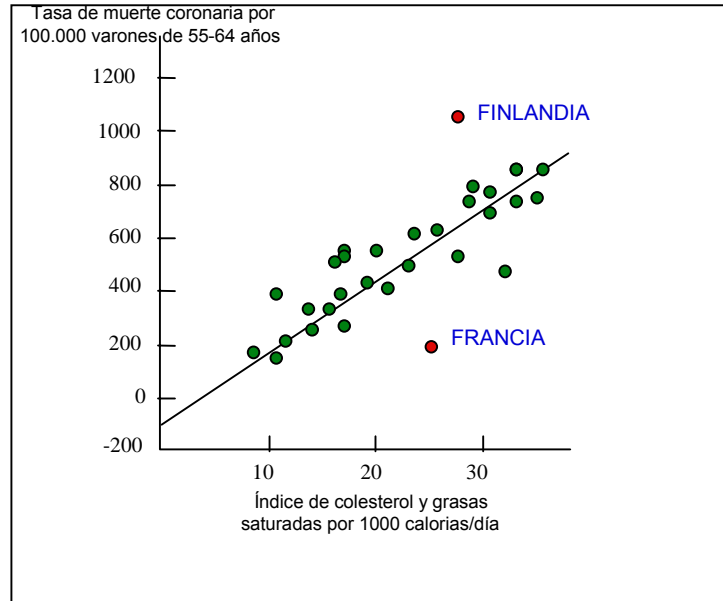


Figura 2. Paradoja Francesa. Correlación entre la tasa de muerte coronaria en varones de 55-65 años de diferentes países y un índice que indica el consumo de grasas saturadas y colesterol. Se podría definir el concepto de Paradoja Francesa como una población con una cantidad elevada de colesterol y grasas saturadas en la dieta y una tasa de mortalidad coronaria anormalmente baja (Artaud-Wild, 1993).

En 1992, otro estudio publicado en la revista *Circulation*, puso de manifiesto el efecto protector de esta bebida contra la patología coronaria (Langer, 1992). Las investigaciones subrayan que la mortalidad coronaria en zonas consumidoras de vino es notablemente inferior a la que registran los países nórdicos. Por tanto, y a tenor de las diferentes pruebas presentadas, el consumo moderado de vino parece ser beneficioso para la salud, tal y como puede apreciarse en la figura 3 que posee forma de J (Finkel, 1996):

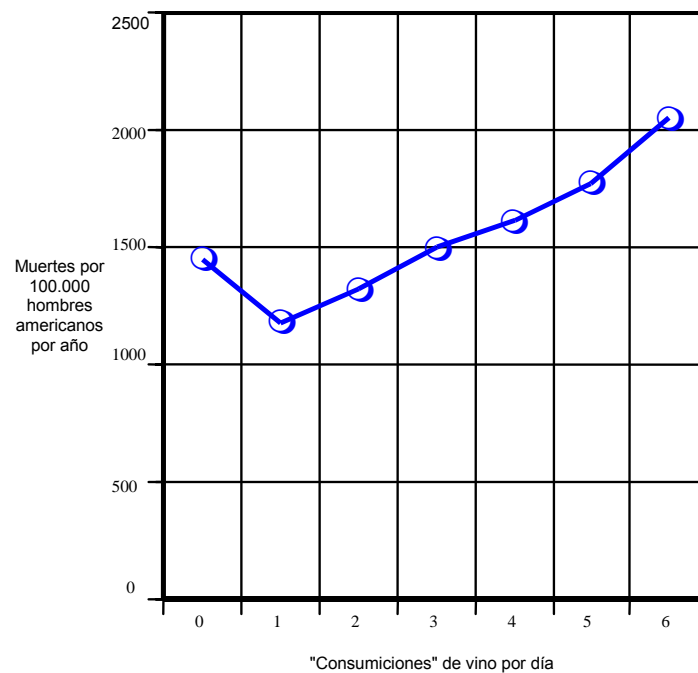


Figura 3. Tasa de mortalidad y consumo de vino: la curva en j. Un consumo moderado de vino parece ser más beneficioso para la salud que el consumo excesivo o no consumo de este producto. Gráfica según H. Finkel, *Wine News*, 10, 14, 1994.



Una de las principales conclusiones que se puede extraer de esta gráfica es que una persona que consuma vino de forma moderada, posee menor probabilidad de mortalidad que una persona abstemia o que abuse del consumo de este producto. En este sentido, un estudio francés realizado en 1997 encontró que los bebedores moderados de vino tinto tienen un riesgo reducido de contraer la enfermedad de Alzheimer y la demencia senil, comparado con los no bebedores de vino. Orgogozo *et al.* (1997), encontraron que los bebedores moderados de vino tinto poseían un riesgo de contraer Alzheimer menor de un 25% y un riesgo de padecer demencia senil menor del 20%. Además, el consumo moderado de vino parece prevenir los efectos adversos que provoca la aspirina en algunos pacientes, según datos publicados por un equipo de investigación del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza con pacientes que sufrían insuficiencia coronaria (Lanas, 1997). Weise *et al.* (1995), comprobaron que los vinos blancos y tintos eran efectivos para destruir las bacterias responsables de las diferentes dolencias estomacales, destacando al vino como más efectivo que el bismuto salicílico en erradicar tres tipos de bacterias que comúnmente provocan intoxicación, disentería y diarrea. Del mismo modo, se demostró que el vino tinto, de entre un campo de 21 bebidas, estaba más fuertemente asociado al decrecimiento del riesgo de formación de cálculos renales ya que reducía el riesgo de formación de éstos en un 39% (Curhan, 1996), reduciendo también en un 19%, con respecto a los abstemios, el riesgo de padecer degeneración macular, dolencia que se ha convertido en la causa más frecuente de ceguera en personas mayores de 65 años al sufrir una pérdida de la visión central, si bien se conserva la visión periférica y la detección de colores (Obisean, 1998).

Rimm *et al.* (1998), encontraron que las mujeres que consumen grandes cantidades de vitamina B6 y folatos tienen una reducción del riesgo de sufrir enfermedades coronarias en un 45%. En un subgrupo de análisis, se observaron sorprendentes diferencias según si las mujeres consumían o no vino. Niveles elevados de ingesta de folatos solamente reducían el riesgo de enfermedades coronarias en un 15% en las mujeres no bebedoras, mientras que las mujeres que consumían moderadamente vino, el porcentaje ascendía al 75%. Los participantes en este experimento no tenían un historial previo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipercolesterolemia o diabetes (Rimm, 1998). Clifford *et al.* (1996), realizaron un cuidadoso estudio en el que se suministraba vino tinto a ratones, como un componente más de su dieta normal. Éstos poseían un 40% menos de probabilidad de padecer cáncer que el grupo de ratones a los que no se suministraba vino tinto en su dieta. Se encontró catequina (componente del vino que demostró propiedades antioxidantes) en el plasma de aquellos ratones que habían consumido vino tinto. La conclusión de este estudio fue, que el consumo de vino tinto retardaba el comienzo de procesos tumorales, que la catequina era absorbida de la dieta y que la administración suplementaria de vino reforzó el crecimiento normal de los ratones y la reproducción de tres generaciones (Clifford, 1996). Además, se han encontrado componentes en el vino tinto que inhiben la formación de tumores cancerígenos y reducen la formación de placas de ateroma en las arterias en conejos (Lorimier, 2000), así como la reducción de las células del cáncer de mama debido a su actividad anti-estrogénica, ya que parece existir una relación directa entre una elevada cantidad de estrógenos y el cáncer de mama (Williams, 1996).

Otros estudios señalan a los compuestos presentes en el vino tinto como responsables de disminuir el índice de oxidación celular y evitar la coagulación de las plaquetas, además de poseer (como se detallará más adelante) efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, inhibidores de la fosfolipasa A2, de la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, glutatión reductasa y xantina oxidasa. Asimismo, se califica a los antioxidantes presentes en el vino de ser más efectivos que la vitamina E en la protección contra procesos de oxidación (Frankel, 1993; Waterhouse, 1994; Folts, 1996; Guohua, 1997). Por último y como dato curioso, Duncan *et col.*, (1996) examinaron la adiposidad central o grasa alrededor de la cintura mediante la medición de la misma y las caderas. En este trabajo se estudiaron a 12000 personas y se llegó a la conclusión de que los bebedores moderados de vino tinto reducen su diámetro de cintura y caderas más significativamente que los no bebedores habituales de vino.

Todos los datos aportados por el momento hacen hincapié en los efectos saludables del vino, si éste se consume con moderación. Sin embargo, ¿posee el vino mayores efectos fisiológicos beneficiosos sobre la salud que otras bebidas alcohólicas?

Existen publicaciones en las que se afirma que el vino proporciona un grado de protección superior que otras bebidas alcohólicas, como es el caso de la cerveza o las bebidas destiladas (Stampfer, 1988; Renaud, 1998; Wannamethee, 1999; Martínez–Valverde; 2000). Por otra parte, existen otros estudios que señalan al alcohol como el elemento protector, no existiendo diferencias importantes entre vino, cerveza y bebidas destiladas (Camargo, 1997; Berger, 1999). Cleophas *et col.* (1999), realizaron un estudio sobre la incidencia de enfermedades coronarias, el riesgo relativo de muertes de éstas y el tipo de bebida alcohólica consumida. Los resultados de este trabajo señalaban que el vino no era más efectivo que otras bebidas alcohólicas, aunque el nivel de significancia en los estudios realizados eran ligeramente mejores para el vino que para la cerveza o las bebidas destiladas.

Con respecto al alcohol, existen evidencias de que los consumidores moderados de bebidas alcohólicas presentan una menor incidencia de mortalidad por enfermedad coronaria (aproximadamente un 70% inferior) que las personas abstemias (Groenbaeck, 1994; Fuchs, 1995). Este efecto cardioprotector del alcohol se debe a su capacidad para aumentar el colesterol HDL (estas lipoproteínas de alta densidad participan activamente en la eliminación del colesterol dentro del organismo) y para disminuir los mecanismos implicados en el fenómeno de coagulación y agregación plaquetaria (Groenbaeck, 1994; Fuchs, 1995; Hein, 1996; Camargo, 1997; Renaud, 1998; Rimm, 1999). Sin embargo, el alcohol posee efectos pro–oxidantes pudiendo aumentar la oxidación del colesterol LDL (Lorimier, 2000).

Si el alcohol fuera el único responsable de este efecto protector, al suministrar una dosis de etanol similar a la presente en el vino, el efecto de ambos (vino y solución etanólica) sería el mismo; no obstante, existen indicios de que el vino ejerce un mayor efecto protector que el alcohol (Frankel, 1993; Kinsella, 1993; Waterhouse, 1994; Clifford, 1996; Williams, 1996; Folts, 1996; Renaud, 1996 y 1998; Lang, 1997). La pregunta que surge es obvia: ¿cuáles son los compuestos responsables de este efecto protector adicional del vino?. La respuesta se encuentra en los compuestos fenólicos presentes en el vino (principalmente en el vino tinto) que no existen en las bebidas destiladas y que están presentes en muy bajas concentraciones en la cerveza y el whisky de malta. Éste es el caso de los ácidos fenólicos, estilbenos y flavonoides, los cuales, serán explicados más adelante (Leighton, 2000; Martínez–Valverde; 2000; Lorimier, 2000).

Se han calificado a los compuestos fenólicos como antioxidantes, antimutagénicos, con capacidad de quelar metales catalíticos y con capacidad para eliminar radicales libres (como se verá más adelante). Los principales efectos que ejercen este tipo de compuestos en los consumidores moderados de vino son la disminución de la agregación plaquetaria y su adhesión al endotelio, un aumento del colesterol HDL independientemente del contenido de alcohol del vino, una inhibición de la oxidación del colesterol LDL (gracias a la capacidad de estos compuestos de secuestrar radicales libres y actuar como antioxidantes), un bloqueo en la formación de células espumosas al inhibir la enzima cicloxigenasa y lipoxigenasa (responsables de la formación de agentes inflamatorios y estimulantes de los macrófagos) además de ocasionar relajación vascular al incrementar la síntesis de óxido nítrico (Stampfer, 1988; Frankel, 1993; Kinsella, 1993; Waterhouse, 1994; Clifford, 1996; Williams, 1996; Folts, 1996; Renaud, 1996 y 1998; Lang, 1997; Orgogozo, 1997; Truelsen, 1998; Hoidrup, 1999; Wannamethee, 1999; Leighton, 2000; Martínez–Valverde; 2000; Lorimier, 2000).

A pesar de todo, al ciudadano de la calle se le plantea una gran duda. ¿qué significa la moderación en el consumo de alcohol?, o bien, ¿cuánto alcohol se puede beber sin sobrepasar el límite de la moderación?. Se puede definir el consumo moderado de alcohol como la cantidad del mismo que puede ser bebida diariamente con el fin de aprovechar el máximo de sus efectos beneficiosos, sin resultar perjudicial para la salud. La tabla 4 refleja algunas de las recomendaciones realizadas por diferentes organismos de diferentes países sobre las cifras de consumo de alcohol diario, citándose la cantidad máxima diaria del mismo que puede ser ingerida tanto por hombres como por mujeres. En consecuencia, una dosis moderada de alcohol estaría por debajo de los valores presentados en la tabla 4.

País	Autoridad	Máximo (g/día)	Máximo (g/día)
		HOMBRES	MUJERES
Francia	Academia de medicina	60	36
Italia	Ministerio de Sanidad	40	30
Japón	Ministerio de Sanidad	39.5	-
Reino Unido	Ministerio de Sanidad	32	24
España	Ministerio de Sanidad	30	20
EEUU	Ministerio de Agricultura y Sanidad	28	14
Irlanda	Ministerio de Sanidad	24	16

Tabla 4. Cantidades de alcohol recomendadas y máximos permitidos por algunos países.

La cantidad de alcohol consumida es proporcional al volumen en mililitros de bebida alcohólica ingerida multiplicado por el grado alcohólico de la misma. Expresado en forma matemática sería:

$$\text{Cantidad de alcohol ingerida (g)} = \text{Volumen de bebida alcohólica ingerida en mililitros} * \text{grado alcohólico}$$

No obstante, y para simplificar en gran medida el cálculo de la cantidad de alcohol ingerida por una persona, se suele utilizar el término de unidad de alcohol. Se estima que la unidad de alcohol equivale a unos 8–10 gramos de alcohol, que es lo que contendría un vaso de vino de 100 mililitros, una caña de 200 mililitros de cerveza o una copa de 50 mililitros de Jerez u Oporto. En la tabla 5 se puede observar el contenido en alcohol de algunas de las bebidas alcohólicas más comunes.

La manera más adecuada de calcular el alcohol consumido por una persona es tener en cuenta todas las bebidas ingeridas a lo largo de la semana, ya que no se considera válido el cálculo de un día aislado (generalmente suele consumirse mayor cantidad de alcohol durante los fines de semana). Teniendo en cuenta los datos reflejados en la tabla 4, el Ministerio de Sanidad Español cifra la cantidad máxima diaria ingerida de alcohol en 30 gramos ( $\approx$  4 unidades de alcohol) para los hombres y 20 gramos ( $\approx$  2 unidades de alcohol) para las mujeres. Por tanto, la dosis moderada de alcohol estaría por debajo de 4 unidades diarias de alcohol para el hombre y 2 unidades diarias para la mujer. Se considera un consumo de alcohol excesivo la ingesta diaria de más de 40 gramos de alcohol ( $\approx$  5 unidades de alcohol) o 280 gramos de alcohol semanales en el caso de los hombres y más de 24 gramos/día de alcohol ( $\approx$  3 unidades) o 168 gramos semanales para las mujeres.

Tipo	Contenido de alcohol	Volumen de una consumición (mL)	Cantidad de alcohol	
	(gramos)		(gramos/vaso)	Unidades de alcohol
Vino blanco	11 - 13,5°	270	25,5 - 28,8	3,2 - 3,5
Vino rosado	11,5 - 12°	270	24,5 - 25,6	3 - 3,2
Vino tinto	10,9 - 16°	270	23,2 - 34	2,9 - 4,25
Oporto, cócteles, vermú, Jerez...	15 - 16°	110	13,2 - 14,1	1,65 - 1,8
Cava	11,8°	120	11,3	1,4
Ron	40 - 54°	70	22,4 - 30,2	2,8 - 3,8
Ginebra	40 - 51°	70	22,4 - 22,9	2,8 - 2,9
Vodka	50°	70	28	3,5
Whisky	40 - 43°	100	32 - 34,4	4 - 4,3
Cofiac	24 - 40°	60	17,8 - 19,2	2,2 - 2,4
Cerveza	5 - 7,4	300	11,8 - 17	1,5 - 2
Cointreau	40°	60	19,2	2,4
Ricard	45°	60	21,6	2,7
Licor 43	34°	60	16,3	2
Anís	44°	30	10,6	1,3
Anisette	25°	60	12	1,5

Tabla 5. Contenido de alcohol de las bebidas más comunes (adaptado de Lorimier, 2000).

## 1.2 Los compuestos fenólicos

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático y un anillo benceno con uno o más grupos hidroxilados incluyendo derivados funcionales, como podrían ser ésteres, metilésteres, glucósidos, etc (Tsimidou, 1998). La naturaleza de estos compuestos varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes debido a su estructura química, ya que son excelentes donadores de protones o electrones (Kinsella, 1993). Los polifenoles se encuentran en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello, la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glucósidos siendo solubles en agua y solventes orgánicos (Shahidi, 1995). Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por ser uno de los grupos de compuestos presentes en el reino vegetal, siendo parte importante de la dieta tanto humana como animal. Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8000 compuestos distintos. Tradicionalmente, estos compuestos han sido considerados como antinutrientes, debido al efecto adverso de uno de sus componentes mayoritarios, los taninos, sobre la digestibilidad de la proteína. Sin embargo, actualmente se ha despertado un gran interés por estos compuestos debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio (Martínez-Valverde, 2000).

La forma más frecuente de encontrar los compuestos fenólicos en los vegetales es en forma de monómeros, oligómeros y polímeros, mientras que su presencia en tejidos animales está relacionada con el consumo e ingestión de alimentos vegetales (Andary, 1997). Las principales funciones de estos compuestos en las células vegetales es, por una parte, la de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y, por otra, como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa (Butler, 1992).

Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, tanto frescos como procesados (Clifford, 1992). Su contribución a la pigmentación de los alimentos está claramente reconocida, a través de las antocianidinas, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y de sus productos (Shahidi, 1995; Belitz, 1988). Además, la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos hacia la formación de quinonas (ver figura 4), catalizada por las enzimas polifenol oxidasas, produce un pardeamiento enzimático en los alimentos (McEvily, 1992), fenómeno de vital importancia para asegurar la calidad de frutas y verduras durante el procesado.

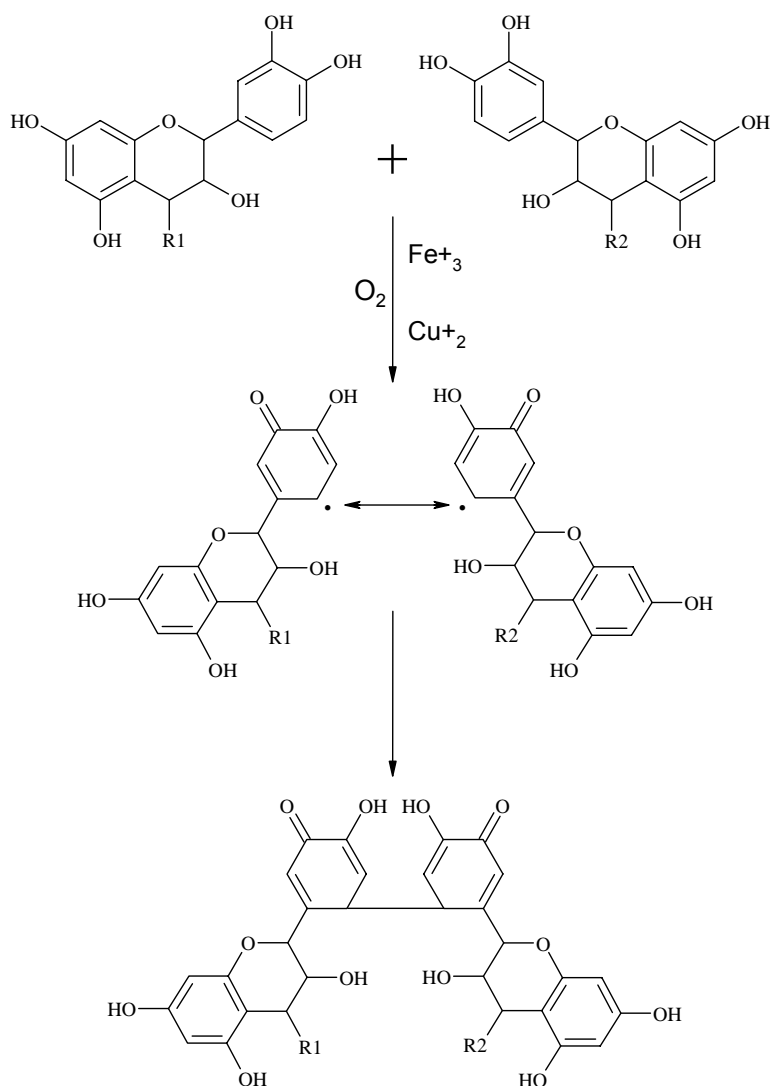


Figura 4. La oxidación de los compuestos fenólicos puede lugar a la formación de semiquinonas y quinonas proporcionando una coloración parduzca en los alimentos. Es importante que no se produzca este fenómeno para asegurar la calidad de frutas y verduras procesadas (Rohr, 1999).

Actualmente, este grupo de compuestos fitoquímicos presentan un gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De este modo, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas principalmente a la actividad antioxidante de estos compuestos, están relacionadas con la presencia y el contenido de compuestos fenólicos (Martínez–Valverde, 2000). La actividad antioxidante de estos compuestos tiene interés desde el punto de vista tecnológico y nutricional (Berra, 1995). Los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la preparación y obtención de los mismos, con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales (Martínez–Valverde, 2000). Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con un papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer, así como en procesos de envejecimiento, por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* (Tsimidou, 1998; Da Silva, 1998; Plumb, 1998; Kondo, 1999; Baba, 2000; Wang, 2000; Osakabe, 2000; Thiagarajan, 2001; Kawase, 2000).

### **1.2.1 Clasificación de los compuestos fenólicos**

Como se ha mencionado anteriormente, los polifenoles son compuestos que constan de un anillo bencénico, sustituido por uno o más grupos hidroxilos. Entre los compuestos fenólicos existentes en los alimentos, se pueden distinguir dos grandes familias (no flavonoides y flavonoides), constituidas cada una de ellas por diferentes subfamilias de compuestos, como se detalla seguidamente.

- No flavonoides:

Ácidos fenólicos:	serie benzoica serie cinámica
Estilbenos	
Taninos hidrolizables	

- Flavonoides:

Flavonoles
Flavanoles
Monómeros
Oligómeros
Polímeros o taninos condensados
Antocianos
Flavonas
Isoflavonas
Flavanonas

A continuación se comentan las características de los compuestos fenólicos más destacados presentes en el vino.

#### **1.2.1.1 No flavonoides**

##### a) Ácidos fenólicos

La estructura básica de estos compuestos es un anillo aromático con un grupo carboxílico sustituido en las dos posiciones meta- (respecto al grupo ácido) y en posición para-. Se distinguen dos familias distintas de ácidos fenólicos, la serie benzoica (si el grupo carboxílico está directamente enlazado al anillo aromático) y la serie cinámica (si el grupo carboxílico está enlazado a él a partir de un sustituyente 2–propanilo). Se pueden encontrar en forma libre o esterificados con azúcares.

Dentro de la serie benzoica, los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainillínico, p-hidroxibenzoico y los aldehidos como la vainillina, también son abundantes en las plantas superiores y helechos. Las estructuras de la serie benzoica de los ácidos fenólicos pueden observarse en la tabla 6 (Belitz, 1988). En el caso de la serie cinámica, los ácidos cinámicos (caféico, ferúlico, p-cumárico y sinápico) raramente se encuentran libres ya que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido caféico se encuentra esterificado con el ácido quínico dando lugar a los ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico (Belitz, 1988). Las cumarinas y las isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido (Bravo, 1998), mientras que los cromonoles son menos conocidos y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio (Belitz, 1988). Las estructuras de los ácidos fenólicos, en su serie cinámica, se representan en la tabla 7.

SERIE BENZOICA			
R1	R2	Nombre compuesto	
H	H	ácido p-hidroxibenzoico	
OH	H	ácido protocatéquico	
OH	OH	ácido gálico	
OCH <sub>3</sub>	H	ácido vainílico	
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	ácido siríngico	

Tabla 6. Estructura de la serie benzoica de los ácidos fenólicos

SERIE CINÁMICA			
R1	R2	Nombre compuesto	
H	H	ácido p-cumárico	
OH	H	ácido caféico	
OCH <sub>3</sub>	H	ácido ferúlico	
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	ácido sinápico	

Tabla 7. Estructura de la serie cinámica de los ácidos fenólicos

## b) Estilbenos

Se han descrito unas 200 estructuras diferentes de estilbenos. Estas estructuras se encuentran en un gran número de especies vegetales, localizándose principalmente en la médula del tronco de especies arbóreas como el pino o el eucalipto. La forma molecular más extendida de este grupo es el resveratrol, muy característico de las familias *Pinaceae* y *Vitaceae* y cuya estructura se representa en la figura 5.

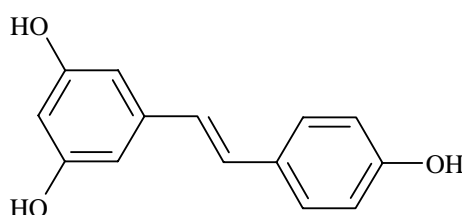


Figura 5. Estructura química del resveratrol.

### c) Taninos hidrolizables

Este tipo de compuestos se caracteriza por la acumulación, en una misma molécula de tamaño moderado, de un número substancial de grupos fenólicos, algunos de los cuales están asociados con orientación *O*-dihidroxi o *O*-trihidroxi dentro del anillo fenólico (Haslam, 1981).

Los taninos hidrolizables tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente, bien con el ácido gálico o bien con el ácido hexahidroxidifénico, formando galotaninos y elagitaninos, respectivamente. Tras la hidrólisis con ácidos, bases o ciertas enzimas, los galotaninos proporcionan glucosa y ácido gálico (Chung, 1998), tal y como se puede apreciar en la figura 6. Estos compuestos están presentes en la madera y llegan al vino precedentes, fundamentalmente, de las tinajas de envejecimiento (Escribano-Bailón, 1993).

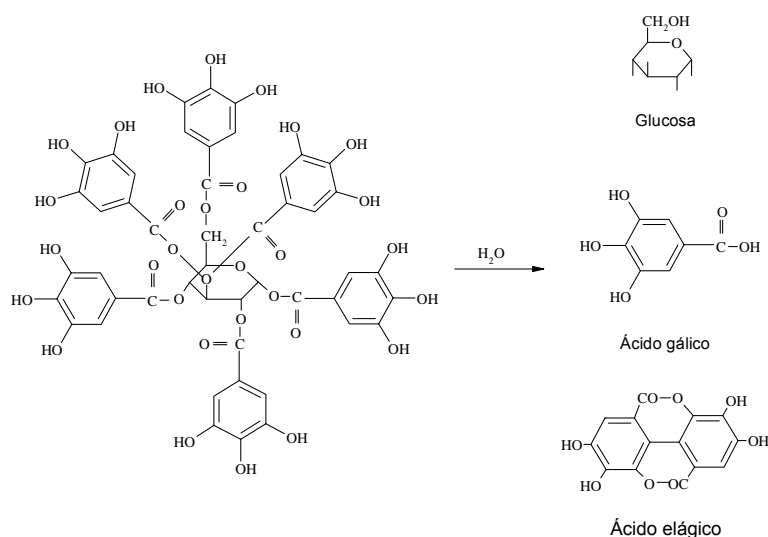


Figura 6. Estructura química de los taninos hidrolizables.

#### 1.2.1.2 Flavonoides

Se han descrito más de 4000 flavonoides (C6–C3–C6) diferentes que se clasifican en varias familias según cambios en su estructura básica. Son compuestos polifenólicos tanto de bajo como de elevado peso molecular que comparten el esqueleto común de difenil piranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirano o pirano heterocíclico, que pueden poseer varios grupos hidroxilo (OH) unidos a esta estructura de anillos (figura 7). Normalmente se encuentran como glucósidos y provienen principalmente de las pieles, de las semillas y de los tallos de los racimos de uva (Rice-Evans, 1997; Soleas, 1997).

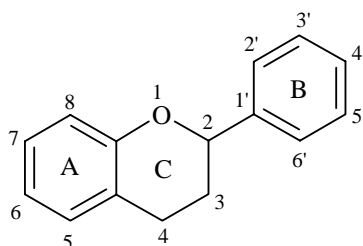


Figura 7. Esqueleto común difenilpirano de los flavonoides.



Los flavonoides más abundantes en los vegetales son los flavonoles (como es el caso de la quercetina, miricetina y kampferol), las flavonas (un subgrupo de flavonoles, entre los que destacan la apigenina, luteolina y diosmetina) y los glucósidos de ambos (Hertog, 1993).

#### a) Flavonoles

Los flavonoles poseen una coloración amarillenta, siendo los responsables del color característico de la piel del racimo y del vino blanco. Estos compuestos pueden ser identificados claramente por la existencia de un grupo carbonilo en C4. El estado de oxidación, la sustitución del anillo heterocíclico y la posición del anillo B son importantes para clasificar los compuestos que pertenecen a este grupo (Halbrock, 1981). Los flavonoles se pueden encontrar libres o esterificados con glucosa. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos se encuentran como C-glicosilados en posición 6 u 8. A su vez, los azúcares pueden ser sustituidos por residuos acilo (malonato, 4-cumarato, cafeato, ferulato) (Halbrock, 1981). Algunos ejemplos de flavonoles se resumen en la figura 8.

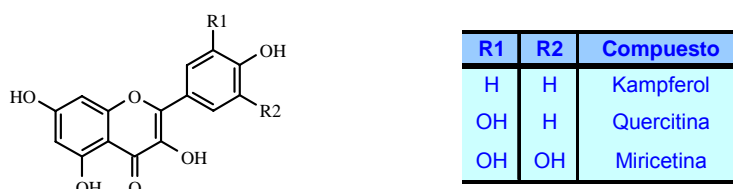


Figura 8. Flavonoles más habituales en el racimo de uva y en el vino.

Según el grado de oxidación de la molécula pueden distinguirse diferentes tipos de compuestos, entre los cuales puede haber interconversión, como muestra la figura 9.

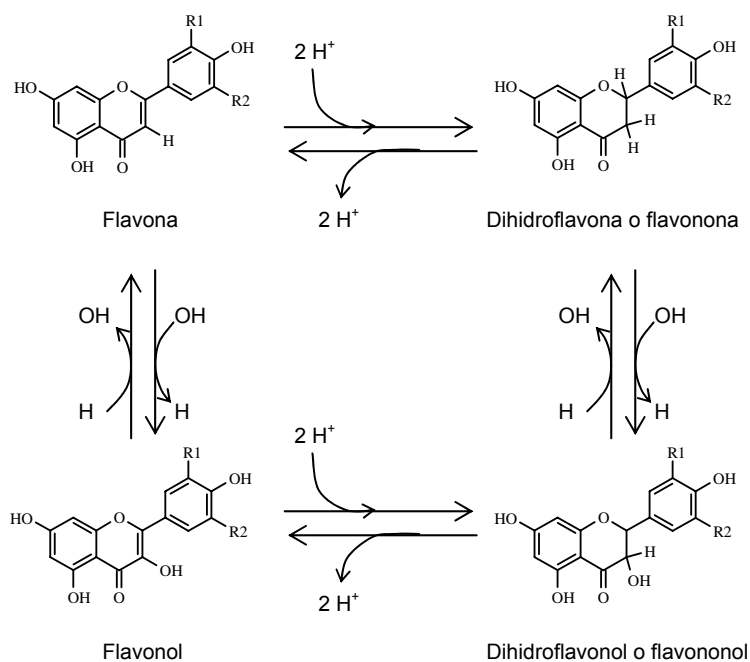


Figura 9: Interconversión entre los diferentes subgrupos de flavonoles.

b) Antocianos

La diferencia principal entre los antocianos y los flavonoles es que los primeros no poseen ningún grupo carbonilo en posición C4. La estructura básica de estos compuestos se presenta en la figura 10, donde también se indican los diferentes nombres que reciben estos compuestos según sean las sustituciones R1 y R2.

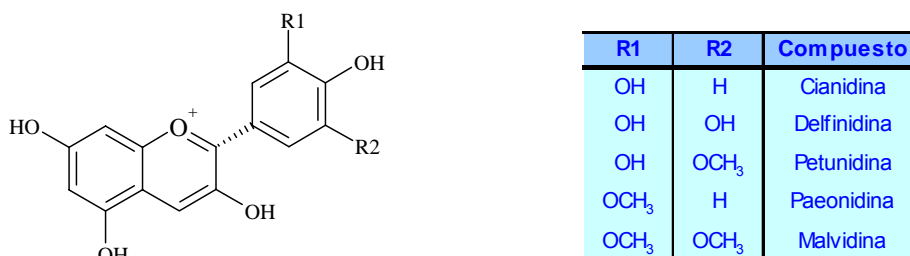


Figura 10. Nomenclatura y estructura general de los antocianos.

Los antocianos se encuentran frecuentemente esterificados con azúcares en el carbono 3; de hecho, puede llegar a encontrarse estructuras más complicadas en las que la glucosa está acilada. También pueden encontrarse estructuras que estén esterificadas en otros carbonos diferentes al C3, denominándose poliheterodios. De forma similar, pueden también combinarse con los taninos (Escribano–Bailón, 1993). Los antocianos se llaman también antocianinas y sus agliconas se denominan antocianidinas. Los antocianos son los colorantes rojos y azules de los vegetales, siendo los principales responsables del color característico de los vinos tintos (Hertog, 1993).

c) Flavanoles

Debido a la importancia de este grupo de flavonoides en el contexto global de la tesis, se comentarán las características de éstos en un subpunto aparte (ver el apartado 1.2.2).

**1.2.2 Flavanoles**

Este grupo de flavonoides es abundante en la uva y en el vino, donde se encuentran como monómeros o flavan–3–oles, dímeros (unión de dos moléculas de flavan–3–oles), oligómeros (unión desde 3 hasta 10 moléculas de flavan–3–oles) y polímeros o taninos condensados (unión de más de 10 moléculas de flavan–3–oles).

**1.2.2.1 Monómeros o flavan–3–oles**

La (+)–catequina, la (–)–epicatequina (representadas en la figura 11), la (+)–galocatequina y la (–)–epigalocatequina son los flavan–3–oles más comunes y suelen ser denominados como catequinas. Éstas constituyen la base de los principales grupos de taninos condensados (de los procianidoles o procianidinas las dos primeras catequinas y de los prodelphinidoles las dos últimas) (Escribano–Bailón, 1993). El resto de compuestos con estructura flavan–3–ol presenta una distribución más restringida. Generalmente, las catequinas monoméricas no son incluidas dentro del grupo de los taninos, ya que casi no interaccionan con proteínas o no poseen esta propiedad (Lea, 1979; González, 1989; Escribano–Bailón, 1993). Por catequina se entiende el 5, 7, 3', 4' tetraoxiflavan–3–ol con fórmula bruta C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>. El compuesto presenta dos centros de asimetría y, por tanto, puede dar lugar a cuatro formas ópticamente activas y a dos formas racémicas: se tiene la serie de las catequinas y de las epicatequinas. En los mostos y en los vinos, como generalmente en la naturaleza, están presentes sobre todo la (+)–catequina y la (–)–epicatequina (Bourzeix, 1986; González, 1989).

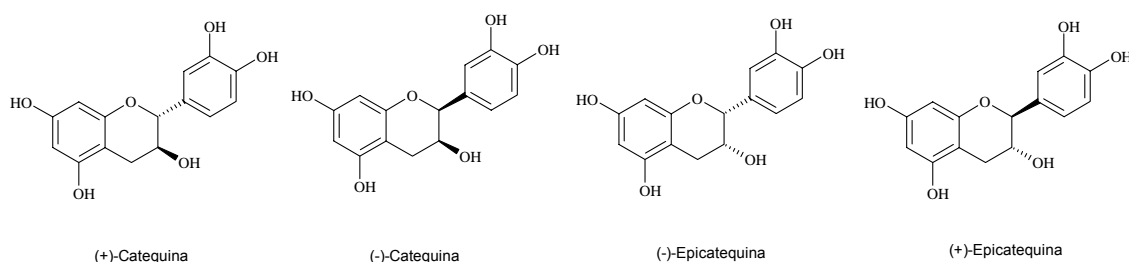


Figura 11. Estructura química e isometría óptica de las catequinas monoméricas.

La presencia de los enantiómeros (+)-epicatequina y (-)-catequina se debe normalmente a procesos de isomerización durante el proceso de extracción. Existen también flavan-3-oles metilados, ésteres de flavan-3-oles y flavan-3-oles glicosilados, generalmente en el anillo C. También son frecuentes los ésteres gálicos de las catequinas donde el ácido está fijado al hidroxilo en posición 3 del heterociclo (Lea, 1979).

En cuanto a la distribución espacial de estos compuestos, el heterociclo central de los flavanos está saturado y no está en el plano. El oxígeno en posición 1 y el C4 están en el plano del anillo bencénico A. El C2 puede estar por encima o por debajo de este plano. Los espectros de infrarrojos confirman que hay fuertes uniones hidrógeno entre el OH en posición 3 (axial) y el oxígeno del heterociclo en el caso de la (-)-epicatequina y de la (+)-catequina (Ribereau-Gayon, 1968).

### 1.2.2.2 Procianidinas diméricas o dímeros

Los dímeros son las procianidinas más sencillas, siendo útiles, por tanto, para el estudio de estructuras de mayor grado de polimerización. Existen dos tipos de dímeros, según el tipo de enlace existente entre las unidades de condensación. Los dímeros más distribuidos en la naturaleza y más abundantes en la uva y el vino son aquellos formados por la condensación de dos unidades de catequina unidas por enlaces C4-C6 ó C4-C8 (dímeros del tipo B). En este tipo de dímeros, cuya estructura se representa en la figura 12, el enlace interflavánico de tipo C4-C8 está favorecido respecto al C4-C6. La estructura presentada por el dímero muestra 5 centros de asimetría que pueden dar lugar teóricamente a 32 formas ópticamente activas: 4 de estas formas han sido aisladas por Weinges *et col.* (1960). Los primeros dímeros caracterizados fueron la procianidina B1, B2, B3 y B4 (Haslam, 1989).

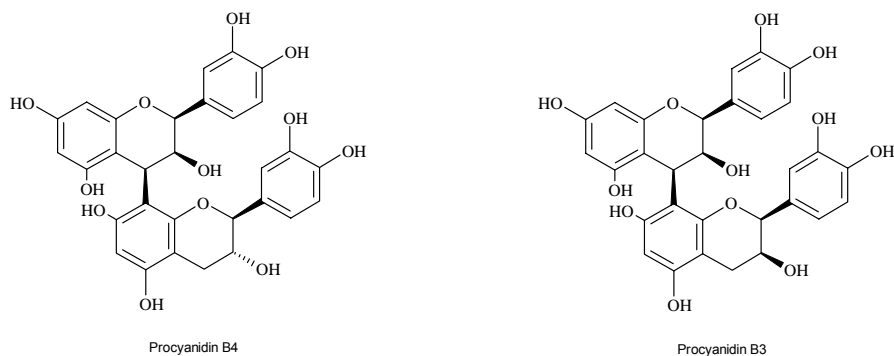


Figura 12. Estructura química de las procianidinas diméricas (enlace tipo B) B4 y B3.

Aparte de estas procianidinas diméricas de tipo B, existen otras denominadas de tipo A, en las que además del enlace C4–C8, presentan un segundo enlace interflavánico de tipo éter C2–C7, como se aprecia en la figura 13. Estos dímeros, por tratamiento en medio ácido, además de cianidina, forman un segundo pigmento antocianíco, debido a la rotura de la unidad flavan–3–ol superior (Escribano–Bailón, 1993; Martínez–Valverde, 2000).

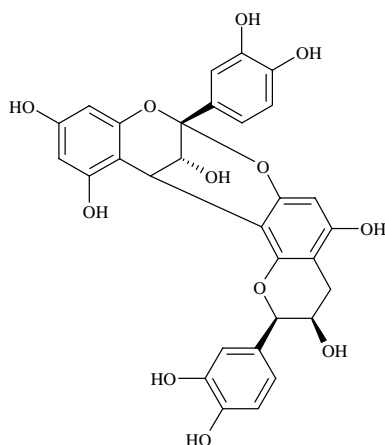


Figura 13. Estructura de una procianidina de tipo A.

### 1.2.2.3 Procianidinas oligoméricas

Se conocen más de 30 compuestos oligoméricos que constan de 3 a 5 unidades. Los compuestos de grado de polimerización más elevado que han podido aislarse y caracterizarse son los hexámeros, que están formados por unidades de (+)–catequina y (–)–epicatequina y suelen presentar, en general, una sola unión entre cada unidad flavánica (que usualmente suele ser C4–C8). Debido a esta característica, suelen ser compuestos esencialmente lineales aunque pueden existir enlaces C4–C6, que darían lugar a ramificaciones del compuesto y a enlaces dobles tipo A. Se han descrito otras estructuras menos frecuentes, como es el caso de compuestos que contienen unidades flavan–3–ol con configuración 2S, oligómeros con enlaces mixtos tipo B y A, procianidinas que contienen residuos galoilados o compuestos mixtos con unidades procianidol y prodelfinidol (González, 1989; Haslam, 1989; Martínez–Valverde, 2000).

A pesar de que no existe un criterio unánime entre los autores para definir el número de unidades monoméricas que forman un oligómero o un polímero, la mayoría de ellos define un oligómero como una procianidina que consta de entre tres y diez unidades monómeros enlazadas entre sí, tal y como muestra la figura 14. Cuando el número de unidades monoméricas que forman la procianidina sobrepasa las diez unidades, se habla de polímeros o taninos condensados (Haslam, 1989; Escribano–Bailón, 1993; Rohr, 1999; Martínez–Valverde, 2000).

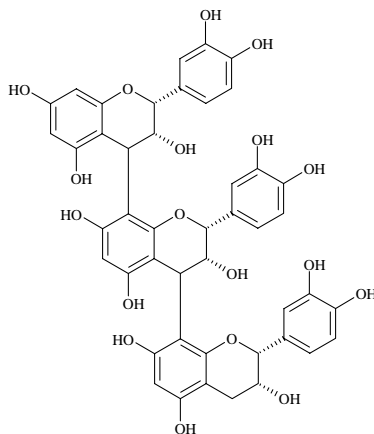


Figura 14. Estructura de la procianidina C1 (trímero).

Los polímeros son generalmente más abundantes que los oligómeros, pero debido a que el proceso de extracción de éstos es difícil, su caracterización todavía no se ha completado. Sin embargo, los oligómeros son los principales responsables de las reacciones atribuidas a los taninos condensados (como son el efecto tanante, astringente y sus actividades farmacológicas). La dificultad de extracción de estos polímeros sin alterarlos, el hecho de que son insolubles en agua y los solventes orgánicos habituales, dificultan su caracterización (Haslam, 1989). Los polímeros raramente presentan una estructura homogénea constituida únicamente por unidades procianidol o prodelfinidol. Lo más habitual es la conformación mixta con acilaciones y glucosilaciones. Se ha observado un predominio de unidades (–)–epicatequina en ellos (Porter, 1988). En los tejidos vegetales, la conformación espacial predominante es la 2R, aunque también se han detectado casos (aunque minoritarios) de vegetales que contienen enantiómeros 2S (Hemingway, 1996).

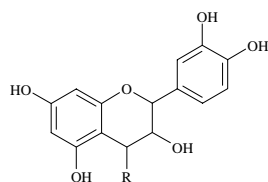
En los medios naturales, las uniones más habituales entre las unidades flavanol de las procianidinas oligoméricas y poliméricas son las C4–C8, aunque también pueden encontrarse enlaces interflavánicos de tipo A (C4–C6) e incluso pueden darse casos en los que coexisten todos los tipos de enlace (Morimoto, 1985; Balde, 1991). También es posible encontrar oligómeros que presentan unidades flavan–3–ol con un patrón de hidroxilación en el anillo B diferente (Cai, 1991).

Se suelen seguir las pautas marcadas por Porter *et al.* en 1982 para nombrar estos compuestos. Según éstas, el C4 de la unidad flavan–3–ol sería equivalente al C1 de un azúcar sencillo de un oligosacárido. Las unidades estructurales básicas de los oligómeros se nombran según la denominación trivial de los monómeros flavan–3–ol. Los nombres de catequina, epicatequina, epigalocatequina, etc., convencionalmente se reservan para las unidades de configuración 2R, mientras que los flavan–3–ol de configuración 2S se distinguen por el prefijo enantio-. Por otra parte, la dirección del enlace interflavánico se indica entre paréntesis con una flecha y la configuración del enlace interflavánico del C4 mediante un  $\alpha$  o un  $\beta$  (Escribano–Bailón, 1993).

### **1.2.2 Polímeros o Taninos condensados**

Los taninos son compuestos fenólicos con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 Daltons (Bate & Smith, 1975; Hagerman & Butler, 1991; Escribano–Bailón, 1993; Martínez–Valverde, 2000). La solubilidad de estos compuestos en agua depende de su peso molecular; las formas más grandes poseen una solubilidad y extrahibilidad limitada en cualquier solvente (Hagerman & Butler, 1991). Estos compuestos se caracterizan por dar las reacciones típicas de los fenoles, aunque sus principales características son la capacidad para ligarse a proteínas (y otros polímeros como los polisacáridos) y su capacidad antioxidante debido al gran número de grupos hidroxilo (entre otros grupos funcionales) que posee (Hagerman & Butler, 1991; Escribano–Bailón, 1993; Martínez–Valverde, 2000). También pueden ligarse a alcaloides, gelatinas y otros materiales, aunque parecen que son las interacciones tanino–proteína la base de las actividades biológicas de los taninos, tales como su influencia en la selección de alimentos, la defensa de las plantas contra los herbívoros y el uso de sus propiedades en el curtido de las pieles haciéndolas imputrescibles al reaccionar con el colágeno y explica también su astringencia causada por las precipitaciones de las glucoproteínas de la saliva. (Martínez–Valverde, 2000). Además, estos compuestos son objeto de estudio e interés en diferentes campos como el agroalimentario, el nutricional y el farmacológico.

Los taninos condensados son un grupo heterogéneo de sustancias fenólicas. Se forman por la condensación de más 10 unidades de flavan–3–ol ó de 5–desoxiflavan–3–ol unidas comúnmente por enlaces C4–C6 o C4–C8 (aunque éstos últimos son minoritarios). La unidad básica, como se aprecia en la figura 15, es el flavan–3, 4–diol, pero su inestabilidad hace que se transforme rápidamente en flavan–3–ol (Bourzeix, 1986; Haslam, 1989; Hagerman, 1991).



R	Compuesto
H	Flavan-3-ol o catequina
OH	Flavan-3,4-diol o procianidina monómero

Figura 15. Estructura química de los taninos condensados.

### 1.2.3 Compuestos fenólicos presentes en el vino

El vino es el producto resultante de la fermentación alcohólica del mosto del racimo sano y maduro, conteniendo consecuentemente, alcohol etílico. En el marco complejo de la fermentación aparecen infinidad de productos mayoritarios y minoritarios, que juntamente con los del racimo de origen y, en función de la tecnología empleada en la viña, en la bodega, durante el envejecimiento, etc., modulan que es el vino (Schwarzwälder, 1998).

El conocimiento sobre la composición química, tanto de la uva como del vino, ha aumentado considerablemente en los últimos años, gracias al desarrollo de técnicas como la cromatografía de gases, la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía en capa fina, la espectroscopia infrarroja, espectroscopia de masas y la resonancia magnética nuclear (Soleas, 1997). Se han encontrado en el vino hasta 500 compuestos diferentes (Soleas, 1997). Generalmente, los vinos contienen 0.8–1.2 g/L de compuestos aromáticos, la mayoría de los cuales (más del 50%) son alcoholes, ácidos volátiles y ácidos grasos esterificados. Otros compuestos, que a pesar de estar presentes en pequeñas concentraciones, contribuyen a las características sensoriales del vino son los carbonilos, fenoles, lactonas, terpenos, acetales, sulfuros y los compuestos nitrogenados. El gusto y la sensación en boca que produce un vino se deben principalmente a compuestos que se encuentran en éste en concentraciones superiores a 100 mg/L, tales como el agua, el etanol, los ácidos orgánicos, los azúcares, el glicerol y los compuestos fenólicos (particularmente, los taninos) (Schwarzwälder, 1998).

La procedencia de los compuestos fenólicos en el vino es diversa: pueden estar presentes en las semillas o en las pieles de la uva (ver figura 16), ser producidos por el metabolismo de la levadura, o bien, ser extraídos de la madera de la tinaja (Infante, 1997). La concentración de estos compuestos puede incrementarse durante la maceración de la piel de la uva, aunque después y, progresivamente, disminuyen a medida que se van formando enlaces con las proteínas. El envejecimiento posee un efecto importante en la reducción de la concentración fenólica de los vinos (Infante, 1997). La cantidad y la calidad de los polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo. La tabla 8 muestra los compuestos fenólicos más comunes presentes en las plantas y en el vino.

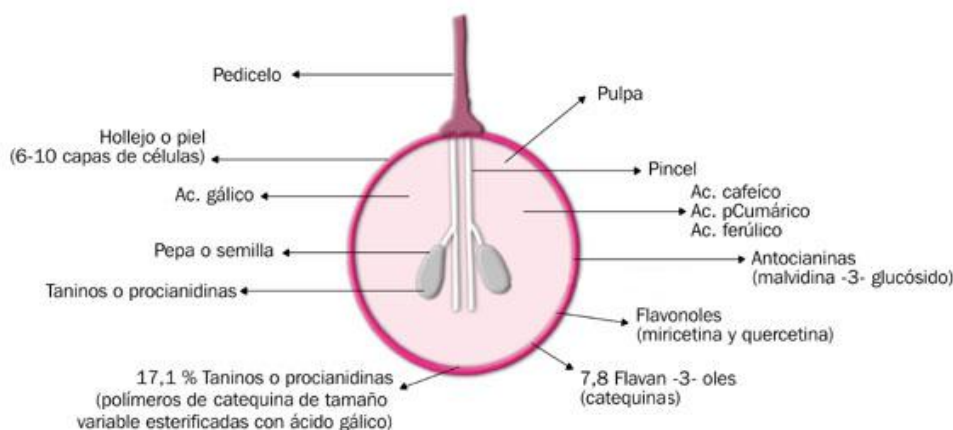


Figura 16: Distribución esquemática de los polifenoles en un grano de uva tinta de *Vitis vinifera* como Cabernet Sauvignon. Los polifenoles están en un 10% en el jugo, 30% en la piel y 60% en las pepitas.

Átomos de Carbono	Esqueleto	Tipo	Ejemplos presentes en vino	Concentración en vino tinto (mg/L)	Concentración en vino blanco (mg/L)
6	C <sub>6</sub>	Fenoles Simples Benzoquinonas			
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos Fenólicos	Ácido Gálico	95	7
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Derivados de Tirosina Ácidos Fenilacéticos	Tirosol		
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos cinámicos Fenilpropenos Cumarinas	Ácido Cafeico	7,1	2,8
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas			
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas			
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos Antraquinonas	Resveratrol	1,5	0,03
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides Isoflavonoides	Quercetina Cianidina Catequina Miricetina Malvidina Epicatequina Rutina	7,7 2,8 191 8,5 23,5 82 9,1	0 0 35 0 1 21 0
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanós Neolignanós			
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Bioflavonoides			
n9	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignanós			
n6	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Melaninas Catecolicas			
n15	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos Condensados	Procianidina	525,4	143

Tabla 8: Principales tipos de compuestos fenólicos en plantas y en el vino. Adaptado de Frankel (1995) y Leighton (2000).

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales características de la estructura química de los compuestos fenólicos es la existencia de anillos aromáticos (fenoles) que permiten a estos compuestos absorber en la zona del ultravioleta ( $\lambda=280$  nm) y proporcionar fenómenos de resonancia. Así, si estos compuestos se encuentran en medio ácido, aparece una carga positiva deslocalizada por resonancia sobre el conjunto de la molécula, absorbiendo en la zona del amarillo-verde y proporcionando una coloración rojo-violácea. Si el medio en el que se encuentran estos compuestos es débilmente ácido, la carga positiva está deslocalizada sobre el átomo de oxígeno del heterociclo (Martínez-Valverde, 2000). Por el contrario, en un medio alcalino, aparece una función quinona en el carbono 4' de estos compuestos, extendiéndose la resonancia hacia toda la molécula, absorbiendo en la zona del naranja (hacia 600 nm) y proporcionando una coloración azul verdosa (Rohr, 1999). Asimismo, los grupos fenoles se oxidan fácilmente a quinonas, siendo los ortodifenoles los compuestos más fácilmente oxidables. Este es el caso de ácidos fenólicos (como el ácido protocatéquico, gálico y caféico), de flavonoles (como quercetol y miricetol), de antocianidoles (como el cianidol, delfinidol y petunidol) y de las moléculas de flavanos que forman los taninos (Martínez-Valverde, 2000). Estos compuestos pueden ser oxidados por diferentes agentes oxidantes y, de manera especial, por el oxígeno del aire que puede oxidarlos mediante un proceso de catálisis normal o mediante un proceso de catálisis enzimática (Infante, 1997). En la catálisis normal intervienen metales plurivalentes como el Fe, Cu y Mn. Por el contrario, la catálisis enzimática ocurre siempre que se rompe el hollejo (piel de la uva). Al abrirse la baya, se rompe la estructura vegetal, poniéndose en contacto los diferentes componentes de las células, que junto con el aire y los diferentes materiales que están en contacto con el mosto, provocan este tipo de oxidación (Martínez-Valverde, 2000). La vulnerabilidad de la vendimia a la oxidación depende de la abundancia de



los sistemas enzimáticos que catalizan la reacción y, en particular de enzimas como la tirosinasa (polifenoloxidasas de la uva unida a las membranas celulares) y la lacasa (enzima de origen exógeno –*Botrytis cinerea*– que, contrariamente a la anterior, posee actividad soluble). Del mismo modo, la sensibilidad a la oxidación depende también de otros factores propios de la vendimia como la abundancia de substratos fácilmente oxidables (particularmente ortodifenoles), el pH, el contenido en ácido ascórbico, etc. Esta fácil oxidabilidad de los compuestos fenólicos puede causar alteraciones en los vinos como la formación continua de sedimentos en los vinos tintos (conocido como “quiebra férrica azul”), pardeamiento en los vinos blancos, etc. (Martínez–Valverde, 2000).

En los vinos tintos, los flavonoides constituyen el 85% del contenido fenólico total (>1000 mg/L). Para los vinos blancos, éstos representan menos de un 20% del contenido fenólico total (<50 mg/L) (Martínez–Valverde, 2000). Durante la vinificación, la cantidad de flavonoides extraídos está influenciada por muchos factores, entre los cuales podemos destacar la temperatura, tiempo de contacto con la piel de la uva, tipo de fermentador, proceso de mezcla y la concentración de etanol, de óxido sulfuroso, de levadura, pH y enzimas pectolíticas. Además, la extracción depende de la concentración de los compuestos fenólicos del racimo de la uva que varía con el tipo de cultivo, el proceso de envejecimiento, las condiciones climáticas regionales y el proceso de vinificación. La maceración carbónica y la termovinificación tienden a extraer menor cantidad de compuestos fenólicos en comparación con la maceración tradicional de las pieles de la uva (Soleas et al., 1997).

Los flavonoides que se pueden encontrar en los vinos son flavonoles, antocianidinas (sobre todo en vinos tintos), catequinas (polihidroxi flavan-3-ol) y sus polímeros (denominados taninos). Los flavonoles y las antocianidinas proceden principalmente de las pieles de la uva proporcionando la coloración característica a éstas (uvas amarillas en el caso de los flavonoles y tintas en el caso de los antocianos), mientras que las catequinas y los flavan-3,4-dioles provienen de las semillas y del tallo. Todos estos compuestos se pueden encontrar libres o polimerizados con otros flavonoides, azúcares (glicósidos), no flavonoides (derivados acilo) o una combinación de éstos (Soleas, 1997). En los mostos y en los vinos jóvenes las procianidinas presentan pesos moleculares medios en torno a 500–700 (dímeros, trímeros), mientras que en los vinos viejos se producen condensaciones con pesos moleculares medios en torno a 2000–3000 (diez moléculas condensadas) (Martínez–Valverde, 2000). En la uva tinta se encuentran cinco tipos de antocianos los cuales son, a la vez, sales de flavilio y glucósidos porque están unidos por enlace glucosídico a una molécula de azúcar. Los antocianos están localizados en el hollejo, mientras que la pulpa es incolora de forma que se pueden obtener mediante suave presión vinos blancos de uvas tintas. Solo alguna escasa variedad de uvas (tintoreras) presenta la pulpa coloreada (Martínez–Valverde, 2000).

*Vitis vinifera* posee unas características genéticas que hace que sus antocianos solo sean monoglucósidos (en posición 3) mientras que los antocianos de otras especies de *Vitis* son preferentemente diglucósidos (en posiciones 3 y 5 del fenilbenzopirilio) y bajo esta forma se encuentran mayoritariamente en los híbridos. Por cromatografía en papel o en capa fina es posible reconocer la presencia en un vino de los diglucósidos de las antocianinas (Ribereau-Gayon, 1968). Entre los antocianos de *Vitis vinifera* existen también formas aciladas, es decir, formas en las que una molécula de un ácido es esterificada a un hidroxilo del azúcar; se trata del ácido cinnámico y, más generalmente, del ácido paracumárico o paraoxicinnámico. La proporción relativa de los diversos antocianos en las distintas variedades de *Vitis vinifera* no es la misma y en base a la composición en antocianos es posible, si no distinguir una variedad de otra, sí al menos reagrupar las variedades en familias similares por composición antociánica. Esto puede ser de utilidad para tratar de distinguir objetivamente el origen de los vinos, aunque en los vinos, las posteriores modificaciones a que están sujetos los antocianos hacen más difícil la solución del problema (Martínez–Valverde, 2000).

Un buen color en un determinado vino predispone al catador a considerar a éste como un producto excelente. De este modo, el color de un vino tinto joven está constituido fundamentalmente por tonalidades violáceas, que suelen colorear incluso, la espuma del vino al ser agitado. Estas tonalidades se deben a la presencia de antocianos que tienen tendencia a desaparecer rápidamente de los vinos tintos jóvenes. Se calcula que después de un año, han desaparecido totalmente, ya sea por precipitaciones o por combinaciones con los taninos,



compuestos que también evolucionan y, con el paso del tiempo, el color se va atenuando de manera que las tonalidades rojizas van cediendo lugar a tonalidades anaranjadas o amarillentas como consecuencia de la aparición de nuevos pigmentos originados por la unión de las antocianinas a taninos y otros compuestos resultantes de la fermentación alcohólica (como es el caso de piruvato, vinil guayacol o vinil ferol). Estos nuevos pigmentos, más estables que las antocianinas originales, contribuyen a la modificación del color del vino tinto con el tiempo (Schwarzwälder, 1998; Peña–Neira, 2004).

En el caso de los vinos blancos, la coloración de éstos no se debe a los antocianos (que no están presentes) sino a los flavonoles. Los vinos blancos poseen una coloración que va desde el verde al amarillo, en sus diferentes tonalidades, hasta llegar al dorado. En un vino blanco como el Sauvignon o el Semillón se puede apreciar una tonalidad verdosa con ligeros reflejos amarillentos. Por el contrario, un Chardonnay posee una típica coloración amarilla verdosa con ligeras tonalidades doradas (Glories, 1984; Schwarzwälder, 1998). La tabla 9 muestra aquellos compuestos responsables de la coloración de los vinos.

Además de proporcionar una determinada tonalidad al vino, los compuestos fenólicos contribuyen a otorgar a éste otras características como la sensación de volumen en la boca, carnosidad, corposidad y textura, parámetros cualitativos fundamentales de estos productos. De este modo, los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos, que como se aprecia en la figura 16 están presentes en la pulpa de la uva, son los responsables, desde el punto de vista enológico, del gusto amargo de los vinos, si bien, los ácidos cinámicos también son responsables del pardeamiento de los vinos blancos (Peña–Neira, 2004). En el caso de los vinos tintos, los taninos condensados son los responsables de la astringencia (la lengua queda áspera, sin lubricación) que presentan una relación inversa en cuanto a amargura y astringencia a medida que aumentan de tamaño (es decir, aumenta el número de unidades (+)–catequina y (–)–epicatequina en su estructura), disminuyendo la amargura en los taninos de mayor tamaño, pero aumentando su astringencia hasta alcanzar un tamaño que no son solubles, no pudiendo reaccionar con las proteínas de la saliva, precipitándolas y, en consecuencia, dejando de producir la sensación de astringencia (Goldstein & Swain, 1963; Schwarzwälder, 1998).

Compuesto	Color	Peso molecular
Antocianos	Rojo-violeta	500
Catequinas y leucoantocianos	Amarillos	600
Taninos poco polimerizados	Amarillo	1000-2000
Taninos condensados y muy condensados	Rojo-naranja (próximo al rojo teja)	2000-5000
Condensados de flavanoles y antocianos	Rojo	1000-2000
Combinaciones entre taninos y polisacáridos	-	>5000

Tabla 9. Materia colorante de un vino (Glories, 1984).

Los taninos presentes en el vino presentan cambios por precipitación, por ruptura de aquellos de mayor tamaño, formación de otros de tamaño medio (polimerización), hecho que modificará las propiedades sensoriales de astringencia y amargura. Estas reacciones, asociadas frecuentemente a un medio oxidativo, se ven favorecidas en el caso de la formación de nuevos pigmentos y polimerización de taninos, por la presencia de acetaldehído, que sirve de puente entre las moléculas (uniones tanino–antociano y tanino–tanino). Este acetaldehído se forma por la oxidación del etanol durante el almacenamiento del vino en barricas o cuando éste se somete a tratamiento como la microoxigenación (Macheix, 1990; Es–Safi, 1999).

### 1.3 Efectos fisiológicos asociados a los compuestos fenólicos

Los efectos fisiológicos asociados a los compuestos fenólicos se deben a la estructura de éstos, siendo sus principales propiedades la formación de complejos con proteínas, la

formación de quelatos con iones metálicos y la capacidad para eliminar radicales (capacidad antioxidante), efectos sobre el metabolismo glucídico, lipídico y mineral, efectos sobre la fluidez de la membrana, efecto antiinflamatorio y antihistamínico, efecto cardioprotector y cardiovascular, efecto antivírico, antibacteriano y antifúngico, efecto sobre el tracto gastrointestinal y efecto antimutagénico.

### **1.3.1 Interacciones con proteínas**

Una importante propiedad de las procianidinas es la capacidad para unirse a proteínas. En general, se consideran a las procianidinas como agentes ligadores no específicos de proteínas, ya que los resultados experimentales obtenidos indican que existe especificidad de unión y que ésta es función del tamaño, la conformación, la concentración y la carga de la proteína, así como del tipo, peso molecular y concentración de las procianidinas. También debe tenerse en cuenta las concentraciones de los dos participantes en la formación del complejo final (Hagerman & Butler, 1981; Siebert, 1996; Nack, 1996), que puede ser soluble o insoluble (Van Buren & Robinson, 1969; Haslam, 1989; Hagerman & Butler, 1981, 1989 y 1991; Tilstra, 1989; Murria, 1994; Kawamoto, 1995; Yan & Bennick, 1995). La actividad biológica de las procianidinas depende de la existencia de los dos tipos de complejos, pudiendo ser detectados mediante ensayos de unión competitiva (sobre todo en el caso de la detección de los complejos solubles) mediante inmovilización de las procianidinas, electroforesis, ensayos de inhibición enzimática (Hagerman & Butler, 1989) o mediante técnicas fluorimétricas más modernas (Tilstra, 1989).

La formación de complejos procianidina–proteína está influenciada por diferentes factores, siendo el pH uno de ellos (Van Buren & Robinson, 1969; Oh, 1980; Hagerman & Butler, 1981 y 1989; Oh & Hoff, 1986; Da Silva, 1991). La formación de complejos procianidina–proteína a pH elevados está disminuida debido a que los grupos fenólicos de las primeras están ionizados, no estando, en consecuencia, disponibles para la formación de puentes de hidrógeno; del mismo modo, a valores elevados de pH las procianidinas pueden ser susceptibles de ser oxidadas, pudiendo formar los productos de la oxidación enlaces covalentes con diferentes nucleófilos como es el caso de grupos sulfidilo y amino de las proteínas (Guinard, 1986; Hagerman & Butler, 1989). En condiciones de pH bajos, existe también una reducción drástica de la formación de complejos; en este caso, las interacciones que más se ven afectadas son las hidrofóbicas (Guinard, 1986). Por otra parte, se ha observado que la incapacidad relativa de las proteínas salivares ácidas para precipitar las procianidinas a pH neutro, posiblemente debido a las interacciones electrostáticas existentes entre el segmento N–terminal de la proteína (que posee casi todos los aminoácidos cargados negativamente) y el segmento C–terminal de la misma (que contiene algunos residuos de aminoácidos básicos), los cuales hace que la proteína no pueda estar en conformación extendida, dificultando la accesibilidad de las procianidinas a los residuos de prolina (Yan & Bennick, 1995). Sin embargo, a pH 3, la mayoría de aminoácidos ácidos del extremo N–terminal no están cargados, no habiendo interacción entre los dos extremos de la proteína; es en este caso, cuando los residuos de prolina son más accesibles, esperándose mayor precipitación (Yan & Bennick, 1995). La formación de complejos insolubles está favorecida cuando el pH está cercano al punto isoeléctrico de la proteína (Van Buren & Robinson, 1969; Hagerman & Butler, 1989; Kawamoto, 1995; Baxter, 1997). Por tanto, el valor del pH en la formación de complejos procianidina–proteína es importante y el valor óptimo del mismo depende de la proteína en cuestión.

El tiempo de formación de los complejos procianidina–proteína también es diferente según las procianidinas y las proteínas involucradas en la reacción (Hagerman & Butler, 1989; Da Silva, 1991). Asimismo, Da Silva *et al* (1991) comprueban que los complejos entre las procianidinas y la poliprolina o la gelatina se producen durante las primeras ocho horas de contacto, mientras que con la caseína el tiempo mínimo es de 24 horas.

Otro de los factores que debe tenerse en cuenta es la fuerza iónica. Se ha comprobado que la presencia de sales en una solución que contiene procianidinas y proteínas produce un efecto favorable a la formación de complejos, hecho que indica la importancia de las interacciones hidrofóbicas en éstos (Van Buren & Robinson, 1969; Oh, 1980; Da Silva, 1991; Yan & Bennick, 1995; Siebert, 1996).

Similarmente, la temperatura también posee una importancia significativa en el proceso de formación de estos complejos (Oh, 1980; Hagerman & Butler, 1989; Da Silva, 1991). Se ha comprobado que la concentración de complejo formado aumenta al aumentar la temperatura (Siebert, 1996). Este hecho se explica fácilmente si las interacciones implicadas en el complejo son de tipo hidrofóbico, ya que al aumentar la temperatura, los grupos hidrofóbicos (que tienden a estar en el interior de las proteínas) quedan expuestos al exterior, aumentando el número de lugares de unión con las procianidinas (Siebert, 1996). No se puede superar un determinado valor de temperatura debido a que se pueden hidrolizar los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las procianidinas a las proteínas o bien éstas se podrían desnaturalizar (Siebert, 1996).

Otros factores a tener en cuenta en el proceso de unión de las procianidinas a proteínas es la concentración de iones metálicos, la concentración de diferentes surfactantes (como dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dioxano o polivinilpirrolidona) o la presencia de detergentes en el medio, debido a que puede haber competencia entre ellos y la procianidina para formar puentes de hidrógeno o enlaces hidrofóbicos con la proteína (Van Buren & Robinson, 1969; Bergman & Mattice, 1987; Hagerman & Butler, 1989 y 1991; Tilstra, 1989; Yan & Bennick, 1995; Siebert, 1996; Sun & Mattice, 1996; Baxter, 1997; Serafini, 1997). La concentración de etanol en el medio también es importante ya que parece que reduce las interacciones químicas entre los grupos hidroxilo de las procianidinas y las proteínas (Van Buren & Robinson, 1969; Guinard, 1986; Da Silva, 1991; Siebert, 1996; Serafini, 1997).

Del mismo modo, la conformación, el peso molecular y la estructura de las procianidinas también poseen una importancia decisiva en la formación de complejos procianidina-proteína (Hagerman & Butler, 1981; Asquith, 1987; Tilstra, 1989; Hagerman & Butler, 1989; Da Silva, 1991; Serafini, 1997). Se conoce que la movilidad conformacional de las procianidinas aumenta la unión de éstas a proteínas (Hagerman & Butler, 1991) y que las procianidinas diméricas con enlace C4-C6 entre los monómeros, se unen más fuertemente a las proteínas que los dímeros con enlace C4-C8; sin embargo, no se aprecian diferencias significativas con los trímeros (Da Silva, 1991). Además, se ha comprobado que la unión de las procianidinas a las proteínas es más fuerte cuanto mayor es el peso molecular de los primeros (Van Buren & Robinson, 1969; Bergman & Mattice, 1987; Outtrup, 1987; Baxter, 1997). El número de grupos galilo presentes en la estructura de la procianidina y la posición de éstos son también factores a tener en cuenta, ya que, debido a problemas estéricos, es mejor que estos grupos estén ampliamente separados unos de otros (Haslam, 1989; Da Silva, 1991; Murria, 1994; Kawamoto, 1995; Charlton, 1996). Asimismo, también es importante el número de grupos O-dihidroxifenoles en la estructura de las procianidinas, ya que son éstos por los sitios donde se unirán a las proteínas (Da Silva, 1991).

Por otra parte, la conformación de las proteínas también es importante en la unión de éstas con las procianidinas (Hagerman & Butler, 1981; Asquith, 1987; Bergman & Mattice, 1987; Hagerman & Butler, 1989; Da Silva, 1991; Serafini, 1997). Las proteínas globulares y las que están débilmente enrolladas poseen una afinidad por las procianidinas más pequeñas que las proteínas que están conformacionalmente estiradas (Hagerman & Butler, 1981; Bergman & Mattice, 1987). Las secuencias proteicas ricas en prolina tienen gran afinidad por los taninos (Hagerman & Butler, 1981; Hagerman, 1980 y 1981; Asquith, 1987; Da Silva, 1991; Murray, 1994; Yan & Bennick, 1995; Charlton, 1996; Sun & Mattice, 1996; Serafini, 1997; Lu & Bennick, 1998). Todos los residuos prolina poseen afinidades similares de unión con las procianidinas (Outtrup, 1987) y que secuencias con prolinas consecutivas son lugares de unión geoméricamente preferidos; se cree que esto es debido a que el anillo pirrolidina adopta una geometría rígida que es más accesible y favorable en la asociación con la procianidina (Tilstra, 1989; Charlton, 1996; Baxter, 1997). Esta elevada afinidad de las procianidinas por la prolina se debe a que éste es un aminoácido que posee un oxígeno carbonilo ligado a un nitrógeno carbonilo secundario, el cual es un buen aceptor de enlaces de hidrógeno (Outtrup, 1987) y a que este aminoácido ayuda al péptido a mantener la estructura extendida, maximizando la superficie disponible para la unión (Da Silva, 1991; Murray, 1994; Sun & Mattice, 1996; Baxter, 1997; Serafini, 1997). En el caso de la poliprolina, los grupos involucrados en la interacción son los orto-hidroxilo de la parte catecol de la molécula (Sun & Mattice, 1996). De entre todas las proteínas ricas en prolina con gran afinidad por las procianidinas deben destacarse las proteínas salivares ricas en prolina (Murray, 1994; Yan & Bennick, 1995 y 1998; Charlton, 1996; Sun & Mattice, 1996; Serafini, 1997) y las histatinas (proteínas de bajo peso molecular con un elevado

porcentaje de aminoácidos básicos, ricas en histidina) (Yan & Bennick, 1995). Sin embargo, se ha demostrado que la polihidroxiprolina posee poco efecto cuando se une a la catequina (Tilstra, 1989; Sun & Mattice, 1996) debido a que el grupo hidroxilo provoca una disminución en la flexibilidad del anillo pirrolidónico (Tilstra, 1989; Sun & Mattice, 1996). Otros autores han descrito la gran capacidad que presenta la albúmina bovina para precipitar las procianidinas (Haslam, 1989; Da Silva, 1991; Kawamoto, 1995).

La longitud, el tamaño y la hidrofobicidad de las proteínas son factores que también deben tenerse en cuenta (Hagerman & Butler, 1981; Da Silva, 1991; Baxter, 1997). Cuanto mayor es la proteína, mayor número de enlaces posee (aunque ésta no es una relación lineal), cosa que indica que la interacción involucra múltiples lugares de unión (Hagerman & Butler, 1981; Da Silva, 1991; Charlton, 1996; Baxter, 1997); además, la proteína de gran tamaño tiene más facilidad para plegarse y establecer fuerzas intermoleculares. Las proteínas con un peso molecular inferior a 20 KDa tienen baja afinidad por las procianidinas (Hagerman & Butler, 1981). Por otra parte, se ha demostrado que los péptidos pequeños forman complejos solubles con las procianidinas, mientras que los péptidos de mayor tamaño precipitan (Outtrup, 1987).

La formación de complejos procianidina–proteína se ve favorecida por la existencia de un número elevado de grupos metileno en las cadenas laterales de los aminoácidos (Oh, 1980). De la misma manera, se supone que la existencia de un carbohidrato ligado a una proteína puede aumentar o disminuir la eficiencia de la formación de complejos procianidina–proteína, dependiendo de si la estabilización se produce en una estructura abierta o compacta (Hagerman & Butler, 1991).

La cantidad de complejo procianidina–proteína y la solubilidad de este depende de la concentración tanto de la proteína como de la procianidina (Da Silva, 1991; Siebert, 1996). De esta manera, la formación de complejos insolubles está favorecida si existe exceso de procianidina (Kawamoto, 1995; Baxter, 1997), pero sin embargo, la formación de complejos procianidina–proteína solubles se da en presencia de un exceso de proteína (Hagerman & Butler, 1989; Naczki, 1996).

Los enlaces que participan en la formación de los complejos procianidina–proteína son de cuatro tipos diferentes: puentes de hidrógeno entre los grupos *O*-dihidroxifenol y los grupos cetimidina de la proteína, enlaces iónicos entre el anión fenolato y el lugar catiónico de la molécula de proteína, interacciones hidrofóbicas entre la estructura del anillo aromático de las procianidinas y las regiones hidrofóbicas de las proteínas y enlaces covalentes (Oh, 1980; Guinard, 1986; Da Silva, 1991; Hagerman & Butler, 1991). Hoy en día, se cree que el tipo de interacciones predominantes son los puentes de hidrógeno y/o las interacciones hidrofóbicas y debido a esto, se postula que la formación de complejos es reversible (Yan & Bennick, 1995; Serafini, 1997). Otros autores dan más importancia a los puentes de hidrógeno en la formación de los complejos procianidina–proteína (Guinard, 1986; Outtrup, 1987), mientras que otros se inclinan por las interacciones hidrofóbicas (Siebert, 1996).

En cuanto a la forma de unión procianidina–proteína se cree que el modo de acción predominante es el apilamiento hidrofóbico del anillo polifenólico con la prolina; en una secuencia repetida de prolinas, el primer residuo es el lugar de unión preferido para las procianidinas (este es el caso de las proteínas ricas en prolina y las histatinas salivares). Las procianidinas de pequeño tamaño pueden unirse con otro anillo fenólico apilado contra un residuo de prolina, mientras que cuando aumenta el grado de polimerización de la procianidina puede ocupar dos o más prolinas consecutivas (Baxter, 1997).

En nuestro laboratorio se demostró que el transporte plasmático de la epicatequina era realizado por unas determinadas proteínas. En el caso de la rata, la epicatequina se unía a transferrina, mientras que en los humanos se unía a la Apo A1 (Brunet, 1999).

### **1.3.2 Formación de complejos con iones metálicos**

Las procianidinas no solamente pueden ligarse a las proteínas, sino que también pueden ser potentes queladores de iones hierro y cobre, reduciendo de esta forma la formación de

radicales libres derivados de la reacción de Fenton (ver figura 17) (Saija, 1995; Sano, 1995; Cook & Samman, 1996; Révész, 1996; Van Jaarsveld, 1996). Esta propiedad de quelar metales hace que la biodisponibilidad de algunos iones metálicos como el  $\text{Fe}^{+3}$  y el  $\text{Al}^{+3}$  pueda ser inhibida o bien, pueda ser incrementada como en el caso del  $\text{Cu}^{+2}$  (Marmolle, 1997). La explicación a estas diferencias observadas es probable que se encuentre en la afinidad para formar complejos con las procianidinas de estos iones metálicos. El significado nutricional de la formación de los complejos procianidina-ión metálico se limita al intestino, aunque una vez se han absorbido y metabolizado, retienen parte de su capacidad reductora (Hamdaoui, 1997).

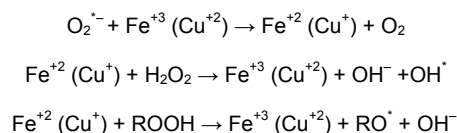


Figura 17: Reacción de Fenton.

### **1.3.3 Actividad antioxidante y eliminadora de radicales libres**

Los seres vivos producen regularmente un determinado número de especies oxigenadas altamente reactivas como  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{NO}^\cdot$  y radicales libres alquilos y peroxilos. Estas especies reactivas causan daños a los lípidos, las proteínas y al DNA, además de participar en procesos de patogénesis y envejecimiento (Kehrer, 1994). El cuerpo humano posee una amplia colección de defensas fisiológicas antioxidantes que eliminan radicales libres y quelan metales. El consumo en la dieta de polifenoles, junto con otros antioxidantes naturales (como la vitamina C, E y los carotenoides) también contribuyen a estas defensas (Gutteridge, 1994).

Todos los polifenoles son capaces de eliminar  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{NO}^\cdot$  y radicales libres alquilos y peroxilos, a través de propiedades dadoras de electrones, generando un radical fenoxilo relativamente estable. Los flavonoides con un grupo O-dihidroxifenilo como anillo B y un anillo C completamente saturado, como es el caso de (galo)catequinas y muchas procianidinas, poseen el lugar de contacto con los radicales libres en el anillo B, y la sustitución del anillo A solamente posee una influencia limitada en los potenciales de reducción del radical semiquinona formado (Jovanovic, 1998), que se muestra bastante estable (Bors & Saran, 1987). Las galocatequinas, con un anillo B 3', 4', 5'-trihidroxifenilo, eliminan radicales libres de una forma más eficiente que las catequinas (Rice-Evans, 1996; Jovanovic, 1998). Asimismo, la galoilación junto con el grupo 3, 4, 5-trihidroxifenilo en la molécula, también aumenta las propiedades de eliminación de radicales (Rice-Evans, 1996).

Debido a la falta de substratos fácilmente disponibles, las procianidinas han recibido menor atención que sus homólogos monoméricos, demostrándose que también son efectivas en la eliminación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{OH}^\cdot$  (Da Silva, 1991; Saint-Cricq, 1999) en soluciones acuosas con igual eficiencia que la quercetina o el hidroxitolueno butilado (Plumb, 1998). La galoilación aumenta la capacidad de eliminación de radicales libres tanto en las procianidinas (Da Silva, 1991; Plumb, 1998), como en las teaflavinas (Millar, 1996). Los dímeros de procianidinas con doble enlace tipo A son menos efectivos que sus homólogos de tipo B (Plumb, 1998; Saint-Cricq, 1999).

La influencia del grado de polimerización no está clara. En algunos experimentos no se observaron diferencias significativas entre monómeros, dímeros y trímeros (Da Silva, 1991). No obstante, en otros experimentos, para una concentración determinada, la capacidad de eliminar radicales libres aumenta para los trímeros, disminuyendo para procianidinas de mayor masa molecular (Saint-Cricq, 1999), o bien es la misma para monómeros y dímeros, decreciendo para moléculas de mayor grado de polimerización (Plumb, 1998). Estas discrepancias podrían atribuirse a diferencias existentes en los ensayos antioxidantes utilizados, a la estructura de la procianidina probada o a la presencia de impurezas residuales en las fracciones de las procianidinas (Santos-Buelga, 2000). Tanto la naturaleza de las unidades monoméricas como la posición del enlace intermonomérico no poseen una influencia significativa sobre la actividad de eliminación de radicales libres (Plumb, 1998).



Las procianidinas también se muestran efectivas al inhibir la peroxidación lipídica, aunque, en este caso, la galoilación posee un efecto negativo sobre la capacidad antioxidante (Plumb, 1998). Las procianidinas con un grado de polimerización medio entre 8 y 10, muestran una capacidad antioxidante comparable a (–)-epigallocatequina galato (Santos–Buelga, 2000), mientras que otros estudios muestran como la capacidad antioxidante decrece cuando el grado de polimerización aumenta desde monómeros hasta hexámeros (Bos, 1996; Plumb, 1998).

Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas. La primera es que cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar, ralentizar o prevenir la oxidación mediada por un radical libre. La segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores (Pratt, 1992). Los métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de mezclas complejas como vino, extractos de tejidos, fluidos biológicos, etc, son varios. No existe un único método y los índices obtenidos para una muestra dependen del procedimiento utilizado para evaluarla. Es necesario tener en cuenta que las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* solamente dan una idea aproximada de lo que puede ocurrir en situaciones complejas *in vivo*. No obstante, la capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino que también depende del microambiente en el cual se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí, pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. En general, las diferentes mediciones se expresan en equivalentes de vitamina E, utilizando TROLOX, que es un análogo soluble de vitamina E (Leighton, 2000).

Algunos de los índices utilizados para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto son: el índice TRAP, el índice TAR, el índice TAA y la inhibición de la oxidación de las LDL. El índice TRAP (potencial antioxidante total) corresponde a la cantidad de radicales libres que pueden ser atrapados por una muestra que contenga antioxidantes. En este caso, se mide principalmente la cantidad y no la calidad de los antioxidantes presentes en la muestra, sin mayor diferencia según la reactividad de los antioxidantes estudiados (Romay, 1996). Por otra parte, el índice TAR (reactividad antioxidante total) se define como la concentración de radicales libres que pueden ser inicialmente atrapados por la muestra, dependiendo de la cantidad y de la reactividad de los antioxidantes de la misma (Romay, 1996). El índice TAA (actividad antioxidante total) es un procedimiento intermedio entre los otros dos, que refleja la cantidad y la reactividad de los antioxidantes presentes en la muestra. Finalmente, la inhibición de la oxidación de las LDL es otra forma de evaluar la capacidad antioxidante de diferentes compuestos y mezclas complejas. En este caso, los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la oxidación de las LDL respecto al control, o bien, se proporciona la concentración del compuesto para tener un 50% de inhibición (IC50) en base a una curva de concentración (Romay, 1996).

El contenido total de polifenoles de un vino se correlaciona directamente con su capacidad antioxidante (Rice-Evans, 1997; Sato, 1996). La tabla 10 muestra la capacidad antioxidante tanto de un vino tinto, como de uno blanco, utilizando para ello diferentes procedimientos.

Del mismo modo, se ha evaluado la capacidad antioxidante de los distintos compuestos puros, basándose en la composición de polifenoles en el vino y de datos de actividades antioxidantes equivalentes Trolox (TEAC) de polifenoles puros. Además, se ha calculado la contribución de cada componente del vino a la capacidad antioxidante de éste (Rice–Evans, 1997; Frankel, 1995). Asimismo, se ha evaluado la capacidad antioxidante del vino mediante su efecto sobre la oxidación de las LDL demostrándose que, *in vitro*, los componentes fenólicos del vino inhiben la susceptibilidad de las LDL a la oxidación (Kinsella, 1993; Frankel, 1995; Vinson, 1995; Abu-amsha, 1996; Caldú, 1996; Hurtado, 1997). Adicionalmente, Leighton *et al.* (2000), han demostrado que catequina y vino son capaces de proteger a las LDL de la oxidación, y estudios similares han puesto de manifiesto que la catequina es, incluso más efectiva, que la vitamina E como antioxidante (Leighton, 1997; Frankel, 1993).

Referencia	Índice	Sistema	Vino Tinto	Vino Blanco
Campos (1996)	TRAP	Blanqueamiento de radicales catiónicos ABTS	29.1 ± 2.3 mM* (n = 10)	4.2 ± 1.2 mM* (n = 3)
Campos (1996)	TAR	Luminol/ABAP	35 ± 2 mM* (n = 2)	5.5 mM* (n = 1)
Whitehead (1995)	TRAP	Luminol/Peroxidasa	15.4 ± 3.4 mM* (n = 9)	1.1 ± 0.2 mM* (n = 4)
Rice-Evans (1997)	TAA	Ferrilmioglobina/ABTS	16.7 mM* (n = 6)	
Ghiselli (1998)	TRAP	R-ficoeritrina/AAPH	7.8 mM* (n = 1)	
Sato (1996)	SOSA	Hipoxantina-xantina oxidasa	286.5 – 1122 U/mL (n = 23)	39.3 – 215.9 U/mL (n = 7)

\*Valores expresados mM equivalentes Trolox

Tabla 10. Mediciones de capacidad antioxidante en vino tinto y blanco. Adaptado de Leighton *et col*, (2000).

Frankel *et col* (1995) analizaron el porcentaje relativo de inhibición de la oxidación de las LDL de 20 vinos californianos, comprobando que este porcentaje variaba entre 46 y 100% para vinos tintos y entre 3 y 6% para vinos blancos. Si se comparaban con la misma concentración de fenoles totales (equivalente a 10 µM de ácido gálico), los porcentajes de inhibición variaban entre 37 y 65% para vinos tintos y entre 27 y 46% para los vinos blancos. La actividad antioxidante relativa para estos vinos podía correlacionarse con el contenido de fenoles totales ( $r = 0.94$ ) y con la concentración de ácido gálico ( $r = 0.92$ ), catequina ( $r = 0.76$ ), miricetina ( $r = 0.70$ ), quercetina ( $r = 0.68$ ), ácido caféico ( $r = 0.63$ ), rutina ( $r = 0.50$ ), epicatequina ( $r = 0.45$ ), cianidina ( $r = 0.43$ ) y malvidina-3-glucósido ( $r = 0.38$ ). Estos datos demuestran que cada componente fenólico contribuye de diferente manera sobre la capacidad antioxidante de un vino (Frankel, 1995). Paralelamente, diversos autores han analizado las diversas fracciones del vino con el fin de identificar los compuestos polifenólicos responsables de la capacidad antioxidante del mismo. Un resumen sobre algunos estudios realizados, utilizando diferentes métodos de extracción y análisis, así como diferentes procedimientos para evaluar la capacidad antioxidante en diferentes fracciones del vino, se presentan en la tabla 11.

Los polifenoles pueden interferir en distintas etapas que conducen al desarrollo de tumores malignos al proteger al DNA del daño oxidativo, inactivando de este modo los carcinógenos, inhibiendo la expresión de los genes mutágenos y de la actividad de las enzimas encargadas de la actividad de procarcinógenos, activando los sistemas enzimáticos responsables de la detoxificación de xenobióticos (Bravo, 1998). Uno de los polifenoles más estudiado hasta el momento es el resveratrol (abundante en la piel de la uva y en el vino) que muestra una capacidad químico preventiva contra el cáncer al inhibir los procesos que resultan en la formación y dispersión de tumores cancerígenos. El resveratrol previene o reduce en un 98% el número de tumores de piel en ratones propensos a contraer cáncer (Jang, 1997).

En nuestro laboratorio se han realizado diferentes estudios sobre la capacidad antioxidante de algunos de los compuestos fenólicos presentes en el vino. Se ha estudiado la capacidad antioxidante de monómeros, como la catequina y la epicatequina, demostrándose que el sistema de enzimas antioxidantes en hígado se activa en ratas que han consumido vino en dosis moderadas (Arola, 1997). También se ha observado que un extracto de procianidinas de la semilla de uva ejerce un efecto protector en hepatomas sometidos a estrés oxidativo, modificando la expresión de las enzimas antioxidantes (Cu,Zn-superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa) (artículo enviado a la revista *Antioxidants & Redox Signalling*), así como un efecto protector de la integridad del DNA (efecto antigenotóxico) (López, 2004).

Referencia	Fraccionamiento	Sistema	Resultado
Abu-amsha (1996)	Cromatografía en capa fina	Oxidación LDL	Las dos fracciones con mayor actividad no tenían flavonoides; en ellas identificaron ácido cumárico, ácido caféico y ácido protocatecuico. El ácido cumárico resultó ser inactivo.
Baldi (1996)	Extracción líquido/líquido	Espectroscopia EPR (O <sub>2</sub> )	Las fracciones que contienen compuestos de menor PM tienen mayor capacidad antioxidante que las que tienen mayor PM.
Ursini (1996)	Cromatografía en columna	“Crocín Bleaching Inhibition”	La capacidad antioxidante del vino tinto se debe en un 55% a antocianinas, 25% a taninos, 15% a flavonoles y un 5% a ácidos fenólicos hidrosolubles.
Kerry (1997)	Cromatografía en columna	Oxidación LDL mediada por Cu	La fracción que contiene antocianinas y catequinas es la más activa; seguida por la que contiene ácidos fenólicos, flavonoles y procianidinas.
Ghiselli (1998)	Extracción líquido/líquido	R-ficoeritrina/AAPH	La fracción que contiene las antocianinas es la más activa. Las otras dos fracciones que contienen ácidos fenólicos y quercetina-3-glucurónido, procianidinas, catequinas y quercetina-3-glucósido son menos activas.

Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos en algunos estudios realizados en distintas fracciones de vino tinto utilizando diferentes métodos de extracción y análisis y procedimientos para evaluar capacidad antioxidante. Adaptado de Leighton *et col*, (2000).

### **1.3.4 Efectos sobre el metabolismo glucídico, lipídico y mineral**

Diferentes estudios realizados sobre metabolismo lipídico ponen de manifiesto que una dieta rica en procianidinas disminuye los niveles séricos de colesterol total y triglicéridos, al mismo tiempo que provoca un aumento de los niveles de colesterol ligado a HDL y una disminución de los niveles de colesterol ligado a LDL y VLDL (Kato & Yoshida, 1981; Imai & Nakachi, 1995; Rimm, 1996; Cooper, 2004). Yoshino *et al* (1994) demostraron que la suplementación con procianidinas del té (1%) a ratas durante 19 meses reducía los niveles de colesterol total, triglicéridos y de fosfolípidos, resultados que coincidían con los obtenidos por Imai & Nakachi (1995). Ikeda *et al*. (1992) también comprobaron que las catequinas del té poseían actividad hipocolesterolemica, ya que se aumentaba la excreción de colesterol y de lípidos totales en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolemica. Además, las procianidinas presentes en el té inhiben la absorción del colesterol en el intestino, aumentándose los niveles de excreción fecal de éste; sin embargo, no se conoce el mecanismo de inhibición (Ikeda, 1992; Tebib, 1994; Van Jaarveld, 1996).

La suplementación con procianidinas poliméricas de semilla de uva (2%) evitan el incremento de peso del hígado y de los niveles de lípidos totales y de colesterol hepático en la rata. Este efecto no se observa cuando la suplementación se realiza con monómeros (Tebib, 1994). La suplementación con quercetina, morina y ácido ferúlico en pollos deficientes en vitamina E induce un marcado cambio en la composición de ácidos grasos del hígado y del músculo (Jenkins & Atwal, 1995). En humanos, el consumo durante 10 días de 200 ml de vino tinto reduce los niveles de colesterol-LDL, considerándose que estos efectos se deben a los compuestos no alcohólicos presentes en el vino tinto, ya que los mismos efectos no se observan cuando se suministra vino blanco. El consumo de 200 ml de vino blanco o tinto por día durante un periodo de 10 días reduce el nivel de Apo B y aumenta la relación colesterol-LDL/apo B, hecho que indica un aumento del tamaño de las LDL. Por el contrario no se observa ningún cambio morfológico en las HDL (Sharpe, 1995). En nuestro laboratorio se ha comprobado como las procianidinas presentes en el vino disminuyen el nivel plasmático de triglicéridos, ácidos grasos libres, lipoproteínas asociadas a Apo B y colesterol-LDL, mientras que aumentan ligeramente el nivel plasmático de colesterol-HDL (del Bas, 2005).



En cuanto al metabolismo mineral, la ingesta de procianidinas en ratas provoca una disminución de la digestibilidad aparente de ciertos minerales (como es el caso del Fe y Ca) (Nguyen & Canada, 1993; Cook, 1995; Paganga, 1996; Sanders, 1996; Van Jaarsveld, 1996; Zdunczyk, 1996; Handaoui, 1997). La administración a ratas de procianidinas poliméricas extraídas del té negro (0.05 g/100 g dieta) durante un periodo de 28 días reduce la absorción de calcio durante los días 13–18, alcanzándose niveles normales de absorción a partir del día 21; estos cambios en los niveles de absorción no modifican el contenido de calcio en el hueso (Chung, 1998). Además, parece ser que la absorción aparente de calcio en ratas alimentadas con una concentración baja de procianidinas poliméricas no es significativamente menor que las existente en las ratas control; sin embargo, cuando la concentración de éstas aumenta, la absorción de calcio sí que decrece significativamente (Chung, 1998). Gálvez *et al* (1996) aseguran que la quercetina bloquea los canales de calcio, disminuyendo la concentración de calcio disponible para la maquinaria contráctil.

Van Jaarsveld *et al* (1996) muestran que los flavonoides de la dieta disminuyen también la absorción de Fe. Cook *et al* (1995) demuestran que la absorción de Fe está disminuida con la ingesta de este tipo de compuestos, atribuyendo este efecto a la unión del ión Fe con los polifenoles. Morel *et al* (1995) y Paganga *et al* (1996) sugieren que la catequina es más efectiva que la quercetina al quelar Fe de cultivos de hepatocitos. En una experiencia realizada con humanos, Cook *et al* (1995) señalan que el vino tinto (y no el blanco) reduce ligeramente la absorción del hierro no hemo (efecto atribuido a la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en el vino tinto); al mismo tiempo, aseguran que esta reducción en la absorción del Fe no afecta al balance de Fe corporal. Resultados similares obtuvieron Hurrell *et al* (1998) al comprobar que las procianidinas del té inhiben la absorción del hierro no hemo en humanos procedente de la dieta. Esta inhibición se explica por la formación de complejos procianidina-Fe<sup>+3</sup> estables en el intestino (Disler, 1975). El ligando debe consumirse junto con el Fe<sup>+3</sup> para inhibir su absorción (South, 1997). Esta inhibición que ejercen las procianidinas sobre la absorción del hierro depende de la presencia de otros nutrientes (Santos-Buelga, 2000). Hamdaoui *et al* (1997) comprobaron como el consumo de té causaba un incremento en la absorción de cobre, en los niveles plasmáticos de ceruloplasmina y en la retención en los tejidos de este metal, particularmente en el hígado. Por el contrario, el zinc posee una baja afinidad por los polifenoles, sobre todo a pHs ácidos y neutros, hecho que concuerda con la carencia de efecto del té, vino y cerveza sobre su biodisponibilidad en humanos (Flanagan, 1985; Ganji, 1994).

Por otra parte, se ha comprobado que en el metabolismo glucídico las procianidinas pueden inhibir las enzimas de la vía de la glucólisis y el transporte de lactato (Agullo, 1996; Volk, 1997). En nuestro laboratorio también se ha comprobado que la administración de procianidinas a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina posee un efecto antihiper glucémico. Además, las procianidinas estimulan la captación de glucosa por parte de adipocitos 3T3L1 y miotubos L6E9 compartiendo vías de señalización de insulina como PI3K y p38 MAPK y estimulando también la translocación de GLUT 4 en la membrana plasmática (Pinent, 2004).

### **1.3.5 Efectos sobre la fluidez de la membrana**

Las procianidinas pueden ligarse fuertemente a los fosfolípidos (Hagerman & Butler, 1991; Saija, 1995; Sharpe, 1995); se sugiere que esta interacción puede ser importante y decisiva en la actividad *in vitro* de estos compuestos, ya que posiblemente los complejos formados podrían alterar la morfología de la membrana (Hagerman & Butler, 1991; Saija, 1995). La facilidad que puedan tener las procianidinas para penetrar en la membrana y modificar su ordenada estructura de bicapa lipídica podría depender de la facilidad de la procianidina para adoptar una configuración planar (Saija, 1995). Sin embargo, existen otros factores que modulan la interacción de las procianidinas con los lípidos, en el modelo de membrana, entre los que se puede destacar la presencia de sustituyentes diferentes en la estructura del compuesto, su liposolubilidad y la presencia de éste en forma de glucósido o de aglicona (Saija, 1995).

Se ha descrito en humanos que el consumo de 200 ml diarios de vino tinto durante un periodo de 10 días aumenta la fluidez de la membrana de los eritrocitos; este efecto no se observa cuando se administra vino blanco, hecho que hace suponer que este efecto es

consecuencia de los componentes no alcohólicos del vino. Se considera que la membrana de los eritrocitos es similar a la de las células endoteliales, sugiriendo que este mecanismo podría ser protector de la arteriosclerosis al disminuir el riesgo de rotura de la membrana y alterar favorablemente la función de los receptores (Saija, 1995; Li, 2000; Dell' Agli, 2004). La influencia de las procianidinas sobre la fluidez de la membrana puede condicionar otros efectos biológicos de éstas, como es el caso de su efectividad antioxidante (Hagerman & Butler, 1991; Saija, 1995; Sharpe, 1995), su actividad antimicrobiana y antibacteriana (Ikigai, 1993; Chung, 1998). Algunos autores suponen que las procianidinas, además de afectar a la fluidez de las membranas, también podrían provocar la fusión de las mismas (Ikigai, 1993; Saija, 1995).

### **1.3.6 Efectos antiinflamatorio y antihistamínico**

Diferentes autores describen que las procianidinas de la dieta pueden tener efectos antiinflamatorios (Masquelier, 1986; Laughton, 1991; Stavric, 1994; Ares, 1995; Jenkins & Atwal, 1995; Recio, 1995; Intorre, 1996; Matsuo, 1996; Sánchez de Medina, 1996; Tait, 1996; Catapano, 1997; Li, 2000; Bernátová, 2002; Zenebe, 2003; Dell' Agli, 2004; Cooper, 2004). Existen diferentes evidencias sobre esta afirmación. Se ha descrito una acción protectora de la catequina contra la úlcera gástrica (Masquelier, 1986) y también parece que en ratas las flavonas protegen contra el daño gástrico inducido por el alcohol (Ares, 1995). Recio *et al* (1995) describen que diferentes glucósidos de la quercetina poseen efectos antiinflamatorios en ratones con inflamaciones, mientras que Sánchez de Medina *et al* (1996) experimentan con el efecto antiinflamatorio de la quercitrina. Se cree que para poseer esta actividad antiinflamatoria, las procianidinas deberían tener una sustitución metoxi en posición 5 y una sustitución metoxi o metilo en posición 7. Se ha descrito como compuestos más activos las procianidinas C1 y A2 (Ares, 1995).

Se han propuesto diferentes procesos de actividad inflamatoria. Uno de estos mecanismos es la capacidad de las procianidinas para disminuir la liberación de histamina, y en consecuencia, de la actividad de la histamina descarboxilasa (Masquelier, 1989; Recio, 1995; Matsuo, 1996). Para tener esta actividad inhibitoria, las procianidinas deben tener una estructura de trifenol, encontrándose la máxima actividad en el galato de epicatequina (Matsuo, 1996). Además, las procianidinas pueden efectuar su actividad antiinflamatoria debido principalmente a su capacidad para inhibir la fosfolipasa A2 —enzima responsable de la hidrólisis y liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana— (Jenkins & Atwal, 1995; Recio, 1995), la ciclooxigenasa (Laughton, 1991) y la lipooxigenasa (Laughton, 1991; Jenkins & Atwal, 1995; Tait, 1996), o bien debido a la fosforilación de proteínas específicas causantes de la activación de los neutrófilos (Recio, 1995).

### **1.3.7 Efectos cardioprotector y cardiovascular**

Se considera que las procianidinas pueden ejercer un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares (Hollman, 1996; Rimm, 1996; Li, 2000; Fitzpatrick, 2002; Dell' Agli, 2004; Cooper, 2004). Además se habla también de las propiedades antitrombóticas de estos compuestos (Stavric, 1994; Demrow, 1995; Hertog, 1996; Cansen, 1998; Pignatelli, 2000; Dell' Agli, 2004; Cooper, 2004). Parece ser que las procianidinas del vino están más relacionadas contra la protección de los procesos trombóticos que con la arteriosclerosis (Hertog, 1996), cifrándose en un 50% la reducción del riesgo de contraer enfermedades de este tipo, debido sobre todo a los efectos antitrombóticos y antioxidantes de las procianidinas (Hollman, 1996).

Hay diferentes mecanismos fisiopatológicos que explican el papel protector de las procianidinas. Uno de éstos es el aumento de las lipoproteínas de elevada densidad (HDL) y de las apoproteínas A1 y A2, así como la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Bujanda, 1999). Se ha comprobado que la suplementación a ratas de procianidinas poliméricas de semilla de uva evita el aumento de la concentración de LDL y la disminución de los niveles de HDL, aunque, sin embargo, estos efectos no se observan si la suplementación se realiza con procianidinas monoméricas (Tebib, 1994). Para algunos autores,

este mecanismo solamente explica una reducción del 30–50% del riesgo de enfermedad cardiovascular (Bujanda, 1999).

La actividad vasodilatadora que presentan las procianidinas influye también en el papel cardioprotector y cardiovascular de éstas (Stavric, 1994; Formica & Regelson, 1995; Chen & Pace-Asciak, 1996; Herrera, 1996; Van Jaarsveld, 1996; Bujanda, 1999). Se ha comprobado como el endotelio vascular sintetiza y libera óxido nítrico (NO), el cual promueve la vasorelajación, reduce la agregación plaquetaria y limita el flujo de proteínas plasmáticas aterogénicas en la pared arterial. El efecto de la vasodilatación del NO ocurre mediante la activación de guanil ciclasa, conduciendo a la acumulación de cGMP (Li, 2000). Asimismo, se ha demostrado que las procianidinas modulan la presión sanguínea en ratas normales e hipertensivas (Mizutani, 1999; Diebolt, 2001; Bernátová, 2002), promueven la vasodilatación, inhiben la migración y proliferación de células musculares lisas e inhiben la agregación plaquetaria (Dell' Agli, 2004). Las procianidinas presentes en las uvas y en el vino tinto provocan una relajación del endotelio de los vasos sanguíneos, aumentando la generación y/o la actividad biológica del NO, provocando un aumento en los niveles de cGMP (Fitzpatrick, 1993, 1995 y 2000; Zenebe, 2003). Se ha comprobado en ratas como los componentes fenólicos del vino aumentan la producción de NO produciendo vasodilatación (Andriambelason, 1997; Bujanda, 1999). La administración de zumo de uva tinta a pacientes con la función endotelial deteriorada aumenta la relajación del endotelio y la vasodilatación de dichos pacientes (Stein, 1999); además, Burns *et col* (2000) estudiaron la correlación existente entre el contenido fenólico del vino y el efecto vasodilatador en voluntarios humanos. Diferentes autores han caracterizado las procianidinas responsables de la actividad dilatadora del endotelio (Andriambelason, 1997; Fitzpatrick, 2000 y 2002) confirmando que las procianidinas monoméricas y los fenoles simples (como el ácido benzoico, gálico e hidroxicinámico) no ejercen un efecto vasodilatador, mientras que las procianidinas poliméricas (dímeros, trímeros y tetrameros) ejercen este efecto vasodilatador, cifrándose el valor umbral para provocar la relajación del endotelio por parte de estos compuestos en 0.5–4 µg/ml (Fitzpatrick, 2000 y 2002). Los polímeros de procianidinas de elevado peso molecular no provocan una actividad vasodilatadora en el endotelio (Andriambelason, 1998). Asimismo, se ha comprobado que las procianidinas reducen la síntesis de un potente vasoconstrictor como endotelina-1 en células endoteliales de aorta de oveja. Se cree que la supresión de endotelina-1 ocurre a nivel transcripcional, asociándose la disminución en la síntesis de este compuesto con la inhibición de enzimas fosforiladas de la familia de las tirosina kinasas (Corder, 2001).

Diversos autores han estudiado el mecanismo mediante el cual las procianidinas provocan vasodilatación dependiente de NO en los vasos sanguíneos (Andriambelason, 1999; Martin, 2002; Zenebe, 2003). Se cree que el incremento de calcio ( $Ca^{+2}$ ) intracelular es el paso crítico para la activación de la NO sintasa. Las procianidinas aumentarían el calcio libre citosólico mediante el aumento de la entrada de calcio extracelular y mediante el aumento de la movilización del calcio desde donde éste está almacenado intracelularmente (Zenebe, 2003). Se cree que las vías de señalización de calcio que llevan a la producción de NO podrían activar múltiples dianas celulares (como proteína G, fosfolipasa C, tirosina kinasa) dependiendo de la composición de procianidinas aplicada. Además del incremento de la actividad NO sintasa, las procianidinas pueden prolongar la vida media del NO, reduciendo su degradación mediada por especies oxígeno reactivas (de Aetano, 2001). Leikert *et al* (2002) afirman que las procianidinas aumentan significativamente la expresión de la NO sintasa actuando sobre la actividad del promotor.

La adhesión de leucocitos, monocitos y linfocitos T al endotelio vascular puede causar aterosclerosis, provocando una respuesta inflamatoria. La sucesiva acumulación de leucocitos en la arteria puede empeorar el estado de la placa aterosclerótica (Dell' Agli, 2004). El proceso de adhesión es facilitado por moléculas de adhesión como ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), E-selectin y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule). La expresión de estas moléculas puede ser regulada transcripcionalmente mediante citocinas inflamatorias como interleucina-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) (Dell' Agli, 2004). Se ha comprobado que una concentración de procianidinas de 5µg/mL produce una disminución de la regulación de la expresión de VCAM-1 modulada por TNF- $\alpha$  en células endoteliales primarias del tejido umbilical humano, resultando en una disminución de la adherencia de los leucocitos y de las células T (Sen, 2001; Bagchi, 2002).

Las células vasculares de músculo liso también contribuyen a la formación de lesiones ateroscleróticas, ya que su proliferación y migración es una prueba crucial en el desarrollo de esclerosis en la pared arterial (Dell' Agli, 2004). Uno de los factores más importantes y potentes liberado por las plaquetas, las células endoteliales y las células vasculares de músculo liso en el lugar donde aparece la lesión es el factor PDGF (platelet-derived growth factor) que ejerce su efecto al activar dos receptores de transmembrana como el PDGF  $\alpha$  y  $\beta$  (Dell' Agli, 2004). El ligando que se une al receptor  $\beta$  promueve la activación de enzimas señalizadoras importantes para la proliferación y migración celular. La activación de las vías de PI3K (fosfatidil inositol 3'-kinasa) y MAPK (mitogen-activated protein kinase) como respuesta a PDGF están implicadas en la motilidad de las células vasculares del músculo liso (Knall, 1997; Hedges, 1999; Imai, 1999; Dell' Agli, 2004). En este sentido, las procianidinas inhiben la proliferación de células musculares lisas de la arteria aorta de rata y la síntesis de DNA (Iijima, 2000 y 2002; Dell' Agli, 2004). Este efecto antiproliferativo se ha detectado tanto para fracciones de procianidinas de peso molecular 200–400 (catequinas y otros flavonoides) como para oligómeros de procianidina de peso molecular 1600–2000, postulándose dos mecanismos diferentes para ello: uno implica la disminución de la regulación de la expresión génica de ciclina A mediante la disminución de la expresión de los factores de transcripción ATF-1 y CREB (elemento sensible a cAMP); el segundo está asociado a la infraregulación de la actividad PI3K que interviene en la regulación del ciclo celular mediante el aumento de la regulación de p27<sup>kip1</sup> actuando como inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina (Collado, 2000; Suzuki, 2000). Asimismo, además de la proliferación, las procianidinas inhiben la migración de las células vasculares de músculo liso mediante la inhibición específica de PI3K y p38MAPK, pero no mediante otras MAPKs y ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase 1 y 2). La atenuación de las señales que provocan la proliferación de las células vasculares de músculo liso también podrían ser consecuencia de la inhibición del receptor  $\beta$  de PDGF por parte de las procianidinas (Rosenkrank, 2002).

El efecto en el sistema de coagulación y fibrinólisis es otro de los mecanismos cardioprotectores de las procianidinas, ya que éstas disminuyen los niveles de fibrinógeno y aumentan los niveles de los activadores del plasminógeno y la acción antitrombina (Bujanda, 1999). Sin embargo, no se ha observado que el consumo de té en humanos modifique la concentración de fibrinógeno ni los niveles del activador y del inhibidor del plasminógeno, por lo que se piensa que si el té protege contra las enfermedades cardiovasculares, lo hace a través de mecanismos diferentes al vino (Vorster, 1996).

La reducción de la agregación plaquetaria (Hollman, 1996; Van Jaarsveld, 1996) y el efecto antihipertensivo de las procianidinas (Stavric, 1994; Formica & Regelson, 1995; Van Jaarsveld, 1996) tienen también una destacada importancia en este efecto protector. Las plaquetas contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis y de lesiones de la arteria coronaria mediante varios mecanismos (Fuster, 1992). Se ha comprobado que tanto el vino como zumo de uva pueden afectar a la agregación plaquetaria en el hombre tanto *ex vivo* como *in vitro*, reduciendo la concentración plasmática de tromboxano B<sub>2</sub> y la concentración disponible de ADP y trombina para la agregación plaquetaria (Landolfi, 1984; Seigneur, 1990; Demrow, 1995; Pace-Asciak, 1996; Janssen, 1998; Pignatelli, 2000).

La formación de un trombo puede causar reducciones en el flujo sanguíneo coronario. Algunos trabajos muestran una eliminación de estas reacciones tras realizar una administración intragástrica o intravenosa de zumo de uva y vino tinto (Demrow, 1995; Janssen, 1998). También se ha comprobado que la agregación plaquetaria es fuertemente inhibida por el vino tinto, moderadamente inhibida por el zumo de uva y no es afectada por el vino blanco (Dell' Agli, 2004; Cooper, 2004). Del mismo modo, la agregación plaquetaria se reduce en ratas que ingieren etanol, vino tinto y blanco, pero cuando las bebidas son eliminadas, las ratas que han consumido vino tinto no exhiben el efecto rebote sobre las plaquetas que suele observarse horas después de haber consumido alcohol, hecho que se ha asociado con el infarto en el hombre (Ruf, 1995).

Pignatelli *et col* (2000) utilizaron catequina y quercetina en un estudio realizado *in vitro*, comprobando que cuando ambos flavonoides son combinados en concentraciones en las que por separado no ejercen ningún efecto (25  $\mu$ M de catequina y 5  $\mu$ M de quercetina) se observan efectos significativos sobre la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y sobre la adhesión plaquetaria sobre éste. Estos resultados sugieren que los flavonoides podrían

actuar sinérgicamente inhibiendo la agregación plaquetaria, pudiendo ser este hecho relevante tras realizar un consumo de vino tinto.

Contrariamente, existen algunos estudios que demuestran que algunos compuestos fenólicos pueden inducir el desarrollo de la arteriosclerosis. Este es el caso de Wilson et al (1996) que demostraron que conejos tratados con resveratrol tienen más lesiones ateroscleróticas que conejos tratados sin este compuesto.

### **1.3.8 Efectos antivírico, antibacteriano y antifúngico**

También se han descrito actividades antivíricas y antimicrobianas de las procianidinas (Ikigai, 1993; Stavric, 1994; Huyese, 1995; Cook & Samman, 1996; Critchfield, 1996; Valcic, 1996; Chung, 1998) y también actividades antifúngicas (Valcic, 1996; Chung, 1998). Existen evidencias de la inhibición de la HIV-1 proteasa y la integrasa (Critchfield, 1996) y también de la transcriptasa inversa (Stavric, 1994; Critchfield, 1996) por los flavonoides.

Se cree que el efecto bactericida de las procianidinas es más acusado sobre las bacterias Gram-positivas que sobre las Gram-negativas, debido a que estas últimas tienen la membrana externa muy próxima a la membrana citoplasmática, hecho que permite la difusión de la barrera funcional (lipopolisacáridos y lipoproteínas) presente en la membrana externa de las bacterias (Ikigai, 1993). La baja susceptibilidad de las procianidinas por las bacterias Gram-negativas puede deberse parcialmente a la presencia de una fuerte carga negativa en los liposacáridos en la cara exterior de la membrana externa (Ikigai, 1993). La presencia de la procianidina en la membrana cambia la fluidez y la morfología de ésta, y disminuye el flujo de tiourea y cicloleucina (Ikigai, 1993). Se observa también una elevada capacidad antibacteriana de las procianidinas del té sobre las bacterias patógenas intestinales y sobre el crecimiento y la adherencia de las bacterias en las células epiteliales de la boca (Wiese, 1995). Shet *et al*, (1988) publican un artículo donde se estudia el efecto *in vitro* de diferentes bebidas sobre las bacterias enteropatógenas (*Salmonera typhimurium*, *Shigella sonnei* y *Escherichia coli*). Se observa como el vino provoca una disminución rápida del número de colonias, especulándose sobre el efecto del pH y del etanol del vino sobre el efecto bactericida en las bacterias enteropatógenas. En cambio, hay autores (Wiese, 1995) que determinan en diversos experimentos que estos efectos pueden ser provocados por los compuestos fenólicos del vino (Bujanda, 1999).

### **1.3.9 Efectos sobre el tracto gastrointestinal**

Las procianidinas muestran también propiedades preventivas o terapéuticas contra trastornos gastrointestinales. Se cree que a nivel intestinal las procianidinas están involucradas fundamentalmente en la secreción ácida, en la motilidad intestinal y en la capacidad bactericida frente a diversos gérmenes enteropatógenos (Bujanda, 1999). De hecho, vegetales y verduras ricos en procianidinas se utilizan comúnmente en medicina popular para tratar la diarrea. Este efecto contra la diarrea se atribuye a la formación de complejos inespecíficos entre las procianidinas y las proteínas de la mucosa intestinal, formándose así, una capa protectora (Loeb, 1989). Otro de los mecanismos que explica el comportamiento antidiarreico de las procianidinas es la formación de complejos entre éstas y compuestos como la toxina del cólera (Hör, 1995) o la inhibición de la motilidad intestinal (Gálvez, 1991). Se ha comprobado que el consumo de vino (tanto blanco como tinto) y de cerveza en dosis moderadas aumenta la secreción gástrica y la liberación de gastrina, mientras que si solamente se consume alcohol no hay efecto o se observa una inhibición. Al mismo tiempo, disminuye la secreción pancreática (Bujanda, 1999). Además, la ingestión de vino o cerveza provoca una disminución de la presión de los esfínteres superior e inferior del esófago, favoreciendo el flujo gastroesofágico en individuos sanos (Bujanda, 1999).

Asimismo, las procianidinas previenen contra las caries dentales (Sakanaka, 1998) al inhibir la actividad de glucosiltransferasas que catalizan la formación de glucanos (insolubles en agua) a partir de glucosa (Hattori, 1990; Sakanaka, 1990) o por inhibición del crecimiento de los *Streptococcus* cariogénicos (Sakanaka, 1989; Sarni-Manchado, 1998).





### **1.3.10 Efecto antimutagénico. Cáncer**

Las propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas de las procianidinas se han puesto de manifiesto en diferentes estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* en los que se describe la capacidad de las procianidinas para unirse directamente a agentes carcinógenos, induciendo enzimas de fase II (como la UDP-glucuronosil transferasa) e inhibiendo la formación de aminas heterocíclicas (Kampa, 2000; Yang, 2001; McKay, 2002). Diversos mecanismos moleculares como la inducción de apoptosis mediada por catequina y la detención del ciclo celular, la inhibición de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP1, la reducción de la actividad de la proteína tirosina kinasa y la expresión del mRNA de *c-jun* sugieren la existencia de diferentes vías quimiopreventivas para las procianidinas (Ahmad, 1999; Kampa, 2000; Yang, 2001; McKay, 2002).

Matsushima *et al* (1996) demuestran la actividad quimioprotectiva de la catequina y que la administración a ratas de té verde *in vivo* inhibe la aparición de cáncer de vejiga, inducido por la N-butil-N-(4-hidroxibutilo)-nitrosamina. Se ha hablado mucho de la importancia de las procianidinas como agentes anticancerígenos, describiéndose efectos antiproliferativos de éstas en los cánceres gastrointestinales (Stavric, 1996, Yang, 2001), de pulmón (Hertog, 1994; Akama, 1996; Cross, 1996; Zheng, 1996; Goldbohm, 1996; Le Marchand, 2000), de ovarios (Stavric, 1994; Cross, 1996), de mama (Stavric, 1994; Zheng, 1996; Goldbohm, 1996; Tavani, 1998; Nakachi, 1998; Nagata, 1998; McKay, 2002), de colon (Baron, 1994; Stavric, 1994; Zheng, 1996; Cross, 1996; Bushman, 1998; Hartman, 1998; Muñoz, 1998; August, 1999), de esófago (Kinjo, 1998); de estómago (Tajima, 1985; Yu, 1995; Zheng, 1996; Inoue, 1998; Hibasami, 1998; Bushman, 1998; Chow, 1999; Kamajima, 1999; Shibata, 2000; Tsubono, 2001), de vejiga y riñones (Ohno, 1985; Wakai, 1993; Lu, 1999; Nagano, 2000; Bianchi, 2000), de próstata (Liao, 1995; Jain, 1998; Paschka, 1998; Ellison, 2000; Kampa, 2000) y de piel (Zhao, 1999 a y b; Katiyar, 1999 y 2001; Kakim, 2000; Elmets, 2001; Uehara, 2001) tanto en animales de experimentación como en humanos. También se ha observado este efecto en células leucémicas (Stavric, 1994). Además, mediante la utilización de técnicas *in vitro*, se ha comprobado que los compuestos fenólicos con mayor actividad anticancerígena son las procianidinas (Bomster, 1996). Asimismo, se ha comprobado que las catequinas oxidadas poseen la actividad anticancerígena más inhibida (Goldbohm, 1996), y se cree que el compuesto fenólico presente en el té con mayor actividad antimutagénica es el galato de epicatequina (Yen & Chen, 1996; Valcic, 1996), aunque la epigalocatequina y la epicatequina poseen también una elevada actividad (Valcic, 1996).

No obstante, debe tenerse en cuenta que una vez iniciado el tumor, comienza un proceso irreversible, por lo que es importante en la prevención de los cánceres identificar las sustancias que puedan inhibir la propagación irreversible del tumor. De este modo, debe controlarse la estimulación de la producción de hidroperóxido, el incremento de la síntesis de DNA y la inducción de la actividad ornitina descarboxilasa. Se ha comprobado que la síntesis de DNA está inhibida en un 30-35% y que este efecto se produce tanto con procianidinas monoméricas como con procianidinas poliméricas, independientemente de la dosis de éstos (Yang, 2001; McKay, 2002). Por otra parte, la inhibición de la enzima ornitina descarboxilasa por parte de las procianidinas poliméricas es reversible, sugiriéndose que si las procianidinas poliméricas se aplican 15 minutos después de la iniciación del tumor, éstas inhiben la inducción de la enzima. La efectividad de esta inhibición aumenta con el grado de polimerización. Las procianidinas de elevado grado de condensación interfieren en la acción de las sustancias carcinogénicas y/o con las etapas moleculares de regulación de la actividad de la enzima (Gali, 1994; Yang, 2001; McKay, 2002).

### **1.4 Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos**

Los efectos fisiológicos descritos anteriormente para los compuestos fenólicos dependen en gran medida de la composición de los alimentos en estos compuestos. Por esta razón, se analizarán las principales fuentes de compuestos fenólicos en el siguiente subapartado.

### 1.4.1 Fuentes de compuestos fenólicos en la dieta

La mayoría de los vegetales contienen polifenoles, los cuales están presentes en cantidades diferentes dependiendo de la planta y del grupo de compuesto fenólico estudiado, diferenciándose estos contenidos de acuerdo con la parte del vegetal que se trate, bien sea fruto, hojas o parte leñosa de la planta. En general, las hojas, flores, fruta y otros tejidos de las plantas contienen glucósidos (Knekt, 1991; Shahidi, 1995). Los tejidos leñosos contienen agliconas, las semillas pueden contener ambas formas, mientras que las raíces y tubérculos contienen escasas concentraciones de flavonoides (Knekt, 1991; Justesen, 1998; Price, 1997). Los principales polifenoles presentes en los alimentos vegetales son los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos (detallado en la tabla 12).

Tejido	Contenido relativo
Frutas	Ácido cinámico > catequinas > leucoantocianidinas > flavonoles
Hojas	Flavonoles ≈ ácido cinámico > catequinas ≈ leucoantocianidinas
Corteza y madera	Catequina ≈ leucoantocianidinas > flavonoles > ácido cinámico

Tabla 12. Concentración relativa de flavonoides y ácidos cinámicos en tejidos vegetales en general. Adaptado de Martínez-Valverde (2000).

La diversidad estructural de los polifenoles presentes en la dieta no se limita a diferencias en la estructura del esqueleto carbonado y del estado de oxidación del heterociclo, sino que es algo más complicado, ya que pueden variar los patrones de hidroxilación de los anillos fenólicos mediante glucosilación de los flavonoides y acilación de los ácidos fenólicos o por la existencia de esteroisómeros. Esta diversidad estructural de los polifenoles hace difícil su estimación en los alimentos (Martínez-Valverde 2000).

Debido a esta diversidad estructural y a otra serie de razones, existe una falta de métodos analíticos estandarizados y, teniendo en cuenta la variación en el contenido de un alimento en particular, es especialmente difícil realizar una estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos. Muchos autores se refieren a los datos publicados hace más de 25 años (Kühnau, 1976). Se ha cifrado la ingesta diaria de estos compuestos en 1 g; sin embargo, no se detallan los métodos utilizados para determinar este dato. Para la determinación del contenido en polifenoles, suelen utilizarse dos técnicas diferentes: por una parte, se puede realizar la estimación de compuestos específicos como el ácido clorogénico en patatas o café, quercetina en cebollas o catequina en té mediante técnicas cromatográficas, o bien la estimación de los fenoles totales mediante reducción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Scalbert, 1992). Generalmente los valores obtenidos por el primer método son menores que los valores obtenidos por el ensayo de Folin, debido a que algunos polifenoles no son determinados por cromatografía. Éstos pueden ser compuestos desconocidos que están presentes en niveles traza, que no se tienen en cuenta en la caracterización de determinados alimentos o bien puede tratarse de compuestos no resueltos por cromatografía, como es el caso de los polímeros de procianidinas y de los polifenoles oxidados en manzanas, vinos, té o cerveza (Santos-Buelga & Scalbert, 2000). Una segunda razón a esta sobrevaloración obtenida por el método de Folin es que existen, o pueden existir, otros agentes reductores en los alimentos. Por ejemplo, el ácido ascórbico también reduce el reactivo de Folin, siendo 1 mg de éste equivalente a 0.7 mg de catequina, que suele utilizarse como estándar en este tipo de ensayos (Singleton & Rossi, 1965). De este modo, el contenido en ácido ascórbico en la patata, tomate, cebolla, manzana y zumo de naranja (17, 24, 8, 12 y 54 mg/100 g peso fresco, respectivamente) significaría un 40–46% de la estimación total de fenoles en patatas y tomates pero solamente un 6–4% en alimentos ricos en polifenoles como las cebollas y las manzanas (Souci, 1986). Mediante el método de Folin, se ha evaluado que las verduras (incluyendo las legumbres secas) suponen una cantidad diaria ingerida de fenoles totales de 218 mg de promedio en una dieta tipo de EEUU (Vinson, 1998). Debido a la contribución del ácido ascórbico a los valores obtenidos mediante el método de Folin, los valores reales deberían ser más bajos.

Los polifenoles no están distribuidos uniformemente en los tejidos de las plantas, pudiéndose dar una pérdida o un enriquecimiento en algunos compuestos fenólicos durante el procesamiento de los alimentos. Así, los polifenoles que se encuentran en las capas externas del grano de trigo, suelen perderse durante el proceso de refinado de la harina (Shahidi & Naczki, 1995). En contraposición, la presión al fabricar zumo puede llegar a solubilizar los compuestos fenólicos que se encuentran en partes no comestibles de la fruta. Este es el caso de la florizina de las manzanas que se encuentra en la piel y especialmente en las pepitas (Spanos & Wrolstad, 1992).

Las verduras poseen una amplia variedad de compuestos fenólicos dependiendo de la especie (Bravo, 1998; Knekt, 1997). De forma global, Hertog *et al.* (1992), encontraron entre un total de 28 vegetales analizados, que los principales flavonoides presentes en ellos eran la quercetina seguida del kaempferol. El principal aporte de la quercetina lo constituye la cebolla (347 mg/Kg), la col rizada (110 mg/Kg), la lechuga (14 mg/Kg) y el tomate (8 mg/Kg) siendo las principales fuentes de kaempferol la col rizada fresca, el brócoli y las judías verdes (Hertog, 1992). Los taninos están presentes en las judías y en los guisantes en una concentración del 2% expresados como equivalentes de catequina o de ácido tánico. En general, las verduras de la familia *Solanaceae* aportan gran parte del ácido clorogénico de la dieta, como de otros ácidos hidroxicinámicos (Bartolomé, 1996). Así, los tomates y los pimientos maduros son ricos en ácidos clorofénico y ferúlico, siendo la patata uno de los vegetales con mayor contenido en ácido clorogénico (17.36 mg/100 g de peso fresco) el cual constituye el 88.9% del total de los polifenoles presentes en ella. El contenido en ácido clorogénico se encuentra afectado por el tratamiento térmico, observándose que las mayores concentraciones se presentan en la patata cruda (0.8 mg/100 g de peso seco), decreciendo en la cocinada en microondas (0.434 mg/100 g de peso seco) y en la hervida (0.319 mg/100 g de peso seco) (Dao, 1992).

En cuanto a los principales compuestos fenólicos presentes en las legumbres y los cereales son los flavonoides y ácidos fenólicos. El contenido de polifenoles en cereales es menor de un 1% de la materia seca, excepto para alguna variedad de sorgo (*Sorghum bicolor*) en los que alcanzan contenidos superiores al 10% (Bravo, 1998; Knekt, 1997). La harina de arroz contiene 85.6 mg de ácidos fenólicos/100 g de este producto, siendo este contenido similar al que tienen las harinas de trigo y avena, respectivamente. Tanto en la harina de trigo como en la de avena destaca el ácido ferúlico como el principal componente fenólico (Hermann, 1988). Las legumbres con un mayor contenido en compuestos fenólicos son las de color oscuro entre las que destacan las judías rojas y las negras. Las isoflavonas son compuestos fenólicos también presentes en las legumbres (Bravo, 1998).

Los frutos son, por término general, más ricos en polifenoles que las verduras, con un contenido total de fenoles de 1–2 g/100 g de peso fresco de algunas frutas como es el caso de las ciruelas (Macheix, 1990). Las frutas destacan en la dieta por su alto contenido en flavonoles, conteniendo también cantidades considerables de otros compuestos fenólicos, dependiendo del tipo de fruta analizada. Existen frutas que poseen un elevado contenido en procianidinas (como es el caso de las manzanas, ciruelas y uvas) y antocianidinas (cerezas y otros frutos rojos) que no suelen encontrarse en verduras, a excepción de berenjenas y legumbres secas (Clifford, 1996; Santos–Buelga & Scalbert, 2000). El contenido de ácidos hidroxibenzoicos en las frutas es bajo en general, con la excepción de las moras, las frambuesas, la grosella morada y la grosella roja siendo mayor en general el contenido en ácidos hidroxicinámicos. De éstos últimos, el ácido caféico es el más predominante en muchas frutas, constituyendo el 75% del total de estos ácidos y encontrándose en ciruelas, manzanas, albaricoques y arándanos. Sin embargo, el ácido p-cumárico es el componente mayoritario de los cítricos y de la piña (Mancheix, 1990).

Otra fuente importante de compuestos fenólicos son determinadas bebidas como el vino tinto, el café, el té y algunos zumos de frutas. Estas bebidas son una gran fuente de ingesta de polifenoles en personas que los consumen diariamente. La cerveza también es una importante fuente de procianidinas con un contenido total de fenoles que oscila entre 50–100 mg/L (Leupold & Drawert, 1981), encontrándose niveles elevados de catequina (31 mg/L) o de epicatequina (33 mg/L) en algunas de ellas (González–San José, 2002).



El contenido en polifenoles en los zumos de frutas oscila generalmente entre 2 y 500 mg/L, dependiendo del tipo analizado (Bravo, 1998). El zumo de naranja no es una bebida rica en polifenoles. Su contenido en vitamina C (50 mg/100 mL) supone un 40% de la estimación total de fenoles, mientras que el resto corresponde a flavanonas (Souci, 1986). Las mayores concentraciones de éstas se han encontrado en la pulpa de la naranja donde se detectan valores del orden de 31 mg/100 g de peso fresco (Justesen, 1998). Asimismo, el contenido de hesperidina encontrado en la pulpa del pomelo es menor (1.5 mg/100 g de peso fresco), encontrándose en éste también, pequeñas concentraciones de quercetina y kaempferol (0.5 y 0.4 mg/100 g de peso fresco respectivamente) (Justesen, 1998).

Por otra parte, el vino posee una gran cantidad de compuestos fenólicos y está siendo extensamente estudiado. Como se mencionó anteriormente, la composición del vino es compleja. Además, existen diferencias significativas si la muestra a analizar es un vino blanco o tinto. La concentración total de compuestos fenólicos en el vino tinto varía entre 1.8 y 4.06 g/L equivalentes en ácido gálico, con promedio de 2.57 g/L. Para un vino blanco, los valores obtenidos son 0.16 a 0.33 g/L, con un promedio de 0.24 g/L (Frankel, 1995). La catequina es el compuesto fenólico monomérico más abundante en el vino tinto, seguido del ácido gálico, el cual, proviene principalmente de la hidrólisis de ésteres de flavonoides presentes en la piel y en las pepitas de las uvas. Los niveles de epicatequina son menores que los de catequina en la mayoría de los vinos. El contenido en procianidinas oligoméricas de diversas variedades de uva oscila entre 114 mg/Kg en la variedad Cariñena y 175 mg/Kg en la variedad Pinot noir, hasta los 371 mg/Kg de la variedad Cabernet sauvignon (Bourzeix, 1995). Las concentraciones de ácido cafeico son relativamente bajas tanto para vino blanco como tinto. Este ácido es producto de la hidrólisis del ácido caftárico, siendo la inducción de la hidrólisis dependiente de la exposición al sol (Price, 1994). También las antocianidinas, como la cianidina y la malvidina, están presentes en cantidades relativamente altas en el vino tinto, entre 0-7 mg/L y 0-90 mg/L, respectivamente y son las principales responsables de su color, como ya se ha mencionado con anterioridad (Frankel, 1995).

En cuanto a los flavonoles, considerando la suma de miricetina y quercetina, el contenido total de flavonoles en vinos tintos varía entre 4.6 y 41.6 mg/L. Miricetina y quercetina pueden encontrarse libres o conjugadas, siendo la proporción de las primeras un valor variable entre 20-50% del total (McDonald, 1998). Los glucósidos de quercetina se acumulan en la piel de las uvas negras, con lo que los vinos provenientes de estas uvas con una elevada cantidad de piel en relación con su volumen (como es el caso de Cabernet sauvignon), contienen concentraciones más elevadas de flavonoles (Price, 1994). Por último, la concentración de resveratrol (uno de los polifenoles del vino que más atención ha suscitado) varía entre 0.003 y 3.0  $\mu$ M en un vino tinto (Infante, 1997; Jang, 1997). Sin embargo, la presencia y los niveles de resveratrol pueden ser muy variables debido al carácter fungicida del mismo y a que es inducido por determinadas infecciones (Frankel, 1995).

Otra de las bebidas con mayor contenido en compuestos fenólicos de interés nutricional, es el té, destacando por su alta concentración en catequinas (las cuales constituyen más del 30% del peso seco de la hoja), flavonoles (quercetina, kaempferol y sus glucósidos), flavonas y ácidos fenólicos (ácido gálico y ácido clorogénico). La fermentación del té conlleva importantes variaciones en su composición fenólica: el té verde es muy rico en flavonoles, mientras que el té negro contiene elevadas concentraciones de polifenoles oxidados (teaflavinas). Las infusiones de té poseen concentraciones elevadas de quercetina que oscilan entre 10 y 25 mg/L (Bravo, 1998; Hertog, 1993).

Por otra parte, el chocolate es un producto muy rico en compuestos fenólicos, y un consumo mínimo de éste puede significar una gran contribución a la ingesta de polifenoles totales en general y de catequina y procianidinas en particular (Arts, 1999). La tabla 13 resume el contenido en polifenoles de algunos productos que se consumen diariamente.

Teniendo en cuenta todos los datos aportados, la ingesta total de polifenoles se puede calcular a partir de las cantidades de compuestos fenólicos que contiene cada alimento y tablas en las que se detallan las cantidades consumidas de los mismos. Como ya se ha comentado anteriormente, Kühnau en 1976 determinó una ingesta diaria de flavonoides en torno a 1 g/día en USA. Sin embargo, una persona que consume en un día diferentes cantidades de los alimentos que aparecen en la tabla 13, ingerirá seguramente más de 1 g diario de flavonoides y ácidos fenólicos, independientemente del método utilizado para estimar los polifenoles (ensayo colorimétrico de Folin o cromatografía).

Comestibles (Cantidad)	<i>Flavonoides</i>						<i>Fenoles totales</i>		Referencia
	Ácidos fenólicos	<i>Flavanoles</i>				Cromatografía	Ensayo de Folin <sup>3</sup>		
		Flavonoles	Catequina (monómeros)	Procianidinas	Flavanonas			Antocianidinas	
<b>Vegetales</b>									
Patata, 200 g	28						28	57	Hughes & Swain, 1962; Vinson, 1998
Tomate, 100 g	8	0.5					8	37	Fleuriet & Macheix, 1985; Crozier, 1997; Vinson, 1998
Lechuga, 100 g	8	1					9	23	Vinson, 1998
Cebolla, 20 g		7					7	18	Winter & Herrmann, 1986; Hertog, 1992; Vinson, 1998
<b>Frutas</b>									
Manzana, 200 g	11	7	21	200 <sup>1</sup>			239	440	Hertog, 1992; Vinson, 1998; Spanos & Wrolstad, 1992; Hammerstone, 2000
Cereza, 50 g	37	1	3	35		200	276	276	Macheix, 1990; Clifford, 1999
<b>Otros alimentos</b>									
Trigo, 10 g	50						50	50	Kroon, 1997
Chocolate, 20 g			16	86 <sup>1</sup>			102	168	Waterhouse, 1996; Adamson, 1999; Hammerstone, 2000
<b>Bebidas</b>									
Zumo naranja, 100 ml						22	22	75	Rousseff, 1987; Henn & Stehle, 1998
Vino tinto, 125 ml	12	2	34	45 <sup>2</sup>		4	97	225	Ricardo da Silva, 1991; Ricardo da Silva, 1992; Frankel, 1995
Café, 200 ml	150						150	179	Brown, 1990; Clifford, 1999
Té negro, 200 ml		8	130				138	200	Brown, 1990; Ding, 1992; Hertog, 1993a

<sup>1</sup> Oligómeros hasta grado de polimerización 10 (decámeros)

<sup>2</sup> Oligómeros hasta trímeros

<sup>3</sup> Estimación realizada por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu como equivalentes de catequina o ácido gálico.

Tabla 13. Contenido en polifenoles de diferentes alimentos. Todos los datos están expresados en mg. (Adaptado de Hammerstone, 2000).

La contribución a la ingesta de los polifenoles está compartida de una forma más o menos igual entre la comida y la bebida. Los ácidos fenólicos suelen suponer 1/3 de los fenoles totales, mientras que los flavonoides suponen el resto (2/3). Esta relación depende en gran medida del consumo de café (Clifford, 1999). Personas que consumen grandes cantidades de café, ingieren más ácidos fenólicos que flavonoides. La proporción de los diferentes flavonoides ingeridos varía enormemente en función de la ingesta de determinados alimentos. Aquellas personas que consumen a diario frutas o bebidas como vino tinto, té, chocolate o cerveza, ingieren mayoritariamente flavanoles (principalmente catequinas y procianidinas), antocianidinas y los productos de su oxidación. Si se toman juntas frutas y bebidas, esto supondrá más de 2/3 de la ingesta diaria de polifenoles totales (Clifford, 1996; Santos–Buelga & Scalbert, 2000). En consecuencia, parece ser que la ingesta de polifenoles depende en gran medida de los hábitos

dietéticos. Este hecho afecta, no solo al consumo de polifenoles en su conjunto o a una determinada clase de ellos, sino también individualmente a cada compuesto fenólico (Santos-Buelga & Scalbert, 2000).

Sin embargo, todavía existe una falta de precisión a la hora de evaluar la ingesta diaria de polifenoles. La mayoría de los datos existentes sobre el contenido en polifenoles de los diferentes alimentos, provienen de fuentes muy dispersas. Sería necesario llevar a cabo un riguroso estudio sobre los tipos de polifenoles que están presentes en los alimentos utilizando métodos correctamente estandarizados. En este sentido, desde marzo de 2003 existe en la web (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/>) del Departamento de Agricultura de USA una base de datos donde se ha publicado el contenido en flavonoides de 225 alimentos; esta tabla de composición de los polifenoles permite el cálculo de la cantidad diaria ingerida. Existen algunos trabajos realizados sobre esto, en el caso de flavonoles, flavonas (Hertog, 1992 y 1993b) e isoflavonas (Reinli & Block, 1996), e incluso, se ha establecido la ingesta de flavonoles (mayoritariamente quercetina) y flavonas en 21 y 2 mg/día respectivamente para la población holandesa (Hertog, 1993b) y, en el caso de las isoflavonas, la población japonesa suele ingerir una cantidad diaria entorno a 30–40 mg/día (Kimira, 1998; Wakai, 1999). El consumo en los países occidentales es, significativamente inferior debido al menor consumo de productos de soja (Kirk, 1999).

#### **1.4.2 Absorción de los compuestos fenólicos**

No se conocen los mecanismos de la absorción gastrointestinal de los polifenoles. La mayoría de los polifenoles son demasiados hidrofílicos para penetrar la barrera intestinal mediante difusión pasiva. Tampoco se han identificado todavía los posibles transportadores de membrana que podrían estar involucrados en la absorción de los polifenoles. En la actualidad, el único transportador activo de membrana descrito es un mecanismo de transporte sodio-dependiente involucrado en la absorción de ácido ferúlico y cinámico en el yeyuno de rata (Ader, 1996).

Todos los flavonoides (excepto los flavanoles) se encuentran glicosilados o glucosilados en los alimentos, influenciando este hecho la absorción de estos compuestos. El destino de los glicósidos en el estómago no está claro. Algunos experimentos en los que se han utilizado ratas tratadas quirúrgicamente en las que la absorción se restringía al estómago muestran que es posible la absorción a nivel gástrico para algunos flavonoides como la quercetina y la daidzeina, pero no para sus glicósidos (Piskula, 1999; Crespy, 2002). Probablemente, la mayoría de los glicósidos resisten la hidrólisis ácida en el estómago, pudiendo llegar intactos al duodeno (Gee, 1998). En el intestino delgado solamente se absorben las agliconas y algunos glucósidos, mientras que los polifenoles que poseen unida una unidad ramnosa alcanzan el colon donde son hidrolizados por ramnosidasas de la microflora intestinal antes de ser absorbidos (Manach, 1995; Hollman, 1997). Se podría aplicar lo mismo a los polifenoles que están unidos a arabinosa o xilosa, aunque no se ha estudiado este aspecto específicamente. Como regla general, los glicósidos con ramnosa se absorben más lentamente y con menor eficiencia que sus respectivas agliconas, debido a que se absorben en el colon y aquí el proceso de absorción se lleva a cabo con mayor dificultad que en el intestino delgado, ya que el área de intercambio es más pequeña. Este hecho se ha estudiado con glicósidos de quercetina en humanos, donde la absorción máxima ocurre 0.5–0.7 horas después de producirse la ingestión de quercetina 4'-glucósido y 6–9 horas después de la ingestión de la misma cantidad de rutina (quercetina-3-β-rutinósido). La biodisponibilidad de rutina es solamente el 15–20% de la biodisponibilidad de la quercetina 4'-glucósido (Hollman, 1997 y 1999; Graefe, 2001). La absorción de quercetina es más rápida y eficiente tras la ingestión de cebolla (que es rica en glucósidos) que tras la ingestión de manzana que contienen tanto glucósidos como glicósidos (Hollman, 1997). La absorción de los glucósidos de quercetina ocurre en el intestino delgado, siendo la eficiencia de la absorción mayor que la eficiencia de la absorción de sus agliconas (Hollman, 1995; Morand, 2000). Se ha encontrado parcialmente el mecanismo subyacente mediante el cual la glicosilación facilita la absorción de la quercetina. Hollman *et al* (1995) sugieren que los glucósidos pueden ser transportados al interior de los enterocitos a través de un transportador de glucosa sodio-dependiente (SGLT1) como se aprecia en la figura 18. Una vez dentro de los enterocitos, los glucósidos pueden ser hidrolizados por una β-glucosidasa citosólica (Day, 1998). Otra vía diferente a ésta implica a la lactato florizina

hidrolasa, una glucosidasa situada en la membrana del “brush border” del intestino delgado que cataliza la hidrólisis extracelular de algunos glucósidos, seguida de la entrada de la aglicona a través del “brush border” mediante difusión (Day, 2000). Seguramente, las dos enzimas están involucradas, aunque la contribución relativa de ambas sobre los diferentes glucósidos no está aún clara. La quercetina 3'-glucósido, que no es un sustrato de las β-glucosidasas citosólicas, se absorbe, al menos en ratas, tras ser hidrolizada por la lactato florizina hidrolasa, mientras que la hidrólisis de la quercetina 4'-glucósido parece involucrar a ambas vías (Sensik, 2003; Day, 2003). Sin embargo, en humanos, sea cual sea el mecanismo de deglucosilación involucrado, las concentraciones plasmáticas son similares tras la ingestión de quercetina 3'-glucósido y quercetina 4'-glucósido (Olthof, 2000).

El efecto de la glucosilación y/o glicosilación sobre la absorción de las isoflavonas es menos claro que para la quercetina, comprobándose que la hidrólisis de los glicósidos en sus respectivas agliconas en las bebidas de soja no cambia la biodisponibilidad de las isoflavonas en humanos (Michelle, 2002). La glicosilación no influye en la naturaleza de los metabolitos que se encuentran en el torrente circulatorio. De hecho, no se han encontrado glicósidos de quercetina, daidzeina y genisteina en plasma u orina (tanto humana como de rata) tras la ingestión de los compuestos puros (Manach, 1998; Sesink, 2001; Wittig, 2001; Setchell, 2002). En el caso de las flavanonas, solo se han detectado niveles traza de glicósidos en orina humana, correspondiéndose con el 0.02% de la dosis de naringenina administrada (Ishii, 2000).

Las antocianinas constituyen una excepción, ya que los glicósidos intactos en plasma son las formas principales que se han encontrado. La explicación para este hecho puede encontrarse en la inestabilidad de estas moléculas cuando se encuentran como agliconas o en un mecanismo específico de absorción o metabolismo para las antocianinas. Passamonti *et al* (2002) proponen que los glicósidos de antocianinas son transportados mediante translocasas a nivel gástrico, debido a que parecen tener una elevada afinidad por este transportador. Además, podrían ser convertidos en glucurónidos mediante la acción de una UDP glucosa deshidrogenasa (Wu, 2002).

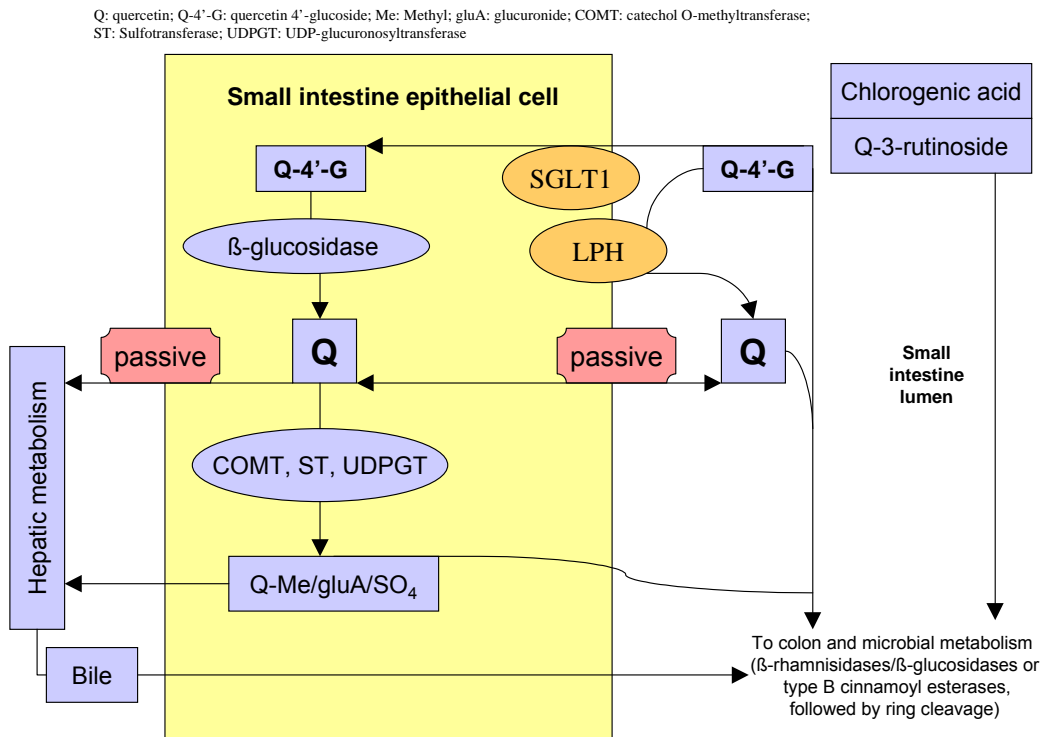


Figura 18: Posible ruta de absorción de un compuesto fenólico glucosilado en el intestino delgado. Adaptado de Burdell & Coughtrie (1997).

Las procianidinas difieren de la mayoría de los polifenoles de las plantas debido a su naturaleza polimérica y a sus elevados pesos moleculares. Esta particular característica debería limitar su absorción a través de la barrera intestinal. De hecho, los oligómeros que poseen un tamaño superior a trímeros poseen una probabilidad muy baja de que sean absorbidos en el intestino en sus formas nativas (Manach, 2004). Los experimentos realizados *in vitro* con capas de células Caco-2 como modelo de absorción muestran que solamente dímeros y trímeros de flavanoles son capaces de atravesar el epitelio intestinal (Deprez, 2001).

La procianidina B2 se absorbe pobremente en ratas mientras que la procianidina B3 no se absorbe (Hollman, 1995; Baba, 1997). Spencer *et al.* (2000) estudian la probabilidad de que las procianidinas oligoméricas sean hidrolizadas en condiciones ácidas para proporcionar dímeros y monómeros en experimentos *in vitro*. Sin embargo, se ha comprobado en ratas que la procianidina dimérica B3 purificada, así como procianidinas extraídas de la semilla de uva con un elevado grado de polimerización, no son degradadas en monómeros que sean absorbidos más fácilmente (Donovan, 2002). Del mismo modo, se ha investigado la estabilidad *in vivo* de las procianidinas en el estómago de voluntarios humanos que habían consumido una bebida de cacao rica en procianidinas, confirmándose que las procianidinas no son degradadas en las condiciones ácidas existentes en el estómago (Rios, 2002).

Las procianidinas diméricas son ligeramente absorbidas en humanos. Se ha detectado procianidina B2 en el plasma de voluntarios que consumieron una bebida de cacao; sin embargo, la máxima concentración plasmática de procianidina B2 se alcanza 2 horas después de la ingestión y es menor que la concentración plasmática de epicatequina obtenida en una ingestión equivalente de este compuesto (0.04  $\mu\text{mol/L}$  para la procianidina B2 y 6.0  $\mu\text{mol/L}$  para la epicatequina) (Holt, 2002).

Las procianidinas oligoméricas, que son uno de los polifenoles dietéticos más abundantes, son pobremente absorbidas, ejerciendo solamente una actividad local en el tracto gastrointestinal o una actividad mediada por los ácidos fenólicos producidos en la degradación microbiana de las mismas. No obstante, la acción local realizada es importante debido a que el intestino está expuesto particularmente a agentes oxidantes pudiendo ser afectado por una inflamación y numerosas enfermedades como el cáncer (Halliwell, 2000). La concentración de polifenoles en el colon puede alcanzar varios cientos de micromoles por litro (Scalbert, 2000) y junto con algunos carotenoides constituyen los únicos antioxidantes de la dieta presentes en el colon, ya que las vitaminas C y E se absorben en los segmentos superiores del intestino.

Scalbert *et al.* (2000) han realizado una hipótesis de trabajo que permitiría una predicción de la absorción de estos compuestos de la dieta. Esta hipótesis se muestra en la figura 19 y podría ser de utilidad en el diseño de futuros experimentos sobre el estudio del proceso de absorción de estos compuestos. El modelo se basa en datos de experimentos realizados con voluntarios humanos *in vivo* junto con el conocimiento desarrollado sobre estudios de especificidad enzimática y modelos animales (Scalbert, 2000).

Los efectos de la matriz de los alimentos sobre la biodisponibilidad de los polifenoles no se ha estudiado con detalle. Pueden darse interacciones directas entre los polifenoles y algunos componentes de los alimentos, como proteínas y polisacáridos, que podrían afectar al proceso de absorción de estos compuestos. Asimismo, factores como el pH gástrico e intestinal, fermentaciones intestinales, excreción biliar, tiempo de tránsito, entre otros, pueden afectar a la absorción de los polifenoles. Las enzimas y los transportadores involucrados en la absorción y en el metabolismo de los polifenoles pueden ser inducidos o inhibidos por la presencia en la dieta de algunos micronutrientes o agentes xenobióticos (Manach, 2004).

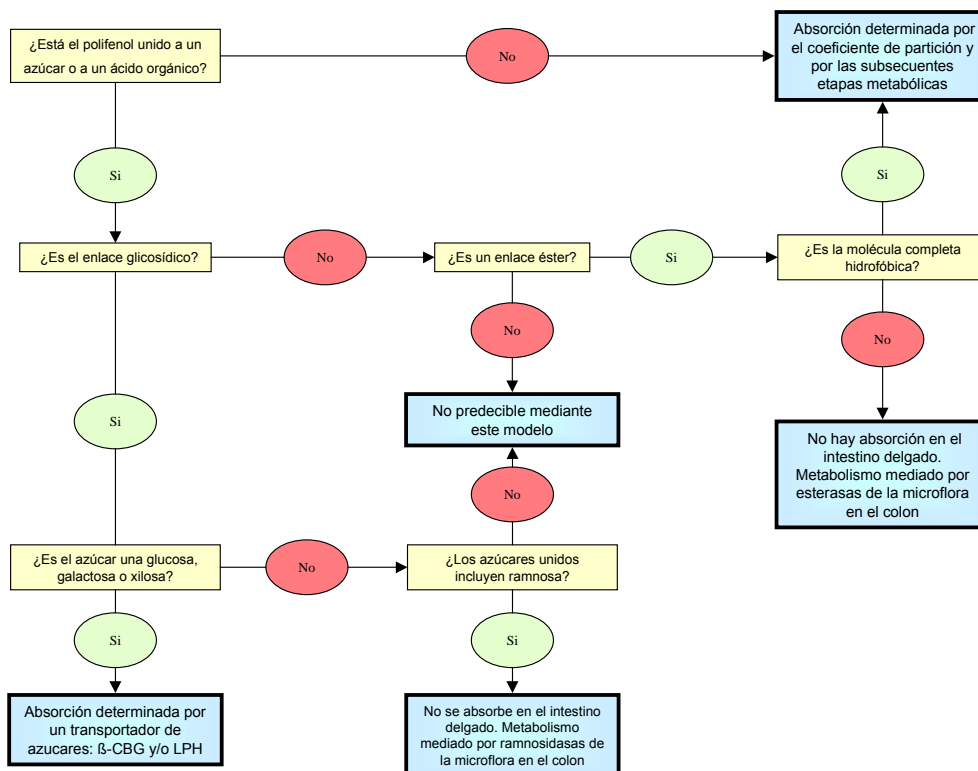


Figura 19: Esquema para la predicción de la absorción de los polifenoles en humanos. Adaptado de Scalbert (2000).

### 1.4.3 Metabolismo de la microflora intestinal

Aquellos compuestos fenólicos que no son absorbidos en el estómago o en el intestino delgado alcanzan el colon, donde la microflora hidroliza los glicósidos a sus respectivas agliconas, que son metabolizadas dando lugar a varios ácidos aromáticos (Kuhnau, 1976; Scheline, 1991). Además, los polifenoles absorbidos, metabolizados en el hígado y excretados a la bilis, también alcanzarán el colon, pero en una forma química diferente, como por ejemplo, en forma de glucurónido (Bokkenheuser, 1987). Las agliconas sufren una rotura, produciéndose la apertura del heterociclo en diferentes puntos dependiendo de la estructura química: los flavonoles producen principalmente ácido hidroxifenilacético, las flavonas y flavanonas producen ácido hidroxifenilpropiónico, mientras que los flavanoles dan lugar a fenilvalerolactonas y ácido hidroxifenilpropiónico (figura 20). Estos ácidos son aún más metabolizados hacia derivados de ácido benzoico.

El colon puede llegar a contener alrededor de  $10^{12}$  microorganismos por  $\text{cm}^3$  con un potencial hidrolítico y catalítico enorme. Las reacciones de deconjugación ocurren fácilmente. A modo de ejemplo, la quercetina-3-O-ramnoglucósido y la quercetina-3-O-ramnósido no son hidrolizadas por enzimas humanas, pero son, sin embargo, fácilmente hidrolizables a quercetina por la microflora intestinal por medio microorganismos como *Bacteroides distasonis* (que poseen actividad  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa), *Bacteroides uniformis* ( $\beta$ -glucosidasa) y *Bacteroides ovatus* ( $\beta$ -glucosidasa) (Bokkenheuser, 1987). *Enterococcus casseliflavus* utiliza parte de la azúcar de la quercetina-3-O-glucósido para dar como productos formato, acetato y lactato pero no metaboliza más la aglicona. La quercetina-3-O-glucósido es transformada en ácido 3, 4-dihidroxifenilacético, acetato y butirato en el colon debido a la acción de *Eubacterium ramulus*. Se estima que el número de bacterias capaces de utilizar quercetina-3-O-glucósido es de 107-109 por gramo de masa seca (Schneider, 1999).





7, o 4' protege al compuesto de las roturas que puede sufrir en el intestino (Griffiths, 1972). Sin embargo, los datos disponibles sobre este tipo de reacciones en humanos son limitados, siendo posible la identificación de nuevos metabolitos microbianos; debe también evaluarse la variabilidad interindividual existente, la composición de la microflora intestinal y el tipo de dieta ingerida para conocer mejor la producción de los metabolitos microbianos (Manach, 2004).

Das *et col.* (1971) hallaron en plasma glucurónidos de los principales metabolitos producidos en el colon de ratas. Este es el caso de tres valerolactonas diferentes, ácido 3-hidroxifenilpropiónico, además de sulfatos de  $\delta$ -(3-hidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona. La fisión del anillo heterocíclico de catequina está totalmente mediada por los microorganismos del colon; además las bacterias presentes en este órgano también son capaces de degradar los ácidos fenólicos (Das, 1968 y 1971; Griffiths, 1964).

Asimismo, la circulación biliar es importante para el metabolismo de la catequina en roedores. En ratas canuladas en el conducto biliar, cerca de un 40% de la catequina administrada oralmente, es absorbida y posteriormente secretada junto a la bilis en el intestino delgado (Hackett, 1986) en forma de conjugados glucurónicos o sulfatos de catequina, y del metabolito hepático más abundante 3'-metoxi-(+)-catequina (Shaw, 1980). Las catequinas secretadas junto a la bilis también son degradadas por las bacterias presentes en el colon. Tras la hidrólisis de los conjugados, la catequina, el ácido feólico y los metabolitos de lactona serían reabsorbidos nuevamente (Shaw, 1980; Das, 1971). Cerca de un 60% de los metabolitos de 3'-metoxi-(+)-catequina que son secretados junto a la bilis son reabsorbidos en una circulación enterohepática (Hackett, 1983).

Algo similar ocurre en el caso de los flavonoles. El primer paso en la degradación de estos compuestos en el colon es la fisión del anillo por parte de las bacterias. Los lugares específicos de la rotura del anillo C de los flavonoles se muestran con flechas rojas en la figura 21. Los últimos resultados aportados indican que los ácidos fenólicos formados solamente poseen intacto el anillo B (Kallianos, 1959; Masri, 1959; Petrakis, 1959; Shali, 1991; Martínez-Valverde, 2000; Walle, 2004). No obstante, tras la supresión de los microorganismos presentes en el colon con un antibiótico, no se encontraron los ácidos fenilacéticos (típicos en la fisión del anillo de la quercetina), rutina y miricetina en ratas (Nakagawa, 1965; Griffiths, 1972; Baba, 1981).

Los metabolitos encontrados en la orina tras una administración oral de flavonoles son similares a aquellos producidos por una incubación anaeróbica *in vitro* de miricetina, miricitrina (miricetina-3-O-ramnósido) y rutina con microorganismos del intestino ciego de rata (Griffiths, 1972; Baba, 1983). Los ácidos fenólicos formados tras la fisión del anillo C de los flavonoles están sujetos a posteriores biotransformaciones por parte de enzimas y bacterias. La biotransformación llevada a cabo por las enzimas, generalmente dan lugar a ácidos fenilpropiónicos y fenilacéticos (Masri, 1959; Das, 1971 y 1974; Honohan, 1976).

El ácido O-hidroximetoxifenólico excretado en la orina en cerdos, ratas y en el hombre, podría estar generado por la fisión del anillo O-metilado de los flavonoides secretados con la bilis. Los ácidos fenilpropiónicos suelen ser convertidos en ácidos benzóicos mediante la  $\beta$ -oxidación de la cadena propilo en todas las especies (DeEds, 1957; Booth, 1957 y 1958 y 1959; Das, 1968 y 1969; Hackett, 1983). Por ejemplo, se ha comprobado que cuando se incubaba quercetina-3-O-ramnósido con bacterias intestinales humanas en condiciones anaeróbicas, se obtienen como metabolitos quercetina, ácido 3, 4-dihidroxifenilacético y ácido 4-hidroxibenzoico (Das & Griffiths, 1969).

La figura 21 resume el metabolismo desarrollado por la microflora intestinal presente en el colon sobre una molécula de quercetina (flavonol). El resultado de este metabolismo es la formación de diferentes ácidos de menor tamaño molecular que la quercetina de la que provienen (Hollman, 1997).



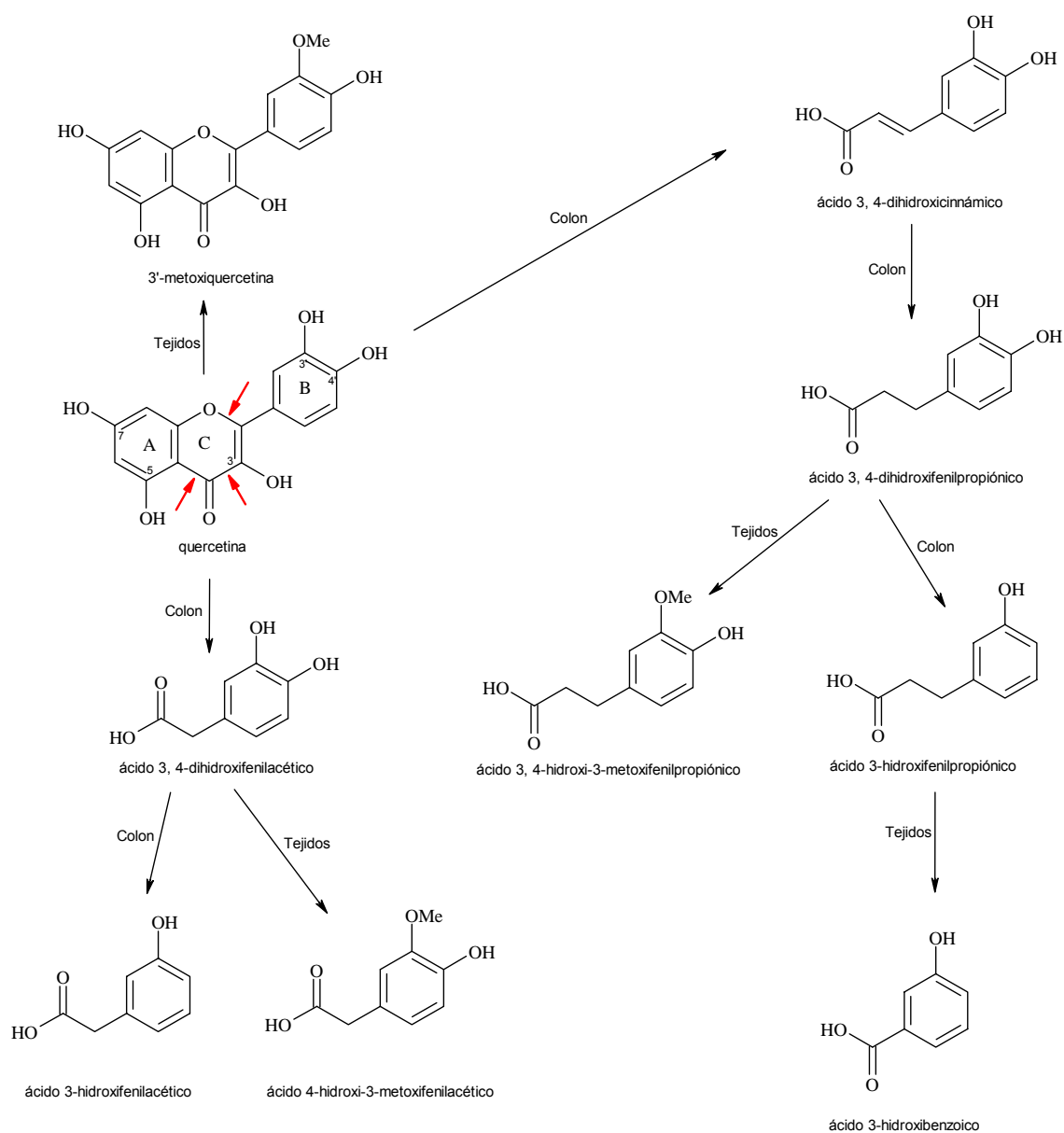


Figura 21: Reacciones metabólicas de los flavonoles en tejidos corporales y en el colon. Adaptado de Hollman (1997).

Estudios recientes demuestran que las concentraciones plasmáticas y la excreción urinaria de los metabolitos microbianos en humanos pueden ser mayores que la concentración de metabolitos titulares, en especial para los polifenoles presentes en el vino, los cuales no son fácilmente absorbidos (Rechner, 2002; Gonthier, 2003 a y b). Por otro lado, se ha comprobado que si se cultiva la microflora del colon humano *in vitro* y en condiciones anaeróbicas, ésta es capaz de romper polímeros y oligómeros de procianidinas en ácidos fenólicos de menor peso molecular que podrían ser mejor absorbidos *in vivo* a través del colon (Déprez, 2000). Además, la identificación y cuantificación de los metabolitos microbianos constituye un importante campo en la investigación. Algunos de estos metabolitos microbianos poseen efectos fisiológicos; este es el caso del ácido hidroxifenilacético que parece inhibir la agregación plaquetaria (Kim, 1998). Además, algunos ácidos aromáticos de bajo peso molecular, de entre la amplia variedad de éstos, pueden ser utilizados como biomarcadores de la ingesta de polifenoles. Se ha encontrado una asociación entre la ingesta de polifenoles y la cantidad de ácido hipúrico excretado en humanos que han consumido té negro o un extracto crudo de *Equisetum arvense* (Graefe, 1999; Clifford, 2000). Sin embargo, el ácido hipúrico no es un producto de degradación de la catequina, pudiendo derivar de fuentes diferentes a los polifenoles como ácido quínico y

aminoácidos aromáticos; además, algunos autores creen que el ácido hipúrico no es un biomarcador conveniente de la ingesta de polifenoles (Gonthier, 2003; Manach, 2004), ya que existen otros ácidos (como el ácido 3-hidroxihipúrico) que pueden ser biomarcadores más fiables de la ingesta de estos compuestos (Rechner, 2001).

Finalmente y a modo de corolario o resumen final, los polifenoles provenientes de la dieta alcanzan el intestino delgado donde pueden ser absorbidos. Aquellos compuestos fenólicos que sean absorbidos, llegan al hígado, donde son metabolizados (mediante reacciones de conjugación), pudiendo alcanzar, por un lado diferentes tejidos corporales, o bien, son transportados al riñón, para posteriormente ser expulsados a través de la orina. Del mismo modo, los polifenoles también pueden ser metabolizados en los tejidos, desde donde pueden ser transportados al riñón para su eliminación vía orina. Ésta es una forma de eliminación de estos compuestos del cuerpo. Sin embargo, existe otra forma de eliminar estos compuestos, como es a través de la bilis. Una parte de los compuestos fenólicos que llegan al hígado pueden ser eliminados vía bilis, pudiendo alcanzar otra vez el intestino delgado.

Por otra parte, los polifenoles provenientes de la dieta que han alcanzado el intestino y que no son absorbidos, son transportados (junto con aquellos polifenoles expulsados vía bilis) al intestino grueso, donde son metabolizados por las bacterias presentes en este órgano. Los compuestos resultantes de este proceso de metabolización son compuestos de un tamaño molecular inferior al de los compuestos de los que provienen. Este hecho hace que estos nuevos compuestos formados puedan ser absorbidos fácilmente en el colon o bien ser eliminados del cuerpo vía heces. La figura 22 resume el proceso de absorción, transporte y eliminación de los polifenoles a través de los diferentes órganos corporales implicados.

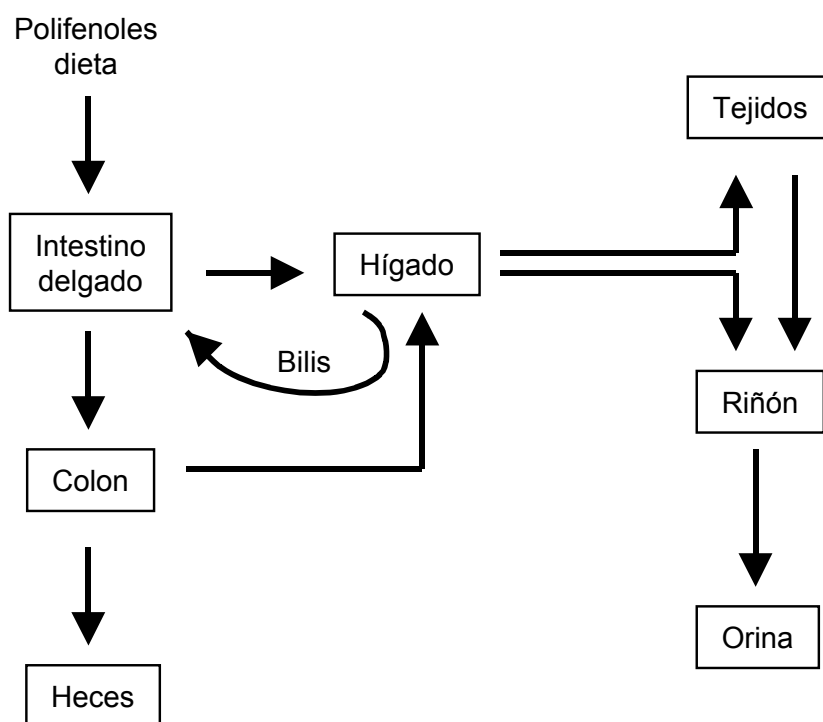


Figura 22: Proceso de absorción, transporte y eliminación de los polifenoles consumidos en la dieta a través de los diferentes órganos corporales humanos implicados. Adaptado de Bokkenheuser (1987).

#### **1.4.4 Metabolismo de los compuestos fenólicos**

Una vez absorbidos, los polifenoles están sujetos principalmente a tres tipos de conjugación: metilación, sulfatación y glucuronidación. La enzima catecol-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.3) cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina a los

polifenoles que poseen una subunidad catecol (*o*-difenólico). Este tipo de reacción está bastante descrita para la quercetina, catequina, ácido caféico y luteolina; además, Wu *et al* (2002) han mostrado recientemente por primera vez la metilación de cianidina en humanos. Generalmente, la metilación ocurre predominantemente en la posición 3' del polifenol, aunque también y de forma minoritaria pueden ser metilados en la posición 4' dando lugar a compuestos 4'-*O*-metilados. De hecho, se ha encontrado una gran cantidad de 4'-metilepigalocatequina en plasma de voluntarios humanos que ingirieron té (Meng, 2001; Lee, 2002). La enzima catecol-*O*-metiltransferasa está presente en un amplio rango de tejidos, siendo su actividad mayor en el hígado que en los riñones (Tilgmann, 1996; Piskula, 1998), aunque también se ha detectado la actividad de esta enzima para la catequina en el intestino delgado de ratas (Donovan, 2001).

Las sulfotransferasas (EC 2.8.2.1) catalizan la transferencia de un grupo sulfato desde 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato a un grupo hidroxilo presente en varios substratos (esteroides, ácidos biliares, polifenoles, etc.). No obstante, no se han identificado claramente ni las isoformas que están involucradas específicamente en la sulfatación de los polifenoles, ni las posiciones de sulfatación de éstos, aunque se conoce que este tipo de reacciones ocurre principalmente en el hígado (Falany, 1997; Piskula, 1998). El substrato endógeno de estas enzimas son las iodotironinas aunque también pueden incluirse como substratos el 4-nitrofenol, fenoles e hidroxiarilaminas (Coughtrie, 1998). Se ha descrito que en el hígado hay una elevada actividad de SULTA1, mientras que en el colon la actividad más elevada es la de SULTA13 con una gran actividad sobre los grupos catecol que forman parte de los compuestos fenólicos. Por regla general, las sulfotransferasas no son inducidas por la dieta, compuestos xenobióticos o por el ambiente (Burchel, 1995). Algunas sulfotransferasas son inhibidas por algunos polifenoles como es el caso de la quercetina que inhibe la sulfotransferasa humana SULT1A1 (Walle, 1995). SULTA1 también es inhibida por la ingesta de café fuerte o vino tinto dealcoholizado. No existe una enfermedad genética específica asociada con la deficiencia de sulfotransferasas, aunque existe una gran variación entre la población humana (Burchell & Coughtrie, 1997).

La UDP-gucuronosiltransferasa (EC 2.1.4.17) es una enzima de membrana que está localizada en el retículo endoplasmático de varios tejidos catalizando la transferencia de un ácido glucurónico desde el ácido UDP-glucurónico a esteroides, ácidos biliares, polifenoles, miles de componentes de la dieta y compuestos xenobióticos. La presencia en la sangre portal y mesentérica de metabolitos glucuronidados tras realizar una perfusión con polifenoles en el intestino delgado de ratas muestra que la glucuronidación de los polifenoles ocurre en primer lugar en los enterocitos antes de que estos compuestos sean más conjugados en el hígado (Sfakianos, 1997; Spencer, 1999; Crespy, 2001). Probablemente, este también sea el caso que ocurre en humanos, ya que se ha comprobado que la glucuronidación de quercetina y luteolina *in vitro* en microsomas del intestino humano es marcadamente más elevada que la glucuronidación existente en microsomas del hígado humano (Boersma, 2002). Se han identificado en humanos cerca de 15 isoformas de UDP-glucuronosil transferasas (que poseen una gran especificidad por substratos) con diferente distribución tisular (Fisher, 2001). La subfamilia de UDP-glucuronosil transferasas llamada UGT1A se localiza en el intestino donde desempeña un importante papel en el metabolismo de los polifenoles. La UGT1A también se encuentra en el hígado y los riñones. Las subfamilias de enzimas UGT1A3, -1A4, -1A6 y -1A9 se encuentran localizadas en el hígado humano mientras que las enzimas UGT1A1, -1A3, -1A4, -1A6, -1A8 -1A9 y -1A10 se expresan en el colon humano. En el riñón se expresa altamente la enzima UGT1A9. UGT1A7 y UGT1A10 se expresan en el epitelio gástrico humano (Mojarrabi & Mackenzie, 1998; Strassburg, 1998 y 1999). Estas isoenzimas poseen un amplio patrón de expresión polimórfico, resultando en una elevada variabilidad interindividual en la glucuronidación de los polifenoles. Las isoenzimas activas de la familia 1A difieren según el polifenol considerado (Doerge, 2000; Boersma, 2002). La glucuronidación *in vitro* de quercetina, luteolina o isoramnetina con microsomas de intestino e hígado humano y de rata muestran que incluso si la naturaleza de los glucurónidos formados es constante, la proporción de varios metabolitos formados varía ampliamente dependiendo de las especies y de los órganos implicados (Morand, 1998; Day, 2000; Boersma, 2002). El nivel más elevado de conjugación se observa en la posición 7 del polifenol, mientras que la posición 5 no parece ser un lugar donde se lleve a cabo este tipo de reacciones de glucuronidación. Para la mayoría de los flavonoides, una amplia proporción de los glucurónidos formados en la mucosa intestinal se secretan otra vez al lumen intestinal, hecho que reduce la absorción de estos compuestos (Crespy, 1999; Andlauer, 2000). En este proceso podría estar implicado el transportador multiresistente proteína

2 (MRP2) o la glicoproteína P (Walle, 1999; Ayrton, 2001). La proporción de glucurónidos secretados a través de la mucosa intestinal depende en gran medida de la estructura del polifenol (Crespy, 2003). Además, la excreción intestinal de glucurónidos no ocurre con la catequina y con el ácido ferúlico, hecho que indica que éste no es un mecanismo de eliminación para todos los polifenoles (Donovan, 2001; Adam, 2002; Crespy, 2003). La figura 23 muestra las etapas metabólicas existentes en el metabolismo de los polifenoles.

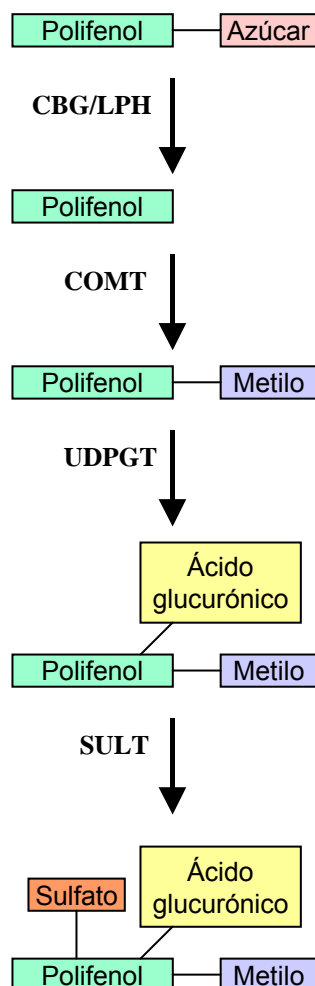


Figura 23: Esquema simplificado que muestra el metabolismo de los polifenoles. CBG:  $\beta$ -glucosidasa citosólica; LPH: lactato florizina hidrolasa; COMT: catecol-*O*-metil-transferasa; UDPGT: UDP glucuronosil transferasa; SULT: sulfotransferasa. Adaptado de Scalbert (2000).

Por otra parte, se ha comprobado que la sulfatación en ratas macho es el doble que en ratas hembra. Estos resultados se confirman mediante incubaciones *in vitro* con sulfotransferasas no fraccionadas del hígado de rata (Hollman, 1999). Sin embargo, se han encontrado conjugados de quercetina en orina y plasma, así como 3'-metoxiquercetina tras una administración oral diaria de quercetina en humanos (Hollman, 1996 y 1997). La figura 24 muestra el metabolismo descrito para la quercetina.

Heavy arrows indicate position of sulphate and/or glucuronide conjugation

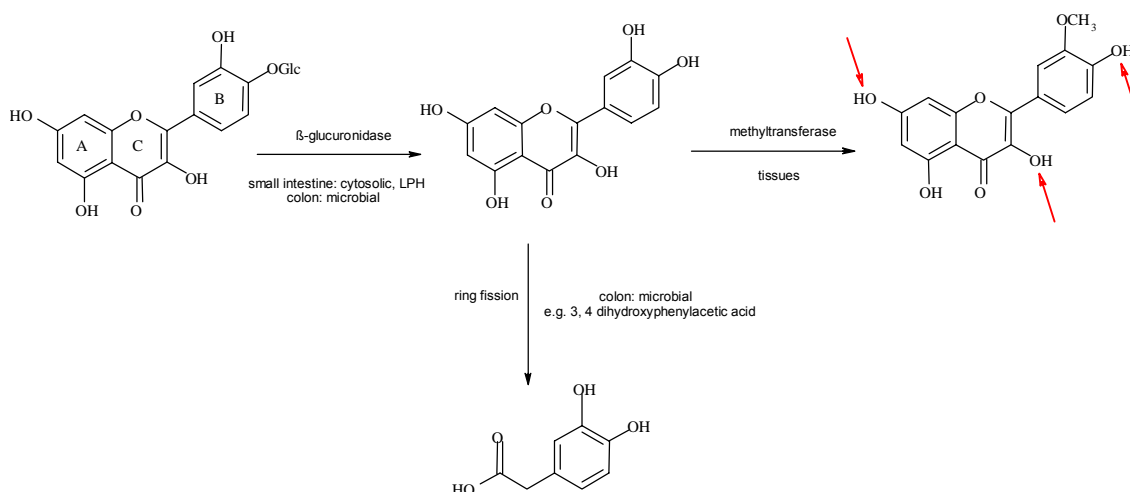


Figura 24: Reacciones metabólicas propuestas para la quercetina. Adaptado de Scalbert (2000).

El destino metabólico en el hígado de los conjugados producidos en el intestino no está demasiado claro. Se ha comprobado que tras la penetración de quercetina 7–glucurónido y quercetina 3–O–glucurónido en células HepG2, éstas experimentan dos tipos de metabolismo: metilación del grupo catecol y deglucuronidación seguida de sulfatación en la posición 3' (O'Leary, 2003). Sin embargo, la quercetina 4'–glucurónido no es metabolizada en las mismas condiciones. Esto se explica por un nivel muy bajo de penetración de la quercetina 4'–glucurónido dentro de las células o por una baja afinidad de las enzimas implicadas en este metabolismo por este sustrato. Parece probable la existencia de una compleja serie de enzimas conjugadoras y transportadores de los hepatocitos involucrados en la regulación de la absorción, producción y liberación de varios metabolitos de los polifenoles (Vore, 1994; Sallustio, 2000). La actividad de estas enzimas y de los sistemas de transportadores depende de la naturaleza del polifenol, pudiendo estar influenciados por polimorfismos genéticos que provocan importantes diferencias interindividuales en la capacidad de metabolizar los polifenoles (Manach, 2004).

La importancia relativa de estos tres tipos de conjugación (metilación, sulfatación y glucuronidación) varía acorde con la naturaleza del sustrato y con la dosis ingerida del mismo. Por término general, la sulfatación es una vía que posee una mayor afinidad pero una menor capacidad que la glucuronidación, ya que cuando las dosis ingeridas aumentan, se observa un cambio desde la sulfatación hacia la glucuronidación (Koster, 1981). El balance entre la sulfatación y la glucuronidación de los polifenoles también se ve afectado por las especies, el sexo y por la privación de alimentos (Piskula, 2000). Además, la inhibición de la metilación por un inhibidor específico cambia el metabolismo de los glucurónidos de quercetina hacia la sulfatación en las células HepG2 (O'Leary, 2003). En general, la capacidad para la conjugación es elevada sin reparar en las contribuciones respectivas de la metilación, sulfatación y glucuronidación. Generalmente, la concentración de la aglicona libre en el plasma tras la ingestión de una dosis nutricional es baja, excepto para las catequinas de té (77% para la epigallocatequina galato) (Lee, 2002). Igualmente se ha observado saturación en los procesos de conjugación en ratas a las que se les ha administrado una elevada dosis de polifenoles y en ratas a las que se les ha suministrado una dosis aguda de éstos (Sfakianos, 1997; Piskula, 1998). También podría darse una inhibición competitiva de la conjugación en presencia de varios polifenoles y compuestos xenobióticos en el intestino, aunque este hecho no se ha estudiado (Manach, 2004). En estas condiciones pueden circular por el torrente sanguíneo cantidades significantes de agliconas libres que, probablemente tendrán unos efectos biológicos diferentes a los que tendrían los metabolitos conjugados.

La identificación de los metabolitos que circulan en el torrente sanguíneo solamente se ha llevado a cabo para algunos polifenoles. Esta identificación no solamente debe incluir el número y la naturaleza de los grupos conjugados, sino de las posiciones de estos grupos en la estructura del polifenol, ya que estas posiciones pueden afectar a las propiedades biológicas de los conjugados (Day, 2000). Los compuestos más abundantes en el plasma humano después del consumo de cebollas, que contienen una elevada concentración de glucósidos de quercetina, son la quercetina 3-O-glucurónido, 3'-O-metilquercetina-3-O-glucurónido y quercetina 3'-O-sulfato (Day, 2001). Sin embargo, el análisis mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de muestras de plasma humano, obtenidas en condiciones muy similares, no confirma la presencia de quercetina sulfatada (Wittig, 2001). Para otros polifenoles solamente existen escasos datos sobre la proporción de varios tipos de conjugados y de los porcentajes de las formas libres en plasma (Baba, 2000; Doerge, 2000; Setchell, 2001; Shelnut, 2002; Manach, 2003; Zhang, 2003). Generalmente, los principales compuestos conjugados que circulan por el torrente sanguíneo son glucurónidos (Manach, 2004).

### 1.5 Análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos fenólicos

La identificación y la cuantificación de los compuestos fenólicos de la dieta ha despertado gran interés por su importancia nutricional, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de los alimentos. Del mismo modo, la necesidad de detectar y cuantificar estos compuestos en muestras animales con la finalidad de estudiar su proceso de absorción y metabolismo, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación. Las primeras técnicas desarrolladas fueron técnicas espectrofotométricas, que si bien tienen interés desde el punto de vista del control de calidad, no aportan la suficiente información desde el punto de vista nutricional, por lo que ha sido necesario recurrir a otras técnicas más precisas, como las cromatográficas, que permiten la identificación individualizada de cada uno de los polifenoles de interés nutricional (Martínez-Valverde, 2000). Debido a que la presente tesis se dedica por completo al estudio de las procianidinas, este apartado se centra en el análisis de estos compuestos desde un punto de vista tanto cualitativo como cuantitativo. Los métodos utilizados para el análisis de procianidinas se pueden dividir en tres categorías: métodos convencionales, métodos basados en efectos biológicos y métodos cromatográficos.

Los métodos convencionales (como por ejemplo los ensayos colorimétricos) son rápidos y baratos, ya que no son necesarios procedimientos de limpieza de la muestra, que por lo general suelen ser muy tediosos. Sin embargo, poseen ciertos inconvenientes, como poca especificidad para algunos grupos de compuestos, las reacciones raramente siguen un orden estequiométrico y muchas variables de los diseños experimentales hacen imposible una colección de datos proporcionados. Por otra parte, los métodos convencionales representan un compromiso entre viabilidad y precisión (Rohr, 1999).

Los métodos basados en efectos biológicos, enfocados con características físico-químicas específicas, son importantes para establecer una actividad biológica potencial. Se cree que las interacciones entre las procianidinas y las proteínas son responsables de la mayoría de los efectos biológicos, enológicos y tecnológicos. De ahí que muchos métodos estén basados en determinar las interacciones polifenol-proteína. Las interacciones entre los compuestos fenólicos y proteínas específicas es un tema bastante estudiado. Se ha caracterizado recientemente la inhibición de la elastasa por extractos de espino (Shahat, 1996; Chatterjee, 1997). Sin embargo, las procianidinas no solamente interaccionan con proteínas. Las reacciones con otros biopolímeros como los carbohidratos, también son viables. Es posible que las propiedades antioxidantes y la habilidad para unirse a iones metálicos sean las causantes de la forma de actuar de estos compuestos. Existen algunos trabajos en los que se ha estudiado la eliminación de los radicales libres y el poder antioxidante de estos compuestos, que podría ser utilizado como una alternativa a la química aplicada comúnmente o a los métodos de precipitación de proteínas en el análisis de procianidinas (Aviram, 2000; Loft, 2000; Young, 2001).



Debe hacerse hincapié en que los resultados obtenidos con métodos convencionales o con los métodos basados en efectos biológicos, son totalmente empíricos. Teniendo en cuenta los efectos heterogéneos de las matrices, la diversidad estructural de los compuestos fenólicos analizados y los numerosos ensayos diseñados, quizás sería más adecuado hablar de estimación de polifenoles en lugar de contenido. Estos dos tipos de métodos no son convenientes durante el almacenamiento y procesamiento de las bebidas o durante el desarrollo estacional de los tejidos de las plantas ya que esto produce cambios en los compuestos fenólicos presentes en las muestras, de manera que al estudiar un determinado compuesto fenólico, éste está sujeto a cambios en su estructura que afectarán a su determinación. Solo los procedimientos cromatográficos son lo suficientemente específicos como para permitir la determinación individual de procianidinas. Es necesario e indispensable que el trabajo con las muestras sea rápido y simple para mantener los compuestos fenólicos lo menos alterados posible.

### **1.5.1 Métodos convencionales**

Existen numerosos trabajos que hablan sobre este tipo de métodos (Scalbert, 1992; Waterman, 1994; Singleton, 1988; Delcour, 1988; Deshpande, 1986), pudiendo dividirse éstos en tres categorías: ensayos colorimétricos basados en reacciones redox o en reacciones de complejación, ensayo de grupos funcionales y otros métodos, como por ejemplo, métodos gravimétricos o volumétricos.

Para determinar el contenido en procianidinas de una muestra, suelen utilizarse los ensayos de grupos funcionales específicos. A la hora de analizar el contenido polifenólico de una muestra, primero habría que distinguir entre contenido en polifenoles y en "no" polifenoles de la misma. Esta distinción debería hacerse antes de utilizar un ensayo de determinación de compuestos fenólicos y después de realizar una precipitación con proteínas, con Nylon 66 o polivinilpirrolidona (PVPP). En términos generales, tanto lípidos como clorofilas deben eliminarse de las muestras vegetales mediante una extracción líquido-líquido antes de realizar un ensayo colorimétrico (Porter, 1989). Hoy en día el método más utilizado para estimar el contenido total de compuestos fenólicos en extracto de plantas, así como en alimentos y bebidas es el método de Folin-Ciocalteu. Sin embargo, algunos autores prefieren el método azul de prusia debido a que presenta menos interferencias con compuestos que no son de origen fenólico como las proteínas. Además, con este método, se puede calibrar con un estándar bien definido como el azul prusiano. Los métodos gravimétricos se utilizan raramente para estimar los compuestos fenólicos en la actualidad (Rohr, 1999).

#### **1.5.1.1 Ensayos colorimétricos basados en reacciones redox y reacciones de complejación.**

Este tipo de ensayos se basa en las propiedades óxido-reductoras de los compuestos fenólicos y en la capacidad de éstos para formar complejos con diferentes metales. El color obtenido en los ensayos basados en reacciones redox dependerá en gran medida del potencial redox de los grupos fenólicos. Por ejemplo, utilizando el método azul de prusia se encontró una diferencia de respuesta de aproximadamente 7 veces entre la quercetina y la hidroquinona. Además, las reacciones de los fenoles con los reactivos Folin-Denis y Folin-Ciocalteu son estequiométricamente predecibles. El floroglucinol (representado en la figura 25) reacciona como un monofenol, mientras que el catecol (ver también figura 25) reacciona como un difenol, proporcionando el doble de color que el floroglucinol. La absorbancia molar de los polifenoles oligoméricos es aproximadamente igual a la suma de los componentes monoméricos que lo constituyen. Como término general, los productos tipo pirogallol (ver figura 25) son fácilmente oxidados. Los compuestos orto-difenoles (tipo catecol) son oxidados, mientras que los mono- y meta-fenoles (tipo floroglucinol) y sus derivados metoxilados son menos susceptibles a la oxidación (Singleton, 1988).

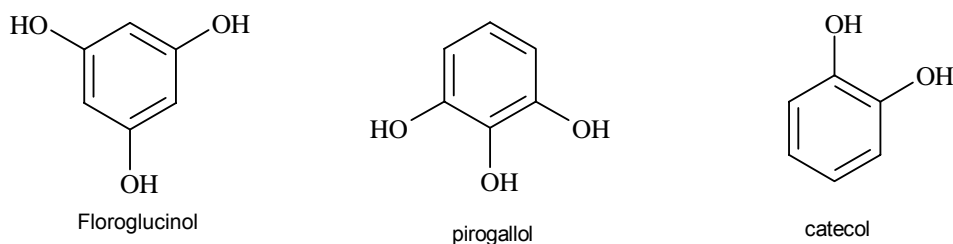


Figura 25. Estructura química del floroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno), pirogallol (ácido pirogálico) y del catecol (1, 2-di-hidroxibenceno).

El gran inconveniente de los ensayos basados en reacciones redox es que cualquier compuesto que haya en la muestra susceptible de ser oxidado, también reaccionará. Algunos de estos compuestos son el ácido ascórbico, dióxido de sulfuro (en vinos), aminas aromáticas y carbohidratos (Singleton, 1988; Scalbert, 1992). Los ensayos de formación de complejos metálicos son más específicos que los ensayos redox ya que el color que adquieren los complejos depende de un patrón específico de sustitución en el anillo fenólico. Las procianidinas, como se ha explicado anteriormente, forman quelatos con iones metálicos a través de sus grupos orto-difenólicos de su anillo B (Slabbert, 1992).

#### 1.5.1.2 Ensayos colorimétricos basados en los grupos funcionales.

Suelen utilizarse los siguientes ensayos: ensayo de la procianidina, ensayo de la vainillina y ensayo de dimetilaminocinamaldehído (DMACA).

##### Ensayo de la procianidina

La degradación ácida es ampliamente utilizada en la identificación de las procianidinas. Al poner éstas en solución ácida, se rompen para formar carbocationes a partir de sus unidades superiores, y flavan-3-oles de sus unidades inferiores. Inmediatamente, los carbocationes son convertidos en antocianidinas mediante autooxidación. La secuencia de reacciones que sufre la procianidina B1 (dímero) al realizar este tipo de ensayo, se detalla en la figura 26. En el caso de las procianidinas, se produce una coloración roja, mientras que ésta será naranja para las propelargonidinas y malva, púrpura y azul para las prodelfinidinas (Harborne, 1984).

Los flavan-3-oles monoméricos solo pueden detectarse al comienzo de la reacción o si se utilizan condiciones medianamente ácidas en el medio (Tits, 1992). Bajo las condiciones en las que se realiza el ensayo de procianidina, los monómeros forman productos de color amarillo-marronoso que puede influenciar en la medida de la absorbancia a la longitud de onda de detección.

El rendimiento teórico para un dímero es de un 50%, pero por ejemplo, para la procianidina B2 es solo del 30%, o si se compara con su cuantificación mediante HPLC, es de un 13%. Las procianidinas con un mayor grado de polimerización producen más antocianidina que las procianidinas diméricas, ya que hay más unidades susceptibles de ser convertidas en carbocationes. De este modo, para un polímero de procianidina con un grado de polimerización medio de 9.4, se obtiene un rendimiento de cianidina de un 58%. Los rendimientos tan bajos que se obtienen se deben a reacciones laterales que llevan a la formación de polímeros que no absorben a una longitud de onda de 450 nm. Estas reacciones laterales son fruto del efecto matriz. Algunos compuestos de extractos de madera contienen anillos aromáticos conjugados que absorben a 550 nm., si la mezcla de reacción es incubada durante más de 15 minutos. Se recomienda el uso de blancos en este tipo de ensayos (sustitución del componente ácido por agua) (Waterman, 1994; Deshpande, 1986). Los resultados analíticos dependen en gran medida del estándar utilizado en la preparación de los patrones. Si se utiliza cianidina como estándar (Waterman, 1994), los valores serán infraestimados ya que solo se produce un porcentaje de pigmento rojo que absorbe a 550 nm. Las procianidinas purificadas son los mejores patrones



para el ensayo de la procianidina (Deshpande, 1986). El problema estriba en que las procianidinas oligoméricas no están disponibles a nivel comercial. Por otra parte, la pureza de las procianidinas oligoméricas que pueden comprarse, como por ejemplo los polifenoles Quebracho, es desconocida y no se garantiza una calidad determinada. Además, algunas de estas procianidinas produce una curva de calibración bifásica y el color obtenido en la reacción por parte de estas procianidinas decrece durante su almacenamiento (Waterman, 1994).

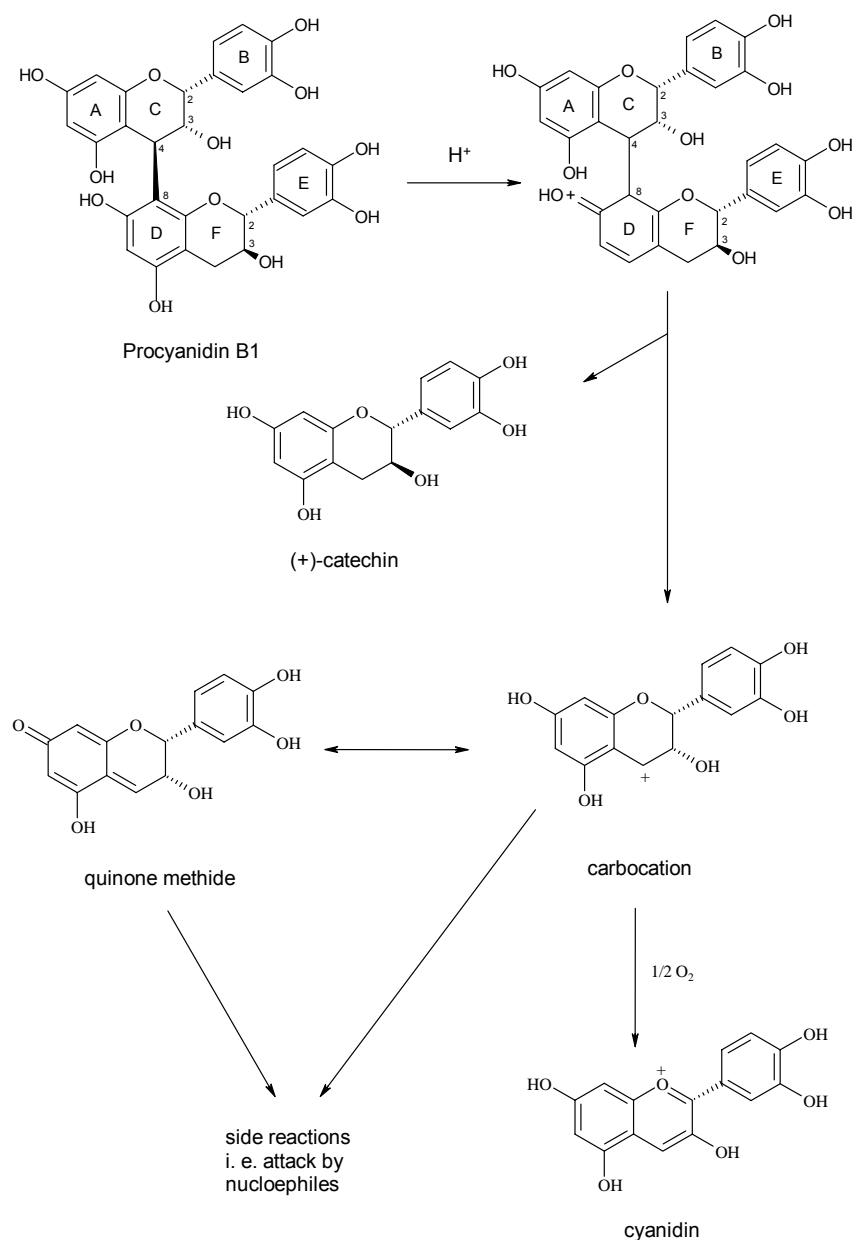


Figura 26. Secuencia de reacciones sufrida por la procianidina B1 en el ensayo de la procianidina (Rohr, 1999).

### Ensayo de la vainillina

Este ensayo se basa en la elevada reactividad de los compuestos fenólicos con los aldehídos en medio ácido. La reactividad de los núcleos floroglucinol con aldehídos se conoce desde hace tiempo, siendo populares los procedimientos colorimétricos que utilizan benzaldehídos sustituidos. El más utilizado es la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (Butler, 1982). Los aldehídos son protonados en su grupo carbonil-oxígeno en soluciones ácidas fuertes y forman carbocationes electrolíticos. La electrofilidad en benzaldehídos sustituidos se reduce por deslocalización de la carga positiva. Así, las reacciones solo ocurren con compuestos que poseen un patrón tipo floroglucinol o resorcinol (Goldstein, 1963; Geiger, 1985). Los sustituyentes pueden ser grupos hidróxidos o alcóxidos, mientras que los grupos que atraen electrones (como por ejemplo los carbonilos) reducen considerablemente su reactividad (Geiger, 1985). La secuencia de reacción de condensación de la vainillina con (-)-epicatequina se representa en la figura 27.

Sarkar y Howarth (1976) han estudiado detalladamente los requisitos estructurales para la reacción de la vainillina en ácido sulfúrico al 70%, encontrando que la reacción se limita a flavonoides que poseen grupos hidroxilo en el anillo A con orientación meta-, un simple enlace C2-C3, ninguna función carbonilo en C4 y un grupo hidroxilo libre en C7. De esta manera, la reacción es altamente específica para un estrecho rango de flavanoles. Los polifenoles Quebracho, que son utilizados frecuentemente como estándar en otros métodos convencionales, solo producen una pequeña coloración (Scalbert, 1992).

Por otra parte, los polifenoles hidrolizables no dan reacción. Sin embargo, algunos anillos heteroaromáticos ricos en electrones (como por ejemplo pirrol o indol), algunas dihidrocalconas (como floretina y florizina) y algunos floroglucinoles basados en flortaninos, reaccionan positivamente con la vainillina (Geiger, 1985; Sarkar, 1976). Las antocianidinas pueden interferir sustancialmente en el ensayo de la vainillina, hecho que debe ser corregido por sustracción con un blanco (Deshpande, 1986; Sarkar, 1976; Broadhurst, 1978). La reacción de condensación entre la vainillina y los compuestos fenólicos tiene lugar en las posiciones 6 u 8. La posición 6 del esqueleto flavano está favorecida porque está generalmente menos impedida estéricamente que la posición 8.

En contraste con el ensayo de procianidinas, la reacción de condensación se da sin producir depolimerización de las procianidinas (Sarkar, 1976). En consecuencia, los monómeros también reaccionan y pueden obtenerse una multitud de diferentes colores dependiendo de la complejidad de la muestra. Las absorbancias de las muestras están influenciadas por el patrón de sustitución de la reacción de condensación en el anillo. Los productos de condensación de los núcleos de floroglucinol muestran una absorbancia máxima en torno a 500 nm., mientras que los núcleos de resorcinol y de pirogallol proporcionan una absorbancia máxima en torno a 520 nm., (Goldstein, 1963). La cinética de la reacción del ensayo de vainillina depende de la estructura química de la muestra. Para la (+)-catequina, la reacción se termina tras 7 minutos, mientras que el extracto de la madera incrementa el tiempo de reacción hasta 100 minutos (Rohr, 1999). El ensayo de la vainillina es más sensible que el ensayo de la procianidina (Leukel-Lenz, 1988).

Da Silva *et al.* (1988), mencionan las siguientes condiciones para que el ensayo de vainillina produzca resultados óptimos, como es utilizar ácido sulfúrico con una normalidad comprendida entre 1.8-9N o bien, 20-25% v/v, un tiempo de reacción de 15 minutos para monómeros (como catequina y epicatequina) y de 10 para oligómeros y polímeros de procianidina y una temperatura comprendida entre 25-35°C para los primeros y temperatura ambiente para los segundos. Asimismo, el contenido en agua de la muestra debe ser bajo (ya que de lo contrario se produce una disminución de la absorbancia) y la concentración de vainillina óptima es en torno a 10-12 g/L. La absorbancia (que disminuye por efecto de la luz directa sobre la reacción) de los productos formados durante el ensayo se mide a 500 nm. La clorofila y el ácido ascórbico son compuestos que interfieren en esta reacción.

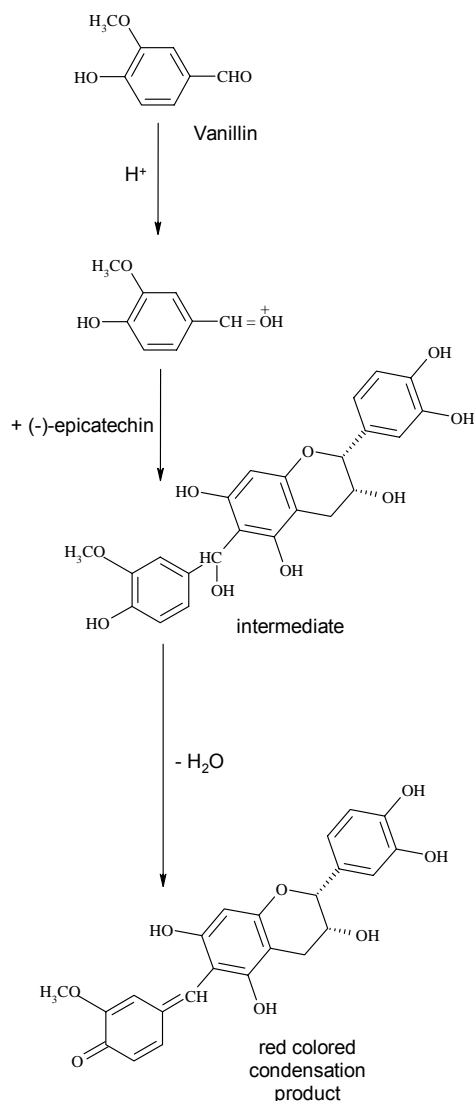


Figura 27. Condensación de la vainillina con (-)-epicatequina (Rohr, 1999).

### Ensayo del dimetilaminocinamaldehído (DMACA)

La utilización de este reactivo para una determinación colorimétrica de flavanoles y procianidinas fue realizado por primera vez por Thies y Fisher en 1971, aunque el primer protocolo lo realizó Mc Murrough y Mc Dowell para purificar extractos de cebada y lúpulo (*Humus lupulus*) (Mc Murrough & Mc Dowell, 1978). El esquema de esta reacción se representa en la figura 28.

De nuevo, la reactividad de las procianidinas reside en la hidroxilación en las posiciones 5 y 7 del anillo aromático A, un enlace simple C2–C3 y la falta de una función carbonilo en C4. El reactivo DMACA solo reacciona con unidades terminales aunque los valores de absorbancia molar para monómeros, dímeros y trímeros son de la misma magnitud (Mc Murrough, 1978). Algunos autores sugieren que las absorbancias dependen de la estereoquímica entre los carbonos C2–C3 (Vivas, 1994).

En contraposición con lo que ocurre en la reacción de la vainillina, los compuestos con una configuración 2–3–cis– muestran una reactividad mayor en ensayo con DMACA que los compuestos 2–3–trans–. De esta forma, la (-)-epicatequina da una respuesta de color más elevada que la (+)-catequina. Estos resultados también fueron confirmados para dímeros como

la procianidina B4 y la B2, mostrando unos valores de absorbancia mayores que todas las procianidinas de configuración trans- como la B3 (Treutter, 1994).

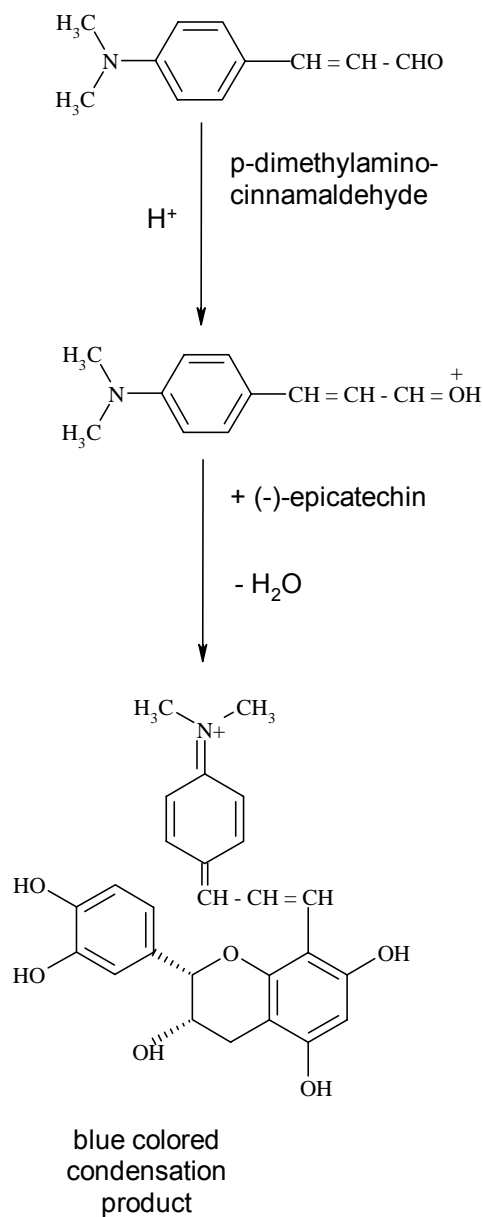


Figura 28. Condensación del DMACA con (-)-epicatequina (Rohr, 1999).

Igual que ocurre en el ensayo de la vainillina, las dihidrocalconas, el indol, el floriglucinol, el resorcinol, entre otros muchos compuestos, pueden formar productos de condensación con DMACA, absorbiendo éstos a 640 nm (Treutter, 1994). Los aminoácidos aromáticos y algunos flavonoides que poseen un grupo carbonilo en C4 (naringina y naringenina) muestran una débil reactividad. Todas estas evidencias, parece que llevan a la conclusión de que el ensayo con DMACA es más específico que el ensayo con vainillina. La mayor ventaja del ensayo DMACA con respecto al ensayo con vainillina es su mayor sensibilidad. Así, en el análisis de legumbres, el reactivo DMACA es 5 veces más sensible que el reactivo vainillina. Otra ventaja del ensayo DMACA es que es más fácil de realizar que el ensayo de vainillina, ya que los experimentos pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente sin la necesidad de un control riguroso de la temperatura. La presencia de interferencias en las muestras afecta menos al ensayo DMACA que al ensayo con vainillina. El patrón más utilizado en los ensayos que utilizan DMACA es la (+)-catequina (Treutter, 1994).

### **1.5.2 Métodos basados en efectos biológicos: precipitación con proteínas**

La reacción de precipitación de los polifenoles con proteínas depende de la concentración y de la estructura de los compuestos utilizados en este ensayo, del pH del medio de reacción, así como de la presencia de modificadores (Scalbert, 1992; Waterman, 1994). Diferentes estudios sobre la reacción de precipitación en solución muestran que la afinidad de las proteínas por los polifenoles varía en algunos órdenes de magnitud (Sun, 1990; Cheynier, 1992; Waterman, 1994). Las procianidinas poseen una elevada afinidad por proteínas ricas en prolina, siendo la seroalbúmina bovina (BSA) la proteína más utilizada en estos ensayos de precipitación.

El mecanismo de unión se basa en enlaces por puente de hidrógeno y en interacciones hidrofóbicas (Sun, 1990). La atracción electrostática es improbable en el caso de las procianidinas ya que los grupos hidroxilo del anillo fenólico solo se ionizan a un pH muy alcalino. La reacción de precipitación solamente es posible si existe un determinado número de grupos hidroxilo por molécula que permitan el número suficientes de "crosslinkings". La afinidad de las procianidinas para las proteínas resulta ser proporcional al número de grupos orto-difenoles y aumentan con el número de uniones 4 $\beta$ →6 y con el número de sustituyentes galoilados (Waterman, 1994; Cheynier, 1992). En esta reacción, los polímeros precipitan en primer lugar, mientras que las unidades de menor tamaño permanecen en solución (Prieur, 1994). Se pueden formar complejos solubles polifenol-proteína con polifenoles de alto peso molecular, lo cual se demuestra por el hecho de que se necesita una concentración umbral de polifenoles para efectuar la precipitación (Waterman, 1994). El mínimo grado de polimerización necesario para causar desnaturalización de proteínas es de 6. Por tanto, los monómeros y los oligómeros de bajo peso molecular no deberían precipitar, pero pueden ser coprecipitados con compuestos de peso molecular más elevado. Todos estos resultados evidencian que el ensayo basado en la precipitación por proteínas es poco idóneo si se quiere cuantificar las procianidinas oligoméricas.

### **1.5.3 Métodos cromatográficos.**

A continuación se describen los métodos cromatográficos más utilizados en el análisis de los compuestos fenólicos.

#### **1.5.3.1 Cromatografía de gases.**

La cromatografía de gases solamente ha sido utilizada con éxito en el análisis de dímeros en muestras de cerveza. Es inevitable la derivatización para mejorar la volatilidad de estos compuestos. Uno de los grandes inconvenientes de la aplicación de esta técnica al análisis de polifenoles es que los oligómeros de alto peso molecular son menos volátiles y su resolución en los cromatogramas no mejoran los obtenidos por HPLC utilizando detección a 280 nm. Además la derivatización en matrices complicadas puede no ser cuantitativa o reproducible (Rohr, 1999).

#### **1.5.3.2 Cromatografía en capa fina.**

Para el análisis cualitativo de las procianidinas se suele utilizar la cromatografía en capa fina sobre sílica utilizando un solvente compuesto por tolueno/acetona/ácido fórmico (solvente TAF). Mediante esta técnica se pueden separar monómeros y oligómeros en función de su peso molecular, hasta un máximo de hexámeros o heptámeros. Sin embargo, los estereoisómeros son apenas distinguibles (Lea, 1979; Baoshan, 1998). La tinción de la placa cromatográfica con vainillina permite obtener diferentes manchas rojas correspondientes a los diferentes compuestos fenólicos existentes en la muestra (Vanhaelen-Fastre, 1989)

### 1.5.3.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica más utilizada en el análisis de procianidinas. La utilización de esta técnica en fase normal permite la separación de las procianidinas según su grado de polimerización y solo suele utilizarse para análisis cualitativos. La fase estacionaria escogida suele ser la sílica (Rigaud, 1993; Santos–Buelga, 2000). En estas condiciones, las procianidinas son eluidas por orden creciente de pesos moleculares. Generalmente, suele ocurrir una deriva considerable de la línea base. Se han llegado a detectar pentámeros en cacao y heptámeros en zumo de manzana (en este caso utilizando una columna ciano). Utilizando las condiciones cromatográficas descritas por Rigaud *et al.* (1993), se pueden detectar monómeros flavan–3–oles y algunos oligómeros (Rigaud, 1993).

Sin embargo, el método más habitual de separar las procianidinas es mediante la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. No obstante, la resolución solamente es posible hasta un nivel de tetrámero. Las razones por las cuales las procianidinas de elevado peso molecular no son detectadas son múltiples: la capacidad de pico de la fase estacionaria está saturada en muestras complejas, las concentraciones de los compuestos individuales decrece ya que el número posible de isómeros aumenta cuando aumenta el grado de polimerización y la sensibilidad de la detección es insuficiente (Revilla, 1989). Generalmente, las muestras de procianidinas son cromatografiadas en sorbentes C18. Suelen utilizarse columnas C18 en el análisis de vinos y de tejidos de uva porque se obtienen menores tiempos de retención, aunque para el análisis de tejidos de manzana, zumos y sidras suelen utilizarse columnas C6. El eluyente debe contener un ácido para suprimir la ionización de los ácidos fenólicos. Los gradientes utilizados suelen comenzar con un gran porcentaje de la fase acuosa (generalmente 80–100%) y como componente orgánico de los eluyentes suele utilizarse metanol, acetonitrilo y ácido acético. En el caso del análisis de las procianidinas del espino se utiliza tetrahidrofurano (Treuter, 1994).

Una de las características típicas de los cromatogramas de las muestras de procianidinas es la presencia de hombros no resueltos y la aplicación de largos gradientes lineales, que como mínimo aumenta o causa deriva en la línea base (Rohr, 1999). Las procianidinas de bajo peso molecular que se obtienen como picos individuales en fase reversa, no eluyen según su grado de polimerización. Los factores que influyen en los tiempos de retención son: estereoquímica, sustitución en el anillo B, peso molecular y la polaridad total. Las procianidinas tipo pirogallol eluyen más rápidamente que las procianidinas de tipo catecol debido a su mayor polaridad. La (–)–epicatequina y sus oligómeros eluyen más tarde que los derivados de (+)–catequina (Rohr, 1999). Además, las procianidinas con enlaces 4→6, así como las procianidinas doblemente unidas, poseen tiempos de retención más altos que las procianidinas con enlaces 4→8. Los dímeros y trímeros con una unidad (+)–catequina terminal eluyen antes que sus procianidinas análogas que posean una (–)–epicatequina terminal (Dumon, 1990). Sin embargo, el orden de elución de las procianidinas diméricas y triméricas (C1 y C2) se mantiene sorprendentemente constante, independientemente del tipo de eluyente ácido y fase estacionaria utilizada. Por otra parte, los tiempos de retención de las procianidinas B1, B4 y C1 están más afectados por los cambios en el sistema cromatográfico que el resto de procianidinas (Rohr, 1999). Del mismo modo, el comportamiento cromatográfico de las procianidinas también se ve afectado por la concentración de la muestra inyectada. Cuando se añaden a una columna C18 cantidades elevadas de la fracción procianidina, los picos generados por éstas en el perfil de elución cambian hacia tiempo de retención menores. Este efecto provocado por la concentración es reversible, pudiendo deberse a la formación de complejos polares de oligómeros pequeños consigo mismos o con compuestos de elevado peso molecular (Rohr, 1999).

La utilización de un patrón interno es difícil, ya que los cromatogramas suelen salir muy poblados de picos. Por tanto, son pocos los métodos que incluyen la adición de un patrón interno, aunque, por ejemplo, el ácido procatecuico (5 mg/L) se utiliza como patrón en el análisis de cerveza, cebada y lúpulo utilizando detección electroquímica, el  $\alpha$ –naftol (3.2 mg/L) en el análisis de zumo de manzana utilizando detección ultravioleta a 220 nm y por último epigallocatequina–3–galato peracetilada en el análisis de procianidinas peracetiladas en muestras de manzana utilizando detección ultravioleta a 280 nm (Rohr, 1999).

Los principales métodos de detección utilizados para la identificación y la determinación cuantitativa de procianidinas son: detección UV/DAD, detección electroquímica y detección por espectrometría de masas (Rohr, 1999; Santos–Buelga, 2000). En el caso de la detección UV/DAD (detección ultravioleta y Diode Array), el espectro de absorbancia de los compuestos fenólicos consiste en dos bandas que muestran un máximo entre 230-240 nm y en 270 nm. Puede darse el caso de que aparezca una tercera banda entre estos dos máximos, siempre que los sustituyentes estén conjugados con el anillo aromático (como por ejemplo, ácido gálico). La máxima absorbancia a una determinada longitud de onda depende del número, posición y tipo de sustituyentes adicionales en el anillo. Por ejemplo, la sustitución orto– y meta– tiene por resultado un cambio batocrómico. Las procianidinas poseen un máximo a 280 nm. La galoilación lleva también a un cambio hipsocrómico, además de a un ensanchamiento de las bandas que puede ser utilizado para distinguir formas acetiladas de no acetiladas (Rohr, 1999).

Habitualmente, las procianidinas se identifican fácilmente en los cromatogramas con la ayuda de un detector UV/DAD, aunque, otros compuestos presentes en la muestra podrían apreciarse mejor que éstas, debido a que los coeficientes de absorción de las procianidinas a 280 nm son relativamente bajos si se comparan con los coeficientes de absorción molar de ácidos fenólicos u otros flavonoides, tal y como se detalla en la figura 29. Una posible solución a esta baja sensibilidad a 280 nm es la cuantificación de las procianidinas a 220 nm hecho que ya ha sido utilizado en el análisis de zumos de manzana (Rohr, 1999). En la serie (+)–catequina, procianidina B2 (dímero), procianidina C1 (trímero) y un tetrámero, las absorbancias molares decrecen, siendo un inconveniente para la detección UV/DAD en el análisis de procianidinas (Rohr, 1999; Martínez–Valverde, 2000).

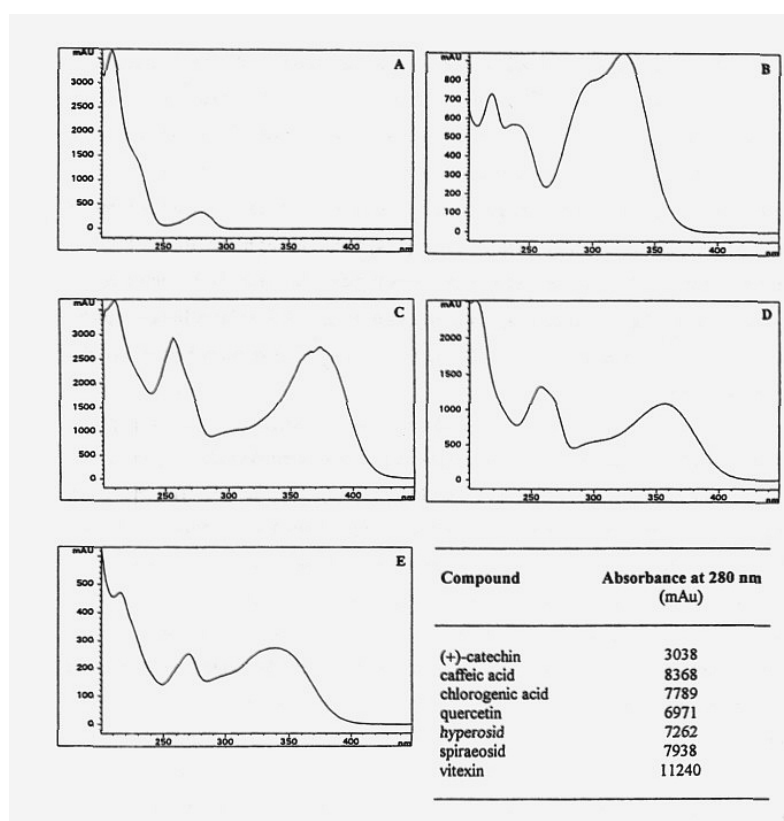


Figura 29. Espectro de absorbancia UV de un monómero flavan–3–ol, ácidos fenólicos y flavonoides. Espectros: A = catequina; B = ácido caféico; C = quercetina; D = hyperoside; E = vitexina. Tabla: Absorbancia para soluciones de compuestos referencia 1mM a 280 nm, calculados a partir de datos de HPLC. (Adaptado de Rohr, 1999.)



El hecho de que las absorbancias molares de las procianidinas oligoméricas son raramente la suma de las absorbancias molares de los monómeros que las forman, ha llevado a la utilización de monómeros de referencia como patrones para realizar ensayos cuantitativos, como la (–)-epicatequina. La cuantificación en términos de equivalentes de monómero es una práctica extendida, como por ejemplo en el análisis de manzana, zumo de manzana, vino blanco, vino tinto, mostos, tejidos de uva, cerveza, etc.

La utilización de factores de calibración es un intento de corregir las diferencias existentes en las absorbancias molares. Esta aproximación se ha escogido para la determinación cuantitativa de procianidinas en tejidos de uva utilizando (+)-catequina y en vinos tintos utilizando procianidina B2 (y C2-2'-O-galato) (Santos-Buelga, 2000). El gran inconveniente de este procedimiento de cuantificación es que las condiciones experimentales (como por ejemplo, las cromatográficas) deben permanecer inalteradas, lo cual es, en ocasiones, difícil de conseguir (Rohr, 1999).

Otro método utilizado para la identificación y determinación cuantitativa de las procianidinas es la detección electroquímica, donde las moléculas son oxidadas o reducidas por un potencial eléctrico generado entre dos electrodos. Los electrones, que son intercambiados sobre la superficie del electrodo de trabajo, producen una corriente que se puede medir y que es proporcional al número de moléculas reactivas (Roston, 1981). El comportamiento electroquímico de los compuestos puede estudiarse con la ayuda de voltamogramas que proporcionan información sobre la respuesta de corriente que se genera al aplicar un determinado potencial. Dependiendo de la organización experimental, se puede distinguir entre voltamogramas hidrodinámicos o cíclicos (Rohr, 1999).

En el caso de los voltamogramas hidrodinámicos, se selecciona un potencial para cada compuesto. Este tipo de voltamogramas es especialmente indicado para compuestos impuros o para compuestos que solamente están disponibles en pequeñas cantidades. La utilización de un gradiente de elución en la fase móvil puede modificar la línea base obtenida en los cromatogramas (Madigan, 1994; Lunte, 1988). La figura 30 muestra ejemplos de voltamogramas hidrodinámicos de procianidinas y ácidos fenólicos.

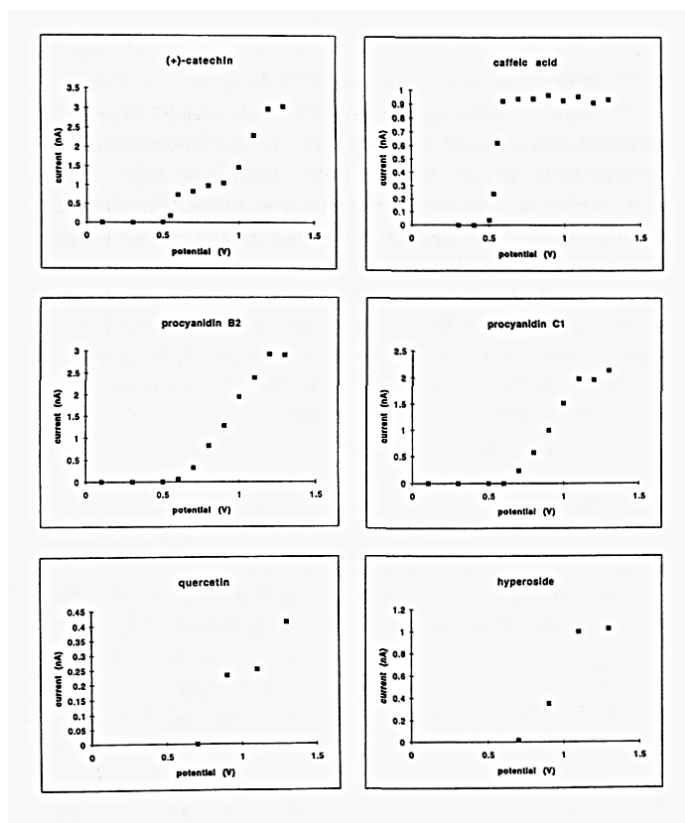


Figura 30. Cromatogramas hidrodinámicos de procianidinas y ácidos fenólicos.



Por otra parte, en los voltamogramas cíclicos, la fase móvil riega continuamente la celda junto con una solución de analito, mientras el potencial varía gradualmente. En este caso, el uso de una detección electroquímica en modo dual da la oportunidad de acceder reversiblemente a reacciones redox. La forma de las curvas resultantes depende de las propiedades electroquímicas del analito y también de la geometría de la celda, la condición de los electrodos, el flujo utilizado, etc (Lunte, 1988; Roston, 1981; Hayes, 1987).

En la detección electroquímica, los orto-difenoles son oxidados más fácilmente a sus respectivas quinonas que los meta-difenoles, hecho que ha sido confirmado registrando voltamogramas de (-)-epicatequina. En este caso, tienen lugar dos reacciones diferentes: la primera es la responsable de la oxidación del anillo B de los orto-difenoles y la segunda, a un potencial más elevado, representa la oxidación del anillo A de los meta-difenoles. Asimismo, la oxidación del anillo B resulta ser reversible, mientras que la del anillo A es irreversible. La oxidación del anillo B tiene lugar a potenciales comprendidos entre +0.49V y +0.6V, mientras que la oxidación del anillo A ocurre a entre los potenciales +0.8V y +0.85V. Además, la reducción del anillo B de la quinona tiene lugar cuando el potencial utilizado se encuentra entre +0.3V y +0.46V (Lunte, 1988; Hayes, 1987). Por regla general, La respuesta generada por los monómeros (fácilmente oxidables) en la detección electroquímica es siempre mayor que la respuesta generada por las procianidinas oligoméricas (Chiavari, 1987).

La selectividad de la detección electroquímica puede mejorarse utilizando dos electrodos (dual-mode detection). Básicamente se utilizan dos combinaciones diferentes: dos celdas amperométricas y la combinación de una celda coulombimétrica con una celda amperométrica. La diferencia entre estos dos tipos de celda es que en la celda amperométrica solamente reacciona con una fracción de los analitos eluidos, mientras que en la celda coulombimétrica los analitos (y todos los demás compuestos eluidos) son cuantitativamente convertidos en función del potencial de trabajo (Madigan, 1994; Roston, 1981).

La sensibilidad en la detección electroquímica es superior a la detección UV (Roston, 1981) aunque algunos autores colocan a ambas en el mismo orden (Lunte, 1988). Este hecho puede reflejar otra vez la dependencia de la respuesta del detector con la condición y el tipo de electrodos por una parte, y el tipo de celda que posee el detector por otra. En el caso de la (-)-epicatequina, se obtiene un límite de detección del rango de picomolar en detectores dual-mode (Lunte, 1988), mientras que sin utilizar este tipo de detectores, los límites de detección obtenidos para la (+)-catequina, (-)-epicatequina y procianidina B2 es de 0.1 mg/L (Madigan, 1994). Por el contrario, el mayor inconveniente de la detección electroquímica es que posee menor selectividad que la detección UV/DAD. Los flavonoides y los ácidos fenólicos son fácilmente oxidables a potenciales de trabajo elevados (sobre 1.0 V) que suelen utilizarse en el análisis de procianidinas. La diferenciación entre procianidina y no procianidina en una detección electroquímica en single-mode se basa simplemente en los diferentes tiempos de retención. Si se aplica un modelo de detección dual, se aumenta la selectividad, pero las agliconas de los flavonoides, con una mitad orto-difenol, muestran un comportamiento electroquímico similar a las procianidinas. Aunque los voltamogramas son específicos para las procianidinas, la recogida de solo dos respuestas a dos potenciales diferentes en modo dual no da la suficiente información para que sea aplicada con éxito en el análisis de matrices complejas (Chiavari, 1987).

Por otro lado, un método de identificación de procianidinas que se está utilizando ampliamente en los últimos años es la detección mediante espectrometría de masas. En este tipo de detección, los compuestos separados mediante cromatografía líquida de alta resolución son introducidos en un espectrómetro de masas donde estos compuestos son detectados en función de su relación carga-masa ( $m/z$ ). Existen diferentes interfases en el mercado para conectar un aparato de HPLC con el espectrómetro de masas y producir las especies iónicas correspondientes. Comúnmente, suelen utilizarse atomizadores calientes APCI (atmospheric pressure chemical ionization) y electrospray o ionspray (ESP, ISP) como interfases más utilizadas. Además de diferentes variables experimentales (como por ejemplo la composición del eluyente, el modo de ionización positiva o negativa), el tipo de interfase posee una enorme influencia en la ionización de los compuestos eluidos. La detección de masas se lleva a cabo principalmente utilizando un espectrómetro de masas cuadrupolo. Si se conectan tres cuadrupolos en serie, pueden producirse fragmentos de iones adicionales de una determinada

especie iónica (técnica LC-MS-MS) (Niessen, 1992). La mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo con interfase de termospray en el modo de ionización positiva. La ionización por termospray no es muy sensible (Kiehne, 1996). En el caso de las procianidinas, se ha obtenido un límite de detección de 1  $\mu\text{g}$  (Roeder, 1995), aunque no existen datos disponibles sobre los límites de detección de las procianidinas con otras interfases. Actualmente, la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución con detección de fotodiodeo array y acoplado a un despectrómetro de masas se ha utilizado para la cuantificación de flavonoles, flavonas y flavononas en alimentos. En esta técnica, las áreas de pico de cada uno de los compuestos a investigar se emplean para la cuantificación, mientras que el detector de masas se utiliza para aumentar la especificidad del método (Justesen, 1998).

Si se utiliza una interfase de termospray en un modo de ionización positivo, se generan pequeñas cantidades de iones moleculares protonados a partir de procianidinas. Esto se cumple hasta un grado de polimerización de tres. La fragmentación suele ocurrir por la rotura de los enlaces interflavánicos. Además, se genera una secuencia de iones de los cuales el monómero protonado ( $m/z = 291$ ) generalmente constituye el pico base. Una manera fácil de obtener información sobre el peso molecular de una muestra es utilizar el modo de ionización negativo. Es entonces, cuando se obtienen fragmentos monoméricos y oligoméricos en pequeñas cantidades, indicando que el enlace interflavánico es lábil en este modo de ionización. Pueden llegar a obtenerse iones moleculares de un nivel de polimerización de 7 con un modo de ionización negativo con off-line FAB-MS (fast atom bombardment). También es posible la caracterización de series completas de procianidinas con un grado de polimerización comprendido entre 4 y 17, si se utiliza una técnica de ionización electrospray (ES) en modo negativo. En este último caso, algunas especies iónicas pueden estar doblemente cargadas (Rohr, 1999).

Lin *et al.* (1993), estudiaron la rotura del anillo heterocíclico de las procianidinas y flavanoides en experimentos de disociación inducida por colisión con una interfase de termospray. La pérdida de un fragmento de masa 138 u (unidades de masa) se utiliza para identificar procianidinas en matrices complejas. También tiene lugar la pérdida de un fragmento de 152 u tanto en procianidinas como en el resto de flavonoides. La pérdida de este fragmento es consecuencia de una fisión retro-Diels-Alder del anillo heterocíclico, hecho que es conocido como una típica reacción de las procianidinas en ambos modos de ionización de experimentos FAB-MS, tal y como indica la figura 31.

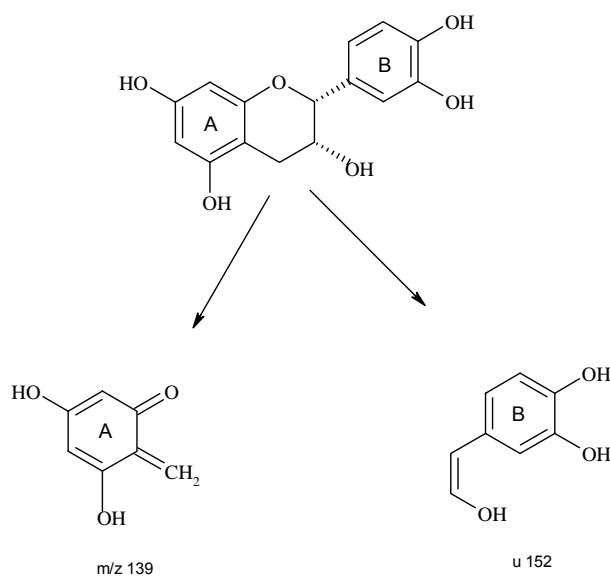


Figura 31. Fisión retro-Diels-Alder del anillo pirano de (-)-epicatequina. Ejemplo: interfase APCI, modo de ionización positivo. Adaptado de Rohr, 1999.

Las procianidinas monómeros y flavonoles que poseen un grupo funcional oxigenado en posición C3 pierden un fragmento de 123 u (representado en la figura 32), mientras que la pérdida de un fragmento de 165 u se corresponde con flavan-3-oles y flavanonas. No se observa estas pérdidas de fragmentos en flavonas y flavonoles (Lin, 1993).

La ventaja de utilizar la detección LC-MS sobre la detección UV o la electroquímica es la tremenda selectividad de esta técnica. El análisis por LC-MS proporciona una información inequívoca sobre el grado de polimerización de las procianidinas eluidas. Además, los espectros de masas son mucho más característicos que los espectros UV. Las procianidinas galoiladas, por ejemplo, son detectadas fácilmente por la existencia de un fragmento de masa correspondiente al ácido gálico (170 u). Incluso es posible distinguir entre procianidinas del tipo A y B, las cuales poseen una diferencia de masa de 2 unidades. Sin embargo, esta diferenciación no es fácil de conseguir en matrices complejas con un espectro de masas de primer orden. La detección debería realizarse en modo de ionización negativo porque los iones pseudo-moleculares suelen ser, generalmente, más estables en este modo que en el modo de ionización positivo (Rohr, 1999).

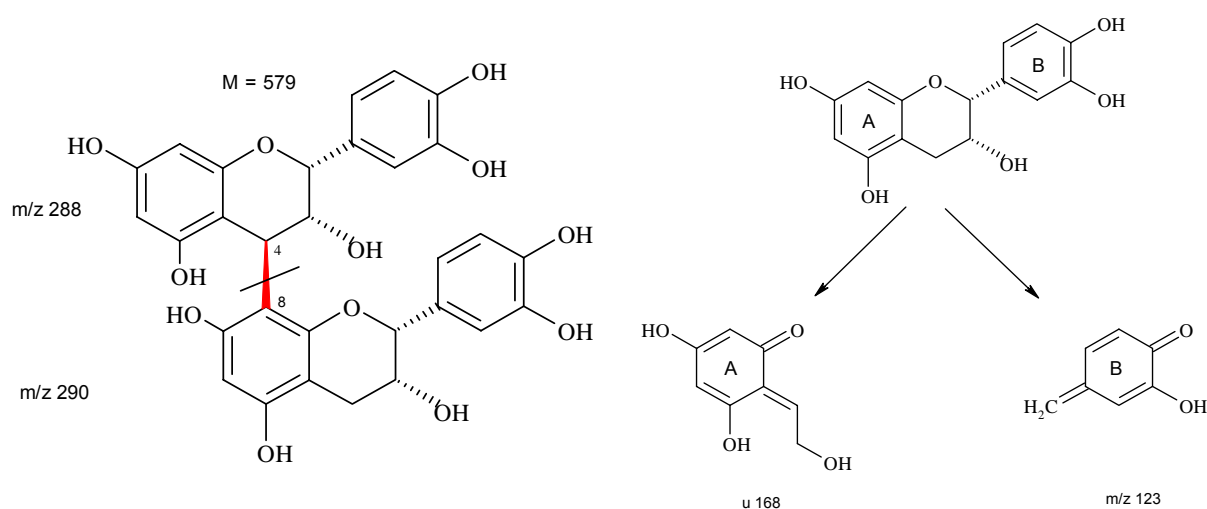


Figura 32. Rotura del enlace interflavánico de la procianidina B2 y del anillo heterocíclico de la (-)-epicatequina. Ejemplo: interfase APCI, modo de ionización positivo.

Por el contrario, existen algunas limitaciones a la detección con MS. Por una parte, es imposible diferenciar entre diastereoisómeros como la (+)-catequina y la (-)-epicatequina y, por otra parte, no se puede determinar la configuración del enlace interflavánico.

Finalmente, debe destacarse que aunque existen multitud de métodos para la cuantificación de procianidinas, no existe un único procedimiento que pudiésemos denominar "procedimiento estándar". Las razones son numerosas debidas a la complejidad y a las características físico-químicas de esta clase de productos naturales.

## 1.6 Bibliografía

Abu-amsha R, Croft KD, Puddey IB, et al. Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of serum and low-density lipoprotein oxidation *in vitro*: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clinical Science* 1996;91:449-458.

Adam A; Crespy V; Levrat-Verny MA; Leenhardt F; Leuillet M; Demigné C; Rémésy C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr*, 2002; 132 (7), pp. 1962-8.

Adamson, G. E.; Lazarus, S. A.; Mitchel, A. E.; Prior, R. L.; Cao, G.; Jacobs, P. H.; Kremers, B. G.; Hammerstone, J. F.; Rucker, R. B.; Ritter, K. A.; Schmitz, H. H. HPLC method for the quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Foo Chem.* (1999), 47: 4184-4188.

Ader P; Grenacher B; Langguth P; Scharrer E; Wolfram S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol*, 1996; 81 (6), pp. 943-55.

Agullo G; Gamet-Payrastre L; Fernandez Y; Anciaux N; Demigné C; Rémésy C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett* 1996 Jul 19; 105 , pp. 61-70.

Ahmad N; Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev*, 1999; 57, pp. 78-83.

Amiot, M. J.; Tacchini, M.; Aubert, S.; Nicolas, J. Phenolic composition and Browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.* (1992), 57: 958-962.

Andary, C; Mondolot-Cosson, L. Hitolocalization of plant polyphenols in tissues and cell walls. Some applications. En *Polyphenols in foods*, 1997 Aberdeen Escocia.

Andlauer W; Kolb J; Fürst P. Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine. *FEBS Lett*, 2000; 475 (2), pp. 127-30.

Andriambelason E; Magnier C; Haan-Archipoff G; Lobstein A; Anton R; Beretz A; Stoclet JC; Andriantsitohaina R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr*, 1998; 128 (12), pp. 2324-33.

Andriambelason E; Stoclet JC; Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999; 33 (2), pp. 248-54.

Andriambelason, E.; Kleshyov, A.L.; Muller, B.; Beretz, A.; Stoclet, JC.; Andriantsitohaina, R. Nitric oxide production and endothelium dependent vasorelaxation induce by wine polyphenols in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*, 1997, 120, 1053–1058.

Ares, JJ.; Outt, PE.; Randall, JL.; Johnston, JN.; Murray, PD.; O'Brien, LM.; Weisshaar, PS.; Ems, BL. Synthesis and biological evaluation of flavonoids and related compounds as gastroprotective agents. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1996, 6 (8), 995–998.

Ares, JJ.; Outt, PE.; Randall, JL.; Murray, PD.; Weisshaar, PS.; O'Brien, LM.; Ems, BL.; Kakotdkar, SV.; Kelm, GR.; Kershaw, WC.; Werchowski, KM.; Parkinson, A. Synthesis and biological evaluation of substituted flavones as gastroprotective agents. *J. Med. Chem.*; 1995, 38, 4937–4943.

Arola L; Roig R; Cascón E; Brunet MJ; Fornós N; Sabaté M; Raga X; Batista J; Salvadó MJ; Bladé C. Model for voluntary wine and alcohol consumption in rats. *Physiol Behav* 1997; Vol. 62 (2), 353-7.

Arts, I. C.; Hollman, P. C.; Kromhout, D. Chocolate as source of tea Flavonoids. *Lancet*. (1999), 354: 488.

August DA; Landau J; Caputo D; Hong J; Lee MJ; Yang CS. Ingestion of green tea rapidly decreases prostaglandin E2 levels in rectal mucosa in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999; 8, pp. 709-13.

Aviram, M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular disease. *Free Rad. Res.* (2000), 33, pp 85-97

Ayrton A; Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica*, 2001; 31 (8-9), pp. 469-97.

Aziz, A. A.; Edwards, C. A.; Lean, M. E. J.; Crozier, A. Absorption and excretion of conjugated Flavonols, including Quercetin-4'-O- $\beta$ -glucoside and Isorhamnetin-4'-O- $\beta$ -glucoside by Human Volunteers after the consumption of onions. *Free Rad. Res.* (1998), 29: 257-269.

Baba S; Osakabe N; Natsume M; Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33 (1), pp. 142-8.

Baba S; Osakabe N; Yasuda A; Natsume M; Takizawa T; Nakamura T; Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res*, 2000; 33 (5), pp. 635-41.

Baba, S.; Furuta, T.; Horie, M.; Nakagawa, H. Studies of Drug metabolism by use of Isotopes. XXVI. Determination of Urinary metabolites of Rutin in Humans. *J. Pharm. Sci.* 1981, 70: 780-782.

Baba, S.; Furuta, T.; Fujioka, M.; Goromau, T. Studies of Drug metabolism by use of Isotopes. XXVII. Urinary metabolites of Rutin in Rats and the Role of Intestinal Microflora in the Metabolism of Rutin. *J. Pharm. Sci.* 1983, 72: 1155-1158.

Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Yasuda, A.; Takizama, T.; Nakamura, T.; Terao, J. Cocoa powder enhances the level of antioxidative activity in rat plasma. *British Journal of Nutrition*. 2000, 84, 673-680.

Bagchi D; Bagchi M; Stohs S; Ray SD; Sen CK; Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 957, pp. 260-70.

Balant, L.; Burki, B.; Wermeille, M.; Golden, G. Comparison of some Pharmacokinetic parameters of (+)-cyanidanol-3 obtained with specific and non-specific Analytical Methods. *Arzneim. Forsch.* (1979), 29: 1758-1762.

Balde, A. M.; Pieters, L. A.; Wrang, V.; Kolodziej, H.; Ven der Berghe, D. A.; Claeys, M.; Vlietinck, A. J. Dimeric and trimeric proanthocyanidins possessing a double linked structure from *Pavetia ovariensis*. *Phytochem* (1991), 30, 4129.

Baldi A. (1996) Antioxidants in Red Wine. *Wine and Human Health*. Udine 9-11 October, 1996.

Baron JA; Gerhardsson de Verdier M; Ekborn A. Coffee, tea, tobacco, and cancer of the large bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994; 3, pp. 565-70.

Bartolomé, B.; Hernández, T.; Bengoechea, ML.; Quesada, C.; Gómez-Cordovés, C.; Estrella, C. Determination of some structures features of procyanidins and related compounds by photo diode array detection. *J. Chromatogr. A*. 1996; 723: 19-26

Baspeyras, J. Le vin médecin, 1 vol. Minerve édit., Paris, 1986

Bate-Smith, EC. Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochem.* 1975, 14, 1107.

Belitz y Grosch. Química de los Alimentos. Ed. Acribia. España: Zaragoza, 1998

Bell, J. R. C.; Donovan, J. L.; Wong, R.; Waterhouse, A. L.; German, J. B.; Walzem, R. L.; Kasim-Karakas, S. E. (+)-catechin in Human Plasma after Ingestion of a single serving of reconstituted Red Wine. Am. J. Clin. Nutr. (2000), 71: 103-108.

Bellosta S; Dell'Agli M; Canavesi M; Mitro N; Monetti M; Crestani M; Verotta L; Fuzzati N; Bernini F; Bosisio E. Inhibition of metalloproteinase-9 activity and gene expression by polyphenolic compounds isolated from the bark of *Tristaniopsis calobuxus* (Myrtaceae). Cell Mol Life Sci, 2003; 60 (7), pp. 1440-8.

Beretz, A.; Stierle, A.; Anton, R.; Cazenave, JP. Role of cAMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin. Biochem Pharmacol, 1981, 31, 3597-600.

Berger K; Ajani UA; Kase CS; Gaziano JM; Buring JE; Glynn RJ; Hennekens CH. Light-to-moderate alcohol consumption and risk of stroke among U.S. male physicians. N Engl J Med, 1999; 341, pp. 1557-64.

Bernátová I; Pechánová O; Babál P; Kyselá S; Stvrtina S; Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002; 282 (3), pp. H942-8.

Berra, B.; Caruso, D.; Cortesi, N.; Fedeli, E.; Rasetti MF.; Galli, G. Antioxidant Properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of Cholesterol in human LDL. Riv. It. Sost. Grasse 1995; 72:285-291.

Bianchi GD; Cerhan JR; Parker AS; Putnam SD; See WA; Lynch CF; Cantor KP. Tea consumption and risk of bladder and kidney cancers in a population-based case-control study. Am J Epidemiol, 2000; 151, pp. 377-83.

Boersma MG; van der Woude H; Bogaards J; Boeren S; Vervoort J; Cnubben NH; van Iersel ML; van Bladeren PJ; Rietjens IM. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. Chem Res Toxicol, 2002; 15 (5), pp. 662-70.

Bokkenheuser, V. D.; Shackleton, C. H. L.; Winter, J. Hydrolysis of Dietary Flavonoid glycosides by Strains of intestinal *Bacteroides* from Humans. Biochemistry. (1987), 248: 953-956.

Booth, A. N.; Emerson, O. H.; Jones, F. T.; DeEds, F. Urinary Metabolites of Caffeic and Chlorogenic Acids. J. Biol. Chem. 1957, 229: 51-59.

Booth, A. N.; Jones, F. T.; DeEds, F. Metabolic fate of Hesperidin, Eriodictyol, Homeriodictyol and Diosmin. J. Biol. Chem. (1958), 230: 279-286.

Booth, A. N.; Masri, M. S.; Robbins, D. J.; Emerson, O. H.; Jones, F. T.; DeEds, F. The Metabolic Fate of Gallic Acid and Related Compounds. J. Biol. Chem. 1959, 234: 3014-3016.

Boukharta, M.; Jalbert, G. Castonguay, A. Efficacy of Ellagitannins and Ellagic Acid as Cancer Chemopreventive Agents. XVIth International Conference of the Groupe Polyphénols, Lisbon, Portugal, (1992) pp 245-249.

Bourzeix, M.; Weyland, D.; Heredia, N.; Desfeux, C. Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. Bulletin de l'O.I.V. 1986, 669-670.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Review Nutrition Reviews. 56(11):317-33, 1998

Broadhurst, R B.; Jones, W T. J. Sci. Food Agric. 1978, 29, 788



- Brown, J. E.; Khodr, H.; Hider, R. C.; Rice-Evans, R. C. Structural dependence of Flavonoid interactions with Cu<sup>+2</sup> ions: implications for their antioxidant properties. Biochem. J. (1998), 330: 1173-1178.
- Brown, R. C.; Klein, A.; Simmons, W. K.; Hurrell, R. F. The influence of Jamaican herbs teas and other polyphenol- containing beverages on iron absorption in the rat. Nutr. Res. (1990), 10: 343-353.
- Brown, S.; Griffiths, L. A. New Metabolites of the Naturally occurring mutagen, Quercetin, the pro-mutagen, rutin and Taxifolin. Experientia. 1983, 39: 198-200.
- Bu-Abbas, A.; Clifford, M. N.; Joannides, C.; Walker, R. Stimulation of rat hepatic UDP glucuronosyl tranferese activity following treatment with green tea. Foo Chem. Toxicol. (1995), 33: 27-30.
- Bujanda L; Gutiérrezz Stampa MA; Marimón JM. Wine at moderate doses: health or disease?. Med Clin.; 1999; 112, pp. 29-35.
- Burchell, B.; Brierley, C. H.; Rance, D. Specificity of Human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. Life Sci. (1995), 57: 1819-1831.
- Burchell, B.; Coughtrie, M. W. H. Genetic and Environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation. Environ. Health Perspect. (1997), 105: 739-747.
- Burns J; Gardner PT; O'Neil J; Crawford S; Morecroft I; McPhail DB; Lister C; Matthews D; MacLean MR; Lean ME; Duthie GG; Crozier A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. J Agric Food Chem, 2000; 48 (2), pp. 220-30.
- Bushman JL. Green tea and cancer in humans: a review of the literature. Nutr Cancer, 1998; 31, pp. 151-9.
- Butler, L G.; Price, M L.; Brotherton, J E. J. Agric. Food Chem. 1982, 30, 1087.
- Butler, LG. Protein polyphenols interaction: nutricional aspects. En Proceedings of grape polyphenol,1992. Vol. 16, part II, pp. 11-18
- Cai, Y.; Evans, F. J.; Robert, M. F.; Phillipson, J. D.; Zenk, M. H.; Gleba, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. Phytochem, (1991) 30, 2033.
- Caldú P, Hurtado I, Fiol C. White wine reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation. Am J Clin Nutr 1996;63:403.
- Camargo CA Jr; Stampfer MJ; Glynn RJ; Grodstein F; Gaziano JM; Manson JE; Buring JE; Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and risk for angina pectoris or myocardial infarction in U.S. male physicians. Ann Intern Med, 1997; 126, pp. 372-5.
- Campos AM, Lissi EA.. Total Antioxidant Potential of Chilean Wines. Nutrition Research 1996;16:385-389.
- Capatano, AL. Antioxidant effect of flavonoid. Angiology, 1997, 48, 39-44.
- Carrero, P.; Ortega, H.; Martínez-Botas, J.; Gómez-Coronado, D.; Lasunción, MA. Flavonoid-induced ability of minimally modified low-density lipoproteins to support lymphocyte proliferation. Biochemical Pharmacology, 1998, 55, 1125-1129.
- Cassidy, A.; Bingham, S. Setchell, K. D. Biological effects of a diet of Soy protein rich in Isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. (1994), 60: 333-340.

Chai, YC.; Binion, DG.; Macklis, R.; Chrisholm, GM. Smooth muscle cell proliferation induced by oxidised LDL-borne lysophosphatidylcholine: evidence for FGF-2 release from cells not extracellular matrix. *Vascular Pharmacology*, 2002, 38, 229–237.

Chang WC; Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1989; 38, pp. 181-8.

Chatterjee SS. Koch E. Jaggy H. Krzeminski T. In vitro and in vivo studies on the cardioprotective action of oligomeric procyanidins in a *Crataegus* extract of leaves and blooms. *Arzneimittel-Forschung*. 47(7):821-5, 1997

Chen CK; Pace-Asciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*, 1996; 27, pp. 363-6.

Cheynier, V.; Rigaud, J.; Ricardo da Silva, J M. In *Basic Life Science. Plant Polyphenols, Synthesis, Properties, Significance*; Hemingway, R W.; Laks, P E. Eds. Plenum Press: New York, London, 1992; Vol. 59 pp 281–294.

Chiavari, G; Vitali, P;. Galletti, GC. Electrochemical detection in the high-performance liquid chromatography of polyphenols (vegetable tannins). *Journal of Chromatography*. 392:426-34, 1987 Apr 17. 87251067

Chopra, M.; Thurnham, D.I. Antioxidants and lipoprotein metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1999, 58, 663–671.

Chow WH; Swanson CA; Lissowska J; Groves FD; Sobin LH; Nasierowska-Guttmejer A; Radziszewski J; Regula J; Hsing AW; Jagannatha S; Zatonski W; Blot WJ. Risk of stomach cancer in relation to consumption of cigarettes, alcohol, tea and coffee in Warsaw, Poland. *Int J Cancer*, 1999; 81, pp. 871-6.

Chung KT. Wong TY. Wei Cl. Huang YW. Lin Y. Tannins and human health: a review. *A Review Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 38(6):421-64, 1998

Cishek, MB.; Galloway, MT.; Karim, M.; German, JB.; Kappagoda, CT. Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits. *Clinical Science*, 1997, 93, 507–511.

Cleophas TJ. Wine, beer and spirits and the risk of myocardial infarction: a systematic review. *Biomed Pharmacother*, 1999; 53, pp. 417-23.

Clifford AJ; Ebeler SE; Ebeler JD; Bills ND; Hinrichs SH; Teissedre PL; Waterhouse AL. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an aminoacid based diet supplemented with red wine solids. *Am J Clin Nutr*, 1996; 64, pp. 748-56.

Clifford MN; Copeland EL; Bloxside JP; Mitchell LA. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica*, 2000; 30 (3), pp. 317-26.

Clifford, MN. Review: Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and other dietary burden. *J. Sci Food Agric*. 1999, 79: 362–372.

Clifford, MN. Sensory and dietary properties of phenols. *En Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Conference of Grape Polyphenol*, 1992. Vol. 16, part II, pp. 18-23

Collado M; Medema RH; Garcia-Cao I; Dubuisson ML; Barradas M; Glassford J; Rivas C; Burgering BM; Serrano M; Lam EW. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem*, 2000; 275 (29), pp. 21960-8.

Conner EM, Grisham MB. Inflammation, Free Radicals and Antioxidants. *Nutrition* 1996;12: 274

Cook JD; Reddy MB; Hurrell RF. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1995; 61, pp. 800-4.



Cook, NC.; Samman, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. Nutr. Biochem. 1996; 7; 66–76.

Cooper, K.A.; Chopra, M.; Thurnham, D.I. Wine polyphenols and promotion of cardiac health. Nutrition Research Reviews, 2004, 17, 111–129.

Corder R; Douthwaite JA; Lees DM; Khan NQ; Viseu Dos Santos AC; Wood EG; Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. Nature, 2001; 414 (6866), pp. 863-4.

Coughtrie, M. H.; Sharp, S.; Maxwell, K.; Innes, N. P. Biology and Function of the reversible Sulfation pathway catalysed by Human Sulfotransferases and Sulfatases. Chem. Biol. Interact. (1998), 109: 3-27.

Crespy V; Morand C; Besson C; Cotelle N; Vézín H; Demigné C; Rémésy C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003; 284 (6), pp. G980-8.

Crespy V; Morand C; Besson C; Manach C; Démigné C; Rémésy C. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. J Nutr, 2001; 131 (8), pp. 2109-14.

Crespy V; Morand C; Besson C; Manach C; Demigne C; Remesy C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. J Agric Food Chem, 2002; 50 (3), pp. 618-21.

Crespy, V.; Morand, C.; Manach, C.; Besson, C.; Demigne, C.; Rémésy, C. Part of Quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. Am. J. Physiol. (1999), 40: G120-G126.

Criqui MH, Ringel BL. Does diet or alcohol explain the French paradox? Lancet 1994;344:1719-1723.

Criqui, MH. Alcohol and Coronary Heart Disease: consisten relationship and public health implications. Clinica Chimica Acta. 1996; 246, 51–57.

Critchfield JW; Butera ST; Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. AIDS Res Hum Retroviruses, 1996; 12, pp. 39-46.

Crozier, A.; Lean, M. E. J.; McDonal, M. S; Black, C. Quantitative analysis of the Flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuces and celery. J. Agric. Food Chem. (1997), 45: 590-595.

Cuevas, AM.; Guasch, V.; Castillo, O.; Iribarra, V.; Mizon, C.; San martin, A.; Strobel, P.; Germain, AM.; Leighton, F. A high-fat diet induces a red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. Lipids, 2000, 35, 143–148.

Curhan GC; Willett WC; Rimm EB; Spiegelman D; Stampfer MJ. Prospective study of beverage use and the risk of kidney stones. Am J Epidemiol, 1996; 143, pp. 240-7.

Da Silva, E.; Piskula, M.; Terao, J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. Free Radical Biology and Medicine. 1998, 24, 1209-1216.

Dangles, O.; Dufour, C.; Morand, C.; Manach, C; Rémésy, C. Binding of Flavonoids to plasma proteins. In: Bioflavonoids and Polyphenols (Packer, L.; ed.), Academic Press, Orlando, FL. 2000.

Daniel, E. M.; Ratnayake, S.; Kinstle, T.; Stoner, G. D. The effect of pH and rat intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins. J. Nat. Prod. (1991), 54: 946-952.

Dao, L.; Friedman, M. Chlorogenic acid contents of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. J. Agric. Food Chem. 1992; 40:2152-2156.

Das, N. P. Studies on Flavonoid Metabolism. Absorption and Metabolism of (+)-catechin in man. Biochem. Pharmacol. 1971, 20: 3435-3445.

Das, N. P. Studies on Flavonoid Metabolism. Excretion of m-hydroxyphenylacrylic Acid from (+)-catechin in the Monkey. Drug Metab. Dispos. 1974, 2: 209-213.

Das, N. P.; Griffiths, L. A. Studies on Flavonoid Metabolism. Metabolism of (+)-[<sup>14</sup>C]catechin in the rat and guinea pig. Biochem. J. (1969), 115: 831-836.

Das, N. P.; Griffiths, L. A. Studies on Flavonoids Metabolism. Metabolism of (+)-catechin in the guinea pig. Biochem. J. (1968), 110: 449-456.

Das, N. P.; Sothy, S. P. Studies on Flavonoid Metabolism: Biliary and Urinary excretion of (+)(U-<sup>14</sup>C)catechin. Biochem. J. 1971, 125: 417.

Day AJ; DuPont MS; Ridley S; Rhodes M; Rhodes MJ; Morgan MR; Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. FEBS Lett, 1998; 436 (1), pp. 71-5.

Day AJ; Gee JM; DuPont MS; Johnson IT; Williamson G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. Biochem Pharmacol, 2003; 65 (7), pp. 1199-206.

Day AJ; Mellon F; Barron D; Sarrazin G; Morgan MR; Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. Free Radic Res, 2001; 35 (6), pp. 941-52.

Day, A. J.; Canada, F. J.; Diaz, J. C.; Kroon, P. A.; Mclauchlan, R. W.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G. Dietary Flavonoid and Isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Lett. (2000), 468: 166-170.

Day, AJ.; Bao, Y.; Morgan, MRA.; Williamson, G. Conjugation position of quercetina glucurónidos and effect on biological activity. Free Radical Biology and Medicine, 2000, 29, 1234-1243.

de aetano G.; Cerletti, C. Wine and cardiovascular disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis., 2001; 11, 47-50.

De Lorimier, A. Alcohol, Wine and Health. The American Journal of Surgery. Vol. 180, 2000.

Decker, EA. Phenolics: Prooxidants or antioxidants? Nutritional Reviews, 1997; 55 (1), 396-398

Deckert, V.; Desrumaux, C.; Athias, A.; Duverneuil, L.; Palleau, V.; Gambert, P.; Masson, D.; Lagrost, L. Prevention of LDL [alpha]-tocopherol consumption, cholesterol oxidation and vascular endothelium dysfunction by polyphenolic compounds from red wine. Atherosclerosis, 2002, 165, 41-50.

DeEds, F.; Booth, A. N.; Jones, F. T. Methylation and Dehydroxylation of Phenolic Compounds by Rats and Rabbits. J. Biol. Chem. 1957, 225: 615-621.

Del Bas JM, Fernandez-Larrea J, Blay M, Ardevol A, Salvado MJ, Arola L, Blade C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. FASEB J. On line, 2005.

Delcour, J A.; Liskens, H F.; Jackson, J F. In Modern Methods of Plant Analysis, Bear Analysis. Eds. Springer - Verlag: New York, London, 1998; Vol. 7, pp 225 - 240.

Dell' Agli, M.; Buscialà, A.; Bosisio, E. Vascular effects of wine polyphenols. Cardiovascular Research, 2004, 63, 593–602.

Demrow, HS.; Slane, PR; Folts, JD. Administration of wine and grape juice inhibits *in vivo* platelet and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. Circulation, 1995, 91, 1182–1188.

Déprez S; Brezillon C; Rabot S; Philippe C; Mila I; Lapierre C; Scalbert A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. J Nutr, 2000; 130 (11), pp. 2733-8.

Deprez S; Mila I; Huneau JF; Tome D; Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. Antioxid Redox Signal, 2001; 3 (6), pp. 957-67.

Déprez, S. Biomarquage de Tanins Condensés et Étude de leur Biodisponibilité dans l'Organisme Humain. Paris, Institut National Agronomique (1999). Paris-Grignon.

Déprez, S.; Brézillon, C.; Rabor, S.; Phillipe, C.; Mila, I.; Lapierre, C. P.; Scalbert, A. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by Human Colonic Microflora into low Molecular Weight Phenolic Acids. J. Nutr. (in press). 2000.

Deshpande SS. Cheryan M. Salunkhe DK. Tannin analysis of food products. Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 24(4):401-49, 1986.

Diebolt M; Bucher B; Andriantsitohaina R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. Hypertension, 2001; 38 (2), pp. 159-65.

Ding, Z.; Kuhr, S.; Engelhardt, U. H. Influence of Catechins and Theaflavins on the astringent taste of black tea brews. Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1992), 195: 108-111.

Doerge DR; Chang HC; Churchwell MI; Holder CL. Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. Drug Metab Dispos, 2000; 28 (3), pp. 298-307.

Donovan JL; Crespy V; Manach C; Morand C; Besson C; Scalbert A; Rémésy C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. J Nutr, 2001; 131 (6), pp. 1753-7.

Donovan JL; Manach C; Rios L; Morand C; Scalbert A; Rémésy C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3. Br J Nutr, 2002; 87 (4), pp. 299-306.

Donovan, J. L.; Bell, J. R.; Kasim-Karakas, S.; German, J. B.; Walzaem, R. L.; Hansen, R. J.; Waterhouse, A. L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. J. Nutr. (1999), 129: 1662-1668.

Dumon, M. C. Recherches Analytiques sur les Pycnogenols. Tesis Doctoral. 1990. Universidad de Burdeos.

Duncan, B. Prospective study of beverage use and the risk of kidney stones. American Journal of Epidemiology. 1996, pag. 240.

Duthie, G. G.; Pedersen, M. W.; Gardner, P. T.; Morrice, P. C.; Jenkinson, A. M.; McPhail, D. B.; Steele, G. M. The effect of Whisky and Wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. Eur. J. Clin. Nutr. (1998), 52: 733-736.

Ellison LF. Tea and other beverage consumption and prostate cancer risk: a Canadian retrospective cohort study. Eur J Cancer Prev, 2000; 9, pp. 125-30.

Elmets CA; Singh D; Tubesing K; Matsui M; Katiyar S; Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. J Am Acad Dermatol, 2001; 44, pp. 425-32.

Erlund, I.; Alfthan, G.; Siren, H.; Ariniemi, K.; Aro, A. Validated method for the quantification of Quercetin from Human plasma using HPLC with electrochemical detection. J. Chromatogr. (1999), B727:197-189.

Escribano-Bailón, M. T. Estudio de la composición flavánica de la semilla de uva. Tesis Doctoral (1993). Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

Falany CN. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. FASEB J, 1997; 11 (4), pp. 206-16.

Finkel, H. E. Wine and health: a review and perspective. Journal of wine research, 1996, 7, 157-196.

Fisher MB; Paine MF; Strelevitz TJ; Wrighton SA. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. Drug Metab Rev, 2001; 33 (3-4), pp. 273-97.

Fitzpatrick DF; Bing B; Maggi DA; Fleming RC; O'Malley RM. Vasodilating procyanidins derived from grape seeds. Ann N Y Acad Sci, 2002; 957, pp. 78-89.

Fitzpatrick DF; Fleming RC; Bing B; Maggi DA; O'Malley RM. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. J Agric Food Chem, 2000; 48 (12), pp. 6384-90.

Fitzpatrick DF; Hirschfield SL; Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. Am J Physiol, 1993; 265, pp. H774-8.

Fitzpatrick DF; Hirschfield SL; Ricci, T.; Jantzen, P.; Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. J Cardiovasc Pharmacol, 1995; 26(1), pp. 90-95.

Fleuriet, A.; Macheix, J. J. Tissue compartmentation of phenylpropanoid metabolites in tomatoes during growth and maturation. Phytochemistry. (1985), 24: 929.

Folts, D. Red wine, atherosclerosis and coronary thrombosis. Wine in context: nutrition, physiology and policy. Wine & health Symposium, Reno (Nevada). American Society for Enology and Viticulture. 1996.

Formica JV; Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol 1995; 33, 1061-80.

Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. J Agric Food Chem 1995;43:890-894.

Frankel, EN.; Kanner, J.; German, JB.; Parks, E.; Kinsella, JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet, 1993, 341, 454-457.

Fremont, L. Biological effects of resveratrol. Life Sci, 2000, 66, 663-73.

Fuchs CS; Stampfer MJ; Colditz GA; Giovannucci EL; Manson JE; Kawachi I; Hunter DJ; Hankinson SE; Hennekens CH; Rosner B. Alcohol consumption and mortality among women. N Engl J Med, 1995; 332, pp. 1245-50.

Fuhr, U.; Kummert, A. L. The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? Clin.Pharmacol. Ther. (1995), 58: 365-373.

Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. Am. J. Clin. Nutr. (1995), 61: 549-554.

Furuta, T.; Kasuya, Y. Determination of naringin and naringenin in human urine by HPLC utilizing solid-phase extraction. J. Chromatogr. (1997), 704: 299-305.

Fuster V; Badimon L; Badimon JJ; Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). N Engl J Med, 1992; 326 (4), pp. 242-50.

Gálvez, J.; Duarte, J.; Sánchez de Medina, F.; Jiménez, J.; Zarzuelo, A. Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions. Phytotherapy Res. 1996, 10, 66-69.

Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL, et al. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. N Engl J Med 1993;329:1829-1834.

Gaziano, JM.; Godfried, SL.; Hennekens, ChH. Alcohol and Coronary Heart Disease. TCM 1996. 6 (6), 175-178.

Gee, J. M.; Dupont, M. S. Rhodes, M. J. C.; Johnson, I. T. Quercetin glucosides interact with the gastrointestinal glucose transport pathway. Free Radic. Biol. Med. (1998), 25: 19-25.

Geiger H Schwerdtfeger WK. Danscher G.. Entorhinal and prepiriform cortices of the European hedgehog. A histochemical and densitometric study based on a comparison between Timm's sulphide silver method and the selenium method. Brain Research. 348(1):69-76, 1985

Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. J Agric Food Chem 1998;46:361-367.

Glories, T. La Couleur des Vins Rouges. Connaissance de la Vignes et du Vin. 1984; 4, 235-271.

Glories, Y. Evolution des Composés Phénoliques au Cours du Vellissement di Vin. Ann. Nutr. Alim. 1978; 32, 1163-1169.

Goldberg, DM.; Hahn, SE.; Parkes, JG. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. Clinica Chimica Acta, 1995, 237, 155-187.

Goldbohm RA; Hertog MG; Brants HA; van Poppel G; van den Brandt PA. Consumption of black tea and cancer risk: a prospective cohort study. J Natl Cancer Inst, 1996; 88, pp. 93-100.

Goldstein, J.; Swain, T. Nature, 1969, 198, 587.

Gonthier MP; Cheynier V; Donovan JL; Manach C; Morand C; Mila I; Lapiere C; Rémésy C; Scalbert A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. J Nutr, 2003 b; 133 (2), pp. 461-7.

Gonthier MP; Verny MA; Besson C; Rémésy C; Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. J Nutr, 2003 a; 133 (6), pp. 1853-9.

González-San José, M. L. Comportamiento de compuestos del metabolismo secundario en la maduración de la uva de *Vitis vinifera*. Tesis Doctoral (1989). Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC.

Gopalan, V.; Pastuzyn, A.; Galey, W. R.; Glew, R. H. Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic  $\beta$ -glucosidase. J. Biol. Chem. (1992), 267: 14027-14032.

Graefe EU; Veit M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine*, 1999; 6 (4), pp. 239-46.

Graefe EU; Wittig J; Mueller S; Riethling AK; Uehleke B; Drewelow B; Pforte H; Jacobasch G; Derendorf H; Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, 2001; 41 (5), pp. 492-9.

Griffiths, L. A. Studies on Flavonoid Metabolism. Identification of the Metabolites of (+)-catechin in rat Urine. *Biochem. J.* 1964, 92: 173-179.

Griffiths, L. A.; Barrow, A. Metabolism of Flavonoid Compounds in germ-free Rats. *Biochem. J.* (1972), 130: 1161-1162.

Griffiths, L. A.; Smith, G. E. Metabolism of Apinegin and related compounds in the Rat. Metabolite formation *in vivo* by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* (1972), 128: 901-911.  
Griffiths, L. A.; Smith, G. E. Metabolism of Myricetin and related compounds in the Rat. Metabolite formation *in vivo* by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* (1972), 130: 141-151.

Groenbaek, M. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. *British Medical Journal*. 1995.

Groenewoud G; Hundt HK. The microbial metabolism of condensed (+)-catechins by rat-caecal microflora. *Xenobiotica*, 1986; 16 (2), pp. 99-107.

Grønbaek M; Deis A; Sørensen TI; Becker U; Borch-Johnsen K; Müller C; Schnohr P; Jensen G. Influence of sex, age, body mass index, and smoking on alcohol intake and mortality. *BMJ*, 1994; 308, pp. 302-6.

Gryglewski RJ; Korbut R; Robak J; Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol*, 1987; 36 (3), pp. 317-22.

Guoua, C. Sofic, E. Ronald, LP. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structure activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997; 22 (5): 749-760.

Hackett, A. M. The Metabolism of Flavonoid compounds in mammals. In: V. Cody, E. Middleton, J. Harborne, Eds. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. Biochemical, Pharmacological, Structure-Activity Relationships. Pp 177-194. New York: Alan R. Liss, 1986.

Hackett, A. M.; Griffiths, L. A. The Disposition of 3-O-methyl-(+)-catechin in the Rat and the Marmoset following oral administration. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokin.* 1983, 8: 35-42.

Hackett, A. M.; Griffiths, L. A.; Broillet, A.; Wermeille, M. The Metabolism and Excretion of (+)-[<sup>14</sup>C]cyanidanol-3 in Man following Oral Administration. *Xenobiotica*. (1983), 13: 279-286.

Hagerman, A.; Butler, L. Tannins and Lignins. Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, 2E. Volume I, 1991.

Hahlbrock, K. Flavonoids. *The biochemistry of plants*. (1981), 7, 425-456.

Hakim IA; Harris RB; Weisgerber UM. Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000; 9, pp. 727-31.

Halliwell B; Zhao K; Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res*, 2000; 33 (6), pp. 819-30.

Hamajima N; Tajima K; Tominaga S; Matsuura A; Kuwabara M; Okuma K. Tea polyphenol intake and changes in serum pepsinogen levels. *Jpn J Cancer Res*, 1999; 90, pp. 136-43.

Hammerstone, J. F.; Lazarus, S. A.; Schmitz, H. H. Proanthocyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr.* (2000), 130: 2086S-2095S.



Harborne, J. B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall, London, 2<sup>nd</sup> ed., 1984; pp. 61-68.

Harborne, J.B.; Ed. The Flavonoids: Advances in Research since 1986. Chapman & Hall, London, U. K. 1994.

Harbourne, J.; Williams, C. Advances in flavonoides research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55, 481–504.

Harmand M.; Blanquet, P. The fate of total flavanolic oligomers (OFT) extracted from *Vitis vinifera* L. in the rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1978, 3, 15–30.

Hartman TJ; Tangrea JA; Pietinen P; Malila N; Virtanen M; Taylor PR; Albanes D. Tea and coffee consumption and risk of colon and rectal cancer in middle-aged Finnish men. *Nutr Cancer*, 1998; 31, pp. 41-8.

Haslam, E. Natural Polyphenols (vegetable tannins) as Drugs: possible modes of actions. *J. Nat. Prod.* (1996), 59: 205-215.

Haslam, E. Plant polyphenols. Vegetable tannins revisited. (1989). Cambridge University Press.

Hayek T; Fuhrman B; Vaya J; Rosenblat M; Belinky P; Coleman R; Elis A; Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17 (11), pp. 2744-52.

Hayes, PJ.; Smyth, MR; McMurrough, I. Comparison of electrochemical and ultraviolet detection methods in high-performance liquid chromatography for the determination of phenolic compounds commonly found in beers. Part 2. Analysis of beers. *Analyst*. 112(9):1205-7, 1987 Sep. 88104611.

Hedges JC; Dechert MA; Yamboliev IA; Martin JL; Hickey E; Weber LA; Gerthoffer WT. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem*, 1999; 274 (34), pp. 24211-9.

Hein HO; Suadicani P; Gyntelberg F. Alcohol consumption, serum low density lipoprotein cholesterol concentration, and risk of ischaemic heart disease: six year follow up in the Copenhagen male study. *BMJ*, 1996; 312, pp. 736-41.

Hemingway, R. W. Exploring the conformations of polyflavonoids. An approach to understanding the significance of tannins. *Polyphenols* 96, 1996, July 15-18.

Henn, T; Stehle, P. Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. *Ernähr.-Umsch.* (1998), 45: 308-313.

Hertog MG. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc Nutr Soc*, 1996; 55, 385-97.

Hertog MG; Feskens EJ; Hollman PC; Katan MB; Kromhout D. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr Cancer*, 1994; 22, pp. 175-84.

Hertog MG; Kromhout D; Aravanis C; Blackburn H; Buzina R; Fidanza F; Giampaoli S; Jansen A; Menotti A; Nedeljkovic S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*, 1995; 155, 381-6.

Hertog, MGL.; Hollman, P. C. H.; van de Putte, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* (1993a), 41: 1242-1246.

Hertog, MGL.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. J. Agric. Food Chem. (1992), 40: 2379-2383.

Hertog, MGL.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherland. Nutr. Cancer. (1993b), 20: 21-29.

Hibasami H; Komiya T; Achiwa Y; Ohnishi K; Kojima T; Nakanishi K; Sugimoto Y; Hasegawa M; Akatsuka R; Hara Y. Black tea theaflavins induce programmed cell death in cultured human stomach cancer cells. Int J Mol Med, 1998; 1, pp. 725-7.

Higdon JV; Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003; 43, pp. 89-143.

Høidrup S; Grønbaek M; Gottschau A; Lauritzen JB; Schroll M. Alcohol intake, beverage preference, and risk of hip fracture in men and women. Copenhagen Centre for Prospective Population Studies. Am J Epidemiol, 1999; 149, pp. 993-1001.

Hollman PC; Hertog MG; Katan MB. Analysis and health effects of flavonoids. Food Chem., 1996; 57, 43-6.

Hollman PC; Hertog MG; Katan MB. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. Biochem Soc Trans, 1996; 24, 785-9.

Hollman PC; Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. Biomed Pharmacother, 1997; 51 (8), pp. 305-10.

Hollman PC; Tijburg LB; Yang CS. Bioavailability of flavonoids from tea. Crit Rev Food Sci Nutr, 1997; 37, pp. 719-38.

Hollman, P. C. H. Determinants of the absorption of the dietary flavonoid Quercetin in man. Wageningen: Thesis. 1997. Agricultural University.

Hollman, P. C. H.; de Vries, J. H. M.; van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J. B.; Katan, M. B. Absorption of dietary Quercetin glycosides and Quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am. J. Clin. Nutr. (1995), 62: 1276-1282.

Hollman, P. C. H.; van der Gaag, M. S.; Mengelers, M. J. B.; van Trip, J. M. P. de Vries, J. H. M.; Katan, M. B. Absorption and disposition kinetics of the Dietary Antioxidant Quercetin in Man. Free Radic. Biol. Med. (1996), 21: 703-707.

Hollman, P. C. H.; van Trijp, J. M. P.; Buysman, M. N. C. P.; van der Gaag, M.; Mengelers, M. J. B.; de Vries, J. H. M.; Katan, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid Quercetin from various foods in man. FEBS Lett. (1997), 418: 152-156.

Hollman, P. C.; Bijsman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Radic. Res. (1999), 31: 569-573.

Holt RR; Lazarus SA; Sullards MC; Zhu QY; Schramm DD; Hammerstone JF; Fraga CG; Schmitz HH; Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. Am J Clin Nutr, 2002; 76 (4), pp. 798-804.

Honohan, T.; Hale, R. L.; Brown, J. P.; Wingard, R. E. Synthesis and Metabolic fate of Hesperitin-3-<sup>14</sup>C. J Agric. Food Chem. 1976, 24: 906-911.

Hughes, J. C.; Swain, T. After-cooking blackening in potatoes. II. Core experiments. J. Sci. Food Agric. (1962), 13: 229-236.



Hurtado I, Caldú P, Gonzalo A, et al. Antioxidative Capacity of Wine on Human LDL Oxidation *in Vitro*: Effect of Skin Contact in Winemaking of White Wine. J Agric Food Chem 1997;45:1283-1289.

Iijima K; Yoshizumi M; Hashimoto M; Akishita M; Kozaki K; Ako J; Watanabe T; Ohike Y; Son B; Yu J; Nakahara K; Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. Circulation, 2002; 105 (20), pp. 2404-10.

Iijima K; Yoshizumi M; Hashimoto M; Kim S; Eto M; Ako J; Liang YQ; Sudoh N; Hosoda K; Nakahara K; Toba K; Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. Circulation, 2000, 101 (7), pp. 805-11.

Iijima K; Yoshizumi M; Ouchi Y. Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function--molecular mechanism of the 'French paradox'. Mech Ageing Dev, 2002, 123 (8), pp. 1033-9.

Ikeda I; Imasato Y; Sasaki E; Nakayama M; Nagao H; Takeo T; Yayabe F; Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. Biochim Biophys Acta 1992; 1127, 141-6.

Ikigai H; Nakae T; Hara Y; Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim Biophys Acta, 1993; 1147, 132-6.

Imai K; Nakachi K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. BMJ, 1995; 310, 693-6.

Imai Y; Clemmons DR. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and deoxyribonucleic acid synthesis by insulin-like growth factor-I. Endocrinology, 1999; 140 (9), pp. 4228-35.

Infante R. Polifenoles del vino y oxidabilidad de las lipoproteínas. ¿Blanco o tinto?. Clin. Invest. Arterioesclerosis 1997;9:19-22.

Inoue M; Tajima K; Hirose K; Hamajima N; Takezaki T; Kuroishi T; Tominaga S. Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan. Cancer Causes Control, 1998; 9, pp. 209-16.

Intorre L; Bertini S; Luchetti E; Mengozzi G; Crema F; Soldani G. The effect of ethanol, beer, and wine on histamine release from the dog stomach. Alcohol, 1996; 13, 547-51.

Ishii K; Furuta T; Kasuya Y. Mass spectrometric identification and high-performance liquid chromatographic determination of a flavonoid glycoside naringin in human urine. J Agric Food Chem, 2000; 48 (1), pp. 56-9.

Jain MG; Hislop GT; Howe GR; Burch JD; Ghadirian P. Alcohol and other beverage use and prostate cancer risk among Canadian men. Int J Cancer, 1998; 78, pp. 707-11.

Jang M; Cai L; Udeani GO; Slowing KV; Thomas CF; Beecher CW; Fong HH; Farnsworth NR; Kinghorn AD; Mehta RG; Moon RC; Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science, 1997; 275, pp. 218-20.

Janssen, PLTMK.; Mensik, RP.; Cox, FJJ.; Harryvan, JL.; Hovenier, R.; Hollman, PCH.; Katan, MB. Effects of the flavonoids quercetina and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. Am. J. Clin. Nutr. 1998, 67, 255-262.

Jenkins, KJ.; Atwal, AS. Flavonoids increase tissue essential fatty acids in vitamin E-deficient chicks. Nutr. Biochem., 1995, 6, 97-103.

Jimenez–Ramsey, LM.; Rogler, JC.; Housley, LG.; Elkin, RG. Absorption and distribution of C-14-labelled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *J Agric Food Chem*, 1994, 42, 963–7.

Junquera, B. Factores condicionantes del proceso de maduración del fruto de Vitis vinifera. Caracterización varietal. Tesis Doctoral (1990). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC.

Justesen U. Knuthsen P. Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 799(1-2):101-10, 1998.

Kalin R; Righi A; Del Rosso A; Bagchi D; Generini S; Cerinic MM; Das DK. Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Radic Res*, 2002; 36 (8), pp. 819-25.

Kallianos, A. G.; Petrakis, P. L.; Shetlar, M. R.; Wendre, S. H. Preliminary Studies on Degradation Products of Quercetin in the rat's gastrointestinal tract. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 81: 430-433.

Kampa M; Hatzoglou A; Notas G; Damianaki A; Bakogeorgou E; Gemetzi C; Kouroumalis E; Martin PM; Castanas E. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer*, 2000; 37, pp. 223-33.

Kappenberg, F J. Die quantitative DC in der Drogenstandardisierung am beispiel Procyanidinhaltiger Drogen sowie des Knoblauchs. Tesis Doctoral. Westfälische Wilhelms Universität , Münster, Germany, 1992.

Katiyar SK; Afaq F; Perez A; Mukhtar H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis*, 2001; 22, pp. 287-94.

Katiyar SK; Matsui MS; Elmets CA; Mukhtar H. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol*, 1999; 69, pp. 148-53.

Kato N; Yoshida A. Effect of various dietary xenobiotics on serum total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol in rats. *Nutrition Reports International*, 1981, 23, 825–831.

Kawase, M.; Wang, R.; Shiomi, T.; Saijo, R.; Yagi, K. Antioxidative Activity of (-)-epigallocatechin-3-(3'-O-methyl) gallate Isolated from fresh Tea Leaf and preliminary results on its Biological Activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 64 (10), 2218–2220, 2000.

Kerry NL, Abbey M. (1997) Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 135:93-102.

Kiehne, A.; Engelhardt, UH. Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. II: Chlorogenic acids, theaflavins and thearubigins. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 202(4):299-302, 1996 Apr. 96230730.

Kiehne, A.; Engelhardt, UH. Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. I. Catechins, flavonol O-glycosides and flavone C-glycosides. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 202(1):48-54, 1996 Jan. 96351307

Kim DH; Jung EA; Sohng IS; Han JA; Kim TH; Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res*, 1998; 21 (1), pp. 17-23.

Kimira, M.; Arai, Y.; Shimoi, K.; Watanabe, S. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J. Epidemiol.* (1998), 168-175.

Kinjo Y; Cui Y; Akiba S; Watanabe S; Yamaguchi N; Sobue T; Mizuno S; Beral V. Mortality risks of oesophageal cancer associated with hot tea, alcohol, tobacco and diet in Japan. J Epidemiol, 1998; 8, pp. 235-43.

Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. and Kanner, J. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. Food Technology 1993;85-89.

Kirk, P.; Patterson, R. E.; Lampe, J. Development of a soy food frequency questionnaire to estimate isoflavone consumption in US adults. J. Am. Diet. Assoc. (1999), 99: 558-563.

Kivits, G. A. A.; van der Sman, F. J. P.; Tijburg, L. B. M. Analysis of catechins from green and black tea in humans: a specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids. Int. J. Food Sci. Nutr. (1997), 48: 387-392.

Klurfeld DM; Kritchevsky D. Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits. Exp Mol Pathol 1981, 34 (1), pp. 62-71.

Knall C; Worthen GS; Johnson GL. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. Proc Natl Acad Sci, 1997; 94 (7), pp. 3052-7.

Knekt P. Jarvinen R. Seppanen R. Hellovaara M. Teppo L. Pukkala E. Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. American Journal of Epidemiology. 146(3):223-30, 1997

Koga T; Meydani M. Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. Am J Clin Nutr 2001; 73 (5), pp. 941-8.

Kondo K; Matsumoto A; Kurata H; Tanahashi H; Koda H; Amachi T; Itakura H. Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine. Lancet 1994; 344 (8930), pp. 1152.

Kondo, K.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Suzuki, T.; Toyoda, M. Mechanistic studies of Catechins as antioxidants against Radical Oxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 362, N° 1 pp 79 – 86, 1999.

Koster H; Halsema I; Scholtens E; Knippers M; Mulder GJ. Dose-dependent shifts in the sulfation and glucuronidation of phenolic compounds in the rat *in vivo* and in isolated hepatocytes. The role of saturation of phenolsulfotransferase. Biochem Pharmacol, 1981; 30 (18), pp. 2569-75.

Koupai–Abyazani, MR.; McCallum, J.; Muir, AD.; Bohm, BA.; Towers, GMN.; Gruber, MY. J. Agric. Food Chem. 1993, 41,1066.

Kroon, P. A.; Faulds, C. B.; Ryden, P.; Robertson, J. A.; Williamson, G. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. J. Agric. Food Chem. (1997), 45: 661-667.

Kuchta, M.; Mojzisova, G. Dietary Flavonoids and Coronary Heart Disease. Physiol. Res. 50: 529–535, 2001.

Kühnau, J. The Flavonoids. A class of Semi–essential Food Components: Their Role in Human Nutrition. Wld. Rev. Nutr. Diet. 1976. 24, 117–191.

Lamarco, K. L.; Glew, R. H. Hydrolysis of a naturally occurring  $\beta$ -glucoside by a broad specificity  $\beta$ -glucosidase from liver. Biochem. J. (1986), 237: 469-476.

Lambert, N.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Mclauchlan, W. R.; Kroon, P. A.; Day, A. J.; Williamson, G. Purification of cytosolic  $\beta$ -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. Biochim. Biophys. Acta 1435: 110-116.

Lanas, A.; Serrano, P.; Bajador, E.; Esteva, F.; Benito, F.; Sáinz, R. Evidence of the aspirin use in both upper and lower gastrointestinal perforation. Gastroenterology 1997; 112: 683-689.

Landolfi R; Mower RL; Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. Biochem Pharmacol 1984; 33 (9), pp. 1525-30.

Langer RD. Criqui MH. Reed DM. Lipoproteins and blood pressure as biological pathways for effect of moderate alcohol consumption on coronary heart disease. Circulation. 85(3):910-5, 1992.

Lanningham-Foster L; Chen C; Chance DS; Loo G. Grape extract inhibits lipid peroxidation of human low density lipoprotein. Biol Pharm Bull 1995; 18 (10), pp. 1347-51.

Laparra, J.; Michaud, J.; Masquelier, J Etude pharmacocinétique des oligomères flavanoliques. Plant Med Phytothér, 1977, 11, 133-142.

Laughton MJ; Evans PJ; Moroney MA; Hoult JR; Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. Biochem Pharmacol, 1991; 42, 1673-81.

Lavy A; Fuhrman B; Markel A; Dankner G; Ben-Amotz A; Presser D; Aviram M. Effect of dietary supplementation of red or white wine on human blood chemistry, hematology and coagulation: favorable effect of red wine on plasma high-density lipoprotein. Ann Nutr Metab, 1994; 38 (5), pp. 287-94.

Le Marchand L; Murphy SP; Hankin JH; Wilkens LR; Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. J Natl Cancer Inst, 2000; 92, pp. 154-60.

Lea, A.; Bridle, P.; Timberlake, C.; Singleton, V. The procyanidins of white grapes and wine. Am. J. Enol. Vitic., vol 30, nº 4, 1979.

Lee, M.-J.; Wang, Z.-Y.; Li, H.; Chen, L.; Sun, Y.; Gobbo, S.; Balentina, B. A.; Yang, C. S. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. (1995), 4: 393-399.

Lee, MJ.; Maliakal, P.; Chen, L. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002; 11: 1025-32.

Leese, H. J.; Semenza, G. On the identity between the small intestinal enzymes phorizin hydrolase and glycosylceramidase. J. Biol. Chem. (1973), 248: 8170-8173.

Leighton F, Castro C, Barriga C, Urquiaga I. Vino y Salud. Estudios epidemiológicos y posibles mecanismos de los efectos protectores. Rev Med Chile 1997;125;483-491.

Leighton, F.; Urquiaga, I. Polifenoles del Vino y Salud Humana. Antioxidantes y Calidad de vida, 2000; 7: 5-13.

Leikert JF; Räthel TR; Wohlfart P; Cheynier V; Vollmar AM; Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. Circulation, 2002; 106 (13), pp. 1614-7.

Leukel-Lenz, A. Untersucht zur pharmakologischen Wirkung von Crataegusfraktionen und deren analytische Charakterisierung. Tesis Doctoral. Universidad de Marburg. Alemania, 1988.

Leupold, G.; Drawert, F. Zur analytick phenolischer Verbindungen im Bier. Brauwissenschaft. (1981), 34: 205-210.

Levine, M.; Conry-Cantilena, C.; Wang, Y.; Welch, R. W.; Washko, P. W.; Dhariwal, K. R.; Park, J. B.; Lazarev, A.; Graumlich, J. F.; King, J.; Cantilena, L. R. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1996), 93: 3704-3709.

Li C; Lee MJ; Sheng S; Meng X; Prabhu S; Winnik B; Huang B; Chung JY; Yan S; Ho CT; Yang CS. Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. Chem Res Toxicol, 2000; 13, pp. 177-84.

Li, H.; Förstemann, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J. Pathol. 2000; 190, 244-54.

Liao S; Hiipakka RA. Selective inhibition of steroid 5 alpha-reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. Biochem Biophys Res Commun, 1995; 214, pp. 833-8.

Lin YL; Lin JK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. Mol Pharmacol, 1997; 52 (3), pp. 465-72.

Lin, YY.; Ng, K.; Yang, S. J. Chromatogr., 1993, 629, 389.

Liu Y; Liu G. Isorhapontigenin and resveratrol suppress oxLDL-induced proliferation and activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases of bovine aortic smooth muscle cells. Biochem Pharmacol, 2004; 67 (4), pp. 777-85.

Llópiz N; Puiggròs F; Céspedes E; Arola L; Ardévol A; Bladé C; Salvadó MJ. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. J Agric Food Chem 2004; Vol. 52 (5), pp. 1083-7.

Loft, S.; Poulsen, H. Antioxidant intervention studies related to DNA damage, DNA repair and gene expression. Free Rad. Res. (2000)., 33, pp 67-83.

López-Vélez, M.; Martínez-Martínez, F.; Del Valle-Ribes, C. The study of Phenolic Compounds as natural Antioxidants in Wine. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43 (3): 233 – 244, 2003.

Lu CM; Lan SJ; Lee YH; Huang JK; Huang CH; Hsieh CC. Tea consumption: fluid intake and bladder cancer risk in Southern Taiwan. Urology, 1999; 54, pp. 823-8.

Lugasi, A.; Hovari, J. Antioxidants properties of Commercial Alcoholic and non Alcoholic Beverages. Nahrung/Food 47, 2003, N° 2, pp 79 – 86.

Lunte, S. M.; Blakenship, K. D.; Read, S. A. Detection and identification of procyanidins and flavanols in wine by dual - electrode liquid chromatography-electrochemistry. Analyst. 113 (1): 99-102. 1988.

Macheix JJ. Sapis JC. Fleuriet A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. Review Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 30(4):441-86, 1990.

Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.

Madigan, D.; McMurrough, I.; Smyth, MR. Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. Analyst. 119(5):863-8, 1994 May. 94346585

Malaveille C. Hautefeuille A. Pignatelli B. Talaska G. Vineis P. Bartsch H. Dietary phenolics as anti-mutagens and inhibitors of tobacco-related DNA adduction in the urothelium of smokers. Carcinogenesis. 17(10):2193-200, 1996

Manach C; Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. Free Radic Res, 2004; 38 (8), pp. 771-85.

Manach C; Morand C; Gil-Izquierdo A; Bouteloup-Demange C; Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. Eur J Clin Nutr, 2003; 57 (2), pp. 235-42.

Manach C; Scalbert A; Morand C; Rémésy C; Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr, 2004; 79 (5), pp. 727-47.

Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigné, C.; Texier, O.; Régéat, F.; Rémésy, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. FEBS Lett. (1998), 426: 331-336.

Manach, C.; Morand, C.; Texier, O.; Favier, M. L.; Agullo, G.; Demigné, C.; Régéat, F.; Rémésy, C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. J. Nutr. (1995), 125: 1911-1922.

Mangiapane, EH.; Salter, A. Diet, Lipoproteins and Coronary Heart Disease. A Biochemical Perspective. Nottingham: Nottingham University Press.

Martens JS; Lougheed M; Gómez-Muñoz A; Steinbrecher UP. A modification of apolipoprotein B accounts for most of the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. J Biol Chem. 1999; 274 (16), pp. 10903-10.

Martin S; Andriambelison E; Takeda K; Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. Br J Pharmacol, 2002; 135 (6), pp. 1579-87.

Martínez-Valverde, I.; Periago, M. J.; Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de nutrición (2000).

Masquelier J. Michaud J. Laparra J. Dumon MC. Flavonoids and pycnogenols. International Journal for Vitamin & Nutrition Research. 49(3):307-11, 1979.

Masquelier, J. Action protectrice du vin sur l'ulcère gastrique. Industrie delle bevande. 1986, 13-16.

Masquelier, J. Efectos fisiológicos del vino: su parte en el alcoholismo. Simposio Internacional "El Vino y la Salud" (1987).

Masri, M. S.; Booth, A. N.; DeEds, F. The Metabolism and Acid degradation of Quercetin. Arhc. Biochem. Biophys. 1959, 85: 284-286.

Matsuo N; Yamada K; Yamashita K; Shoji K; Mori M; Sugano M. Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B4 release from rat peritoneal exudate cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1996; 32, 340-4.

Mattivi F; Zulian C; Nicolini G; Valenti L. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. Ann N Y Acad Sci, 2002; 957, pp. 37-56.

Maxwell, S.; Cruickshank, A.; Thorpe, G. Red wine and antioxidant activity in serum. Lancet. (1994), 344: 193-194.

Mazière C; Alimardani G; Dantin F; Dubois F; Conte MA; Mazière JC. Oxidized LDL activates STAT1 and STAT3 transcription factors: possible involvement of reactive oxygen species. FEBS Lett, 1999; 448 (1), pp. 49-52.

Mc Murrough, I; Mc Dowell, J. J. Anal. Biochem, 1978, 91, 92.



McCaffrey TA. TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis. Cytokine Growth Factor Rev, 2000; 11 (1-2), pp. 103-14.

McDonald MS, Hughes M, Burns J, et al. Survey of the Free and Conjugated Myricetin and Quercetin Content of Red Wines of Different Geographical Origins. J Agric. Food Chem 1998;46:368-375.

McEvily, AJ.; Iyenger, R.; Gross, A. Inhibition of polyphenol oxidase by phenolic compounds. En: Phenolic Compounds in Food and their effects on health I: Analysis, Occurrence and Chemistry, Ho, CT.; Lee, CT.; Huang, MT. Eds., ACS Symposium series 506. American Chemical Society. Washington DC, 1992: 318.;321.

McKay DL; Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. J Am Coll Nutr, 2002; 21, pp. 1-13.

Mellor, J. D.; Layne, D. S. Steroid  $\beta$ -D-glucosidase activity in rabbit tissues. J. Biol. Chem. (1971), 246: 4377-4380.

Mellor, J. D.; Layne, D. S. Steroid  $\beta$ -D-glucosidase: purification of the enzyme from rabbit liver. J. Biol. Chem. (1974), 249: 361-365.

Mendilaharsu M; De Stefani E; Deneo-Pellegrini H; Carzoglio JC; Ronco A. Consumption of tea and coffee and the risk of lung cancer in cigarette-smoking men: a case-control study in Uruguay. Lung Cancer, 1998; 19, pp. 101-7.

Meng X; Lee MJ; Li C; Sheng S; Zhu N; Sang S; Ho CT; Yang CS. Formation and identification of 4'-O-methyl-(-)-epigallocatechin in humans. Drug Metab Dispos, 2001; 29 (6), pp. 789-93.

Miyazawa T; Nakagawa K; Kudo M; Muraishi K; Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. J Agric Food Chem, 1999; 47, pp. 1083-91.

Mizuma, T; Awazu, S. Inhibitory effect of phloridzin and phloretin on glucuronidation of p-nitrophenol, acetaminophen and 1-naphthol: kinetic demonstration of the influence of glucuronidation metabolism on intestinal absorption in rats. Biochem. Biophys. Acta. (1998), 1425: 398-404.

Mizutani K; Ikeda K; Kawai Y; Yamori Y. Extract of wine phenolics improves aortic biomechanical properties in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). J Nutr Sci Vitaminol, 1999; 45 (1), pp. 95-106.

Mojarrabi, B.; Mackenzie, P. I. Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998), 247: 704-709.

Morand C; Crespy V; Manach C; Besson C; Demigné C; Rémésy C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. Am J Physiol, 1998; 275, pp. R212-9.

Morand C; Manach C; Crespy V; Remesy C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. Free Radic Res, 2000; 33 (5), pp. 667-76.

Morimoto, S.; Nonaka, GI.; Nishioka, I. Tannins and Related Compounds. XXXV. Proanthocyanidins with doubly linked Unit from Root Bark of *Cinnamanum sieboldii*. Meisner. Chem. Pharm. Bull.1985. 33, 4338.

Mousavi Y; Adlercreutz H. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992; 41 (3-8), pp. 615-9.

Muñoz SE; Navarro A; Lantieri MJ; Fabro ME; Peyrano MG; Ferraroni M; Decarli A; La Vecchia C; Eynard AR. Alcohol, methylxanthine-containing beverages, and colorectal cancer in Córdoba, Argentina. Eur J Cancer Prev, 1998; 7, pp. 207-13.

Nagano J; Kono S; Preston DL; Moriwaki H; Sharp GB; Koyama K; Mabuchi K. Bladder-cancer incidence in relation to vegetable and fruit consumption: a prospective study of atomic-bomb survivors. Int J Cancer, 2000; 86, pp. 132-8.

Nagata C; Kabuto M; Shimizu H. Association of coffee, green tea, and caffeine intakes with serum concentrations of estradiol and sex hormone-binding globulin in premenopausal Japanese women. Nutr Cancer, 1998; 30, pp. 21-4.

Nakachi K; Suemasu K; Suga K; Takeo T; Imai K; Higashi Y. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. Jpn J Cancer Res, 1998; 89, pp. 254-61.

Nakagawa, K.; Okuda, S.; Miyazawa, T. Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epicallocatechin into human plasma. Biosci. Biotechnol. Biochem. (1997), 61: 1981-1985.

Nakagawa, Y.; Shetlar, M. R.; Wender, S. H. Urinary products from Quercetin in Neomycin-treated rats. Biochem. Biophys. Acta. (1965), 97: 233-241.

Nanjo F; Honda M; Okushio K; Matsumoto N; Ishigaki F; Ishigami T; Hara Y. Effects of dietary tea catechins on alpha-tocopherol levels, lipid peroxidation, and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla oil diets. Biol Pharm Bull, 1993; 16, 1156-9.

Ndiaye M; Chataigneau T; Andriantsitohaina R; Stoclet JC; Schini-Kerth VB Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. Biochem Biophys Res Commun, 2003; 310 (2), pp. 371-7.

Nguyen TD; Canada AT. Citrus flavonoids stimulate secretion by human colonic T84 cells. J Nutr, 1993; 123, 259-68.

Nicholson, J K.; Wilson, I D. Understanding "global" systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism. Vol. 2, pp 668 - 676, 2003.

Nielsen, S. E.; Breinholt, V.; Justesen, U.; Cornett, C.; Dragsted, L. O. In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. Xenobiotica. (1998), 28: 389-401.

Niessen, W. M.; Van der Greef, J. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry : principle and applications. Marcel Dekker Inc. New York, 1992.

Nigdikar SV.; Howard, AN. Red wine polyphenols increase plasma total TGF- $\beta$ . Atherosclerosis, 1997, 1-2, 275 Abstr.

Obisean, T; Hirsch, R.; Kosoko, O. Moderate wine consumption is associated with decreased odds of developing age-related macular degeneration in NHANES-1. J. Am. Gertr. Soc. 1998, 46: 1-7.

Ohno Y; Aoki K; Obata K; Morrison AS. Case-control study of urinary bladder cancer in metropolitan Nagoya. Natl Cancer Inst Monogr, 1985; 69, pp. 229-34.

Okabe S; Fujimoto N; Sueoka N; Suganuma M; Fujiki H. Modulation of gene expression by (-)-epigallocatechin gallate in PC-9 cells using a cDNA expression array. Biol Pharm Bull, 2001; 24 (8), pp. 883-6.

O'Leary KA; Day AJ; Needs PW; Mellon FA; O'Brien NM; Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-



glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol*, 2003; 65 (3), pp. 479-91.

Olthof MR; Hollman PC; Vree TB; Katan MB. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr*, 2000; 130 (5), pp. 1200-3.

Orgogozo JM; Dartigues JF; Lafont S; Letenneur L; Commenges D; Salamon R; Renaud S; Bretelet MB. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the bourdeux area. *Rev Neurol (Paris)*, 1997; 153, pp. 185-92.

Osakabe, N.; Yamagishi, M.; Natsume, M.; Takizawa, T.; Nakamura, T.; Osawa, T. Caffeinated beverages: health benefits, physiological effects and chemistry. American Chemical Society. (2000) Chapter 11.

Ozmianski, J.; Bourzeix, M. Pol. J. Food Nutri. Sci. 1996, 5, 43.

Pace-Asciak CR; Rounova O; Hahn SE; Diamandis EP; Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta*, 1996; 246 (1-2), pp. 163-82.

Paganga, G.; Al-Hashim, H.; Khodr, H.; Scott, BC.; Aruoma, OI.; Hidr, RC.; Halliwell, B.; Rice-Evans, CA. Mechanism of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Report*, 1996, 2, 359-364.

Parhami F; Fang ZT; Fogelman AM; Andalibi A; Territo MC; Berliner JA. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest*, 1993; 92 (1), pp. 471-8.

Paschka AG; Butler R; Young CY. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett*, 1998; 130, pp. 1-7.

Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. The interaction of anthocyanins with bilirubin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296, 631-6.

Pellegrini N; Pareti FI; Stabile F; Brusamolino A; Simonetti P. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr*, 1996; 50 (4), pp. 209-13.

Petrakis, P. L.; Kallianos, A. G.; Wender, S. H.; Shetlar, M. R. Metabolic Studies of Quercetin labeled with <sup>14</sup>C. (1959), 85: 264-271.

Pignatelli P; Pulcinelli FM; Celestini A; Lenti L; Ghiselli A; Gazzaniga PP; Violi F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72 (5), pp. 1150-5.

Pinent M; Blay M; Bladé MC; Salvadó MJ; Arola L; Ardévol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 2004; 145 (11), 4985-90.

Piskula MK. Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats. *J Nutr*, 2000; 130 (7), pp. 1766-71.

Piskula, M.; Terao, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.* (1998), 1172-1178.

Piskula, M.; Yamakoshi, J.; Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* (1999), 447: 287-291.

Plumb, G. W.; De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Cheynier, V.; Williamson, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerization, galloilation and glycosylation. Free Rad. Res., 1998, 29, 351-358.

Plumb, G. W.; Garcia Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Rhodes, M.; Ridley, S.; Williamson, G. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. J. Sci. Food Agric. (1999), 79: 390-392.

Porter, L. J. Methods in plant biochemistry. Plant phenolics. Academic Press. London, 1989, vol. 1, pp. 389-419.

Pratt, DE. Natural antioxidant from plant material. In: Huang, MT.; Ho, CT.; Li, CY. Eds., ACS Symposium series 507. Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society. Washington DC, 1992: 54-68.

Price SF, Breen PJ, Vallado M, Watson BT. Wine Phenolic Responses to Cluster Sun Exposure. ASEV Tech 1994 Abstr. 4.

Price, AR.;Bacon, JR.; Rhodes, MJC. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onions (*Allium cepa*). J. Agric. Food Chem. 1997; 45: 938-942.

Price, KR.; Rhodes, MJC. Analysis of the Major Flavonol Glycosides Present in Four Varieties of Onion (*Allium cepa*) and Changes in Composition resulting in Autoanalysis. J. Sci Food Agric. 1997; 74:331-339.

Prieur, C. En la conferencia Internacional sobre polifenoles. Palma de Mallorca, 1994.

Rechner AR; Kuhnle G; Bremner P; Hubbard GP; Moore KP; Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. Free Radic Biol Med, 2002; 33 (2), pp. 220-35.

Rechner AR; Spencer JP; Kuhnle G; Hahn U; Rice-Evans CA. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. Free Radic Biol Med, 2001; 30 (11), pp. 1213-22.

Recio MC; Giner RM; Mnez S; Talens A; Cubells L; Gueho J; Julien HR; Hostettmann K; Rios JL. Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticolum* depending on single or repeated local TPA administration. Planta Med, 1995; 61, 502-4.

Rein D; Paglieroni TG; Pearson DA; Wun T; Schmitz HH; Gosselin R; Keen CL. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. J Nutr, 2000; 130, pp. 2120S-6S.

Reinli, K.; Block, G. Phytoestrogen content of foods: a compendium of literature values. Nutr. Cancer Int. J. (1996), 26: 123-148.

Renaud SC; Guguen R; Schenker J; d'Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. Epidemiology, 1998; 9, pp. 184-8.

Renaud SC; Ruf JC. Effects of alcohol on platelet functions. Clin Chim Acta, 1996; 246 (1-2), pp. 77-89.

Renaud, S., Ruf, J.C. The French paradox: vegetables or wine. Circulation 1994; 90:3118-3119.

Renaud, S; De Lorgeril, M. Wine, Alcohol, platelets and the French Paradox for Coronary Heart Disease. The Lancet (1992), 339; 1523-1526.

Rendig, SV.; Symons, D.; Longhurst, JC.; Amsterdam, EA. Effects of red wine, alcohol and the red wine flavonoid, quercetina, on isolated coronary resistance and conductance arteries. Journal of th American College of Cardiology, 2000, 35, 245A.

Revilla, E; Alonso, E.; Bourzeix, M.; Heredia, N. Flavors and off-flavors, proceedings of the 6<sup>th</sup> International Flavor Conference, Rethymnon, Creta. Grecia. 1989.

Ribereau-Gayon, P. Les Composés Phénoliques des Végétaux (1968). Ed. Dunod, París.

Ricardo da Silva, J. M.; Cheyner, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Cabanis, F. C.; Bourzeix, M. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. J. Sci. Food Agric. (1991), 56: 111-125.

Ricardo da Silva, J. M.; Rosec, J. P.; Bourzeix, M.; Mourgues, J.; Moutounet, M. Dimer and trimer procyanidins in Carignan and mourvedre grapes and red wines. Vitis. (1992), 32: 55-63.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 1997;2:152-159.

Rice–Evans, CA.; Miller, J.; Paganga, G. Structure–Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 1996; 20 (7): 933–956.

Richelle M; Pridmore-Merten S; Bodenstab S; Enslin M; Offord EA. Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. J Nutr, 2002; 132 (9), pp. 2587-92.

Rigaud, J; Escribano-Bailón, M. T.; Prieur, C.; Souquet, J. M.; Cheyner, V. J. Chromatogr. A, 1993, 654, 255.

Rimm EB; Katan MB; Ascherio A; Stampfer MJ; Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. Ann Intern Med, 1996; 125, 384-9.

Rimm EB; Williams P; Fosher K; Criqui M; Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. BMJ, 1999; 319, pp. 1523-8.

Rimm, E. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. JAMA, 1998; 279: 359-364.

Rios LY; Bennett RN; Lazarus SA; Rémésy C; Scalbert A; Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. Am J Clin Nutr, 2002; 76 (5), pp. 1106-10.

Rodríguez Artalejo F; Banegas JR; García Colmenero C; del Rey Calero J. Lower consumption of wine and fish as a possible explanation for higher ischaemic heart disease mortality in Spain's Mediterranean region. Int J Epidemiol, 1996; 25, pp. 1196-201.

Roeder, A; Lam, T.; Galensa, R. Monatsschrift für Brauwissenschaft, 1995, 48, 390.

Rohr, G. E. Analytical investigation and isolation of procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. Tesis Doctoral (1999). Swiss Federal Institute of Technology. Zurich.

Romay C, del Castillo MC, Pascual C, et al. Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. Ciencia e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science 1996;48:86-95.

Rosenkranz S; Knirel D; Dietrich H; Flesch M; Erdmann E; Böhm M. Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the 'French paradox'. FASEB J, 2002; 16 (14), pp. 1958-60.

Roston, D. A.; Kissinger, P. T. Identification of phenolic constituents in commercial beverages by liquid chromatography with electrochemical detection. Analytical Chemistry 53 (11): 169 5-9, 1981.

Roussef, R. L.; Martin, S. F.; Youtsey, C. O. Quantitative survey of narirutin, naringin, heperidin and neohesperidin in *Citrus*. J. Agric. Food Chem. (1987), 35: 1027-1030.

Ruf JC; Berger JL; Renaud S. Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats. Relation to tannins and lipid peroxidation. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995; 15 (1), pp. 140-4.

Russo P; Tedesco I; Russo M; Russo GL; Venezia A; Cicala C. Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2001; 11 (1), pp. 25-9.

Saija A; Scalese M; Lanza M; Marzullo D; Bonina F; Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. Free Radic Biol Med, 1995; 19, 481-6.

Sallustio BC; Sabordo L; Evans AM; Nation RL. Hepatic disposition of electrophilic acyl glucuronide conjugates. Curr Drug Metab, 2000; 1 (2), pp. 163-80.

Sánchez de Medina F; Gálvez J; Romero JA; Zarzuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. J Pharmacol Exp Ther, 1996; 278, 771-9.

Sanders TA. Overview of bioactive compounds in foods. Biochem Soc Trans, 1996; 24, 771-5.

Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. J. Food Sci. Agric. (in press). (2000).

Sarkar, S A.; Howarth, R E. J. Agric. Food Chem. 1976, 24, 317.

Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, et al. Varietal Differences in the Phenolic Content and Superoxide Radical Scavenging Potential of Wines from Different Sources. J Agric. Food Chem 1996; 44:37-41.

Scalbert, A. Plant polyphenols, synthesis, properties and significance. Plenum Press. London, 1992; vol. 59, pp. 259-280.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. J. Nutr. 130: 2073S–2085S, 2000.

Scheline RR. CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds, Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.

Schneider, H.; Schwiertz, A.; Collins, M. D.; Blaut, M. Anaerobic transformation of Quercetin -3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. Arch. Microbiol. (1999), 171: 81-91.

Schwarzwälder, D. Die Weine Spaniens. München, 1998.

Schwitters, B.; Masquelier, J. OPC in practice: The hidden story of proanthocyanidins, Nature's most powerful and patented antioxidant (Rome, Italy: Alfa Omega Editrice, 1995), p. 74.

Seigneur M.; Bonnet, J.; Dorian, B.; Benchimol, D.; Drouillet, F.; Gouverneur, G.; Larrue, J.; Crockett, R.; Boisseau, MR.; Ribereau-Gayon, P.; Bricaud, H. Effect of the consumption of alcohol, white wine and red wine on platelet function and serum lipids. Journal of applied Cardiology, 1990, 5, 215–222.

Sen CK; Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. Mol Cell Biochem, 2001; 216 (1-2), pp. 1-7.

Serafini, M.; Ghiselli, A.; Fero-Luzzi, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. Eur. J. Clin. Nutr. (1996), 50: 28-32.

Serafini, M.; Maiani, G.; Fero-Luzzi, A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. J. Nutr. (1998), 128: 1003-1007.

Sesink AL; Arts IC; Faassen-Peters M; Hollman PC. Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. J Nutr, 2003; 133 (3), pp. 773-6.

Sesink AL; O'Leary KA; Hollman PC. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. J Nutr, 2001; 131 (7), pp. 1938-41.

Setchell KD; Brown NM; Desai P; Zimmer-Nechemias L; Wolfe BE; Brashear WT; Kirschner AS; Cassidy A; Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. J Nutr, 2001; 131, pp. 1362S-75S.

Setchell KD; Brown NM; Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. J Nutr, 2002; 132 (12), pp. 3577-84.

Setchell KD; Brown NM; Zimmer-Nechemias L; Brashear WT; Wolfe BE; Kirschner AS; Heubi JE. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. Am J Clin Nutr, 2002; 76 (2), pp. 447-53.

Setchell KD; Lawson AM; Borriello SP; Harkness R; Gordon H; Morgan DM; Kirk DN; Adlercreutz H; Anderson LC; Axelson M. Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer. Lancet, 1981; 2, pp. 4-7.

Sfakianos J; Coward L; Kirk M; Barnes S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. J Nutr, 1997; 127 (7), pp. 1260-8.

Shahat AA. Hammouda F. Ismail SI. Azzam SA. De Bruyne T. Lasure A. Van Poel B. Pieters L. Vlietinck AJ. Anti-complementary activity of *Crataegus sinaica*. Planta Medica. 62(1):10-3, 1996

Shahidi, F.; Naczki, M. Food phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Tecnominc, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA, 1995.

Shali, N. A.; Curtis, C. G.; Powell, G. M.; Roy, A. B. Sulphation of the Flavonoids Quercetin and Catechin by rat liver. Xenobiotica. 1991, 21: 881-893.

Sharpe PC; McGrath LT; McClean E; Young IS; Archbold GP. Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for atherosclerosis. QJM, 1995; 88, 101-8.

Shaw, I. C.; Griffiths, L. A. Identification of the major Biliary Metabolite of (+)-catechin in the rat. Xenobiotica. 1980, 10: 905-911.

Shelnutt SR; Cimino CO; Wiggins PA; Ronis MJ; Badger TM. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. Am J Clin Nutr, 2002; 76 (3), pp. 588-94.

Shibata K; Moriyama M; Fukushima T; Kaetsu A; Miyazaki M; Une H. Green tea consumption and chronic atrophic gastritis: a cross-sectional study in a green tea production village. J Epidemiol, 2000; 10, pp. 310-6.

Shimoi, K.; Okada, H.; Furugori, M.; Goda, T.; Takase, S.; Suzuki, M.; Hara, Y.; Yamamoto, H.; Kinae, N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- $\beta$ -glucoside in rats and humans. FEBS Lett. (1998), 438: 220-224.

Shoba G; Joy D; Joseph T; Majeed M; Rajendran R; Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. Planta Med, 1998; 64, pp. 353-6.

Shutt DA; Cox RI. Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. J Endocrinol, 1972; 52 (2), pp. 299-310.

Singleton VL. Esau P. Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. Advances in Food Research. Supplement.. 1:1-261, 1988.

Singleton, V. L.; Rossi, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. (1965), 16: 144-158.

Slabbert, N. Plant Polyphenols. Basic life sciences. Plenum Press, London, 1992; Vol 59, pp. 421-436.

Slabbert, N. Plant polyphenols: Synthesis, properties and significance. Plenum press. 1992; Vol 59, pp 421-436

Soleas, G. J.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. Wine as a biological fluid: History, Production and Role in disease prevention. J. Clin. Laborat. Anal. (1997), 11, 287-313.

Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H. Food composition and Nutrition Tables. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, Germany, 1986.

Spanos, G. A.; Wrolstad, R. E. Phenolics of apple, pear and white grape juice and their changes with their changes with processing and storage: a review. J. Agric. Food Chem. (1992), 40: 1478-1487.

Spencer JP; Chaudry F; Pannala AS; Srail SK; Debnam E; Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. Biochem Biophys Res Commun, 2000; 272 (1), pp. 236-41.

Spencer JP; Schroeter H; Crossthwaithe AJ; Kuhnle G; Williams RJ; Rice-Evans C. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. Free Radic Biol Med, 2001; 31 (9), pp. 1139-46.

Spencer JP; Schroeter H; Shenoy B; Srail SK; Debnam ES; Rice-Evans C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. Biochem Biophys Res Commun, 2001; 285 (3), pp. 588-93.

Spencer, C. M.; Cai, Y.; Martin, R. Gaffney, S. H.; Goulding, P. N.; Magnolato, D. Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol-Complexation: some thoughts and observations. Phytochemistry. (1988), 27: 2397-2409.

Spencer, J. P. E.; Chowrimootoo, G.; Choudhury, R.; Debnam, E. S.; Srail, S. K.; Rice-Evans, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate liminal flavonoids. FEBS Lett. (1999), 458: 224-230.

St-Leger, A. S., Cochrane, A.L., Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. Lancet 1979:1017-1020.

Stampfer MJ; Colditz GA; Willett WC; Speizer FE; Hennekens CH. A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. N Engl J Med, 1988; 319 (5), pp. 267-73.

Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. Clin Biochem, 1994; 27 (4), 245-8.

Stein JH; Keevil JG; Wiebe DA; Aeschlimann S; Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. Circulation, 1999; 100 (10), pp. 1050-5.

Strassburg, C. P.; Nguyen, N.; Manns, M. P.; Tukey, R. H. Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. Mol. Pharmacol. (1998), 54: 647-654.



Strassburg, C. P.; Nguyen, N.; Manns, M. P.; Tukey, R. H. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*. (1999), 116: 149-160.

Sugiyama A.; Saitoh, M.; Takahara, A.; Satoh, Y.; Hashimoto, K. Acute cardiovascular effects of a new beverage made of wine vinegar and grape juice, assessed using an *in vivo* rat. *Nutrition Research*, 2003, 23, 1291–1296.

Sun GY; Xia J; Xu J; Allenbrand B; Simonyi A; Rudeen PK; Sun AY. Dietary supplementation of grape polyphenols to rats ameliorates chronic ethanol-induced changes in hepatic morphology without altering changes in hepatic lipids. *J Nutr*, 1999; 129 (10), pp. 1814-9.

Sun, J. S. Association of condensed tannin with Poly(L-Proline): Conformational and Photophysical Approach. Tesis Doctoral. Universidad de Akron. Ohio. 1990.

Suzuki A; Kagawa D; Fujii A; Ochiai R; Tokimitsu I; Saito I. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 2002; 15, pp. 351-7.

Suzuki E; Nagata D; Yoshizumi M; Kakoki M; Goto A; Omata M; Hirata Y. Reentry into the cell cycle of contact-inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor. Possible involvement of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 2000; 275 (5), pp. 3637-44.

Tait, BD.; Dyer, RD.; Auerbach, BJ.; Bornemeier, D.; Guilds-Zamarka, L.; Oxender, M.; Roth, BD.; Trivedi, BK.; Cornicelli, JA.; Catechol based inhibitors of 15-lipoxygenase. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1996, 6 (1), 93–96.

Tajima K; Tominaga S. Dietary habits and gastro-intestinal cancers: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Jpn J Cancer Res*, 1985; 76, pp. 705-16.

Tavani A; Pregolato A; La Vecchia C; Favero A; Franceschi S. Coffee consumption and the risk of breast cancer. *Eur J Cancer Prev*, 1998; 7, pp. 77-82.

Tebib K; Rouanet JM; Besançon P. Effect of grape seed tannins on the activity of some rat intestinal enzyme activities. *Enzyme Protein*, 1994; 48 (1), 51-60.

Tedesco, I.; Russo, M.; Iacomino, G.; Russo, GL.; Carraturo, A.; Faruelo, C.; Moio, L.; Palumbo, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11, 114–119.

Teissedre, PL.; Frankel, EN.; Waterhouse, AL.; Peleg, H.; German, JB. Inhibition of *in vitro* LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, 70, 55–61.

Terril, TH.; Waghom, GC.; Wooley, DJ.; McNabb, WC.; Barry, TN. Assay and digestion of <sup>14</sup>C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *Br J Nutr*, 1994, 72, 467–77.

Thiagaran, G.; Chandani, S.; Sundary, CS.; Rao, SH.; Kulkarni, AV.; Balasubramanian, D. Antioxidant Properties of Green and Black Tea and their potencial ability to Retard the Progression of the Eye Lens Cataract. *Exp. Eye Res*, 2001; 73, 393–401.

Thies, M.; Fisher, R. *Mikrochimika Acta*, 1971, 1, 9.

Thurnham DI; Davies JA; Crump BJ; Situnayake RD; Davis M. The use of different lipids to express serum tocopherol: lipid ratios for the measurement of vitamin E status. *Ann Clin Biochem*, 1986; 23, pp. 514-20.

Tilgmann C; Ulmanen I. Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996; 684 (1-2), pp. 147-61.

Tits, M.; Poukens, P.; Angenot, L.; Dierckxsens, Y. Thin layer chromatographic analysis of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves. J. Pharm. Biomed. Anal. 1992, 10, 1097.

Treutter, D. En Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science. 1994; Vol. 381, pp. 789-796.

Truelsen T; Gronbaek M; Schnohr P; Boysen G. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke : the copenhagen city heart study. Stroke, 1998; 29, pp. 2467-72.

Tsimidou, M. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. Ital. J. Food Sci. 1998; 2 (10):99-116.

Tsimikas S; Palinski W; Witztum JL. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001; 21 (1), pp. 95-100.

Tsubono Y; Nishino Y; Komatsu S; Hsieh CC; Kanemura S; Tsuji I; Nakatsuka H; Fukao A; Satoh H; Hisamichi S. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. N Engl J Med, 2001; 344, pp. 632-6.

Tsushida, T.; Svzuki, M. Content of flavonol glucosides and some properties of enzymes metabolizing the glucosides in onion. 3. Flavonoid in fruits and vegetables. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. (1996), 43: 642-649.

Uehara M; Sugiura H; Sakurai K. A trial of oolong tea in the management of recalcitrant atopic dermatitis. Arch Dermatol, 2001; 137, pp. 42-3.

Ueno, I.; Nakeno, N.; Hirono, I. Metabolic fate of [<sup>14</sup>C]Quercetin in the ACI rat. Jpn. J. Exp. Med. (1983), 53: 41-50.

Unno, T.; Kondo, K.; Itakura, H.; Takeo, T. Analysis of (-)-epigallocatechin gallate in human serum obtained after ingesting green tea. Biosci. Biotechnol. Biochem. (1996), 60: 2066-2068.

Urquiaga, I.; Urzúa, U.; Leighton, F. Antioxidantes Naturales. Impacto en la Salud. 8º Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. 1999.

Ursini F, Tubaro F, Rapuzzi P, Zamburlini A, Maiorino M. (1996) Wine Antioxidants: Effects *in vitro* and *in vivo*. Wine and Human Health. Udine 9-11, 1996.

US Department of Agriculture. USDA database for the flavonoid content of selected foods. March 2003. Internet: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/> (accessed 20 May 2003).

Valcic S; Timmermann BN; Alberts DS; Wächter GA; Krutzsch M; Wymer J; Guillén JM. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. Anticancer Drugs, 1996; 7 (4), 461-8.

van het Hof, K. H.; deBoer, H. S. M.; Wiseman, S. A.; Lien, N.; Weststrate, J. A.; Tijburg, L. B. M. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in human. Am. J. Clin. Nutr. (1997), 66: 1125-1132.

van het Hof, K. H.; Wiseman, S. A.; Yang, C. S.; Tijburg, L. B. M. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1999), 220: 203-209.

van Jaarsveld H; Kuyl JM; Schulenburg DH; Wiid NM. Effect of flavonoids on the outcome of myocardial mitochondrial ischemia/reperfusion injury. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1996; 91 (1), 65-75.

Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastre, R. J. Pharm Bioned. Anal. 1989, 7, 1871.



Velioglu, YS.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. J. Agric. Food Chem. 1998; 46 (10):4113-4117

Vinson JA; Teufel K; Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. Atherosclerosis, 2001; 156 (1), pp. 67-72.

Vinson, J. A. Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. Adv. Exp. Med. Biol. (1998), 439: 151-164.

Vinson, J. A.; Hao, Y.; Su, X.; Zubik, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. J. Agric. Food Chem. (1998), 46: 3630-3634.

Vinson, J.A., Hontz, B.A. Phenol Antioxidant Index: Comparative Antioxidant Effectiveness of Red and White Wines. J. Agric. Food Chem 1995; 43:401-403.

Vivas, N; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C.; Augustin, M. J. Int. Sci. Vigne Vin, 1994, 28, 319.

Vogel RA. Vintners and vasodilators: are French red wines more cardioprotective? J Am Coll Cardiol, 2003; 41 (3), pp. 479-81.

Volk C; Kempfski B; Kempfski OS. Inhibition of lactate export by quercetin acidifies rat glial cells in vitro. Neurosci Lett, 1997; 223 (2), 121-4.

Vore, M. Regulation of drug conjugate processing by hepatocellular transport system. In: Kauffman F, ed. Conjugation–deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity. Berlin: Springer, 1994: 311–38.

Wakai K; Ohno Y; Obata K; Aoki K. Prognostic significance of selected lifestyle factors in urinary bladder cancer. Jpn J Cancer Res, 1993; 84, pp. 1223-9.

Wakai, K.; Egami, I.; Kato, K.; Kawamura, A.; Lin, Y.; Nakayama, T.; Wada, M.; Ohno, Y. Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. Nutr. Cancer. (1999), 33: 139-145.

Walle UK; Galijatovic A; Walle T. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. Biochem Pharmacol, 1999; 58 (3), pp. 431-8.

Walle, T.; Eaton, E. A.; Walle U. K. Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenolsulfotransferase. Biochem. Pharmacol. (1995), 50: 731-734.

Wallerath T; Poleo D; Li H; Förstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. J Am Coll Cardiol, 2003; 41 (3), pp. 471-8.

Wang, J. F.; Schramm, D.; Holt, R.; Ensunsa, J. L.; Fraga, C. G.; Schmitz, H.; Keen, C. L. A dose - response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. Journal of Nutrition. 2000, 130, 21155-21195.

Wannamethee SG; Shaper AG. Type of alcoholic drink and risk of major coronary heart disease events and all-cause mortality. Am J Public Health, 1999; 89, pp. 685-90.

Watanabe, S.; Arai, Y.; Haba, R.; Uehara, M.; Adlercreutz, H. Dietary intake of flavonoids and isoflavonoids by Japanese and their pharmacokinetics and bioactivities. In Phytochemicals and Phytopharmaceuticals, ed. F Shahidi, CT Ho, pp 164-74. Cahampaign, IL: AOCS Press.

Waterhouse AL; Frankel EN; Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet, 1993; 341, pp. 1103-4.

Waterhouse, A. L. Wine and heart disease. International Wine and Health Symposium (1996).

Waterhouse, A. L.; Shirley, J. R.; Donovan, J. L. Antioxidants in chocolate. Lancet. (1996), 348: 834.

Waterhouse, A. Wine antioxidants may reduce heart disease and cancer. American Chemical Society. Washington DC, Aug 1994.

Waterman, P. G.; Mole, S.: Analysis of phenolic plant metabolites. Methods in Ecology. Blackwell Scientific Publications, London, 1994; pp. 66-103.

Watson, D. G.; Oliveira, E. J. Solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urin after consumption of Ginkgo biloba tablets. J. Chromatogr. B. (1999), 723: 203-210.

Weinges K and Fruedenberg K.. (1960) Tetrahedron 8 336.

Weisse ME; Eberly B; Person DA. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial affects of bismuth salicylate and red and white wine. BMJ, 1995; 311, pp. 1657-60.

Whitehead, T.P.; Robinson, D.; Allaway, S.; Syms, J.; Hale, A. Effect of rec wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. Clin. Chem. (1995), 41: 32-35.

Williams, R. L. The estrogenic activity of the polyphenolic resveratrol benefits of moderate consumption of red wine. Poliphenols Communications 96. Bourdeux (France).

Williamson, G.; Day, A J.; Plumb, G W.; Coteau, D. Human Metabolic Pathways of Dietary Flavonoids and Cinnamates. Biochemical Society Transactions. Volume 28, part 2, 2000.

Wilson T; Knight TJ; Beitz DC; Lewis DS; Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. Life Sci, 1996; 59 (1),15-21.

Winter, M.; Herrmann, K. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. J. Agric. Food Chem. (1986), 34: 616-620.

Wittig J; Herderich M; Graefe EU; Veit M. Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001; 753 (2), pp. 237-43.

Witztum, JL.; Steinberg, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?. Trends in Cardiovascular Medicine, 2001, 11, 93–102.

Wolfram S; Weber T; Grenacher B; Scharrer E. A Na(+)-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. J Nutr, 1995; 125, pp. 1300-8.

Wormhoudt, L. W.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P.E. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase and epoxi hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. Crit. Rev. Toxicol. (1999), 29: 59-124.

Wu X; Cao G; Prior RL. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. J Nutr, 2002; 132 (7), pp. 1865-71.

Yang CS; Landau JM; Huang MT; Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu Rev Nutr, 2001; 21, pp. 381-406.

Yang, C. S.; Chen, L. S.; Lee, M. J.; Balentine, D.; Kuo, M. C.; Schantz, S. P. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. (1998), 7: 651-354.

Yang, C. S.; Lee, M. J.; Chen, L. S. Human salivary tea catechins levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* (1999), 8: 83-89.

Yoshino, K.; Tomita, I.; Sano, M.; Oguni, I.; Hara, Y.; Nakano, M. Effect of long-term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats. *Age*, 1994, 17, 79-85.

Young, I. S.; Woodside, J. V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, 2001; 54: 176-186.

Young, J. F.; Nielsen, S. E.; Haraldsdottir, J.; Daneshvar, B.; Lauridsen, S. T.; Knuthsen, P.; Crozier, A.; Sandstrom, B.; Dragsted, L. O. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* (1999), 69: 87-94.

Yu GP; Hsieh CC; Wang LY; Yu SZ; Li XL; Jin TH. Green-tea consumption and risk of stomach cancer: a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Causes Control*, 1995; 6, pp. 532-8.

Zdunczyk, Z.; Frejnagel, S.; Krefft, B. Effect of faba beans coat with different phenolics content on the use of protein by rats. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1996, 5/46 (2), 91-101.

Zenebe W; Pechánová O; Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res*, 2003; 52 (4), pp. 425-32.

Zhang Y; Hendrich S; Murphy PA. Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr*, 2003; 133 (2), pp. 399-404.

Zhao J; Jin X; Yaping E; Zheng ZS; Zhang YJ; Athar M; DeLeo VA; Mukhtar H; Bickers DR; Wang ZY. Photoprotective effect of black tea extracts against UVB-induced phototoxicity in skin. *Photochem Photobiol*, 1999 b; 70, pp. 637-44.

Zhao JF; Zhang YJ; Jin XH; Athar M; Santella RM; Bickers DR; Wang ZY. Green tea protects against psoralen plus ultraviolet A-induced photochemical damage to skin. *J Invest Dermatol*, 1999 a; 113, pp. 1070-5.

Zheng W; Doyle TJ; Kushi LH; Sellers TA; Hong CP; Folsom AR. Tea consumption and cancer incidence in a prospective cohort study of postmenopausal women. *Am J Epidemiol*, 1996; 144, pp. 175-82.

Zhu, B. T.; Ezell, E. L.; Liehr, J. G. Catechol-O-methyl-transferase-catalyzed rapid O-methylation of Mutagenic Flavonoids - Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 292-299.







## 2. SÍNTESIS DE PROCIANIDINAS

*"el vino es la vida para el hombre si se bebe con moderación. ¿Qué vida es la de los que del todo carecen de vino?. Fue creado para alegría de los hombres. Alegría del corazón y bienestar del alma es el vino bebido a tiempo y con sobriedad"*  
Eclesiástico 31, versículo 32–36.





## 2.1 Introducción

Los compuestos fenólicos presentes en el vino más estudiados durante los últimos años son las procianidinas. Dentro de éstas, el grupo con el que más ampliamente se está trabajando son las procianidinas de la serie B (dímeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina). La descripción y caracterización de las procianidinas de estructuras de condensación elevadas es compleja al aumentar el grado de polimerización, ya que el número de posibles formas esteroisómeras existentes crece considerablemente, así como su grado de similitud química. Este hecho complica enormemente el proceso de aislamiento de estos compuestos.

Se conocen muchos de los efectos biológicos desempeñados por las procianidinas, aunque es necesario avanzar más en el estudio de la biodisponibilidad de estos compuestos. Este tipo de estudios presentan grandes dificultades debido a la no comercialización de las procianidinas en sus diferentes grados de condensación, ya que solamente se comercializan monómeros flavan-3-oles (como catequina y epicatequina) y algunas procianidinas diméricas de la serie B (como es el caso de la procianidina B2). Además, ninguna casa comercial fabrica los compuestos mencionados anteriormente con marcaje radiactivo, hecho que complica aún más el estudio de la biodisponibilidad de las procianidinas.

Este hecho hace necesario el estudio de las posibles formas existentes de marcaje radiactivo de estos compuestos. En este sentido, es interesante el estudio de la biosíntesis de las procianidinas por parte de las plantas, poniendo especial énfasis en las rutas biosintéticas implicadas en ello, así como en las enzimas y precursores que son esenciales para que la planta sintetice estos compuestos. Del mismo modo, también posee una gran importancia el conocimiento de la reactividad química de las procianidinas con la finalidad de encontrar algún compuesto capaz de reaccionar con éstas para formar un enlace estable. En este caso, la utilización de un compuesto químico marcado radiactivamente podría facilitar el marcaje radiactivo de las procianidinas. Por esta razón, se estudia a continuación la biosíntesis de las procianidinas en las plantas y posteriormente la reactividad química de estos compuestos.

### 2.1.1 Biosíntesis de las procianidinas

El término de procianidina (también llamadas proantocianidinas) surge originalmente de la observación de que cuando se calientan estos compuestos en ácido mineral, las procianidinas dan origen a pigmentos antocianidina. Por consiguiente, es una idea errónea la tendencia existente a creer que las procianidinas son los precursores biosintéticos de las antocianidinas (Grotewold, 1994). La secuencia de reacciones enzimáticas implicadas en la biosíntesis de procianidinas es común con la vía implicada en la biosíntesis de las antocianinas. Los flavonoides son compuestos sintetizados por las plantas a partir de precursores derivados de acetato y fenilpropanoide, y juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en la defensa contra microorganismos y plagas (Dixon, 1999). Tanto la biosíntesis de antocianidinas como la de procianidinas han sido extensamente estudiadas (Hergert, 1989; Stafford, 1990; Forkman, 1993; Helen & Forkman, 1993; Martín & Gerats, 1993; Porter, 1993; Holten & Cornish, 1995; Mol, 1998).

Las enzimas implicadas en la vía de síntesis de las procianidinas se han establecido a nivel de catequina para *Hordeum vulgare* (cebada; Kristiansen, 1986 y 1986) y para *Onobrychis viciifolia* (Tanner & Kristiansen, 1993). Se han clonado la mayoría de los genes que codifican para las enzimas catalíticas y las proteínas reguladoras de la vía de síntesis de las antocianidinas del grano y de algunos tejidos del maíz mediante mutagénesis de transposones y posteriormente de otros tejidos mediante homología con las secuencias ya conocidas (Holten & Cornish, 1995).

La biosíntesis de la catequina deriva de la condensación entre tres moléculas de malonil-CoA con una molécula de cumaroil CoA, interviniendo en esta etapa la enzima calcona sintasa (CHS), para formar una calcona que, tras la acción de diversas enzimas (ver figura 33) dará lugar a una leucocianidina. Todas estas reacciones tienen lugar en el citoplasma de la célula vegetal, donde la leucocianidina formada puede evolucionar de tres formas diferentes: por una parte, puede dar lugar a una antocianidina por acción de la enzima antocianina sintasa

(ANS), que a su vez, y por mediación de la enzima flavanol-UDP-glucosil transferasa (FGT) proporciona antocianina que es convertida a antocianina-glutación mediante la acción de la enzima glutación-S-transferasa (GST). La antocianina-glutación formada puede entrar dentro de la vacuola a través de una bomba transmembrana de glutación (GSH). Por otro lado, la leucocianidina podría pasar desde el citoplasma al interior de la vacuola a través de un transportador intervacuolar (LC?) de flavan-3, 4-diol. Finalmente, por acción de la enzima leucocianidina reductasa (LAR), la leucocianidina puede ser convertida en catequina que mediante un transportador de membrana de unidades flavan-3-ol (C?), pasa desde el citosol al interior de la vacuola donde puede reaccionar con otras unidades monoméricas para formar dímeros, trímeros, etc., sintetizando finalmente procianidinas oligoméricas.

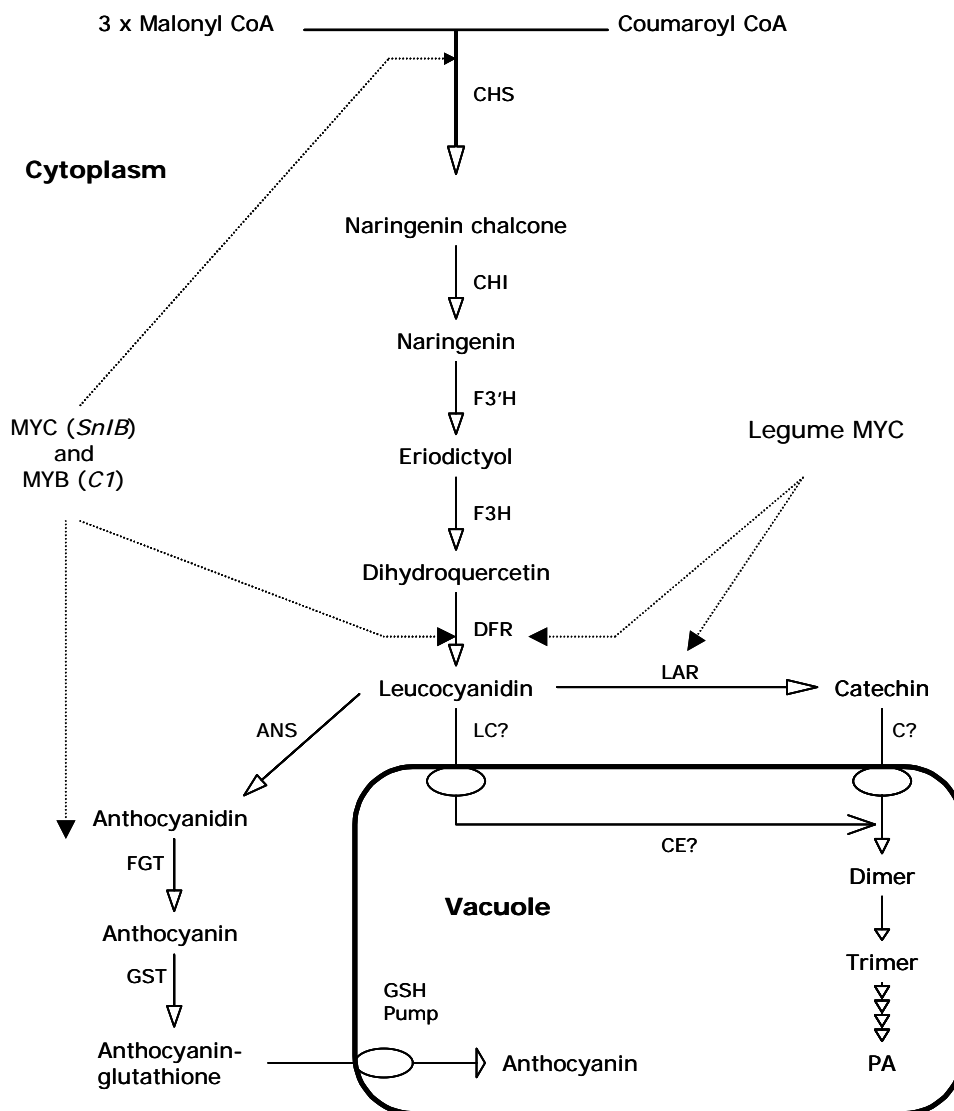


Figura 33. Subcelular compartimentación y control de (pro)antocianidina biosíntesis. La localización intracelular de los intermediarios de antocianidina y proantocianidina biosíntesis se muestran con las enzimas conocidas: chalcone sintasa (CHS), chalcone isomerasa (CHI), flavonoid-3'-hidroxilasa (F3'H), flavanone-3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavanol reductasa (DFR), leucoantocianidina reductasa (LAR), antocianidina sintasa (ANS, también conocida como LDOX), flavanol-UDP-glucosil transferasa (FGT), glutatión-S-transferasa (GST), glutatión transmembrana bomba (GSH pump), la enzima condensante putativa (CE?) e intervacuolar flavan-3, 4 -diol (LC?) y flavan-3-ol (C?) transportadores. La interacción entre las proteínas reguladoras y genes (*italics*) y genes estructurales de maíz antocianidina biosíntesis se muestra por líneas punteadas a la izquierda del diagrama; la interacción propuesta entre una proteína MYC de legumbre y los genes *DFR* y *LAR* es similarmente mostrada a la derecha del diagrama. Adaptado de Tanner, 2003.

De forma muy similar, todos los flavonoides en general derivan de una calcona precursora formada mediante la condensación de una molécula de 4-cumaroyl CoA (producto central de la vía fenil-propanoide) con tres moléculas de malonil CoA (formado a partir de acetato por la acción de acetil CoA carboxilasa) mediante la enzima calcona sintasa (CHS) como puede apreciarse en la figura 34. Esta calcona precursora, mediante la acción de la enzima calcona isomerasa, puede dar lugar a una flavanona que es un producto esencial en la biosíntesis de los flavonoides, ya que en función de la enzima que actúe sobre ella, se obtendrá un compuesto u otro mediante diferentes rutas. Una de estas rutas propicia la síntesis de epicatequina. Muchos genes de la ruta biosintética de los flavonoides han sido clonados de tejidos que poseen la facultad de acumular grandes cantidades de procianidinas (Dixon, 1999). Los cDNAs que codifican para calcona sintasa (CHS), flavonoide 3-hidroxilasa (F3H) y dihidroflavonol reductasa (DFR) han sido clonados de la cebada por Rohde en 1987, Meldgard en 1992 y Kristiansen y Rohde en 1991, respectivamente.

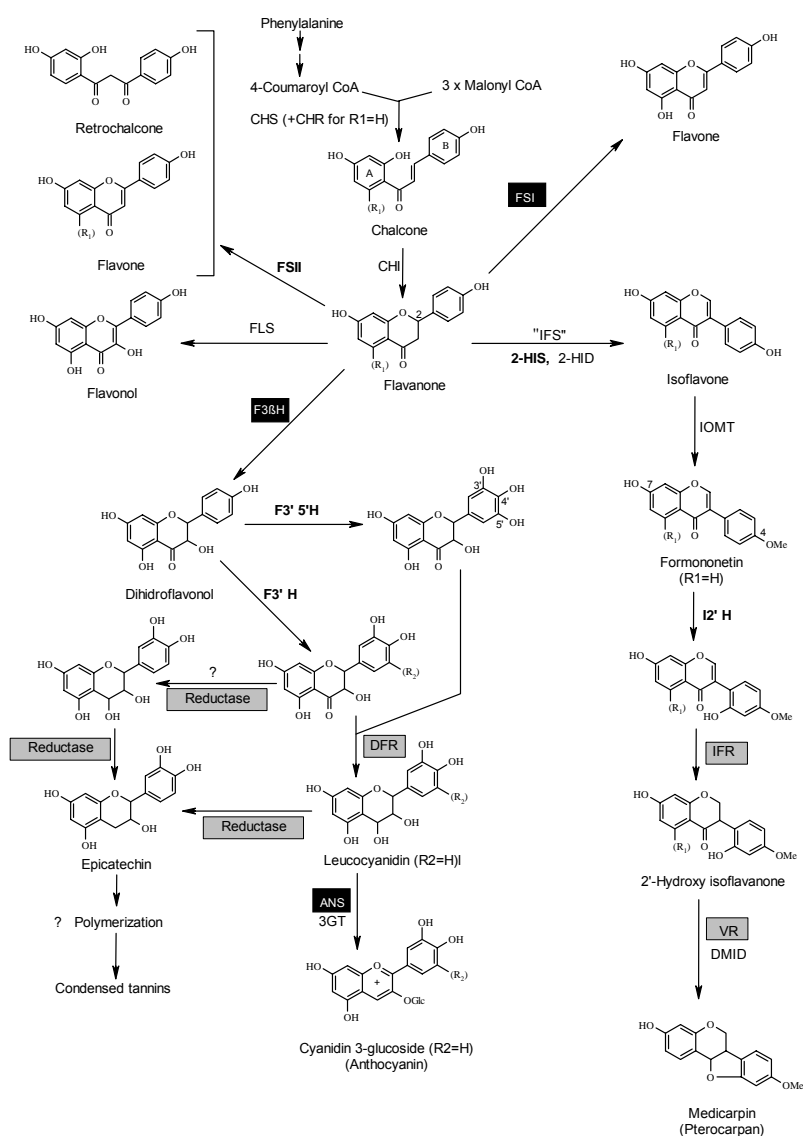


Figura 34. The biosynthesis of the major classes of flavonoid derivatives. The enzymes are: CHS, chalcone synthase; CHR, chalcone reductase; CHI, chalcone isomerase; FSI, flavone synthase I; FSI, flavone synthase II; FLS, flavonol synthase; "IFS", isoflavone synthase, consisting of 2-hydroxy-isoflavanone synthase (2-HIS) and 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (2-HID); F3H, flavanone 3 $\beta$  hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3' 5'H, flavonoid 3' 5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol reductase; ANS, anthocyanidin synthase; 3GT, anthocyanidin 3-glucosyltransferase; IOMT, isoflavone O-methyltransferase; IFR, isoflavone reductase; VR, vestitone reductase; DMID 7, 2'-dihydroxy, 4'-methoxyisoflavanol dehydratase. Enzymes in white are 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, in black bold are cytochrome P450s, and highlighted in gray are NADPH-dependent reductases. Simplifications include not discriminating between the 5-hydroxy (R<sub>1</sub>=OH) and 5-deoxy (R<sub>1</sub>=H) flavonoid and isoflavanoids, for which the loss of the 5-hydroxyl occurs because of the co-action of CHR with CHS, and showing only the anthocyanin pathway leading to the compounds with a di-substituted B-ring (cyanidin derivatives). Parallel pathways function in the formation of the anthocyanins with mono- and tri- substituted B-rings. In the latter, F3' 5'H can act at the level of the dihydroflavonol with a mono- or di- substituted B-ring. The pathway to epicatechin from a dihydroflavonol is shown to follow two routes, both via leucocyanidin. It is unclear whether there is a specific form of DFR that functions only in condensed tannin biosynthesis. The 4'-O-methylation of the B-ring of isoflavones occurs in alfalfa, pea and other legumes, but not in bean or soybean.

Por otra parte, los cDNAs que codifican para la mayoría de las enzimas que intervienen en la ruta biosintética de las antocianidinas de *Vitis vinifera* (uva) han sido clonados por Sparvoli *et al.* en 1994, y cuatro años más tarde se aislaron los cDNAs que codifican para CHS y DFR del pipirigallo (*Onobrychis viciaefolia*, de la familia de las leguminosas) (Joseph, 1998).

Las procianidinas más simples son oligómeros de catequina y galocatequina. Se cree que la polimerización se inicia mediante un ataque nucleófilo de catequina sobre una 3, 4-cis-leucocianidina para formar un dímero (Stafford, 1990). Posteriormente, el dímero ataca a otra molécula de 3, 4-cis-leucocianidina para formar un trímero. Por repetición de este proceso, puede formarse el polímero extendiéndose como una cadena lineal a partir de un grupo inicial catequina, como se representa en la figura 35 (Stafford, 1990).

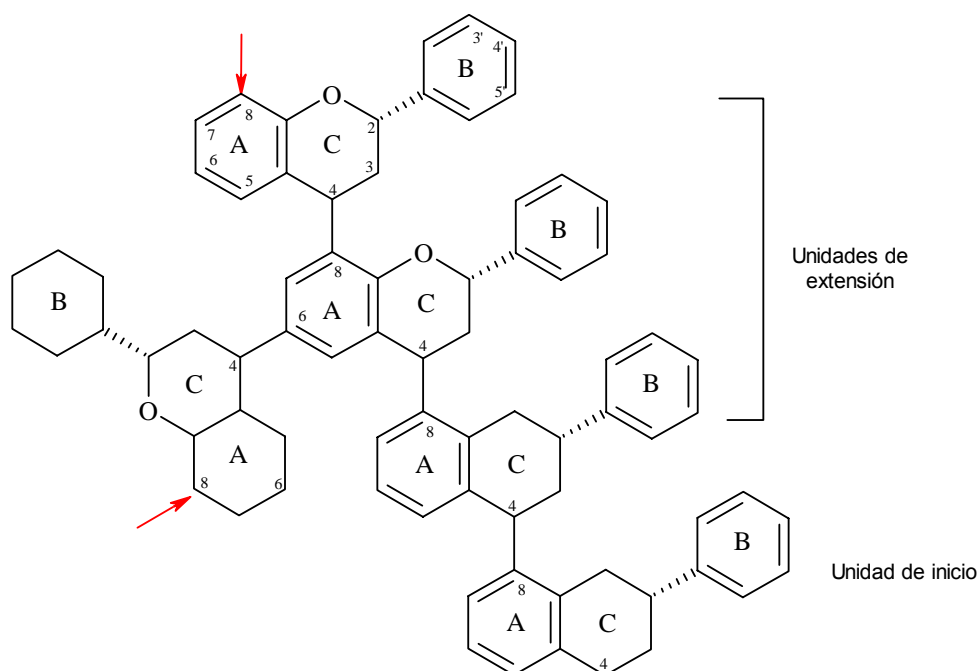


Figura 35: Modelo de un polímero de proantocianidina (después de Stafford, 1990) mostrando la posición y la numeración de los carbonos de los anillos A, B y C, así como los enlaces inter-flavonoides 4-8 y 4-6. Para mayor claridad, no se han mostrado los grupos hidroxilo. Las flechas rojas muestran el lugar por donde las cadenas pueden ser extendidas mediante la adición de otra unidad flavan-3, 4-diol.

La estereoquímica del enlace de los carbonos 2, 3 en los oligómeros de cebada es *trans* y las subunidades flavan-4-ol vecinas están unidas a través de los carbonos C4-C8 para formar un polímero lineal. El enlace 4-8 es el enlace predominante encontrado en la mayoría de las procianidinas. Otros enlaces menos comunes encontrados en este tipo de compuestos son C4-C6 (dando lugar a polímeros con ramificaciones) y dobles enlaces C4-C8 y C4-C6 (Stafford, 1990). No obstante, la estereoquímica observada en las procianidinas de la cebada (una de las plantas más estudiadas) no es típica de las procianidinas más comunes encontradas en otras especies de plantas donde la unidad de extensión predominante son los compuestos 2, 3-*cis*, epicatequina y epigalocatequina (Foo & Porter, 1981). Sin embargo, el compuesto 2, 3-*trans* (catequina) actúa a menudo como iniciador de la cadena en estas procianidinas mixtas (Koupai-Abyazani, 1993a y 1993b; Foo, 1996). Además, una molécula de procianidina contiene varias unidades mediante enlaces simples que dotan potencialmente al polímero de un elevado grado de flexibilidad. Sin embargo, debido a la rotación restringida que posee el enlace interflavánico, los polímeros tienden a formar un rizo o una espiral aleatoria como una verdadera hélice (ver figura 36). Se cree que un polímero que posea bastantes subunidades de catequina, tiende a formar una hélice con giro hacia la derecha (right-handed helix) mientras que un polímero con un gran número de subunidades de epicatequina podría formar una hélice con giro hacia la izquierda (left-handed helix) (Haslam, 1977).

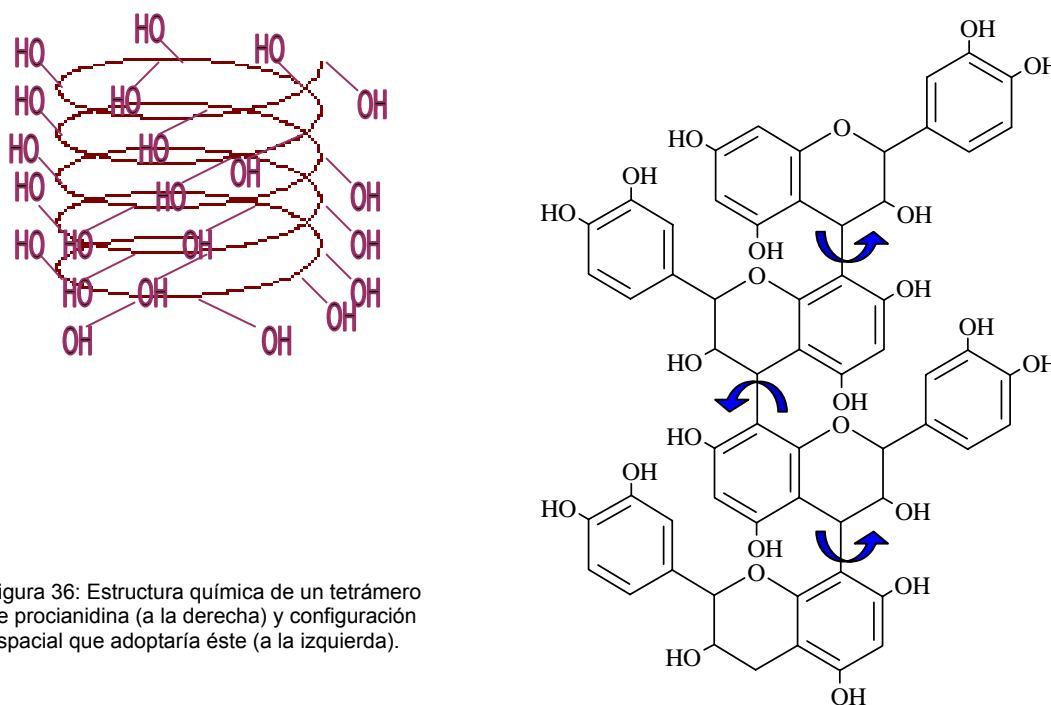


Figura 36: Estructura química de un tetrámero de procianidina (a la derecha) y configuración espacial que adoptaría éste (a la izquierda).

Por otro lado, la biosíntesis de procianidinas puede partir también de naringenina, teniendo lugar una serie de hidroxilaciones en los carbonos 3' y 5' del anillo B y una  $\beta$ -hidroxilación estereoespecífica del carbono 3 sobre el anillo C (ver figura 37), siendo posible que diferentes enzimas compitan con el mismo sustrato para producir el mismo producto final mediante diferentes vías (Stafford 1990). Por ejemplo, la hidroxilación sobre las posiciones 3' ó 3', 5' del anillo B está catalizada por dos enzimas (flavonoide 3'-hidrolasa y flavonoide 3', 5' hidrolasa) que son capaces de hidroxilar tanto la naringenina como el dihidrokaempferol en las posiciones anteriormente mencionadas. Estas enzimas son P450 microsomales y requieren NADPH y O<sub>2</sub> (Heller & Forkman, 1993).

Además, una NADP deshidrogenasa, concretamente la dihidroflavanol reductasa, reduce el grupo carbonilo del carbono 4 de los dihidroflavanoles y dihidrokaempferoles (quercetina o miricetina) a 3, 4-*cis*-leuco-pelargonidina, -cianidina o -delfinidina, respectivamente. Las dihidroflavanol reductasas implicadas en la biosíntesis de las antocianidinas muestran variación por la especificidad de sustrato, por ejemplo, la dihidroflavanol reductasa del maíz actúa preferentemente sobre dihidrokaempferol y dihidroquercetina, mientras que la reductasa de la *Petunia* convierte preferentemente dihidromiricetina (Stafford, 1990). Ninguna dihidroflavanol reductasa envuelta en la biosíntesis de proantocianidinas ha sido, por el momento, substancialmente purificada. Sin embargo, una dihidroflavanol reductasa de *Cryptomeria japonica* parcialmente purificada reduce, preferentemente, dihidroquercetina y no dihidromiricetina (Ishikura, 1988). El grupo hidroxilo en posición 4 de los flavan-3, 4-dioles es eliminado en un simple paso por una leucoantocianidina reductasa, una NADP deshidrogenasa. Se ha demostrado que esta enzima existe en extractos crudos de cebada y pipirigallo (Tañer & Kristiansen, 1993) y en cultivos *in vitro* de abetos y *Ginkgo biloba* (Stafford, 1990).

En cuanto al transporte intervacuolar y al proceso de polimerización, la extensión de las unidades flavan-3, 4-diol de las procianidinas, leucocianidinas, leucodelfinidinas y la unidad inicial flavan-3-ol (catequina o galocatequina) deben entrar en la vacuola para que el proceso de polimerización tenga lugar en su interior (Leeds et al, 1995). Los flavan-3, 4-dioles y los flavan-3-oles son solubles en solventes orgánicos y podrían pasar a través de la membrana mediante difusión pasiva, o bien, podrían ser transportados por transportadores específicos (figura 33; LC? y C?; Tanner, 2003). Podría haber un transportador para cada sustrato o un transportador general. Además, podría ser posible que este transportador de flavonoles fuera similar a la bomba glutatión de membrana que se cree que está envuelta en el transporte de antocianinas. En este caso, sería necesario un paso adicional análogo al paso donde actúa la glutatión-S-transferasa en la biosíntesis de antocianinas (figura 33; GST; Tanner, 2003). Una

vez dentro de la vacuola, los flavan-3, 4-dioles son atacados por flavan 3-oles para formar dímeros. El dímero atacaría entonces a otra molécula de flavan-3, 4-diol para formar un trímero. Este proceso se repetiría hasta la formación de un polímero. Esta polimerización podría ocurrir de forma no enzimática o ser dirigida por alguna enzima (Abrahams, 2003). Stafford propuso en 1990 que el transporte y la polimerización ocurrían simultáneamente sobre la superficie de una transmembrana de un complejo multienzimático.

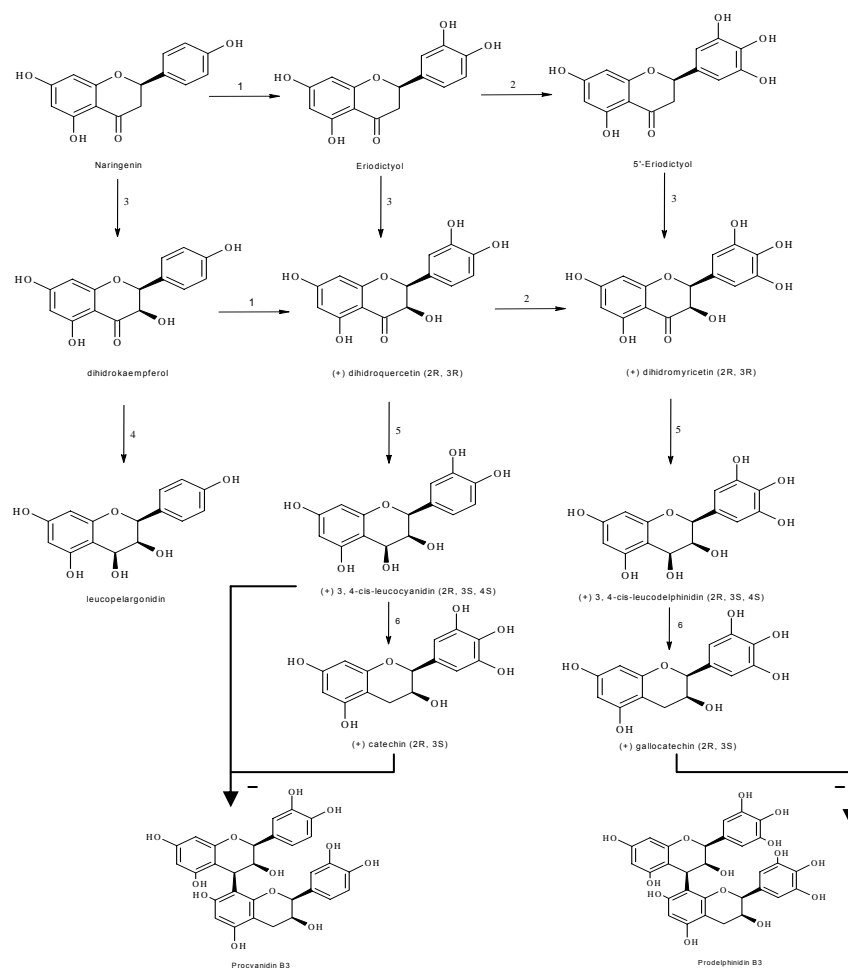


Figura 37: The intermediates of proanthocyanidin biosynthesis. The intermediates from naringenin to the 2, 3- trans proanthocyanidin dimers are shown with the known enzymes: flavonoid-3'-hydrolase (F3'H, 1), flavonoid-3', 5'- hydrolase (F3', 5'H, 2), flavanone-3-hydrolase (F3H, 3); dihydroflavanol reductase (DFR, 4 & 5); leucoanthocyanidin reductase (LAR, 6 & 7). Intervacuolar transport and condensation may be associated with spte 7. Barley testa accumulates the 2, 3-trans proanthocyanidins, however, other plant tissues such as the leaves of *Onobrychis viciifolia* and *Lotus* species also synthesise the 2, 3-cis compounds epicatechin, epigallocatechin and 2, 3-cis proanthocyanidins (not shown). Adapted from Tanner, 2003.

Se ha realizado con éxito la síntesis biomimética de oligómeros de procianidinas en condiciones de pH similares a las que existen en las vacuolas de las plantas (Delcour, 1983). De momento, no se ha obtenido una evidencia de transportadores específicos, sin embargo, es bastante probable que para el proceso de transporte se requiera una célula funcional entera o un protoplasto (Abrahams, 2003). Finalmente, existen similitudes entre la regulación de la copigmentación de antocianinas y de las procianidinas. El nivel y la especificidad tisular de la copigmentación de antocianinas está controlada por un número de genes reguladores (Holten & Cornish, 1995; Mol *et al*, 1998). Estos genes reguladores tienen homología con pro-oncogenes de mamíferos de la familia de proteínas MYC o MYB (Ludwing & Wessler, 1990). Además, se requiere la presencia de un miembro de una de las dos familias de proteínas reguladoras para la expresión coordinada de al menos tres genes que codifican para la calcona sintasa, dihidroflavanol reductasa y flavanol-UDP-glucosil transferasa de la vía de las antocianinas en el maíz (Mol *et al*, 1998).



Estas rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de la biosíntesis de las procianidinas pueden ser utilizadas para marcar radiativamente a estos compuestos, siendo necesario para ello la utilización de un compuesto radiactivo que sea utilizado por la planta y que pueda ayudar a ésta a sintetizar las procianidinas con marca radiactiva. Debe tenerse presente que para asegurar la preservación del isótopo radiactivo en cualquier compuesto marcado, es más útil el marcaje de aquellos átomos que sean químicamente más estables. Por esta razón, es más aconsejable marcar un carbono que forme parte del esqueleto carbonado de una molécula orgánica que el marcaje de un protón fácilmente oxidable o de un grupo amino. De esta forma, el carbono isotópico se puede introducir en las células fotosintéticas como dióxido de carbono marcado ( $^{14}\text{CO}_2$ ), como una molécula marcada que sea precursora en la vía de síntesis de las procianidinas (como por ejemplo fenilalanina) o bien, como fuente de carbono (sacarosa) (Grusak, 2004).

Laparra *et col* (1977) cultivan la vid durante 45 días en una atmósfera enriquecida con  $^{14}\text{CO}_2$ , obteniendo oligómeros de procianidinas marcados con  $^{14}\text{C}$  tras realizar la extracción de estos compuestos de las semillas de las uvas. De forma similar, Abia *et col* (2001) también utilizan una atmósfera rica en  $^{14}\text{CO}_2$  como agente para marcar radiativamente las procianidinas, las cuales son extraídas de las vainas de las algarrobas (*Ceratonia siliqua*).

La utilización de moléculas radiactivas precursoras de la vía de síntesis de las procianidinas es otro método bastante utilizado para obtener procianidinas con marca radiactiva. En este sentido, Abia *et col* (2001) utilizan L-[U- $^{14}\text{C}$ ]-fenilalanina en cultivos *in vitro* de algarroba para obtener procianidinas marcadas radiativamente con  $^{14}\text{C}$ , aunque también han conseguido marcar radiativamente estos compuestos utilizando [U- $^{14}\text{C}$ ]-cinamato. Las procianidinas marcadas con  $^{14}\text{C}$  son extraídas de las vainas de las algarrobas. Similarmente, también se han utilizado moléculas precursoras como  $^{13}\text{C}$ -fenilalanina (Krisa, 1999 a y b) y  $^{14}\text{C}$ -fenilalanina (Vitrac, 2002) para obtener procianidinas marcadas isotópica y radiativamente en cultivos de *Vitis vinifera* (Krisa, 1999 a y b; Vitrac, 2002) o *Marchantia polymorpha* (Friederic, 1999) oscilando el porcentaje de incorporación del isótopo entre un 4–30% ya que parte de la fenilalanina marcada se utiliza para la síntesis de proteínas u otros compuestos, o bien, puede ser oxidada y perdida (Grusak, 2004). De aquí que el marcaje radiactivo de las procianidinas mediante esta técnica puede ser bastante bajo. Los resultados de incorporación de radioactividad en catequinas y antocianidinas obtenida por Vitrac *et col.* (2002) (actividad específica en torno a 260–350  $\mu\text{Ci/g}$ ) es comparable a los obtenidos por Déprez *et al.* (1999) (actividad específica en torno a 200–500  $\mu\text{Ci/g}$ ) en el marcaje de catequina y procianidinas oligoméricas cuando se administran precursores radiactivos como acetato y fenilalanina a esquejos de sauce.

Una tercera forma de obtención de procianidinas marcadas radiativamente mediante cultivos de plantas es la utilización de una fuente de carbono que sea utilizada por la planta como alimento. Este es el caso descrito por Grusak *et al* (2004) que utilizan  $^{14}\text{C}$ -sacarosa como fuente de carbono en cultivos *in vitro* de bayas de arándano (*Vaccinium pahalae*) y uva (*Vitis vinifera*), obteniendo una eficiencia de incorporación de  $^{14}\text{C}$  a las procianidinas de un 20–23%.

### **2.1.2 Reactividad de los compuestos fenólicos**

La utilización de la maquinaria biosintética de las plantas permite obtener procianidinas marcadas radiativamente; sin embargo, es interesante, desde el punto de vista químico, comprobar si las procianidinas que están disponibles comercialmente (catequina, epicatequina, procianidina B2) pueden ser marcadas radiativamente. Por tanto, es necesario conocer cual es la reactividad química de estos compuestos y evaluar la posibilidad de llevar a cabo este marcaje radiactivo. Ya se ha comentado que los flavonoides son productos polifenólicos naturales cuya estructura incluye dos anillos fenólicos (A y B) unidos por una pequeña cadena de tres carbonos (ver figura 7). Generalmente, esta cadena forma parte del anillo C fusionado con el primer anillo aromático A para formar un heterociclo pirano. Cada uno de los tres ciclos de este esqueleto puede sufrir numerosas reacciones debido a la elevada reactividad de estos compuestos, pudiendo ser ampliamente oxidado, dando lugar a diferentes clases de flavonoides (Nay, 2002). La mayor característica distintiva de los flavonoides es el nivel de oxidación del heterociclo oxigenado C, que en las especies altamente oxidadas (como es el caso de 3-hidroxi-flavonas y antocianidinas) poseen una geometría planar, asociada con una elevada



conjugación insaturada que es también responsable de su aspecto visible (coloraciones que comprenden desde el amarillo hasta el violeta). En las especies con un heterociclo saturado, como es el caso de los flavan-3-oles, la quiralidad aumenta debido a los estereocentros existentes, los cuales oscilan entre 1 y 3 (Nay, 2002).

Por regla general, la oxigenación enzimática de los polifenoles va acompañada por una coloración rojiza que puede ser observada frecuentemente en frutas o verduras dañadas. Este fenómeno adquiere importancia desde el punto de vista de la manufacturación de alimentos y del sistema defensivo de la planta. Sin embargo, no están claros los detalles de la reacción debido a la complejidad de los productos de oxidación formados. En la manufacturación del té negro, se ha estudiado ampliamente el mecanismo de oxidación de los cuatro principales flavonoides (catequina, epicatequina, epigallocatequina y sus 3-O-galatos) en sus hojas, comprobándose que la presencia de catecol y pirogallol hace que el tipo de oxidación sea característica (Davies, 1999). La teaflavina y sus derivados 3- y 3'-O-galatos son pigmentos rojo anaranjados del té negro que poseen una estructura benzotropolona y son producidos por una condensación oxidativa de epicatequina y epigallocatequina (Tanaka, 2000). Aunque la mayoría de la epigallocatequina es polimerizada, la presencia de intermediarios quinonas monoméricas y dimericas se demuestran por el aislamiento de sus derivados fenazina. La estructura del dímero formado sugiere que el acoplamiento de los anillos B es importante en la oxidación de la epigallocatequina. Por el contrario, la oxidación bajo condiciones similares da lugar a un metabolito trimérico cuya relación m/z es 863, hecho que indica que se trata de un trímero de epicatequina. Este producto se forma mediante un enlace C-C entre el carbono 6' del anillo B de una epicatequina y el C6 del anillo de otra epicatequina obteniéndose configuraciones 2, 3-*cis*. No ha podido determinarse mediante un análisis estereoscópico la posición concreta de los dos enlaces interflavánicos (posiciones 6 u 8). Sin embargo, las posiciones 8 son más relevantes porque una sustitución sobre el anillo A ocurre preferiblemente en la posición 8 antes que en la 6 (Tanaka, 1994). Esto sugiere que la adición nucleófila del anillo A del floroglucinol al anillo B de la O-quinona prevalece en la oxidación de la epicatequina. El cambio de color observado en el proceso de oxidación de estos compuestos va desde un rojo anaranjado hasta un negro verdoso y se debe probablemente a la formación de un complejo quinhidrona tipo  $\text{H}^+ \text{---} \text{H}^-$  (Haslam, 1998).

Hashida & Ohara *et al* (2002) han estudiado la reactividad de unidades monoméricas (como la (+)-catequina) abundantes en taninos condensados en medio básico donde tiene lugar la apertura de los anillos pirano. En las reacciones catalizadas en medio básico a 25° C, se forma *ent*-epicatequina por epimerización en la posición C2 del anillo pirano, mientras que se obtienen grandes cantidades de ácido catequínico en las reacciones llevadas a cabo a 100° C. Se supone que estas reacciones se dan a través de una apertura del anillo pirano para proporcionar un intermedio quinona, seguida por un cierre del anillo pirano o un ataque nucleófilo de un carbanión en las posiciones C2 ó C8. Paralelamente, también se propone un mecanismo de reacción a través de radicales ya que estas reacciones son inhibidas por la exclusión de oxígeno (Kiatgrajai, 1982; Sears, 1984; Kennedy, 1984; Ohara, 1991). Además, el tratamiento de (+)-catequina a pH 12 y una temperatura de 40° C durante 24 horas proporciona la obtención de diversos compuestos. Uno de los principales productos obtenidos es idéntico al ácido catequínico, mientras que el otro se identificó como un dímero ácido catequínico-diarilopropanol (Ohara, 1991), así como un nuevo estereoisómero del ácido catequínico cuya formación muestra que la redistribución de (+)-catequina a ácido catequínico a través de un intermediario quinona no es estereoespecífica pero sí es estereoselectiva (Ashira & Okada, 2002).

La importancia de los polifenoles en la química actual debería acentuarse. Se ha comprobado como las rutas biosintéticas proporcionan productos como taninos, antocianos, flavonoides, etc., jugando éstos un papel como condimentos, colorantes y medicinas naturales, aspectos de gran interés en el campo de la ciencia de los alimentos, desde el punto de vista de la determinación de su capacidad potencial como substrato susceptible de ser nitrosilado y/o glicosilado (Haslam, 1998; Siebert, 1996 a y b). Además, algunos polifenoles son capaces de interactuar con cloro o nitrito para proporcionar productos de mayor potencial mutagénico que los propios compuestos originales (Lin, 1992). En el caso de las reacciones de nitrosilación de compuestos fenólicos se está prestando una especial atención a la posibilidad de suprimir la formación de compuestos nitrosos en materiales comerciales mediante inhibidores de estas reacciones de nitrosilación. Los biólogos están especialmente interesados en el uso de estos compuestos como modelos de producción de una amplia gama de cánceres (Mirvish, 1975 y



1995; Bartsch, 1988; Lijinsky, 1992), mientras que los químicos están más interesados tanto en el mecanismo de formación de compuestos nitrosilados (Ridd, 1961; Schmid, 1967; Casado, 1983 y 1994; García-Santos, 1996) como en el bloqueo o inhibición de la formación de estas especies (Archer, 1984; Loeppky, 1994; González-Mancebo, 1997; García-Prieto, 1998). Mientras que la reacción del nitrógeno con los anillos aromáticos es una reacción bien caracterizada (Al-Obaidi, 1985; Schofield, 1980), la nitrosilación aromática se ha estudiado en muy pocos casos, e incluso ciertos substratos susceptibles de ser nitrosilados poseen interés debido a las propiedades patogénicas de los productos de la reacción. Las reacciones de nitrosilación de los compuestos fenólicos dependen principalmente de tres factores (Fernández-Lienres, 1997; González-Mancebo, 1999 y 2002): la oxidación del grupo hidroxilo del compuesto fenólico para el ataque nucleofílico mediante agentes nitrosiladores debe ser preferiblemente en posición para-, el efecto hiperconjugativo del sustituyente metilo capaz de causar una carga electrónica que fluye en el núcleo aromático, así como la eliminación del efecto electrónico opuesto de los sustituyentes halogenados y el impedimento estérico de los sustituyentes alquilo que flanquean el lugar donde se llevará a cabo la nitrosilación que reduce, o incluso previene, este tipo de reacción. La figura 38 muestra esquemáticamente el proceso de nitrosilación que puede tener lugar en uno de los grupos funcionales que forman parte de los compuestos fenólicos.

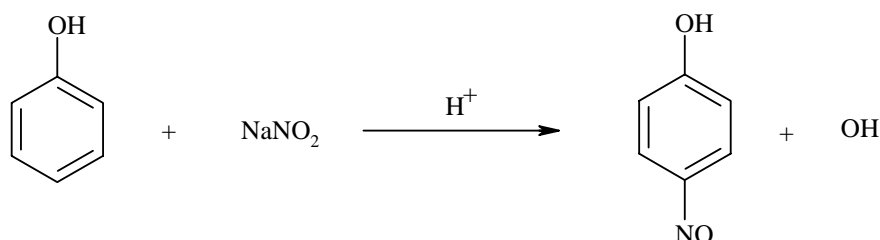


Figura 38: Reacción de nitrosilación de un grupo funcional que forma parte de los compuestos fenólicos.

Debe prestarse atención al posible aumento de nitrosilaciones de ciertos compuestos que potencialmente son C-nitrosilables, como consecuencia de la presencia de sustituyentes donadores de electrones. Este podría ser el caso de ciertos compuestos presentes en el té que presentan átomos de carbono altamente nucleófilos, así como la quercetina presente en los vinos (tintos en particular), que se ha demostrado que pueden ser genotóxicos al ser nitrosilados. A pesar de esto, debe puntualizarse que tanto la quercetina como otros flavonoides, pueden mostrar propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas (Gaspar, 1993). La reacción de nitrosilación de los compuestos fenólicos muestra una fuerte dependencia del pH del medio y de la permisividad del mismo. Se cifra el pH óptimo para este tipo de reacciones en 3, disminuyendo enormemente la reactividad cuando aumenta el pH del medio. Este dato es de interés para la ciencia de los alimentos desde que la ingesta de ácidos/antiácidos puede afectar altamente el nivel de nitrosilación en el estómago (González-Mancebo, 2002). Así, la nitrosilación de los compuestos fenólicos en un medio compuesto por agua/acetonitrilo muestra que la reacción puede estar altamente inhibida si el porcentaje del compuesto orgánico aumenta. Este hecho posee interés siempre que haya presencia de bebidas destiladas en el estómago humano, ya que la constante dieléctrica de estas mezclas es menor que la del agua, esperándose una disminución de las nitrosilaciones de los compuestos fenólicos *in vivo* en presencia de otros compuestos (González-Mancebo, 2002). La utilización de agentes nitrosiladores marcados con el isótopo  $^{15}\text{N}$  (como  $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ ) (Hakata, 2003) podría permitir el marcaje de las procianidinas para estudiar el proceso de absorción *in vivo* de estos compuestos, pudiendo ser detectadas mediante resonancia magnética nuclear.

Otro tipo de reacciones que involucran a los compuestos fenólicos y que se pueden utilizar para marcar radiactivamente a éstos son las reacciones de glucosilación, las cuales están suscitando un enorme interés, ya que los productos resultantes poseen una amplia y diversa actividad biológica como acciones antitumorales, antimutagénicas, antihipercolesterolemias,



reducción del riesgo de padecer cáncer de próstata, de mama, osteoporosis y mejora de la memoria a corto plazo de personas ancianas (Kada, 1985; Oguni, 1988; Adlercreutz, 1995; Tijburg, 1997; Sanguan, 1998; DiCarlo, 1999; Lee, 1999; Morton, 2000). Durante los últimos años, ha crecido el interés de desarrollar de la manera más simple los glucósidos de flavonoides y sus derivados ésteres. Una manera de disminuir el número de pasos requeridos en la síntesis de estos compuestos, es la utilización de enzimas glucosidasas y glucosiltransferasas (Di Carlo, 1999). Los flavonoides pueden solubilizarse eficientemente en soluciones muy saturadas, preparadas con dadores de grupos glucósido, como es el caso de p-nitrofenilglucósidos. Bajo estas condiciones, se ha comprobado que las glucosidasas comerciales disponibles en el mercado, aceptan la catequina como sustrato. La regioselectividad de la reacción se cree que depende de la combinación de enzima-sustrato utilizada, pero como mínimo, tres posiciones del flavonoide pueden ser glucosiladas: 5, 7, 4' (Lee, 1999). El compuesto resultante y los flavonoides glucosilados pueden modificarse adicionalmente mediante una acilación regioselectiva con ésteres de vinilo de ácidos arilopropenoicos. Las lipasas de *Candida antarctica* y en menor medida *Mucor miehei* actúan como catalizadores apropiados, disminuyendo la eficacia de la acilación según el siguiente orden: vinilo cinamato > vinilo ferulato > vinilo cumarato (Morton, 2000). Los sustratos que poseen un grupo hidroxilo en la subunidad azúcar suelen ser acilados con relativa facilidad, mientras que los flavonoides acilados con 6-deoxiazúcares se muestran sustratos pobres para llevar a cabo la reacción. La síntesis de (+)-catequina- $\beta$ -D-glucopiranosido, (+)-catequina- $\alpha$ -D-glucopiranosido, (+)-catequina- $\alpha$ -D-maltósido y la esterificación enzimática para obtener 6''-O-((+)-catequina-7-O- $\alpha$ -D-glucopiranosido) cinamato se representan en la figura 39 (Vulfson, 2000). Sin embargo y a pesar de la facilidad con la que se lleva a cabo la glucosilación de los compuestos fenólicos, esta reacción carece de interés para el estudio de la absorción de las procianidinas *in vivo* ya que las formas glucosiladas no son absorbidas, mientras que si lo son las agliconas. En consecuencia, la utilización de glucósidos radiactivos para marcar las procianidinas no es un método idóneo para el estudio de la absorción de estos compuestos.

Por otra parte, la reserva de taninos en las plantas lleva consigo la presencia de enlaces carbono-carbono mediante la unión entre si de monómeros flavan-3-oles (Porter, 1994; Ferreira & Bekker, 1996; Ferreira & Lee, 2000). Este tipo de uniones se realiza mediante el ataque de un centro nucleófilo del anillo A m-oxigenado de una unidad flavan-3-ol sobre un centro electrofílico existente en una subunidad carbocatión flavan-4-ilo (o equivalente) que deriva de flavan-3, 4-dioles (Hemingway, 1989; Ferreira, 1999). En ausencia de potentes nucleófilos flavan-3-oles con su gran poder para formar enlaces carbono-carbono, existen otros centros alternativos que podrían participar en la formación de enlaces interflavánicos. Esta situación prevalece, especialmente, en fuentes naturales que posean precursores que contengan una funcionalidad 7, 8-dihidroxi en sus anillos A donde la unión C-C entre procianidinas está acompañada frecuentemente por puentes éter entre leucoantocianidinas (Foo, 1989; Coetze, 1998 a y b; Bennie, 2000).

Este tipo de enlaces que se dan en las plantas constituye una forma natural de formación de enlaces carbono-carbono, algo que también puede lograrse químicamente mediante la reacción de Mannich (representada en la figura 40), muy utilizada para introducir cadenas laterales en fenoles. La aminometilación tipo Mannich es un método que permite introducir una cadena lateral en varios fenoles (Sun, 1999; Martin, 1999). Anteriormente, ya se habían descrito reacciones regioselectivas tipo aldol de enolatos fenólicos en agua y alcoholes (Saimoto, 1996). El tratamiento de 2', 4'-dihidroxiacetofenona con formaldehído y varias aminas secundarias en metanol a temperatura de reflujo, introduce selectivamente el correspondiente grupo aminometilo en posición C3, obteniéndose unos buenos rendimientos. Similarmente, los ésteres y los aldehídos pueden ser convertidos en sus derivados 3-aminometilados. La regioselectividad de la formación del enlace carbono-carbono en posición C3 del fenol se estima mediante RMN de protón, mostrando dos dobletes que se corresponden con los protones aromáticos (Omura, 2001).

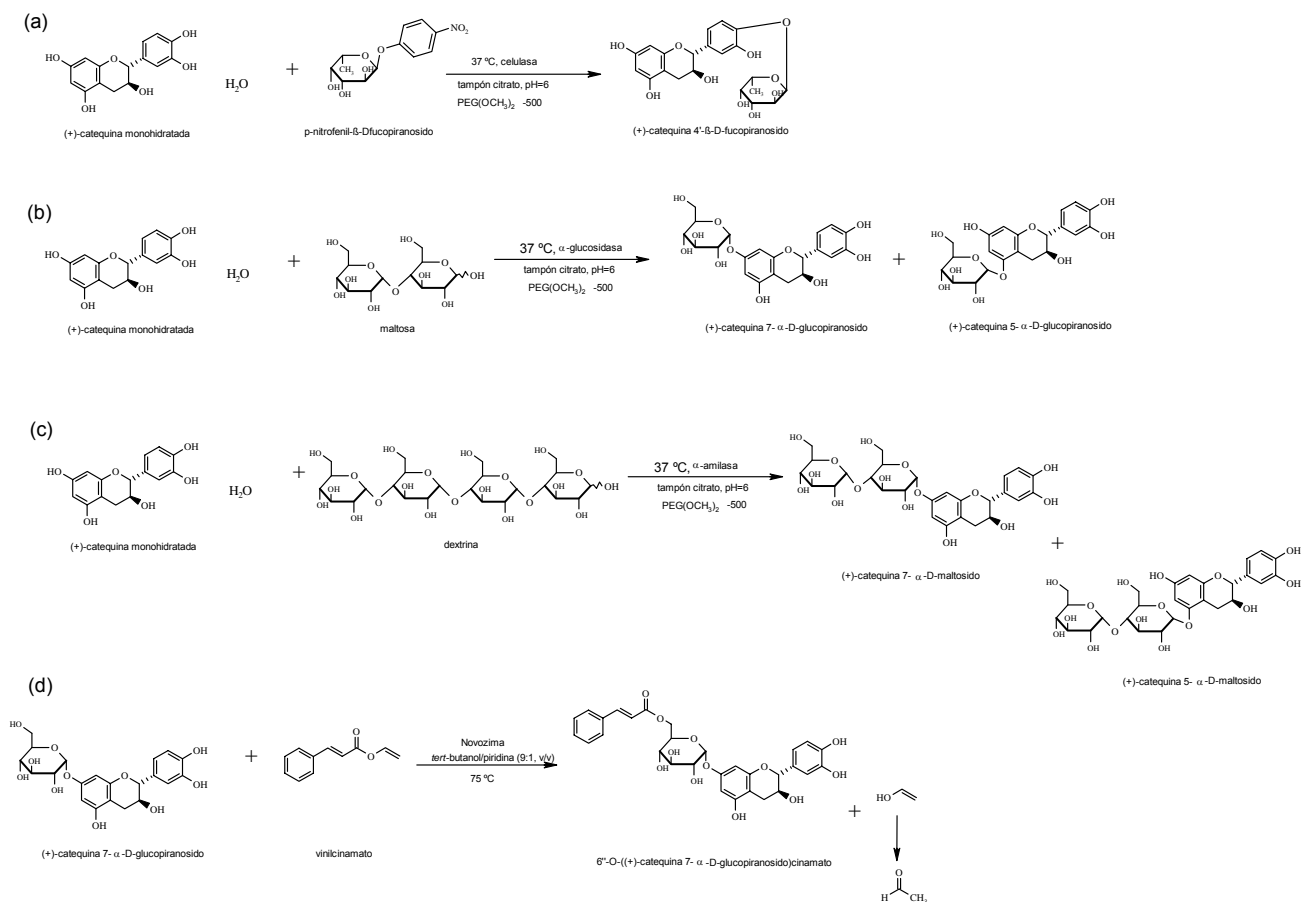


Figura 39: Síntesis de (+)-catequina β-D-fucopiranosido (a), (+)-catequina α-D-glucopiranosido (b) y (+)-catequina α-D-maltosido (c) catalizado por glicosidasas. En (d) se representa la síntesis de 6'-O-((+)-catequina 7-α-D-glucopiranosido)cinnamato catalizada por una lipasa.

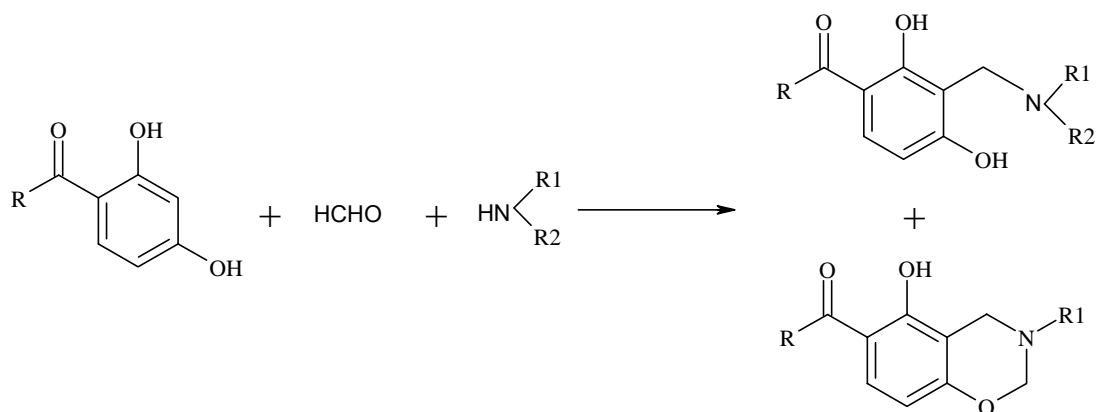


Figura 40: Reacción de Mannich con substratos fenólicos.

La utilización de formaldehído marcado radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  permitiría la introducción en la procianidina de una pequeña cadena carbonada marcada que podría ser detectada en un contador beta. Asimismo, la aplicación de la reacción de Mannich para marcar radiactivamente las procianidinas también permite la posibilidad de utilizar aminas primarias o secundarias con marca radiactiva para esta finalidad. En consecuencia, la utilización conjunta de formaldehído marcado y de aminas radiactivas proporcionaría un mayor grado de marca radiactiva en las procianidinas pudiendo ser detectadas en concentraciones muy bajas.

Por otra parte, los compuestos fenólicos también pueden sufrir reacciones de metilación. En este sentido, el dimetilo carbonato (DMC) es considerado en síntesis orgánica un agente metilador alternativo a otros muchos compuestos que poseen un mayor índice de peligrosidad, como es el caso de los metilhaluros o los dimetilsulfatos (Mauri, 1985; Ono, 1996 y 1997; Memoli, 2001). La orto-metilación de fenoles (ver figura 41) da como resultado alquil aril éteres, productos muy útiles como materiales de partida en la preparación de fragancias, tintes, pesticidas, antioxidantes en aceites y grasas o como estabilizadores de plásticos (Dorotea, 1991). La reacción de metilación de fenoles con DMC puede llevarse a cabo en un autoclave a  $160^\circ\text{C}$  con un sistema catalizador compuesto por una base alcalina o de una amina terciaria junto con un yoduro (Iori, 1981). También se han utilizado como catalizadores aminas terciarias o fosfinas (Merger, 1980), compuestos heterocíclicos que contienen  $\text{N}_2$ (4-[dimetilamino]-piridina) (Thompson, 1984), pentaalquilguanidinas (Barcelo, 1990), carbonato de cesio (Lee, 1998) en la preparación de éteres fenólicos mediante la reacción del fenol con un dialquilo carbonato a una temperatura que oscila entre  $120$  y  $200^\circ\text{C}$  bajo condiciones de presión constante. La utilización de un reactivo como el  $(^{14}\text{CH}_3)\text{CO}$  permite la utilización de esta reacción de orto-metilación para introducir un grupo metilo marcado con  $^{14}\text{C}$  en la estructura de las procianidinas, siendo factible, por tanto, el marcaje radiactivo de estos compuestos mediante este tipo de reacciones.

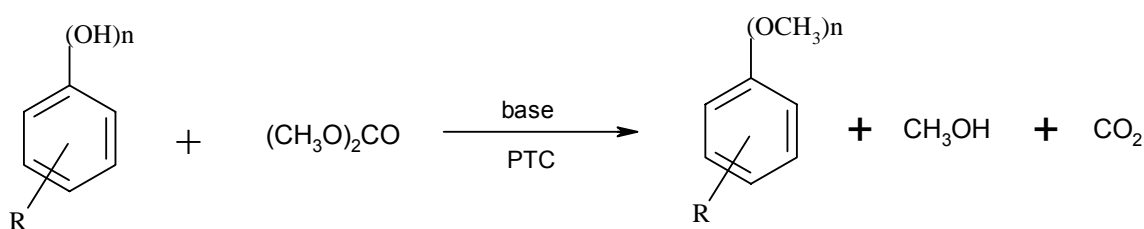


Figura 41. Reacción de *orto*-metilación de fenoles.

El hecho de que se puedan agregar nuevos grupos funcionales como glucósidos,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_2$  y metilos a los compuestos fenólicos se debe, en gran parte a la amplia reactividad de los mismos. Del mismo modo, los polifenoles son utilizados como elementos de partida para obtener otros compuestos químicos como ácido catequínico a partir de catequina, teaflavina a partir de epicatequina, etc. De forma similar, puede llegar a sintetizarse un compuesto fenólico de un determinado grado de complejidad partiendo de otros compuestos más sencillos. En este sentido, Saito *et col.* (2002), sintetizaron procianidina B3 a partir de un monómero como la catequina, basándose en la síntesis altamente estereoselectiva de procianidina B3 bencilada (Thompson, 1972) y de (+)-catequina-(4 $\alpha$ -8)-(+)-catequina mediante una reacción de condensación de tetrabencil-catequina con varios derivados de flavan-3, 4-dioles utilizando  $\text{TiCl}_4$  en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La figura 42 detalla estas secuencias de reacciones. En consecuencia, es posible la obtención de procianidina B3 en una forma diastereoisómera pura sin la utilización de ningún proceso tedioso de purificación. La participación de un grupo vecino 3-O-acetilo es muy efectiva para una condensación estereoselectiva como ésta (Saito, 2002). Uno de los grandes inconvenientes de este método de síntesis es que, a pesar de obtenerse procianidina B3 prácticamente pura, la cantidad final obtenida es bastante escasa. Esta reacción de obtención de dímeros combinada con algunas de las reacciones químicas vistas anteriormente, permitirían el marcaje radiactivo de estos compuestos. No obstante, la escasa cantidad final obtenida hace que este método no sea el idóneo para sintetizar procianidinas marcadas radiactivamente.

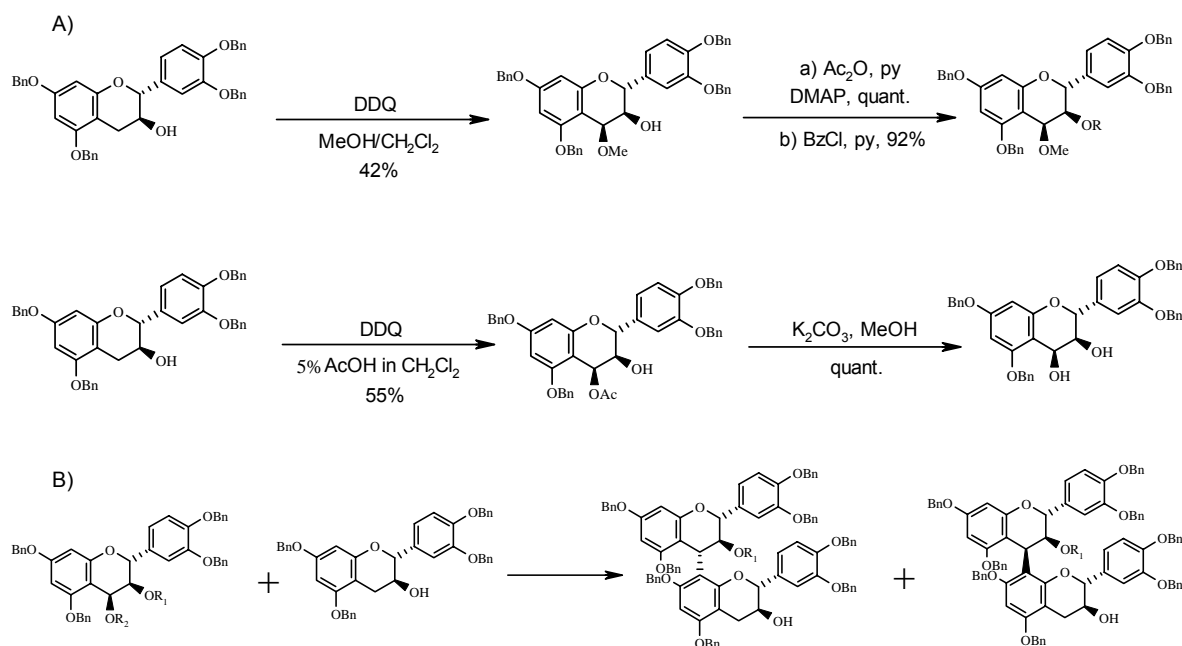


Figura 42. A) síntesis de los electrófilos y B) condensación estereoselectiva de los mismos para obtener procianidina B3.

De la misma manera que se obtienen compuestos fenólicos de una determinada complejidad a partir de polifenoles más simples, también es posible llegar a sintetizar monómeros flavan-3-oles partiendo de compuestos químicos de gran simplicidad. El análisis de la estructura de estos compuestos permite comprobar como el esqueleto flavonoide sigue la pauta C6-C3-C6. Este esqueleto puede sintetizarse según dos análisis retrosintéticos, representados en la figura 43 (Wagner, 1975). Por una parte, es posible romper la estructura en una parte fenólica C6 y en una parte cinámica C3-C6, que podría ser tanto un ácido carboxílico, como un aldehído o un alcohol (como indica la figura 44). Esta ruta retrosintética involucra tanto a una retro-acilación (en un ácido cinámico, representado en la ruta A) como una retro-ailación (en un cinamaldehído o un alcohol cinámico, representados en las rutas B y C, respectivamente). Cada estado de oxidación de estos precursores es valioso en la síntesis específica de diferentes clases de intermediarios de flavonoides (como podrían ser calconas, 2-fenil-2H-cromeno o cinamilfenoles, respectivamente).

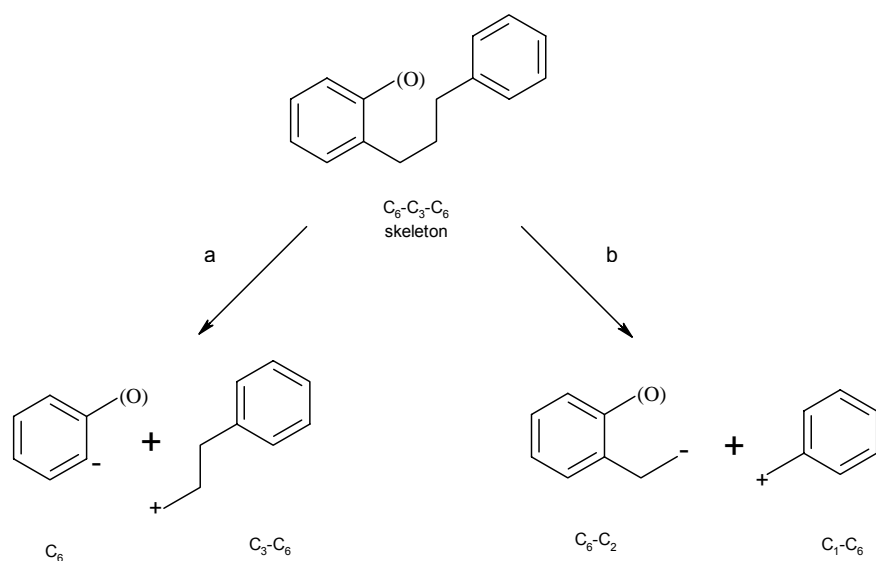
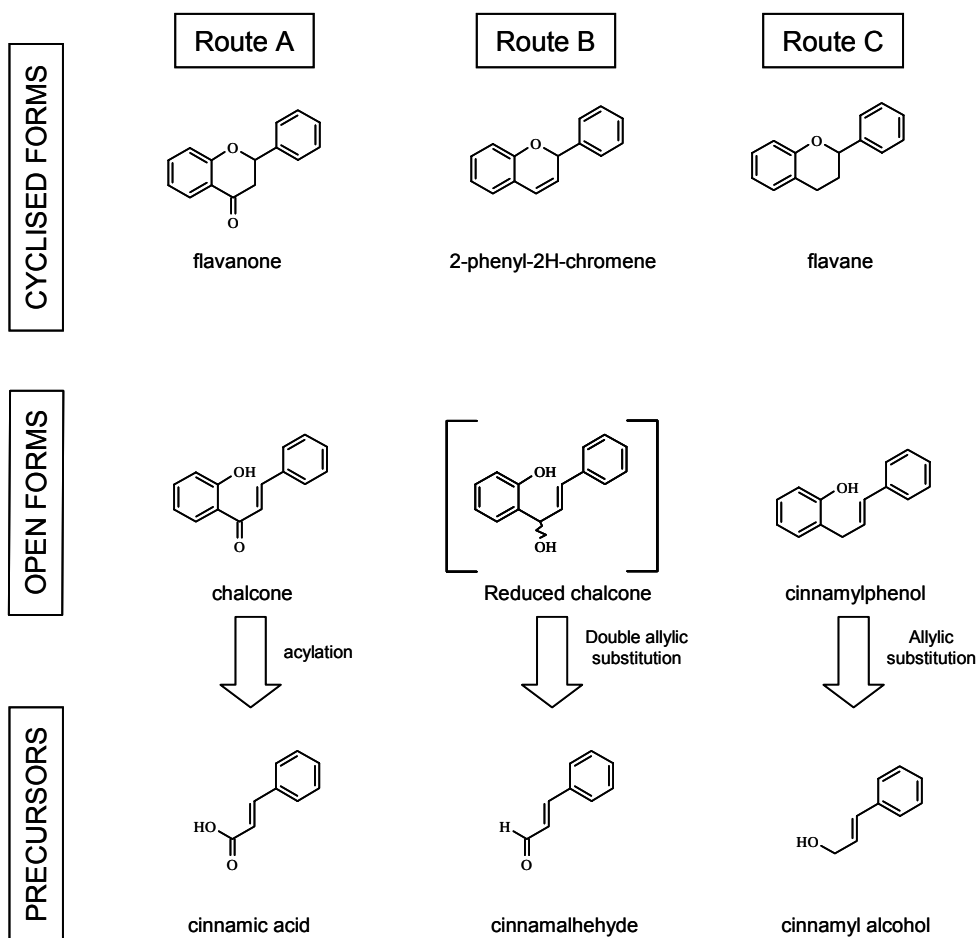


Figura 43: Análisis retrosintético de la síntesis de un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>: estrategias C<sub>6</sub> + C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (a) y C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> + C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (b).

Figura 44: Rutas de síntesis alternativas en la ruta estratégica general C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>.

El acoplamiento de cinamilalcoholes a fenoles catalizado por molibdeno (IV) fue inicialmente propuesto por Malkov *et al.* (1999), y puede aplicarse en la obtención de estos esqueletos abiertos que se utilizan en la síntesis de flavonoides naturales como precursores adecuados, tal y como se muestra en la figura 45 (Nay, 2002). La sustitución alílica puede utilizarse para, no solamente sintetizar catequina a partir de cianuro potásico, sino para marcar isotópicamente el compuesto final en el carbono 4 con <sup>13</sup>C, siendo detectado mediante RMN de protón. Este proceso de síntesis y marcaje isotópico de la catequina consta de 10 etapas, partiendo de K<sup>13</sup>CN vía CH<sub>3</sub><sup>13</sup>CN ya que, por extraño que parezca, comercialmente solo se encuentra disponible <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>CN a un precio bastante elevado. El rendimiento total del proceso está cifrado en un 4% y los detalles de la reacción de síntesis se representan en la figura 46 (Nay, 2000).

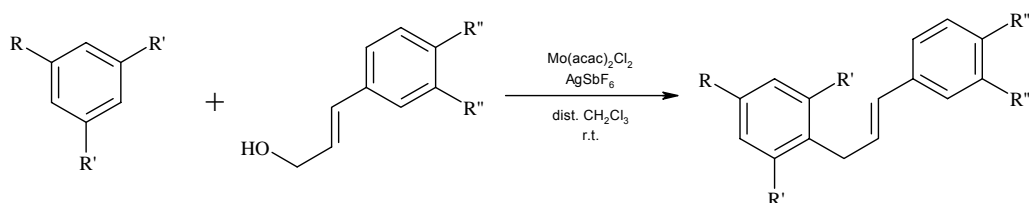


Figura 45: Reacción de acoplamiento de fenoles a derivados de alcohol cinámico catalizada por Mo (IV).

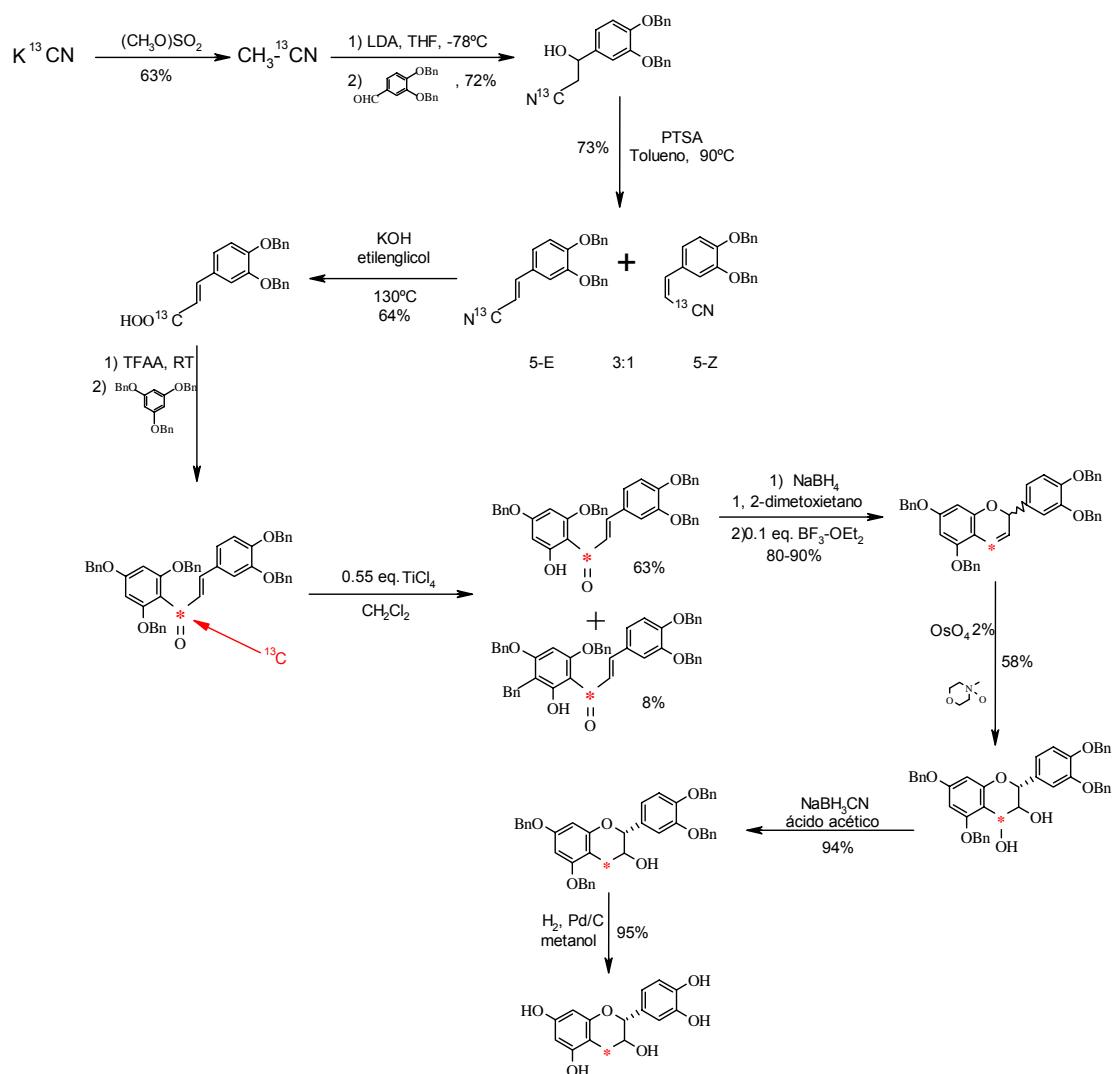


Figura 46. Síntesis de catequina marcada isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  a partir de  $\text{K}^{13}\text{CN}$ .

La mejora de esta ruta depende de la preparación de la catequina ópticamente activa y es, lo suficientemente versátil, como para poder extenderla a otros carbonos isótopos, como, por ejemplo,  $^{14}\text{C}$  para la realización de estudios *in vitro* y  $^{11}\text{C}$  para la detección con cámara de positrón permitiendo el seguimiento directo de las moléculas en el organismo (Nay, 2000). Por otra parte, esta estrategia ha sido poco utilizada para sintetizar catequina debido a la complejidad de estas reacciones, prefiriéndose la otra ruta sintética alternativa (Jurd, 1969; Schiemem, 1982; Nay, 1999 y 2002).

En la segunda estrategia sintética (ver figura 44), el esqueleto del flavonoide se rompe en un parte acetofenona  $\text{C}_6\text{-C}_2$  y en una unidad benzaldehído  $\text{C}_1\text{-C}_6$  gracias a una operación de retrotronización. La utilización de esta ruta es bastante más frecuente, como resultado de la fácil accesibilidad a los materiales de partida [acetofenonas y benzaldehídos] (Arnaudinaud, 2001). Nay *et col.* (2003) utilizaron esta síntesis para obtener un derivado floroacetofenona marcado con  $^{13}\text{C}$  mediante la acilación de tri-*O*-benzilfloroglucinol, utilizando 1- $^{13}\text{C}$  ácido acético, que es transitoriamente activado con TFAA (Tedder, 1955). Posteriormente, el tri-*O*-benzilfloroacetofenona, que está marcado isotópicamente en el grupo carbonilo, es desprotonado por  $\text{TiCl}_4$  para dar una calcona que finalmente evolucionará hacia una acetofenona que reaccionará con un benzaldehído para formar el compuesto final calcona con un elevado rendimiento. Todas las etapas de este proceso se representan en la figura 47 (Kawamoto, 1989).

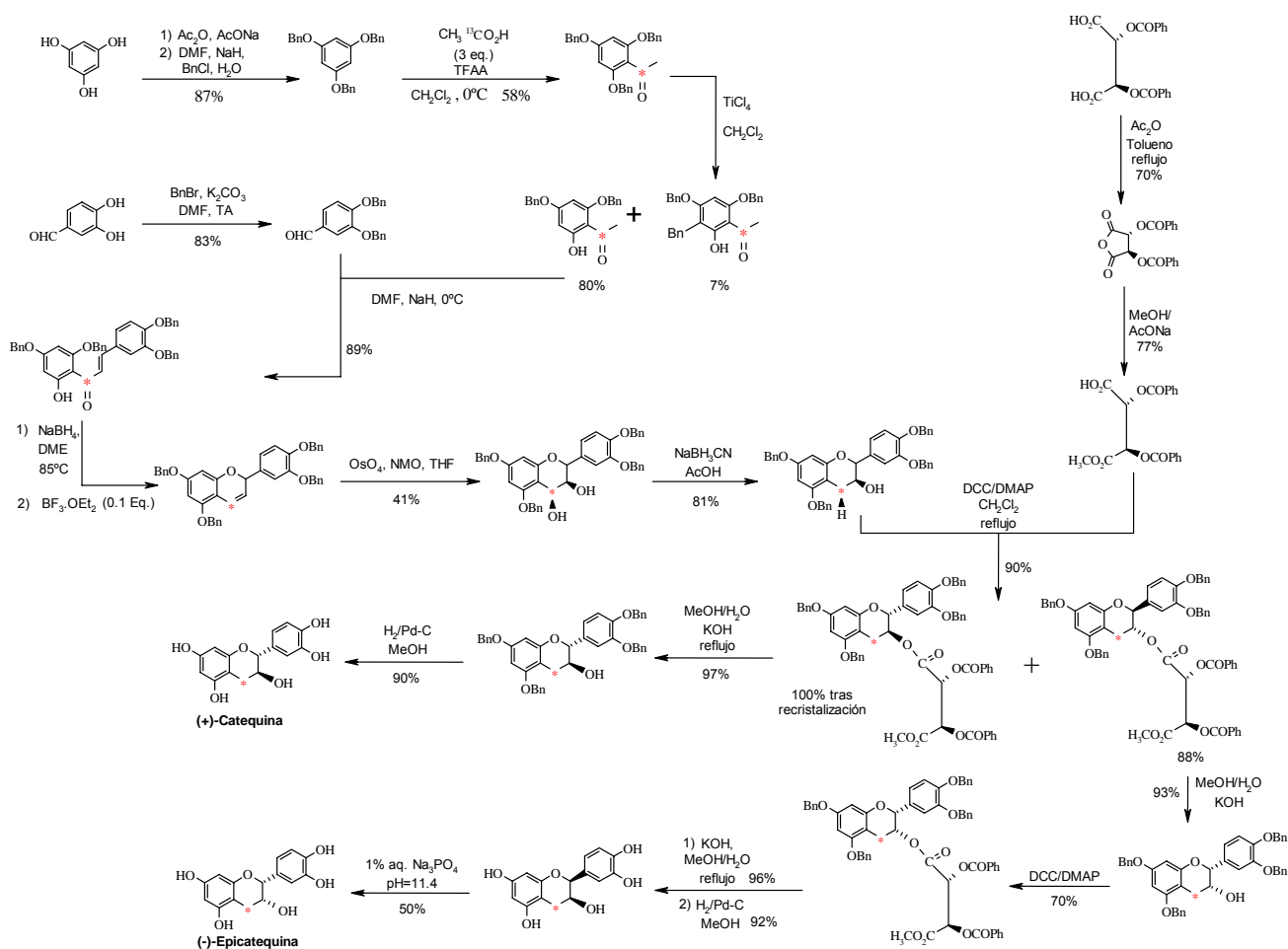


Figura 47. Síntesis de epicatequina y catequina ópticamente puras y marcadas isotópicamente mediante la estrategia C1–C6 y C6–C2.

Finalmente, los productos obtenidos son (+)-catequina y (–)-epicatequina marcadas con  $^{13}\text{C}$  en el carbono 4 con un rendimiento total del proceso de un 6.2% (Nay, 2000 y 2001). Estas dos estrategias sintéticas también pueden utilizarse para la producción de dímeros. Éste es el caso de la procianidina B3 marcada con  $^{13}\text{C}$  en el carbono 4 de la subunidad superior de catequina. La producción de este compuesto es posible a partir de 1-[ $^{13}\text{C}$ ] ácido acético mediante la unión de una molécula de flavan-3, 4-diol ópticamente marcado con una molécula de catequina natural protegida en medio ácido a través de dos rutas sintéticas diferentes. La vía utilizada antiguamente (vía del glicol racémico, representada en la figura 48) requería la unión de una mezcla racémica de flavan-3, 4-diol con catequina benzilada (Arnaudinaud, 2001). El acceso a este intermediario nunca se ha obtenido directamente bajo una forma enantiomérica pura a partir de una calcona. La resolución de la mezcla racémica se lleva a cabo mediante la unión con (+)-catequina. Desafortunadamente, este hecho da como resultado otros tres dímeros diferentes (teniendo, por tanto, cuatro compuestos diferentes). Mediante este método, no solamente existe un descenso del rendimiento de la síntesis, sino que se plantean numerosos problemas de purificación de los diferentes compuestos haciendo de esta estrategia un proceso imposible a gran escala (Arnaudinaud, 2001; Nay, 2000).



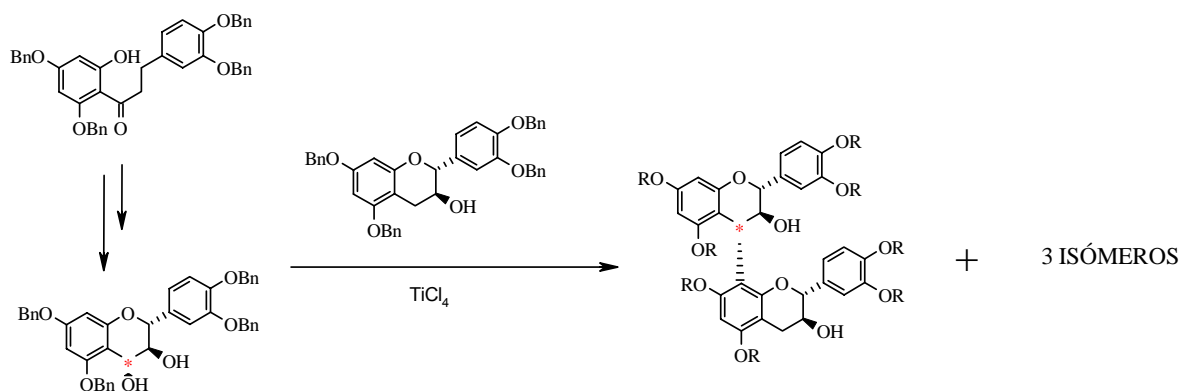


Figura 48. Ruta de síntesis del dímero B3 marcado con  $^{13}\text{C}$  (vía del glicol racémico).

El marcaje radiactivo de los compuestos fenólicos es un proceso factible gracias a que este tipo de compuestos son altamente reactivos, pudiendo reaccionar con otros polifenoles o con compuestos de origen no fenólico obteniéndose nuevas especies. La mezcla resultante puede hacerse progresivamente más compleja. Estas transformaciones afectan a las propiedades sensoriales como por ejemplo el color, el gusto y la estabilidad coloidal durante el almacenamiento y envejecimiento de productos ricos en este tipo de compuestos (Ribereau-Gayon, 1983; Liao, 1992; Singleton, 1992; Fulcrand, 1996 a; Saucier, 1996 y 1997 b). Como se ha comentado anteriormente, los compuestos fenólicos son los principales componentes de los vinos tintos y son responsables de las propiedades organolépticas de los mismos. Durante el almacenamiento y el proceso de envejecimiento de los vinos, el color de éstos cambia desde un rojo brillante hasta una coloración marrón rojiza. La evolución del color en los vinos tintos es un complejo proceso atribuido, en parte, a fenómenos de copigmentación (Mistry, 1991; Brouillard, 1984 y 1994) y al desplazamiento progresivo de las antocianinas originales por parte de los nuevos pigmentos formados (Es-Safi, 1999; Vivar-Quintana, 1999; Martínez-Valverde, 2000). Generalmente, estos pigmentos surgen de la interacción entre antocianinas y otros compuestos fenólicos, especialmente flavan-3-oles como catequinas y taninos condensados. Se han sugerido diferentes mecanismos para explicar la formación de estos nuevos pigmentos. En soluciones modelo, se han demostrado procesos en los que tiene lugar una reacción directa entre antocianinas y flavanoles (Jurd & Bridle, 1967; Jurd & Somers, 1970; Somers, 1971; Liao, 1992; Santos-Buelga, 1995 y 1996), reacciones entre antocianinas y flavanoles a través de puentes etilo (Timberlake & Bridle, 1976; Baranowki & Nagel, 1983; Roggero, 1987; Bakker, 1993; Rivas-Gonzalo, 1995; Escribano-Bailón, 1996; Fulcrand, 1996 a y b; Dallas, 1996 a y b; Francia-Aricha, 1997; Es-Safi, 1996 y 1999; Vivar-Quintana, 1999) o más recientemente, la reacción entre antocianinas y otros pequeños compuestos como ácido glioxílico (Es-Safi, 1999), vinilferol (Cameira dos Santos, 1996; Fulcrand, 1996) y ácido pirúvico (Fulcrand, 1998; Bakker, 1997 a y b). La presencia en vinos de dímeros malvidina-3-glucósido-catequina detectados a  $m/z$  809 ( $M^+$  ion) unidos a través de un puente etilo y productos de condensación acetaldehído-flavanol detectados a  $m/z$  605 y 921 ( $[M-H]^+$ ) es una prueba de estas reacciones de condensación en vinos tintos (Cheynier, 1997; Saucier, 1997).

El estudio de la reactividad de diferentes antocianidinas (cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido) con acetaldehído en soluciones modelo que simulan el proceso de envejecimiento de un vino tinto, pone de manifiesto un aumento de la intensidad del color, seguido de un cambio de éste hacia una tonalidad violeta en todas las soluciones modelo estudiadas (Dallas, 1996). Este hecho se atribuye a que el acetaldehído reacciona como un electrófilo atacando las posiciones 6 u 8 del anillo A de la antocianidina, con la consecuente formación de polímeros que consisten en unidades monoglucósido unidas a través de puentes etilo ( $\text{CH}-\text{CH}_3$ ). Es evidente, que pueden formarse muchos tipos de polímeros ya que tanto las antocianinas como las procianidinas poseen dos posiciones reactivas (Dallas, 1996). Por otra parte, en una solución modelo que contiene solamente procianidina B2 y

acetaldehído, Dallas *et al* (1996) no detectan el dímero B2 ni ningún otro nuevo compuesto mediante HPLC (280 nm) tras 15 días de reacción. Estos resultados podrían ser consecuencia de la formación de un grupo polidisperso de productos de reacción de la procianidina B2 por debajo de los límites de detección. Además, si en el medio de reacción se mezclan antocianinas, procianidina B2 y acetaldehído se forman dos nuevos compuestos como resultado de la condensación del dímero B2 con cianidina-3-glucósido a través de un puente de acetaldehído según el mecanismo descrito anteriormente por Timberlake & Bridle en 1976 (Dallas, 1996).

El mecanismo de esta reacción se explica mediante un ataque del acetaldehído sobre los carbonos 6 u 8 de la procianidina B2. El compuesto resultante, reaccionaría más favorablemente con la posición 8 de la antocianina y no con la posición 6 por analogía del comportamiento de la sal simple de flavilio (Timberlake & Bridle, 1977) y también, por la gran carga negativa que posee la posición 8 (Benz, 1967). Esta reacción también tiene lugar con monómeros flavan-3-oles y su mecanismo se representa en la figura 49. El hecho de que los compuestos polimericen en presencia de acetaldehído para proporcionar otros nuevos compuestos de mayor peso molecular explica el cambio de color que experimenta la solución modelo. Cuando esta condensación llega a ser lo suficientemente elevada, los pigmentos son lo suficientemente grandes como para ser insolubles y precipitar (Haslam & Lilley, 1988; Dallas, 1996). Los resultados muestran que, en general, la velocidad de reacción varía con el tipo de componente, observándose el siguiente orden decreciente de reactividad:



La velocidad de desaparición de los monómeros catequina y epicatequina es menor que la de los dímeros B1, B2, B3 y el trímero C1 indicando la importancia que el grado de polimerización posee en este tipo de reacciones (Dallas, 1996).

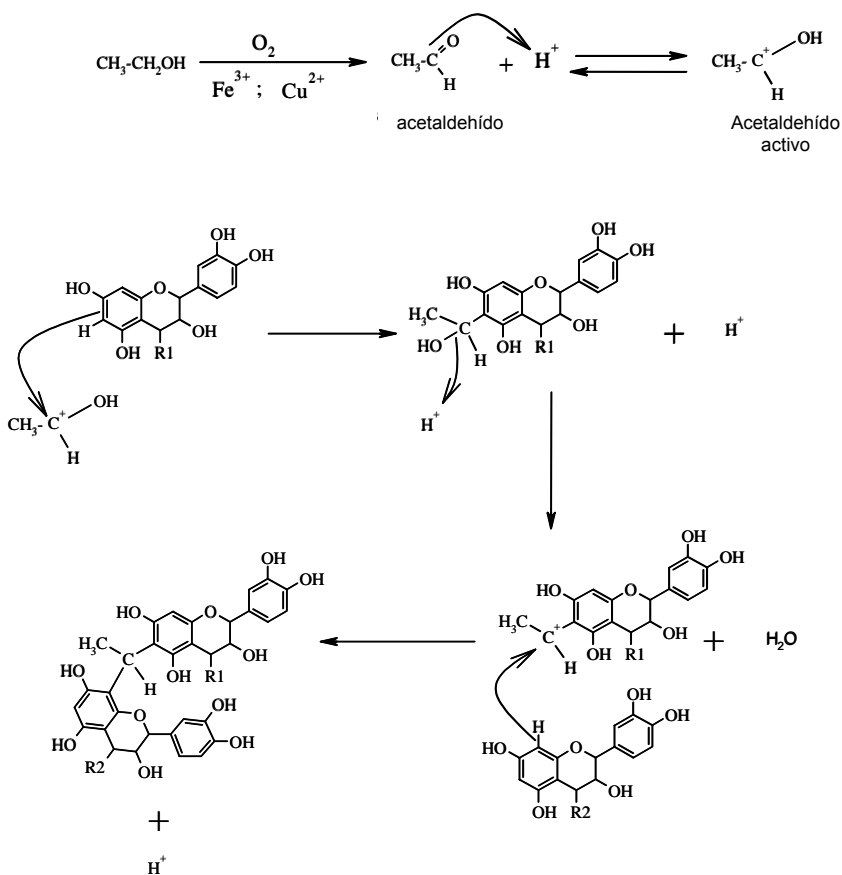


Figura 49. Reacción de polimerización desordenada de las procianidinas con acetaldehído.

Por otra parte, la reacción directa de antocianinas con flavanoles proporciona pigmentos de color amarillo anaranjado, si bien, esta reacción, no está tan estudiada como la reacción que involucra al acetaldehído. Para la condensación de antocianinas con flavanoles, se han propuesto dos mecanismos en los que está implicada la adición nucleófila de uno de los reactivos sobre el otro. Los productos resultantes de estos dos mecanismos se han encontrado en sistemas modelo, pero nunca han sido detectados en vinos (Saucier, 1997). Parece ser que el primer mecanismo (representado en la figura 50) comienza con el ataque nucleofílico de las posiciones C6 ó C8 del flavanol sobre el carbono electrófilo C4 de la forma flavilium de la antocianina dando como resultado un flaveno que puede ser oxidado al correspondiente catión flavilium de aspecto amarillento (Jurd, 1967 y 1969; Jurd & Somers, 1970; Somers, 1971; Baranowki & Ángel, 1983; Liao, 1992; Santos-Buelga, 1995 y 1996) o hacia un producto de condensación bicíclico sin coloración, previamente caracterizado en soluciones modelo que contienen malvidina-3, 5-diglucósido y catequina (Bishop & Ángel, 1984).

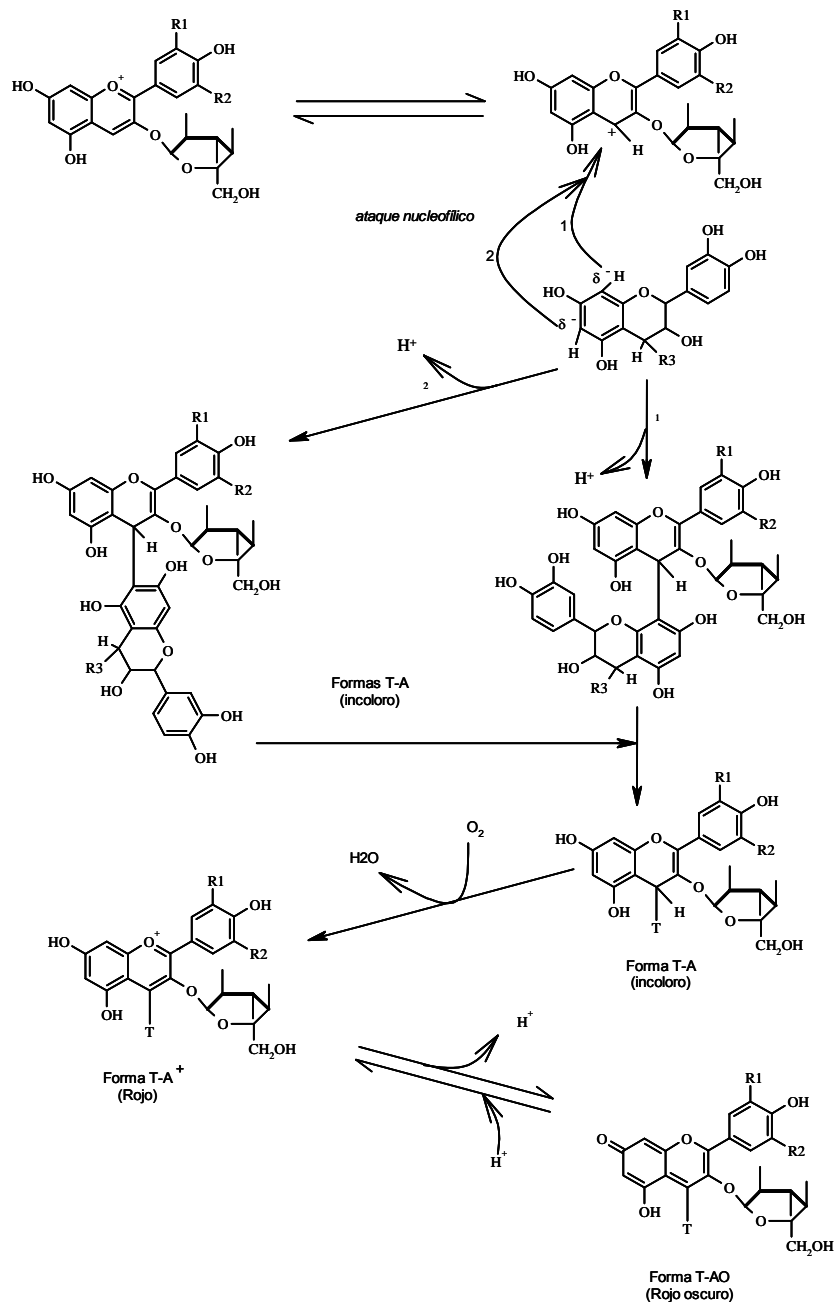


Figura 50. Estabilización del color provocada por la combinación de antocianos con taninos: T<sup>δ-</sup> + A<sup>+</sup>.

El estudio de este tipo de reacción en soluciones modelo que poseen procianidina B2 y varias antocianidinas permite observar que en el rango de pH 2–5 (Asen, 1972), la solución modelo experimenta una gradual pérdida de color en la región del rojo (520 nm) que va acompañada de un incremento de color en la región 420–450 nm, correspondiente a una coloración violácea (Dallas, 1996). La eventual formación de sales de xantilio por condensación directa entre compuestos fenólicos y antocianinas fue propuesto por Ribereau–Gayon en 1973 y por Timberlake & Bridle en 1976.

En el segundo mecanismo (esquemático en la figura 51), la especie electrófila es un ión carbonio liberado por la rotura de un enlace interflavánico de una procianidina en medio ácido (Timberlake, 1976; Haslam, 1980), mientras que la antocianidina reacciona en su forma hemiacetal hidratada como un nucleófilo para formar un nuevo enlace. Éste puede ser parte responsable de la precipitación eventual de las estructuras con mayor grado de polimerización (Ribereau–Gayon, 1982).

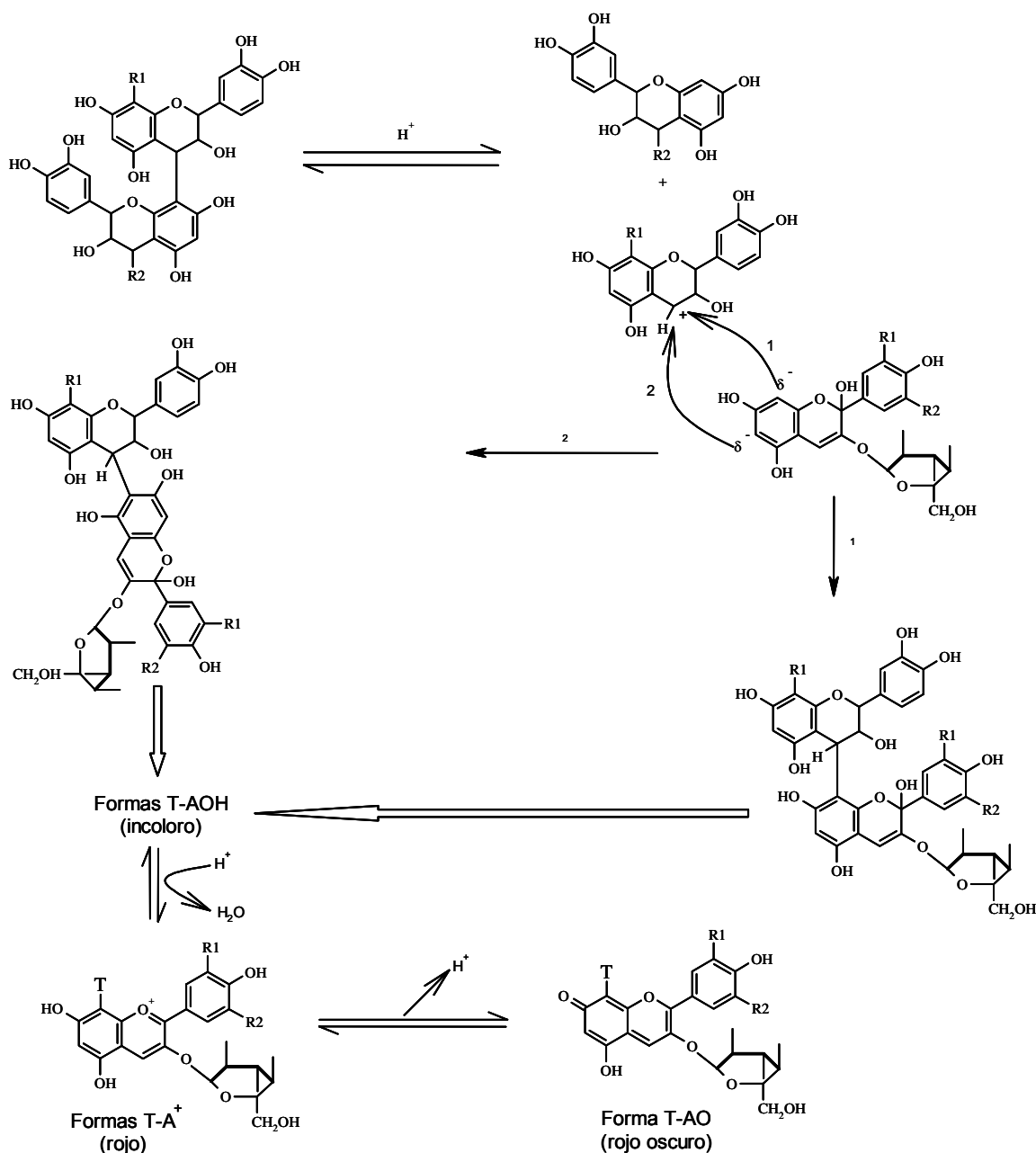


Figura 51. Estabilización del color provocada por la combinación de antocianos con taninos:  $C^+ + AOH^{\delta-}$ .

No obstante, debe destacarse la facilidad con la que se puede desarrollar la sustitución electrófila en el anillo A (floroglucinol) de la unidad monomérica flavan-3-ol que está comprendida en las estructuras oligoméricas. Estos dos mecanismos difieren en la posición de la antocianina o de los flavanoles en los productos resultantes, los cuales se denotan A-T y T-A respectivamente (Es-Safi, 1999). Además, se han detectado mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas con ionización electrospray (LC/ESI-MS) "on line" otros tipos de pigmentos (Cameira dos Santos, 1996). Los pigmentos rojo anaranjados derivados de antocianina son resultado de un mecanismo de ciclo adición entre una antocianidina y un vinilferol (Fulcrand, 1996). Asimismo, se han caracterizado productos similares formados por la adición de ácido pirúvico (Fulcrand, 1998) o etanal (Bakker, 1997; Cheyner, 1997) a las antocianinas en uvas negras y en vinos. La figura 52 muestra un esquema de la reacción de condensación de una antocianidina con un flavan-3-ol a través de un puente de acetaldehído.

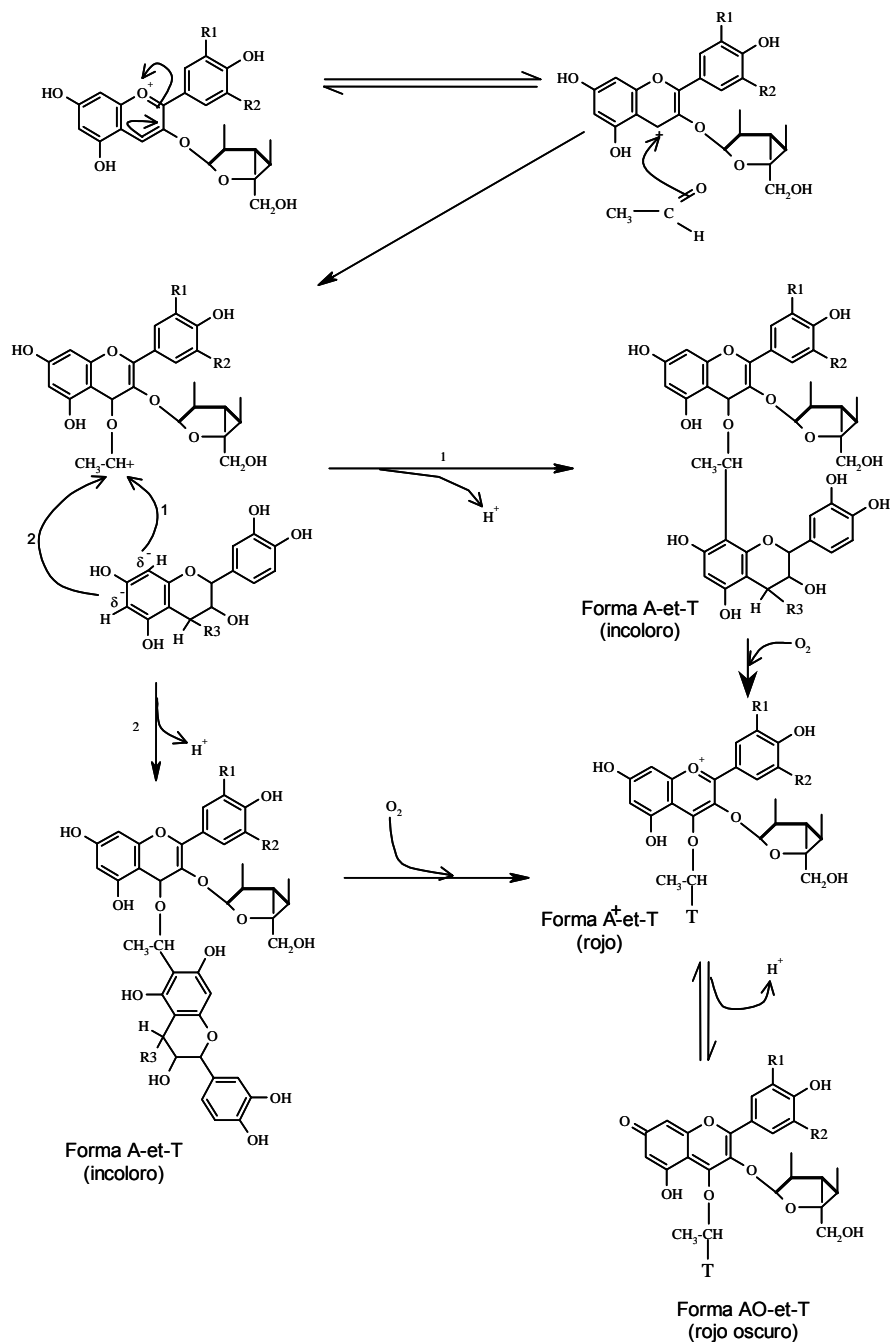


Figura 52. Estabilización del color provocada por la combinación de antocianos con flavanoles:  $\text{A}^+ + \text{Et} + \text{T}^\ominus$ .

La finalidad de todas estas reacciones es la formación de nuevos pigmentos más estables que otorgan al color del vino un determinado grado de estabilidad (coloración rojo ladrillo) y la disminución de la astringencia y la amargura del producto, ya que como se aprecia en la figura 53 cuanto mayor es el grado de polimerización de los compuestos formados, menor es la amargura y la astringencia del producto final (Lea, 1990; Tanaka, 1994).

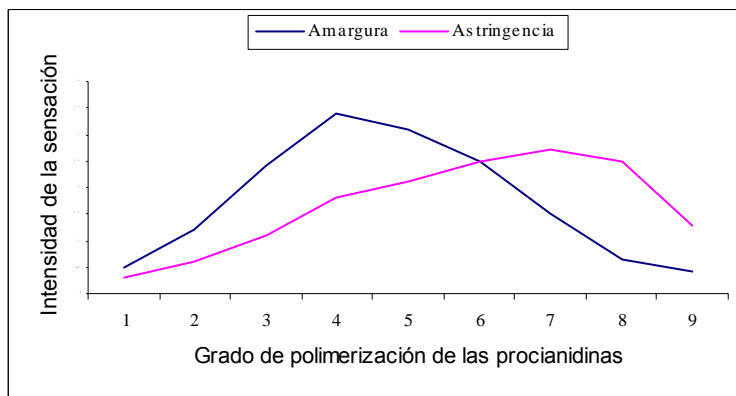


Figura 53. Evolución de la amargura y de la astringencia del vino en función del grado de polimerización de las procianidinas. (Adaptado de Lea, 1990).

Este tipo de reacciones de polimerización que tienen lugar en los vinos pueden ser útiles a escala de laboratorio para dotar a las procianidinas de marcaje radiactivo, ya que la utilización de acetaldehído radiactivo en una solución modelo que reúna las condiciones óptimas podría unir monómeros mediante puentes de acetaldehído, podría formar compuestos radiactivos de mayor grado de polimerización. Debe tenerse en cuenta que la amplia reactividad de los compuestos fenólicos ha sido estudiada principalmente en soluciones modelo, ya que los vinos tintos poseen una química altamente compleja, que hace especialmente difícil el aislamiento de nuevos pigmentos que solo se obtienen en muy pequeñas cantidades (Mateus, 2002). De este modo, los principales parámetros estudiados en este tipo de soluciones modelo son la concentración de acetaldehído existente en el mismo junto con la temperatura y pH. Por tanto, es conveniente conocer el grado de estabilidad de las diferentes procianidinas que pueden ser utilizadas en el estudio de estas soluciones modelo, ya que no todos los compuestos se comportan del mismo modo en este tipo de soluciones, pudiendo generarse compuestos que podrían interferir en las reacciones que deben tener lugar en el medio. Así, la transformación de los flavonoles a cualquier concentración de acetaldehído parece ser una reacción con una cinética de primer orden, pues la condensación de flavonoles mediante acetaldehído ocurre a través de un proceso de polimerización catalizado por ácido, pudiéndose dar al mismo tiempo la rotura ácida de la procianidina inicial (Jurd, 1969; Timberlake, 1976; Haslam, 1980; Rivas-Gonzalo, 1995; Fulcrand, 1996; Saucier, 1997; Es-Safi, 1999). La velocidad a la que se desarrolla la reacción aumenta al aumentar la concentración de acetaldehído. Los trímeros C1 y T2, así como los dímeros B1-3-O-galato y B2-3-O-galato son los compuestos que menor vida media poseen en el medio de reacción, incluso sin la presencia de acetaldehído. Dentro de las procianidinas diméricas, la B2 es el compuesto más afectado por la presencia de acetaldehído reaccionando con él rápidamente, seguida por la procianidina B1. Por el contrario, la procianidina B3 se muestra como el compuesto con menor reactividad, al reaccionar más lentamente con el acetaldehído (Dallas, 2003). La fortaleza del enlace interflavánico dentro de las estructuras oligoméricas parece estar relacionado con la longitud de las moléculas, así como la naturaleza de sus unidades constitutivas. Sin embargo, dentro de un determinado grado de polimerización, la presencia de (+)-catequina en el oligómero parece impartir una estabilidad adicional a la molécula en la mayoría de las condiciones estudiadas. Muchas de las reacciones en las que intervienen los taninos parecen proceder mediante y/o competir con la ruptura de uniones monoméricas. Asimismo, las estructuras triméricas son las que se muestran más sensibles a la presencia de acetaldehído en el medio y a las condiciones de pH y temperatura (Dallas, 2003). Cuando se ponen en contacto en un medio catequina, epicatequina y malvidina-3-O-glucósido con acetaldehído, se observa una disminución en la concentración de los

flavonoles y la aparición de nuevos productos formados que son eluidos después de sus precursores, hecho que indica que estos compuestos son menos polares o de mayor tamaño. Igualmente, poseen un espectro UV-visible entre 250–500 nm similar al que muestran los flavonoles con un máximo de absorbancia cercano a 280 nm, lo que sugiere que se mantiene la estructura flavanol original (Es-Safi, 1999). Los análisis realizados mediante LC/MS en modo ión negativo indican que los productos formados son oligómeros compuestos por unidades flavanol (catequina, epicatequina y malvidina-3-O-glucósido) unidos por puentes etilo formados según el mecanismo propuesto por Timberlake & Bridle y confirmado posteriormente por Fulcrand (1996). Los flavonoles pueden reaccionar a través del carbono 6 u 8, obteniéndose como productos cuatro compuestos que poseen enlaces C6–C6, C8–C8 y C6–C8 (éstos con configuraciones R y S) teniendo en cuenta la presencia de un carbono asimétrico en éstos últimos compuestos. Conjuntamente con estas estructuras diméricas, también se detectan varios compuestos oligoméricos hasta un nivel de tetrámero. La reacción se muestra más veloz con epicatequina que con catequina (Es-Safi, 1996 y 1999; Francia-Aricha, 1997; Fulcrand, 1996 a y b). Si el medio de reacción está compuesto de epicatequina y malvidina-3-O-glucósido, se forma un compuesto de señal  $m/z$  809 que se corresponde con una unidad flavilium unida a una epicatequina mediante un puente etilo. Asimismo, se detectan varios oligómeros y polímeros que finalmente precipitan. En este caso, la reacción de polimerización se detiene cuando el inicio y el final de un oligómero están ocupados por unidades malvidina (Es-Safi, 1999). Estos compuestos sintetizados no son muy estables cuando son aislados, haciendo difícil su identificación mediante métodos espectrales (Fulcrand, 1996 b; Es-Safi, 1999; Remy, 2000). Del mismo modo, se ha estudiado la reactividad de las catequinas del té con formaldehído, produciéndose la sustitución electrófila por parte de éste en los carbonos C6 ó C8 de la (+)-catequina debido a la nucleofilidad del anillo A (McGraw, 1988; Tobiason, 1988; Takagaki, 2000). Las catequinas no galoiladas poseen el mismo grado de reactividad que las galoiladas, por tanto, el número de grupos hidroxilo en el anillo B raramente afecta a la reactividad con formaldehído. Por el contrario, la (-)-epigalocatequina galato y (-)-epicatequina galato, que poseen la unidad galoil en C3, muestran mucha mayor reactividad que las formas no galoiladas. En el caso de los flavonoides, incluso aquellos que poseen una estructura floroglucínica en el anillos A muestran una menor reactividad que las catequinas. Una de las grandes diferencias entre flavonoles y catequinas es la existencia de un grupo carbonilo en posición C4 en los primeros. Es sobradamente conocido que el grupo carbonilo posee propiedades electrón atractivas. Se cree que esta cualidad atractora de electrones del grupo carbonilo en el carbono C4, podría disminuir la densidad de carga en el anillo A y debilitar la nucleofilidad de los flavonoides. Del mismo modo, la baja reactividad vista con las antocianinas puede deberse a una propiedad electrón atractiva de la estructura oxonio. Estos datos sugieren que, al menos dos factores sean necesarios para la existencia de reactividad con formaldehído. Uno de los factores sería la presencia de una estructura floroglucínica en el anillo A, y el otro, la ausencia de un grupo atractor de electrones (como por ejemplo, un grupo carbonilo) que pueda disminuir la densidad de carga del anillo A (Kiatgrajai, 1982; Takagaki, 2000).

Otro de los parámetros importantes a tener en cuenta en las soluciones modelo, es el pH de las mismas. Los ensayos realizados con diferentes procianidinas (B1, B2, B3, C1, T2, B1-3-O-galato y B2-3-O-galato) en soluciones modelo que poseían diferentes pHs (2, 3.2, 3.6, 4, 6) muestran que la desaparición de las procianidinas parece seguir un cinética de primer orden y que es más rápida a pH 2 especialmente para los trímeros, donde la rotura del enlace C–C es más rápida. El pH en el que las procianidinas se muestran más estables es 3.2 (Dallas, 2003). Este resultado es interesante, ya que la mayoría de los vinos poseen un pH alrededor de 3.2. El pH del medio de reacción es importante, porque en función de su valor, pueden tener lugar reacciones de reorganización. Este tipo de reacciones se dan entre las propias procianidinas pudiéndose llegar a derivados con enlaces C4–C6. Se cree que se forman moléculas de menor y de mayor tamaño que del precursor del cual provienen. Si el pH es lo suficientemente ácido, podría ocurrir la ruptura de los enlaces interflavánicos de una forma más fácil debido a la relevancia del carácter nucleofílico de las moléculas. También podría ser posible que se formaran pequeñas cantidades de acetaldehído *in situ* debido a la oxidación del etanol, siendo algunos de los nuevos compuestos formados producto de una reacción inducida por el propio etanal (Dallas, 2003). En este sentido, la procianidina B3 libera al medio solamente cantidades significativas de (+)-catequina a pH 2, un monómero de menor peso molecular que su precursor. Algo similar ocurre con el trímero T2 que libera (+)-catequina y procianidina B1 (un monómero y un dímero). Por el contrario, la procianidina B1, que es un dímero, con el tiempo libera al medio





(+)-catequina (monómero) y procianidina T2 (trímero). De forma similar, el dímero B2, que se muestra bastante estable a pH 3.2, tras 35 días de ser disuelto en el medio, libera (-)-epicatequina (monómero) y procianidina C1 (trímero) mayoritariamente, aunque también podría proporcionar otras procianidinas probablemente más complejas, mostrando que la rotura y formación de enlaces C-C entre las procianidinas puede ocurrir en condiciones suaves y que se pueden desarrollar reacciones de polimerización y depolimerización tal y como lo describieron Timberlake & Bridle y Haslam (Timberlake & Bridle, 1976 a; Haslam, 1977).

Por último, el aumento de la temperatura eleva la velocidad de la reacción de degradación de las procianidinas en el vino (Dallas, 1995). Este tipo de reacciones que se desarrollan con el aumento de la temperatura, parecen seguir una cinética de primer orden. Existen diferencias significativas entre la velocidad de degradación de procianidinas a elevadas (32 y 42° C) y bajas (12 y 22° C) temperaturas (Dallas, 2003). Los trímeros de procianidina T2 y C1, que reaccionan rápidamente en presencia de acetaldehído y son transformados fácilmente a diferentes pH, también poseen una elevada tasa de degradación a diferentes temperaturas cuando las comparamos con otros reactivos químicos. Entre las procianidinas diméricas, las no galoiladas son estables en el rango de temperaturas mencionado anteriormente y, también en este caso, la presencia de (+)-catequina en la molécula, parece darle un grado adicional de estabilidad al compuesto, especialmente a 22°C (Dallas, 2003). En consecuencia, la temperatura de almacenamiento de un vino juega también un importante papel en este tipo de reacciones, ya que influye en la velocidad de transformación de las procianidinas.

Como se explicará en el siguiente capítulo, el método escogido para sintetizar procianidinas radiactivas es la reacción de polimerización caracterizada en los vinos entre el acetaldehído y las catequinas, utilizando soluciones modelo que permitan llevar a cabo este tipo de reacciones.



## 2.2. Obtención de procianidinas radiactivas

### 2.2.1 Síntesis de oligómeros de Epicatequina

El principal objetivo de la presente tesis es el estudio de la absorción *in vivo* en ratas de las procianidinas existentes en el vino. Anteriormente se ha comentado que las procianidinas se encuentran en los vinos en diferentes grados de polimerización (monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros) y que su extracción de diferentes matrices biológicas (plasma, tejidos, etc) es un proceso crítico en el estudio de estos compuestos, ya que solo se extrae un bajo porcentaje de ellos. Por esta razón era interesante trabajar con estos compuestos marcados radiactivamente, pues a pesar del reducido porcentaje de extracción de los mismos, la marca radiactiva haría que se detectaran con mayor sensibilidad.

En el capítulo anterior se han estudiado diferentes métodos que ofrecen la posibilidad de marcar radiactivamente las procianidinas. Uno de estos métodos hacía referencia a la utilización de la maquinaria biosintética de las plantas para sintetizar procianidinas radiactivas a partir de la administración de una fuente de carbono radiactiva (sacarosa), de un precursor marcado de la vía de síntesis de las procianidinas (fenilalanina), o bien, mediante la administración de  $^{14}\text{CO}_2$ . Sin embargo, el mayor inconveniente que posee este método es la extracción de las procianidinas sintetizadas de los tejidos vegetales; los métodos de extracción utilizados suelen ser tediosos y complejos, dificultando bastante el trabajo.

Otros métodos que podrían utilizarse para marcar radiactivamente las procianidinas se basan en la amplia reactividad de éstas. Uno de los métodos hace referencia a la facilidad con la que las procianidinas pueden ser glucosiladas; no obstante y como se comentará posteriormente, los glucósidos de las procianidinas no son absorbidos en el tracto gastrointestinal, con lo que este método de síntesis no puede utilizarse para dotar a las procianidinas de marca radiactiva, pues no serían de utilidad para el estudio del proceso de absorción de estos compuestos *in vivo*.

La nitrosilación es una reacción descrita para los fenoles simples y que podría aplicarse a las procianidinas para introducir un átomo de  $^{15}\text{N}$ . Análogamente a la nitrosilación, las reacciones de *orto*-metilación también ofrecen la posibilidad de introducir un átomo de  $^{14}\text{C}$  en la estructura de las procianidinas en forma de grupo metilo, formándose un enlace C-O entre un grupo hidroxilo de la procianidina y el grupo metilo. Asimismo, la adición de una cadena lateral carbonada que posea  $^{14}\text{C}$  es posible mediante la reacción de condensación de Mannich. No obstante, la adición de grupos funcionales a la estructura de las procianidinas mediante estas reacciones (nitrosilación, *orto*-metilación y condensación de Mannich) podrían afectar al proceso de absorción de las procianidinas al modificar la estructura final de estos compuestos.

Del mismo modo, se ha descrito como a partir de reactivos simples como  $\text{K}^{13}\text{CN}$  es posible sintetizar epicatequina y catequina marcadas isotópicamente; sin embargo y aunque este método está bien descrito en la bibliografía, la necesidad de realizar diez etapas previas para obtener el producto final marcado, teniendo cada etapa un rendimiento determinado, hizo desestimar este mecanismo de síntesis.

Las características deseadas en las procianidinas sintetizadas (tanto con marcaje radiactivo como sin él) es que debían ser similares a los oligómeros y polímeros sintetizados en el vino durante el proceso de envejecimiento de éste. Además, para estudiar el proceso de absorción de estos compuestos *in vivo* en ratas interesaba que el grado de polimerización no fuese demasiado elevado, siendo preferible la obtención de oligómeros (compuestos con un grado de condensación comprendido entre 2 y 10 unidades de epicatequina) que polímeros (cuyo grado de condensación es superior a 10 unidades de epicatequina). Asimismo, la presencia de estructuras monoméricas debía ser inapreciable. Por esta razón, se optó por la reproducción en soluciones modelo a nivel de laboratorio de las reacciones de polimerización entre las procianidinas y el acetaldehído que se dan en los vinos.

Anteriormente se ha comentado como en el vino tiene lugar una polimerización desordenada de los taninos en la que juega un importante papel el acetaldehído. La aparición de este reactivo en el medio proviene de la reactividad del etanol del vino, ya que éste en medio

ácido ( $\text{pH} \approx 3\text{--}4$ ) y con metales que catalizan el proceso, evoluciona hacia la formación de acetaldehído, el cual se torna activo en medio ácido, formándose un carbocatión altamente reactivo que ataca fácilmente las posiciones nucleófilas presentes en monómeros como la catequina o la epicatequina, iniciándose de esta manera el proceso de polimerización. Para reproducir esta reacción, se realizó un medio de polimerización compuesto por dos reactivos (catequina y acetaldehído) disueltos en una solución de ácido tartárico (4 g/L), que además de proporcionar un pH ácido al medio, debía actuar también como catalizador de la reacción. El acetaldehído actuaría como reactivo limitante, y por ello se añadió al medio en defecto (20% en moles de la cantidad de catequina utilizada, que fue de 1 g/L).

Transcurridos quince días desde la puesta en marcha de este medio de polimerización, no se obtuvieron evidencias (ni mediante cromatografía líquida, ni mediante cromatografía en capa fina) que indicasen que había tenido lugar una condensación entre la catequina y el acetaldehído, ya que en los cromatogramas obtenidos solamente se detectaba un pico cromatográfico cuyo tiempo de retención (15.9 min.) coincidía con el tiempo de retención de la catequina (ver figura 54). En consecuencia, solamente se detectaba la catequina que había sido añadida al medio y ningún compuesto más. La elevada reactividad del acetaldehído junto con las posiciones nucleófilas de la catequina deberían haber sido argumentos suficientes como para haber dado lugar a la formación de nuevos compuestos. Una de las razones por las cuales no aparecieron nuevos compuestos en el medio sería que el acetaldehído no hubiera podido formar el carbocatión que atacase a la catequina debido a que el ácido tartárico no proporcionaba la acidez necesaria al medio de reacción como para desencadenar la reacción de condensación. Por tanto, había que buscar otro ácido que proporcionase al medio las condiciones idóneas para poner en marcha un medio de polimerización que permitiera obtener oligómeros y polímeros de flavan-3-oles.

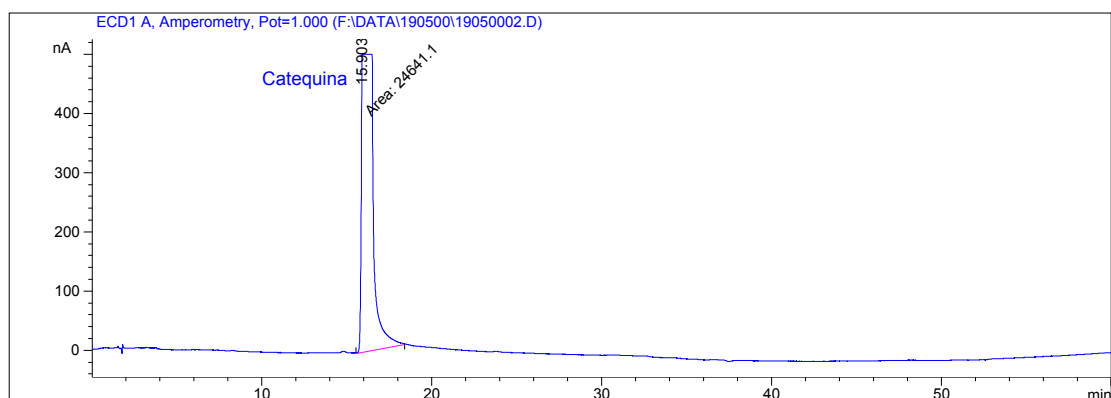


Figura 54. Cromatograma obtenido en el proceso de polimerización de catequina con acetaldehído en un medio de reacción con ácido tartárico.

La búsqueda de información sobre el tema permitió la puesta en marcha de un segundo medio de polimerización que constaba de ácido acético (3% del volumen total), etanol (10% del volumen total, simulando el contenido etanólico de un vino), agua (2 moles), epicatequina (12 g/L) y acetaldehído (2M). En este caso, se utilizó epicatequina para la realización del ensayo, ya que ésta reacciona más rápidamente con el acetaldehído que la catequina según los datos aportados por Es-Safi *et al* (1999). La solución resultante de añadir etanol y ácido acético sobre el agua poseía un pH en torno a 2,2. La epicatequina se añadió en penúltimo lugar y al hacerlo, la solución adquirió una coloración blanquecina. En último lugar se realizaba la adición del acetaldehído que dotaba al medio de reacción de una coloración amarillenta. El medio se mantuvo a temperatura ambiente, sin agitación y al pH citado anteriormente.

Veinticuatro horas después de la adición del acetaldehído, el medio de reacción poseía un aspecto turbio, pudiéndose ver un precipitado blanquecino en el fondo. Este nuevo medio, favorecía la condensación entre la epicatequina y el acetaldehído, y además, la velocidad a la que se producía la polimerización de la epicatequina era elevada. La realización de una cromatografía en capa fina del precipitado obtenido permitió conocer aproximadamente el grado

de polimerización alcanzado (ver figura 55). El grado de condensación obtenido fue elevado ( $\geq 5$ ) ya que la mayoría de los compuestos quedaron en el origen, aunque algunos de ellos se desplazaron sobre la capa fina dejando un pequeño carril continuo sin que los compuestos llegaran a separarse por completo.

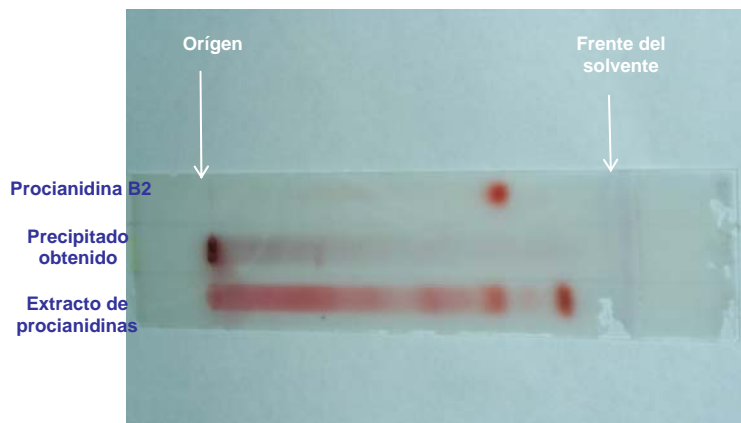


Figura 55. Cromatografía en capa fina obtenida para el precipitado sintetizado en un medio de polimerización con acetaldehído en exceso.

La recogida de alícuotas del medio de polimerización a diferentes intervalos de tiempo permitió el estudio de la evolución temporal de la condensación de la epicatequina con acetaldehído. La primera alícuota ( $t = 0$  h) se recogió cuando la epicatequina fue disuelta en el medio y todavía no se había añadido el acetaldehído, obteniéndose de este modo la concentración inicial de epicatequina existente en el medio de reacción antes de comenzar la condensación entre ambos reactivos. Las siguientes alícuotas se recogieron 1, 2 y 3 horas después de la adición del acetaldehído al medio, proporcionando información sobre la evolución de la concentración de la epicatequina durante las tres primeras horas, mientras que las últimas tres alícuotas se recogieron a las 24, 129 y 192 horas de haber puesto en marcha la reacción de polimerización, caracterizándose de este modo la evolución de la concentración de epicatequina en los instantes finales del proceso de condensación entre epicatequina y acetaldehído. Todas estas alícuotas fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (el protocolo utilizado será detallado más adelante) y en los cromatogramas obtenidos se observó la evolución temporal de la epicatequina tanto en los instantes iniciales como en los finales del proceso de polimerización (ver figura 56 y tabla 14).

Tiempo (h)	Área Ep (mAU*s)	[Ep] (mg/L)	% Ep que ha reaccionado
0	115054	12000	-
1	51286,7	5349	55,4
2	20438,3	2132	82,2
3	9744,4	1016	91,5
24	7804,17	813	93,2
120	4791,07	500	95,8
192	4439	462	96,2

Tabla 14. Datos obtenidos en el control temporal de la concentración de epicatequina en los instantes iniciales y finales del proceso de polimerización entre la epicatequina y el acetaldehído en medio ácido.

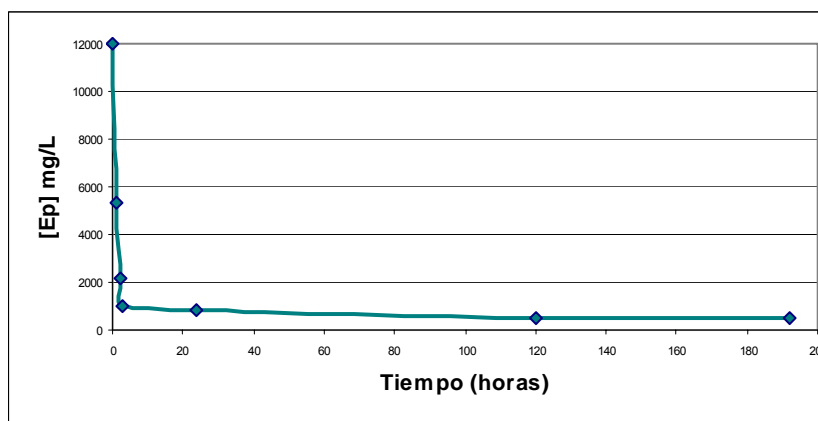


Figura 56. Evolución temporal de la concentración de epicatequina en los instantes iniciales y finales del proceso de polimerización entre la epicatequina y el acetaldehído en medio ácido.

Los resultados obtenidos indicaban que la concentración de epicatequina disminuía rápidamente durante las tres primeras horas de reacción tras la adición de acetaldehído. La desaparición de la epicatequina del medio para formar compuestos de mayor grado de polimerización parecía seguir un curva exponencial decreciente (ver figura 54) que evidenciaba la elevada reactividad de los reactivos en las condiciones en las que se realizó la reacción de condensación. Estos resultados estaban en concordancia con los observados por Es-Safi *et al* (1999) que postulaba una mayor reactividad para la epicatequina con el acetaldehído que para la catequina. De hecho y como se refleja en la figura 57 y en la tabla 14 solamente durante las tres primeras horas de reacción casi el 92% de la epicatequina que se añadió al medio había reaccionado con el acetaldehído. Transcurridas 24 horas, el porcentaje de epicatequina que había reaccionado con el acetaldehído era del 93%, porcentaje que se elevaba hasta cerca de un 96% tras 120 horas de reacción. Este porcentaje parecía mantenerse estable a partir de este punto, ya que 192 horas después del comienzo de la reacción, el tanto por ciento de la epicatequina que había reaccionado con acetaldehído era también del 96%, situándose el porcentaje de epicatequina residual en el medio en torno al 3.8%. En la figura 54 se aprecia como el acetaldehído reaccionaba con la mayoría de la epicatequina en apenas tres horas de reacción, estabilizándose el proceso a partir de este punto, ya que, a partir de aquí la reacción de polimerización tiene lugar entre dímeros, trímeros, etc., junto con la epicatequina residual existente en el medio.

En los instantes iniciales de la reacción de polimerización (tres primeras horas) no aparecía precipitado en el medio, hecho que indicaba que los compuestos formados no poseían el suficiente tamaño y masa molecular como para precipitar. La aparición de precipitado se observaba a las 24 horas de haberse iniciado la reacción de condensación entre la epicatequina y el acetaldehído. Este precipitado presentaba una coloración blanquecina y, como se explicará más adelante, estaba formado por oligómeros y polímeros de epicatequina de diferentes grados de condensación. Este sería el compuesto de partida para el estudio de absorción *in vivo* en ratas de las procianidinas del vino. Además, se observó una evolución en la coloración del precipitado formado, ya que si bien al principio éste poseía un aspecto blanquecino, con el paso de los días, la coloración del precipitado se iba oscureciendo cada vez más, hasta alcanzar una coloración marrón. Del mismo modo, se observó también la evolución de la coloración de la fase acuosa, que de la misma manera que el precipitado, se fue oscureciendo paulatinamente hasta alcanzar una coloración marrón oscura muy similar a la coloración que puede presentar cualquier coñac. Este hecho hizo pensar que los compuestos sintetizados habían sufrido una evolución temporal similar a la que tiene lugar en los vinos durante el proceso de envejecimiento de éstos. Por tanto, las condiciones en las que se realizaba la reacción de condensación permitían la aparición y evolución de nuevos compuestos en el medio de reacción.

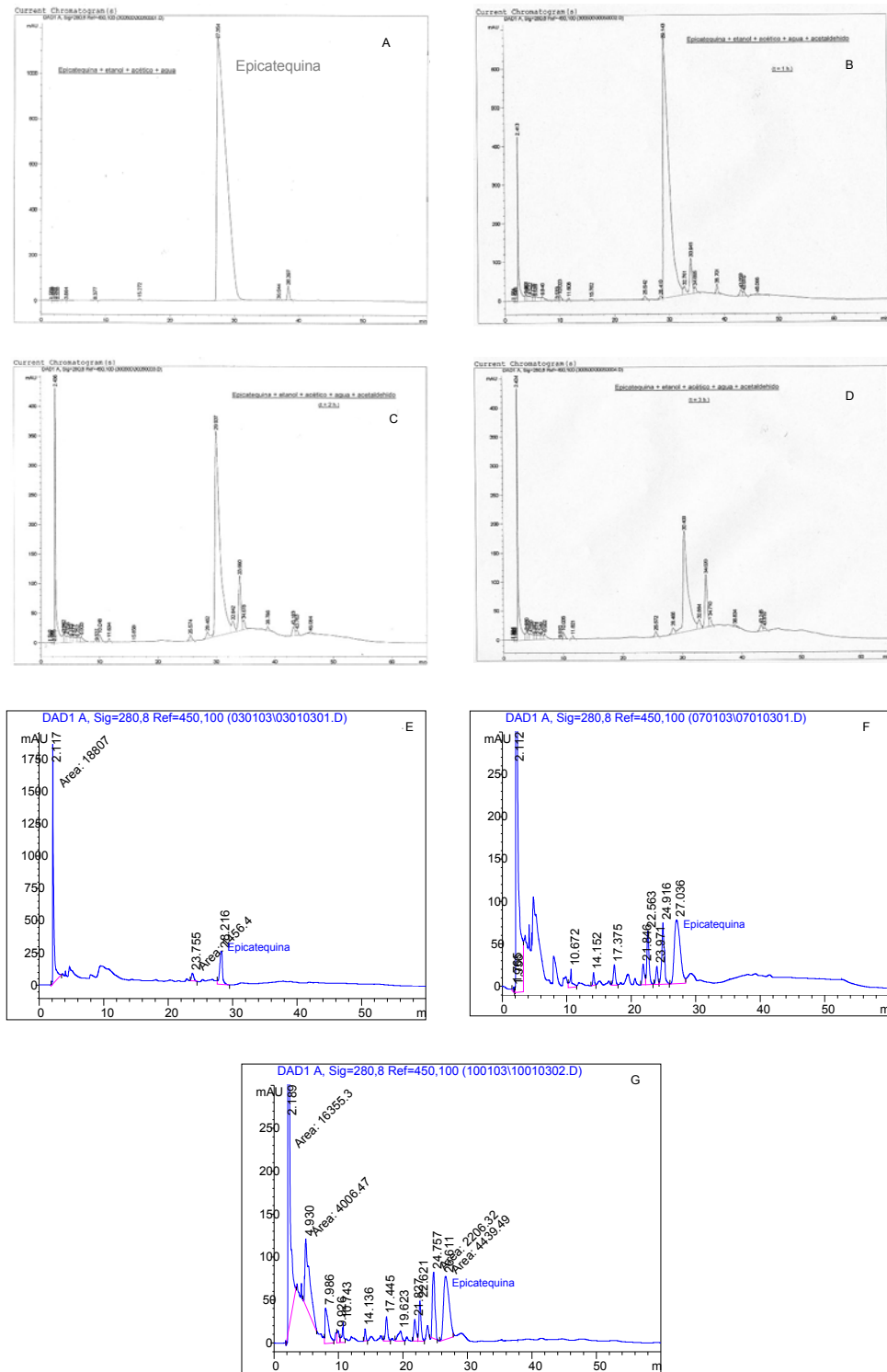


Figura 57. Seguimiento temporal de la variación de la concentración de epicatequina en el medio durante el proceso de polimerización: (A) medio de polimerización sin acetaldehído, (B) medio de polimerización tras 1 hora desde la adición del acetaldehído, (C) medio de polimerización tras 2 horas desde la adición del acetaldehído, (D) medio de polimerización tras 3 horas desde la adición del acetaldehído, (E) medio de polimerización tras 24 horas desde la adición del acetaldehído, (F) medio de polimerización tras 120 horas desde la adición del acetaldehído, (G) medio de polimerización tras 192 horas desde la adición del acetaldehído.

Un segundo objetivo que se planteó fue el control de las condiciones de reacción en las que tenía lugar el ensayo, hecho que permitiría la obtención de un determinado grado de polimerización al poder detener la reacción en el momento deseado. Las condiciones de reacción modificadas fueron el pH del medio y la temperatura. El aumento del pH del medio no permitió el control del grado de polimerización obtenido ya que tanto a pH 7,5 como a pH 12 aparecía una cantidad de precipitado en el medio similar a la generada a pH ácido. Además, la concentración de epicatequina en el medio tras 24 horas de reacción a pH neutro o alcalino era muy pequeña, indicando que toda la epicatequina presente en el medio había reaccionado con acetaldehído, ya que éste podía formar, tanto en medio ácido como en medio básico, un enolato (ver figura 58) que se mostraba igual de reactivo con la epicatequina.

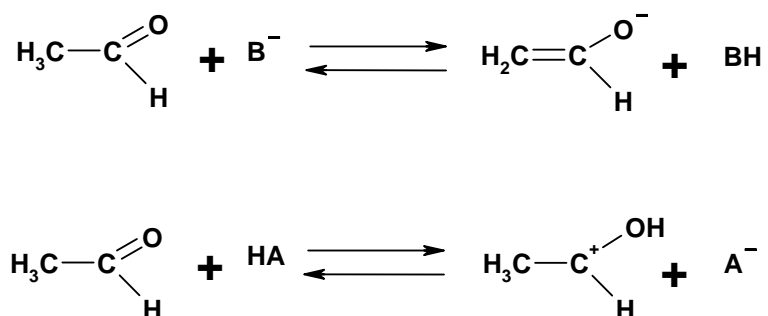


Figura 58. Formación de enolatos reactivos de acetaldehído: (A) a pH básico y (B) ácido. Ambas especies se muestran altamente reactivas con epicatequina.

Consecuentemente, fue imposible controlar el grado de polimerización obtenido mediante una simple variación del pH del medio, ya que un cambio brusco de éste no detenía la reacción. Por otra parte, se tomaron alícuotas de un medio de reacción al que hacía 3–4 horas se le había añadido acetaldehído y se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$ . A esta temperatura, la reacción se detenía, pero proseguía una vez descongelada la alícuota. Esta tampoco era una forma válida de controlar la reacción, ya que, si bien a temperaturas bajas ésta no progresaba, cuando aumentaba la temperatura, volvía a reemprenderse. Este hecho obligaría a tener muy optimizado el proceso de obtención de sondas cuya absorción quería ser estudiada.

Ni la modificación del pH del medio, ni la modificación de la temperatura del mismo fueron de utilidad para controlar la reacción entre la epicatequina y el acetaldehído. Sin embargo, una manera de evitar que ambos reactivos interaccionasen era la adición al medio de reacción de un tercer reactivo que fuera capaz de ligarse a uno de ellos, impidiéndole que pudiera continuar con la reacción de polimerización. Debido a que la reactividad del acetaldehído es mayor que la de la epicatequina en medio ácido, debía ser éste el reactivo a controlar. Un compuesto capaz de interaccionar con los aldehídos e impedir que éstos reaccionen con terceros es el bisulfito sódico. La adición de una cantidad estequiométrica de bisulfito a un medio de reacción tres horas después de la adición del acetaldehído permitió la neutralización de éste, ya que el bisulfito sódico unía al acetaldehído impidiendo de este modo que prosiguiera la reacción. Transcurridas 24 horas desde la adición del bisulfito, el medio de reacción no poseía precipitado, hecho que indicaba que la reactividad del acetaldehído frente a la epicatequina se había modificado de tal forma que la reacción de condensación entre ambos había sido detenida por el bisulfito sódico. La figura 59 muestra como tras 24 horas de reacción existía en el medio epicatequina que no había reaccionado con el acetaldehído. Sin embargo, el inconveniente de utilizar esta técnica para controlar el progreso de la reacción fue que el complejo acetaldehído–bisulfito formado era soluble en el medio, igual que los primeros compuestos formados entre la epicatequina y el acetaldehído durante las primeras horas de reacción. El hecho de que el complejo acetaldehído–bisulfito no precipitara y pudiera ser separado de los productos de condensación entre epicatequina y acetaldehído, podría complicar el estudio de la absorción de estos últimos. Por tanto y a pesar de que el bisulfito detenía la reacción de polimerización entre epicatequina y acetaldehído, ésta tampoco era una forma válida de controlar el grado de polimerización obtenido en los compuestos de epicatequina sintetizados.

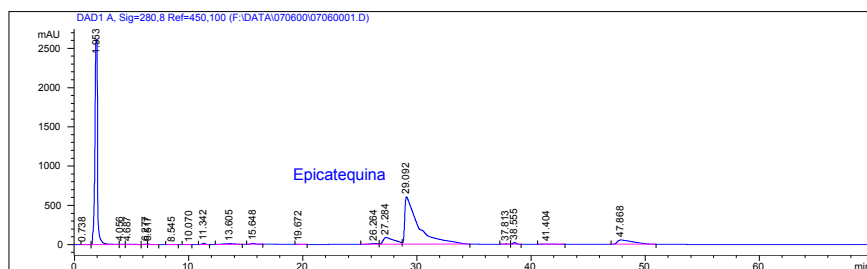


Figura 59. Paralización del proceso de polimerización entre epicatequina y acetaldehído al añadir bisulfito sódico al medio de reacción.

Todos los intentos realizados para controlar la reacción de condensación no habían permitido ejercer un total control sobre el medio de reacción. Además, teniendo en cuenta que era el acetaldehído el compuesto con mayor reactividad, se optó por añadir éste al medio en defecto con respecto a la cantidad de epicatequina utilizada para ver la evolución de la reacción y determinar si el grado de polimerización obtenido era menor. La relación molar epicatequina/acetaldehído utilizada era 1/50, estando el acetaldehído en exceso en el medio respecto de la cantidad de epicatequina disuelta en el mismo. Suponiendo que en el medio solamente se sintetizaran dímeros de epicatequina [Ep-act-Ep], la cantidad estequiométrica de acetaldehído necesaria para que reaccionara con la epicatequina era de 1 mmol aproximadamente, siendo la concentración final del acetaldehído en el medio de 0.024 M. En este caso, la relación molar epicatequina/acetaldehído era 5/3 con lo que el acetaldehído estaba en defecto respecto de la epicatequina disuelta en el medio. La puesta en marcha de un medio de reacción con estas características permitió observar que transcurridas 24 horas desde la adición de 1 mmol de acetaldehído al medio no había aparecido precipitado y, además, el porcentaje de epicatequina que había reaccionado con el acetaldehído fue del 38% (ver figura 60). De esta manera, la reacción de condensación entre la epicatequina y el acetaldehído se ralentizó enormemente. La utilización de acetaldehído en exceso hacía que casi el 92% de la epicatequina existente en el medio había reaccionado con éste en solamente tres horas de reacción. Sin embargo, al utilizar una concentración de acetaldehído 90 veces inferior, solamente 2/5 de la epicatequina había reaccionado en un periodo de tiempo de 24 horas.

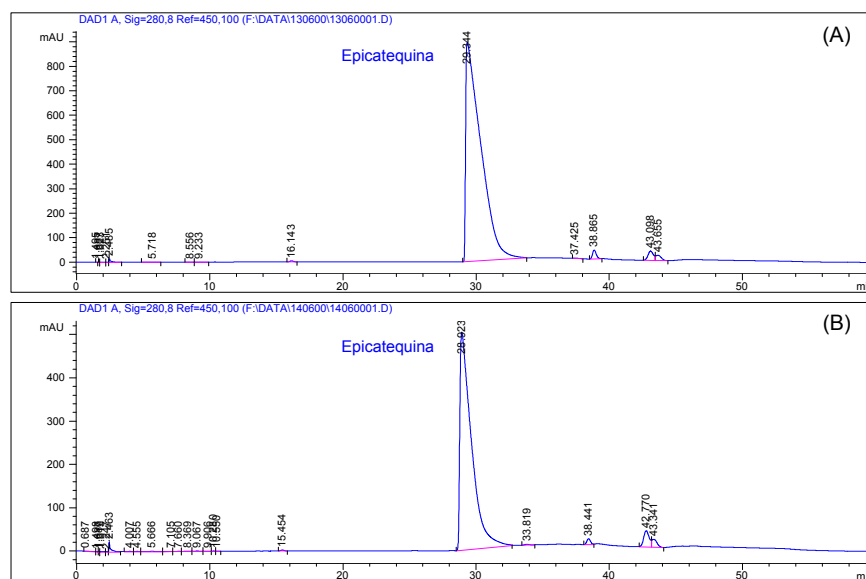


Figura 60. Cromatogramas obtenidos (A) tras 24 horas de reacción y (B) tras 48 horas de reacción para un medio de polimerización en el que el acetaldehído (1 mmol) está en defecto con respecto a la epicatequina.



Tras un periodo de 48 horas desde la adición de 1 mmol de acetaldehído al medio, no se observaba la aparición de precipitado en el mismo, cifrándose el porcentaje de epicatequina que había reaccionado en un 55%. De esta forma, se estudió la evolución temporal de la concentración de epicatequina cuyos resultados se resumen en la tabla 15, observándose que la disminución de la concentración de epicatequina en el medio era más acusada en los primeros días de reacción. Cerca del 70% de la epicatequina inicial que poseía el medio de reacción había reaccionado durante los cuatro primeros días, mientras que a partir del séptimo día de reacción, la disminución de la concentración de epicatequina en el medio se ralentizaba, si bien la reacción no llegaba a detenerse totalmente. Transcurridos 21 días desde el comienzo de la reacción, cerca del 80% de la epicatequina inicial había reaccionado con el acetaldehído para formar compuestos de un mayor grado de condensación. La figura 61 muestra la evolución temporal de la concentración de epicatequina.

Tiempo (días)	[Ep] (mg/L)	% Ep que ha reaccionado	Aparición precipitado	Coloración medio
0	12000	-	NO	marrón claro
1	7440	38	NO	amarillo claro
2	5371	55	NO	amarillo oscuro
3	4269	64	GRUMOS	amarillo muy oscuro
4	3786	68	SI	amarillo muy oscuro
7	3146	73	SI	amarillo muy oscuro
8	3014	74	SI	amarillo muy oscuro
9	2943	75	SI	marrón
14	2711	77	SI	marrón (cognac)
21	2556	79	SI	marrón (cognac)

Tabla 15. Datos obtenidos del estudio de la evolución temporal de la concentración de epicatequina en un medio de polimerización con acetaldehído en defecto.

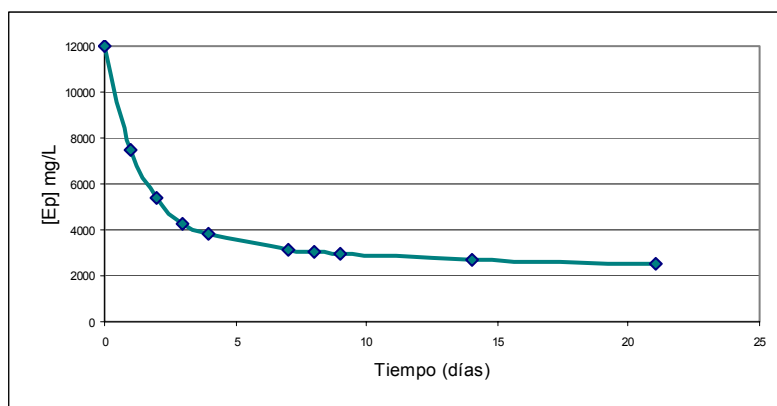


Figura 61. Evolución temporal de la concentración de epicatequina en un medio de polimerización con acetaldehído en defecto.

Cuando el acetaldehído era utilizado en exceso, la aparición de precipitado se observaba 24 horas después del comienzo de la reacción. Por el contrario, cuando este reactivo era utilizado en defecto no se observaba la aparición de precipitado en el medio hasta transcurridas 96 horas desde el inicio de la reacción, si bien, al cabo de 72 horas se apreciaba un aspecto grumoso de la solución que indicaba la formación de productos de condensación lo suficientemente grandes como para precipitar. Del mismo modo, se observó como la coloración del medio de reacción evolucionó paralelamente a la desaparición de epicatequina. Durante las primeras 24 horas de reacción, el color del medio era similar al que podríamos encontrar en cualquier vino blanco (amarillo claro). Sin embargo, el color del medio evolucionó hacia tonalidades de amarillo más oscuras durante las siguientes horas de reacción, produciéndose una variación de color hacia tonalidades marrones tras el decimocuarto día de reacción. Esta misma tonalidad era alcanzada en 3–4 días en un medio de polimerización con acetaldehído en



exceso. Por tanto, no se pudo ejercer un control total sobre la reacción para obtener un determinado grado de condensación en los compuestos sintetizados, pero si que se pudo ralentizar la reacción si el acetaldehído utilizado estaba en defecto con respecto a la epicatequina. Este hecho permitía (como se comprobará más adelante) que el grado de condensación de los compuestos formados fuese menor que el que se obtenía cuando el acetaldehído era utilizado en exceso. En la tabla 16, se resumen las cantidades utilizadas en los diferentes medios de polimerización preparados. Estos medios de reacción solamente se diferenciaban en el volumen final del medio y en la cantidad de acetaldehído añadido al mismo. En todos los casos, desaparecía el 99% de la epicatequina presente en el medio formándose abundante precipitado; el precipitado final sintetizado mediante ambos métodos (con acetaldehído en exceso y en defecto) solamente se diferenciaba, como se explicará más adelante, en el grado de polimerización final obtenido. La utilización de acetaldehído en defecto permite que la reacción evolucione más lentamente, simulando mejor la evolución seguida por las procianidinas en el proceso de envejecimiento de un vino. No obstante, la adición de acetaldehído en exceso al medio de reacción permite obtener los oligómeros y polímeros de epicatequina en un periodo de tiempo más breve. Además, la cantidad de precipitado obtenida en ambos casos es similar. Por ello, y en vista de la rapidez con la que se obtiene el precipitado en el medio de reacción, se decidió añadir acetaldehído en exceso a los medios de condensación para obtener los oligómeros y polímeros de epicatequina que serían utilizados para el estudio de su absorción *in vivo* en ratas.

Reactivo	Medio con acetaldehído en exceso		Medio con acetaldehído en defecto	
	Concentración final		Concentración final	
Ácido acético	3.4% v/v	3.4% v/v	3.4% v/v	3.4% v/v
Etanol	10% v/v	10% v/v	10% v/v	10% v/v
Agua	2 moles	2 moles	2 moles	2 moles
Epicatequina	12 g/L	12 g/L	12 g/L	12 g/L
Acetaldehído	2.12 M	2.12 M	0.024 M	0.024 M
Volumen Final	50 mL	10 mL	44.06 mL	8.8 mL

Tabla 16. Composición de los medios de polimerización preparados.

### 2.2.2 Caracterización de los compuestos sintetizados

Puesta a punto la reacción de condensación entre la epicatequina y el acetaldehído en medio ácido, se comenzó a trabajar con aquellas técnicas que permitiesen la separación (en función del grado de polimerización) y caracterización de los compuestos sintetizados, ya que serían éstas las que se utilizarían en futuros estudios de absorción. Las técnicas utilizadas fueron: cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Finalizada la reacción de polimerización, se procedió a la separación del precipitado formado. Para ello podían utilizarse dos técnicas: la filtración o la liofilización. Si se utilizaba la filtración, el proceso se realizaba a través de un filtro Whatman nº 1, en el que quedaban retenidos los compuestos sintetizados para, posteriormente, ser secado en una estufa a una temperatura de 30°C. El mayor inconveniente de esta técnica de separación era la imposibilidad de poder separar del medio la mayoría del acetaldehído residual que había quedado sin reaccionar. Por el contrario, su mayor virtud consistía en la separación de los nuevos compuestos formados de la epicatequina residual que había quedado en solución sin reaccionar (aunque en muy pequeñas cantidades).

Si la separación del precipitado formado se realizaba mediante liofilización, era posible la eliminación total de la fase acuosa del medio, obteniéndose el polímero sintetizado con un aspecto granuloso muy similar al que poseían los patrones comerciales utilizados (epicatequina, catequina y extracto de procianidinas). La figura 62 representa el perfil cromatográfico obtenido para una solución de extracto de procianidinas de concentración 3500 mg/L sin liofilizar (a) y el perfil cromatográfico obtenido para la misma solución liofilizada y resuspendida en el mismo volumen inicial (b). Puede apreciarse que el perfil cromatográfico de la muestra antes y después de la liofilización es prácticamente idéntico, por lo que esta técnica se mostraba válida para la

eliminación de la fase acuosa de los medios de reacción al no modificar el perfil cromatográfico de los picos obtenidos. Del mismo modo, se eliminaba la práctica totalidad del acetaldehído residual que había quedado en la fase acuosa sin reaccionar. El único inconveniente que presentaba la liofilización era que la epicatequina que había quedado en fase acuosa sin reaccionar (que solía ser menor del 1% de la epicatequina inicial) quedaba junto al polímero sintetizado, sin poder separarla del mismo. Para evitar que quedaran restos de epicatequina junto a los oligómeros sintetizados, se combinaron las dos técnicas de separación: en un primer paso se separó el compuesto sintetizado de la fase acuosa del medio de reacción mediante filtración y, posteriormente, se liofilizó el precipitado filtrado. De esta manera, fué posible separar la epicatequina residual del oligómero formado y, al mismo tiempo, eliminar el acetaldehído residual del mismo. Tanto el acetaldehído como la epicatequina que no reaccionaban, quedaban en fase acuosa.

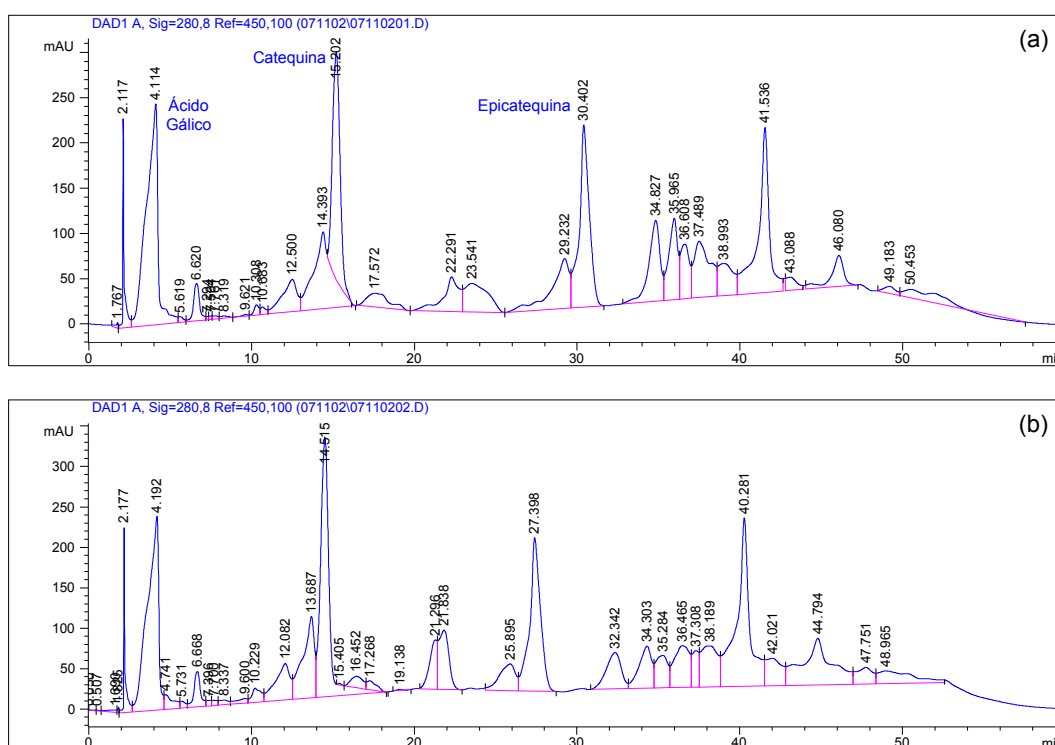


Figura 62. Perfil cromatográfico obtenido para una muestra de extracto de procianidinas (3500 mg/L) (a) sin liofilizar y (b) liofilizada. Ambos perfiles cromatográficos son muy similares, si bien los picos cromatográficos del cromatograma (b) están adelantados un poco con respecto a los picos obtenidos en el cromatograma (a). No obstante, esta única diferencia no es debida al proceso de liofilización, sino a que la columna del cromatógrafo líquido no está termostatazada, pudiendo haber variaciones de este tipo en los tiempos de retención de los compuestos detectados.

Por otra parte, el estudio de los grados de polimerización obtenido en los diferentes precipitados sintetizados se realizó utilizando una técnica cualitativa como la cromatografía en capa fina, cuyo protocolo se presenta en el esquema 1. Mediante la utilización de esta técnica fue posible estudiar y comparar los diferentes grados de polimerización obtenidos para los oligómeros y polímeros sintetizados tanto con acetaldehído en defecto como en exceso. Para ello, se utilizaron patrones comerciales de catequina, epicatequina y procianidina B2 que proporcionaban información sobre los Rf's correspondientes a monómeros y dímeros, mientras que la utilización de un extracto de procianidinas extraído de las semillas de las uvas se utilizó para obtener información sobre los Rf's de compuestos de grado de condensación superior (trímeros, tetrámeros y pentámeros).

**CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

La cromatografía en capa fina en placas de sílica gel es una técnica que permite la separación de las diferentes procianidinas existentes en la muestra en función de su grado de polimerización.

**Cromatoplasmas utilizadas**

Las cromatoplasmas (Merck) utilizadas son de sílica gel-60, sin indicador fluorescente. El tamaño de estas cromatoplasmas es 20\*5\*0.25 cm.

**Preparación de las muestras y de los patrones**

Los patrones y las muestras de los oligómeros de epicatequina formados deben ser disueltos en agua o en una solución hidroalcohólica al 20%. Cuanto mayor es el porcentaje etanólico en la solución en la que se disuelven las muestras y los patrones, mayor es la distorsión de la linealidad del frente del eluyente. Por tanto, se utiliza agua como solvente, teniendo en cuenta que la cantidad de ésta debe ser la misma en las muestras y en los patrones. No se puede utilizar el metanol como solvente para disolver las muestras y los patrones porque éste actúa como inhibidor de la cromatografía en capa fina. Este efecto inhibidor es superior en los monómeros que en los polímeros (Brunet, 1999). Los patrones utilizados en esta técnica fueron epicatequina (Fluka) (monómero) y extracto de procianidinas (mezcla de monómeros y oligómeros de flavan-3-oles extraídos de la semilla de la uva por la empresa Dérivés Résiniques et Terpéniques).

**Eluyente**

El solvente utilizado en la elución de los compuestos fenólicos es una mezcla de tolueno (Carlo Erba)-acetona (QCA)-ácido fórmico (Carlo Erba), en una proporción de 3-7.5-1. La elución de los compuestos fenólicos por las cromatoplasmas se realiza dentro de una cubeta cromatográfica con una atmósfera saturada con el solvente de elución. El proceso cromatográfico se detiene cuando la línea de elución del solvente se encuentra a 1.5-2 cm por debajo de la parte superior de la cromatoplasma.

**Revelador**

El solvente revelador es vainillina al 1% (Panreac) en ácido sulfúrico (Aldrich). Éste es un método de tinción específico de las procianidinas, basado en la reacción de los aldehídos aromáticos con las catequinas, formando un complejo con coloración que absorbe en el visible. El grado de reactividad de la vainillina con las catequinas es superior que con los polímeros de éstas.

**Cálculo de los Rf**

Se mide la longitud recorrida por cada mancha y la longitud recorrida por el solvente. El Rf es el valor numérico que relaciona estos dos parámetros.

Esquema 1. Protocolo del método de separación e identificación por cromatografía en capa fina de los oligómeros de epicatequina sintetizados.

El cálculo de los Rfs (distancia recorrida por el compuesto desde la línea base dividido por la distancia recorrida por el frente del solvente) de las diferentes manchas rojizas de las muestras (aparecidas tras la tinción con vainillina) y su comparación con los Rfs obtenidos para un extracto de procianidinas patrón, permitía conocer el grado de polimerización de los oligómeros de epicatequina sintetizados. En la figura 63 se observa el perfil cromatográfico obtenido para una muestra de oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en defecto.

La única diferencia existente entre ambas cromatografías era el tiempo de reacción transcurrido desde la adición del acetaldehído. La foto (a) representa una cromatografía en capa fina del medio de polimerización a las 24 horas. En el carril superior se inyectó un patrón de epicatequina, mientras que en el inferior se inyectó un patrón de procianidinas (diferentes grados de polimerización). En el carril central se inyectó la muestra que, como se observa, poseía un grado de polimerización comprendido entre monómero y trímero. La separación de los patrones en los compuestos de diferente grado de polimerización era nítida. Sin embargo, en el caso de la muestra, no se conseguía una perfecta separación de los diferentes oligómeros formados. En su lugar, se obtenía un carril continuo, teñido de color rojo (debido al revelador) que informaba del grado de condensación de la muestra.

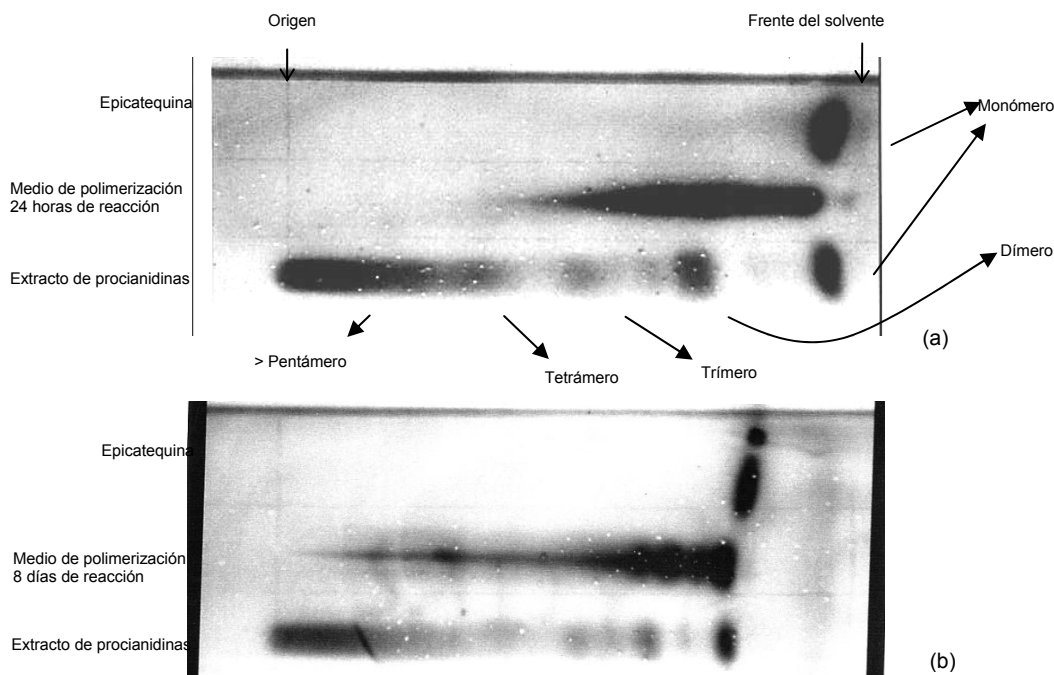


Figura 63. Cromatografías en capa fina obtenidas para un medio de polimerización con acetaldehído en defecto cuando han transcurrido (a) 24 horas de reacción y (b) 8 días de reacción.

La foto (b) pertenecía al mismo medio de polimerización pero 8 días después del comienzo de la reacción. Las muestras y los patrones fueron inyectadas en la capa fina en el mismo orden que en el caso anterior. Una alícuota del medio de polimerización se inyectó en el carril central, obteniéndose un aumento del grado de polimerización de la muestra con respecto a la anterior alícuota analizada. En este caso, el grado de polimerización se situaba entre monómeros y oligómeros mayores de cinco unidades, si bien, los compuestos predominantes parecían ser monómeros, dímeros y trímeros. Los Rfs obtenidos para estas dos cromatografías en capa fina se presentan en la tabla 17.

		Rfs calculados					
24 horas reacción	Epicatequina patrón	0,85	-	-	-	-	-
	Medio polimerización acetaldehído en defecto	0,86	0,7	0,55	0,43	-	-
	Extracto procianidinas patrón	0,85	0,68	0,54	0,42	0,33	0,22
		MONÓMERO	DÍMERO	TRÍMERO	TETRÁMERO	PENTÁMERO	>5
8 días reacción	Epicatequina patrón	0,86	-	-	-	-	-
	Medio polimerización acetaldehído en defecto	0,82	0,71	0,52	0,4	0,34	-
	Extracto procianidinas patrón	0,83	0,72	0,51	0,41	0,32	0,21

Tabla 17. Resultados obtenidos del cálculo de los Rfs en la separación cromatográfica en capa fina de dos alícuotas (24 horas y 8 días de reacción) de un medio de polimerización de epicatequina con acetaldehído en defecto.

Las diferencias existentes en el grado de polimerización de dos medios de polimerización cuya única diferencia era la cantidad de acetaldehído utilizada en el ensayo se ponía de manifiesto al realizar una cromatografía en capa fina (figura 64). El carril (a) pertenecía a un patrón de epicatequina, el carril (b) a un medio de polimerización al que se añadió acetaldehído en defecto (0.024M) tras nueve días de reacción, mientras que el carril (c)

pertenecía a un medio de polimerización con acetaldehído en exceso (2.12M) tras nueve horas de reacción y, por último, el carril (d) correspondía a un patrón de extracto de procianidinas. Puede comprobarse como la adición de acetaldehído en defecto o en exceso al medio de reacción afectaba directamente al grado de condensación final del oligómero de epicatequina formado. En aquellos medios de reacción en los que el acetaldehído era añadido al medio en defecto, el grado de polimerización de los compuestos formados oscilaba entre dímeros y tetrameros, si bien, existía en el medio una gran cantidad de epicatequina sin reaccionar. Sin embargo, la adición de acetaldehído en exceso al medio provocaba un aumento del grado de polimerización de los oligómeros de epicatequina, oscilando éstos entre dímeros y compuestos de grado de condensación 5 en una cantidad muy superior a aquellos medios a los que se añadió acetaldehído en defecto, como se comprueba en la gran intensidad del carril continuo obtenido. La tabla 18 expresa los valores de Rf obtenidos para esta cromatografía en capa fina.

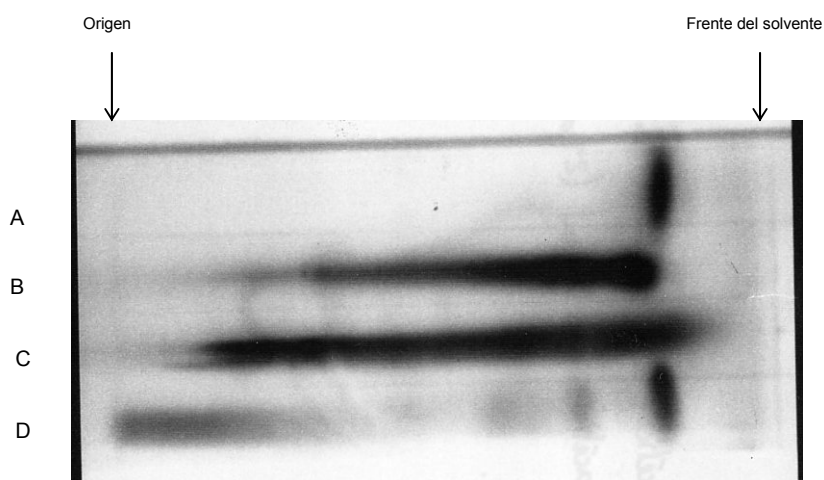


Figura 64. Cromatografía en capa fina de dos medios de polimerización con acetaldehído en defecto (B) y en exceso (C). (A) es epicatequina patrón y (D) extracto de procianidinas patrón.

Rfs calculados						
Epicatequina patrón	0,86	-	-	-	-	-
Medio polimerización acetaldehído en defecto	0,84	0,74	0,66	0,54	-	-
Medio polimerización acetaldehído en exceso	0,86	0,74	0,66	0,53	0,32	-
Extracto procianidinas patrón	0,86	0,75	0,65	0,52	0,3	0,21
	MONÓMERO	DÍMERO	TRÍMERO	TETRÁMERO	PENTÁMERO	>5

Tabla 18. Rf obtenidos en la cromatografía en capa fina de dos medios de polimerización con acetaldehído en defecto y en exceso.

Por otra parte, en las muestras destacaba la ausencia de manchas bien definidas que informen del grado de condensación alcanzado, obteniéndose en su lugar, un carril continuo. Esto podría ser debido a que los dímeros, trímeros, etc., de epicatequina que se han sintetizado en el medio podrían tener unido en uno de sus extremos (o en los dos) una molécula de acetaldehído, modificándose de este modo el Rf de este compuesto. En el caso de un dímero que tuviera una o dos moléculas de acetaldehído unidas a sus extremos, el Rf de este compuesto estaría entre los Rfs de un dímero y un trímero. De esta forma, no se obtenían manchas limpias y bien definidas sino solamente un carril continuo (ver figura 65) que informaba aproximadamente del grado de condensación alcanzado.

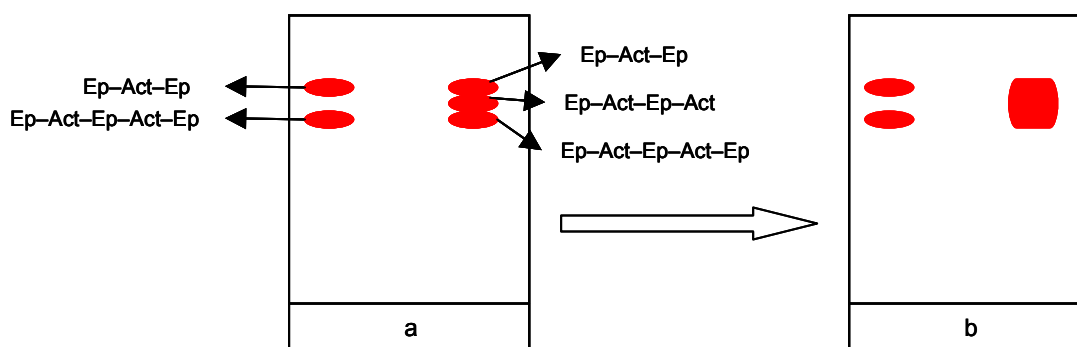


Figura 65. Representación esquemática de las manchas obtenidas en la cromatografía en capa fina para los oligómeros de epicatequina formados. En la figura A, el carril izquierdo representa las manchas que se obtendrían si la separación de los diferentes compuestos fuera nítida. El carril de la derecha representa las manchas obtenidas debido a la existencia de compuestos que poseen una molécula de acetaldehído en posición terminal. La figura B representa las manchas realmente obtenidas al revelar los compuestos con vainillina.

Como método de separación e identificación, la técnica de la cromatografía en capa fina con tinción de vainillina al 1% en ácido sulfúrico (al 70%) permitía la diferenciación de los compuestos fenólicos hasta un grado de polimerización de pentámeros o hexámeros, aunque la bibliografía remarcaba que se había llegado a separar polímeros hasta un nivel de condensación de 7 (Lea, 1979; Oh & Of., 1979; Pérez-Illzarbe, 1979; Jaworski & Lee, 1987; Markham, 1989; Putman & Butler, 1991; Escribano-Bailón, 1992 y 1993; Rigaud, 1993; Tits, 1993; Suárez, 1994; Jolich, 1996; Ossipov, 1997; Matthäus, 1998; Sun, 1998). Sin embargo, Oszmianski & Sapis (1989) detectaban solamente 6 grados de polimerización. Asimismo, esta técnica no permite distinguir entre diferentes compuestos que posean un mismo grado de polimerización. Dado que los resultados obtenidos mediante la cromatografía en capa fina son cualitativos, se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución como técnica que permitiese cuantificar y evaluar la evolución temporal de la concentración de la epicatequina en el medio de reacción. Las condiciones utilizadas en este método se muestran en el esquema 2.

#### **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

El proceso cromatográfico se basa en la técnica cromatográfica en fase reversa. El aparato utilizado es un cromatógrafo Hewlett-Packard, serie 1100 con bomba cuaternaria e inyector automático.

#### **Columna**

La columna utilizada es una Spherisorb ODS-2 (Waters) de 25 cm de longitud, 0.46 cm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula.

#### **Fase móvil**

Las fases móviles utilizadas son las siguientes: A: ácido fórmico al 4.5% (Carlo Erba); B: acetonitrilo (Carlo Erba)-ácido fórmico 4.5% (Carlo Erba), 10:90. La elución se produce a flujo constante de 1.5 mL/min y con el siguiente gradiente de elución:

Tiempo (min)	%A	%B
0.1	100	0
10	60	40
20	50	50
30	40	60
35	0	100
50	0	100
60	100	0

#### **Temperatura de trabajo**

La separación cromatográfica se realiza a temperatura ambiente. Se intenta que haya poca variación con respecto a este parámetro, ya que podrían producirse alteraciones en los tiempos de retención y en la forma de los diferentes picos cromatográficos obtenidos, llevando este hecho a errores en la cuantificación.

#### **Detección**

El detector utilizado es ultravioleta-visible, de diodos integrados. La longitud de onda utilizada en todos los análisis realizados (tanto cuantitativos como cualitativos) es 280 nm, utilizándose también la longitud de onda a 254 nm.

#### **Muestras y patrones**

Las muestras y los patrones inyectados en el cromatógrafo para su análisis deben ser soluciones acuosas.

Esquema 2. Protocolo del método de separación de los oligómeros de epicatequina sintetizados y de los extractos de procianidinas patrones mediante cromatografía líquida de alta resolución.



La utilización de esta técnica como método de identificación y de cuantificación de los oligómeros formados presentaba el problema añadido de la falta de disponibilidad comercial de patrones de oligómeros de procianidinas con los que comparar tiempos de retención y áreas. En cuanto a la cuantificación de la concentración de epicatequina en el medio de reacción se utilizaron rectas de calibración realizadas con diferentes concentraciones del patrón comercial. Además, para la cuantificación de las estructuras diméricas se utilizaron rectas patrones del dímero procianidina B2 comercial. La figura 66 muestra los cromatogramas obtenidos para una mezcla de 4 patrones comerciales (ácido gálico, catequina, epicatequina y procianidina B2) y de un extracto de procianidinas patrón, respectivamente. En el cromatograma A, se observa la correcta separación de los tres patrones monoméricos y del dímero procianidina B2, obteniéndose de este modo cuatro tiempos de retención diferentes que permitieron la identificación de estos compuestos en un extracto comercial de procianidinas.

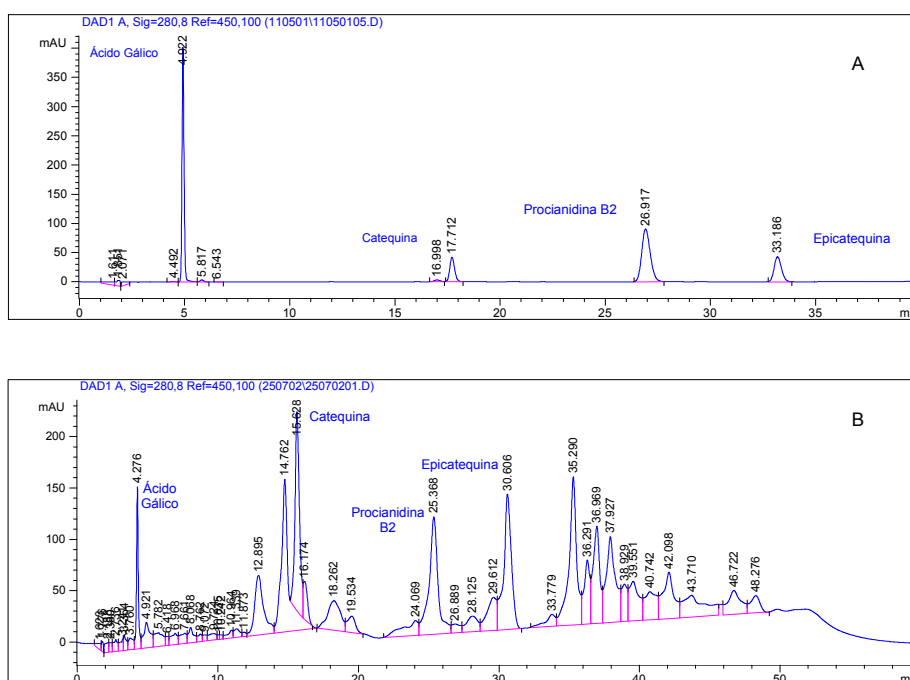


Figura 66. Perfil cromatográfico (HPLC) obtenido para (A) una mezcla de patrones comerciales con concentración final de cada uno en la muestra de 50  $\mu$ M, y (B) perfil cromatográfico obtenido para un patrón de extracto de procianidinas de semilla de uva de concentración 2500 mg/L.

La cromatografía líquida de alta resolución permitió el análisis detallado del contenido del extracto de procianidina patrón. Debido al resultado de la separación, esta técnica era idónea para la resolución de este tipo de muestras por su bajo límite de detección y su elevada reproducibilidad y precisión. La identificación de los picos cromatográficos mayoritarios del extracto de procianidinas fue posible mediante un proceso de derivatización post-columna puesto a punto por los miembros de la Facultad de Farmacia de Salamanca (Escribano-Bailón, 1993). En la tabla 19, se detallan los tiempos de retención de los diferentes picos cromatográficos y el nombre del compuesto fenólico correspondiente.

La identificación de la mayoría de los picos cromatográficos obtenidos para un extracto de procianidinas de semilla de uva fueron de gran utilidad para identificar los compuestos sintetizados en los medios de polimerización, ya que los cromatogramas obtenidos en el control de la evolución de la concentración de epicatequina en estos medios poseían una elevada reproducibilidad. La figura 67 muestra dos cromatogramas correspondientes a dos medios de reacción diferentes. El cromatograma A corresponde a un medio de polimerización con acetaldehído en defecto, mientras que el cromatograma B corresponde a un medio de reacción similar, pero con una cantidad de acetaldehído superior (en exceso).

Orden de elución	Tiempo retención (min)	Nombre del compuesto
1	4,276	Ácido gálico
2	12,895	Dímero B3: cat-(4 $\alpha$ , 8)-cat
3	14,762	Dímero B1: ep-(4 $\beta$ , 8)-cat
4	15,628	Catequina
5	16,174	Trímero: ep-(4 $\beta$ , 8)-ep-(4 $\beta$ , 8)-cat
6	18,262	Dímero B4: cat-(4 $\alpha$ , 8)-ep
7	25,368	Dímero B2: ep-(4 $\beta$ , 8)-ep
8	30,606	Epicatequina
9	35,290	Dímero B2-3'-O-galato???: ep-(4 $\beta$ , 8)-ep-3'-O-galato
10	36,291	Dímero B7: ep-(4 $\beta$ , 6)-cat
11	36,969	Trímero C1: ep-(4 $\beta$ , 8)-ep-(4 $\beta$ , 8)-ep
12	37,927	Tetrámero de ep???: ep-(4 $\beta$ , 8)-ep-(4 $\beta$ , 8)-ep-(4 $\beta$ , 8)-ep
13	42,098	Epicatequina-3-O-galato
14	46,722	Dímero B5: ep-(4 $\beta$ , 6)-ep

Tabla 19. Compuestos fenólicos mayoritarios identificados mediante cromatografía líquida de alta resolución de un extracto de procianidinas de semillas de uva.

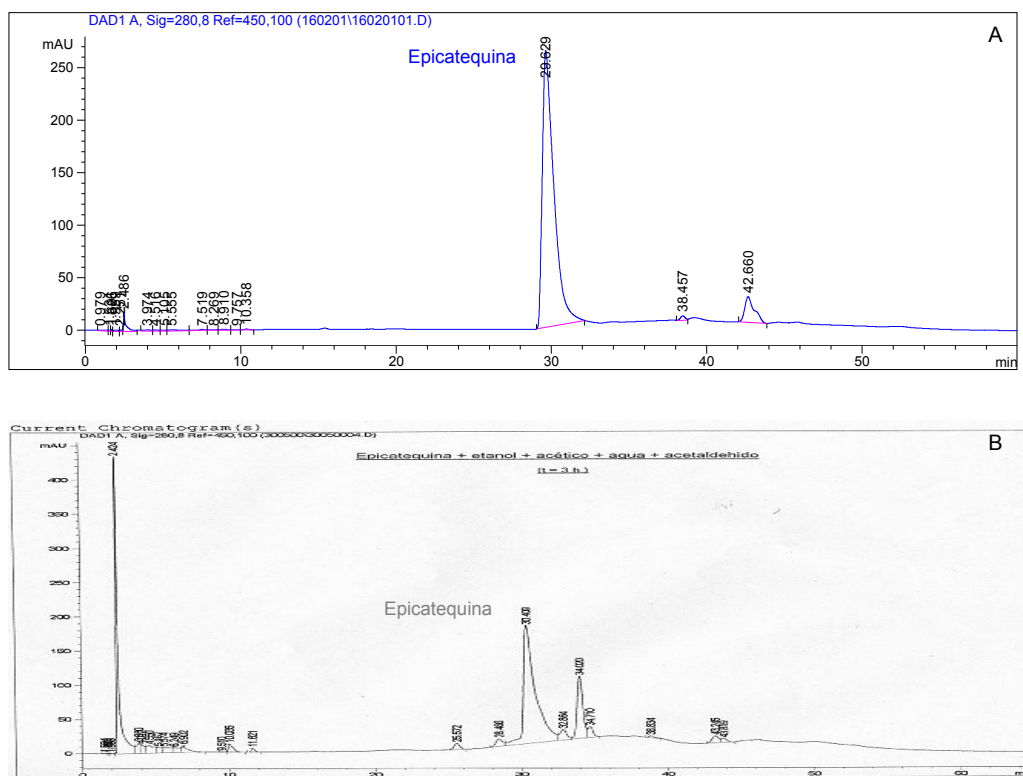


Figura 67. Cromatogramas obtenidos para: (A) medio de polimerización entre epicatequina y acetaldehído en defecto, y (B) medio de polimerización entre epicatequina y acetaldehído en exceso.

El análisis del perfil cromatográfico de cada medio de polimerización permitió apreciar algunas diferencias significativas. Si la reacción de condensación se realizaba con acetaldehído en defecto, aparecían en el cromatograma los picos cromatográficos representados en la tabla 20, mientras que en la tabla 21, se representan los picos cromatográficos obtenidos cuando la adición de acetaldehído al medio de reacción se realiza en exceso.



Orden de elución	Tiempo retención (min)
1	2,486
2	29,629
3	42,660

Tabla 20. Picos cromatográficos mayoritarios obtenidos en el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución de un medio de condensación entre epicatequina y acetaldehído en defecto.

Orden de elución	Tiempo retención (min)
1	2,424
2	30,409
3	34,020
4	43,245
5	43,819

Tabla 21. Picos cromatográficos mayoritarios obtenidos en el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución de un medio de condensación entre epicatequina y acetaldehído en exceso.

Las principales diferencias existentes entre los cromatogramas anteriores son debidas a la concentración de acetaldehído utilizada para la polimerización de la epicatequina. El pico cromatográfico con un tiempo de retención en torno a 2.4 minutos era mayor cuando el acetaldehído se añadía al medio de reacción en exceso obteniéndose, además, un pico con tiempo de retención 34 minutos que no aparecía en el cromatograma del medio de reacción que poseía acetaldehído en defecto. El resto de los picos que conformaban el perfil cromatográfico de ambos medios de reacción era idéntico.

La identificación de todos los compuestos existentes y que generaban estos perfiles cromatográficos hacía necesaria la utilización de otra técnica más específica que pudiera aportar información adicional sobre la estructura de los mismos. Una técnica que ofrecía este tipo de información era la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida de alta resolución. Además, la existencia de material bibliográfico relacionado con la detección de catequinas y procianidinas mediante esta técnica hizo posible acceder a una serie de datos que fueron de gran ayuda para la detección mediante espectrometría de masas los compuestos sintetizados en el medio de polimerización. En este sentido, Rohr *et col* (1999) describieron como se fragmentaba la procianidina dímero B2 proporcionando dos moléculas de epicatequina en la interfase del espectrómetro de masas, generando unas determinadas relaciones masa/carga (m/z). Además, estas dos moléculas de epicatequina obtenidas podían a su vez romperse en pequeños fragmentos que generan unas determinadas relaciones m/z. En la figura 68 se puede comprobar como la estructura de la epicatequina puede abrirse de dos formas diferentes.

Por una parte, la epicatequina puede sufrir la rotura del anillo heterocíclico formando dos fragmentos de m/z 168 y 123, respectivamente. Del mismo modo, la epicatequina puede sufrir otra rotura del anillo heterocíclico conocida como fisión retro-Diels-Alder generando también dos fragmentos cuyas relaciones m/z son 139 y 152, respectivamente. Asimismo, la procianidina B2 (epicatequina-(4 $\beta$ , 8)-epicatequina) puede sufrir la rotura de uno de los dos anillos heterocíclicos que poseen las unidades epicatequina que la componen, generando los fragmentos de relación m/z expresados en la figura 69 (Sun & Miller, 2003). En esta figura se puede comprobar como uno de los heterociclos puede sufrir tres tipos diferentes de rotura, proporcionando tres compuestos distintos con unas relaciones m/z distintivas (451, 439 y 425). Además, el compuesto generado cuya relación masa/carga es 425 puede sufrir la pérdida de un grupo hidroxilo para formar un nuevo compuesto con una relación m/z 407.

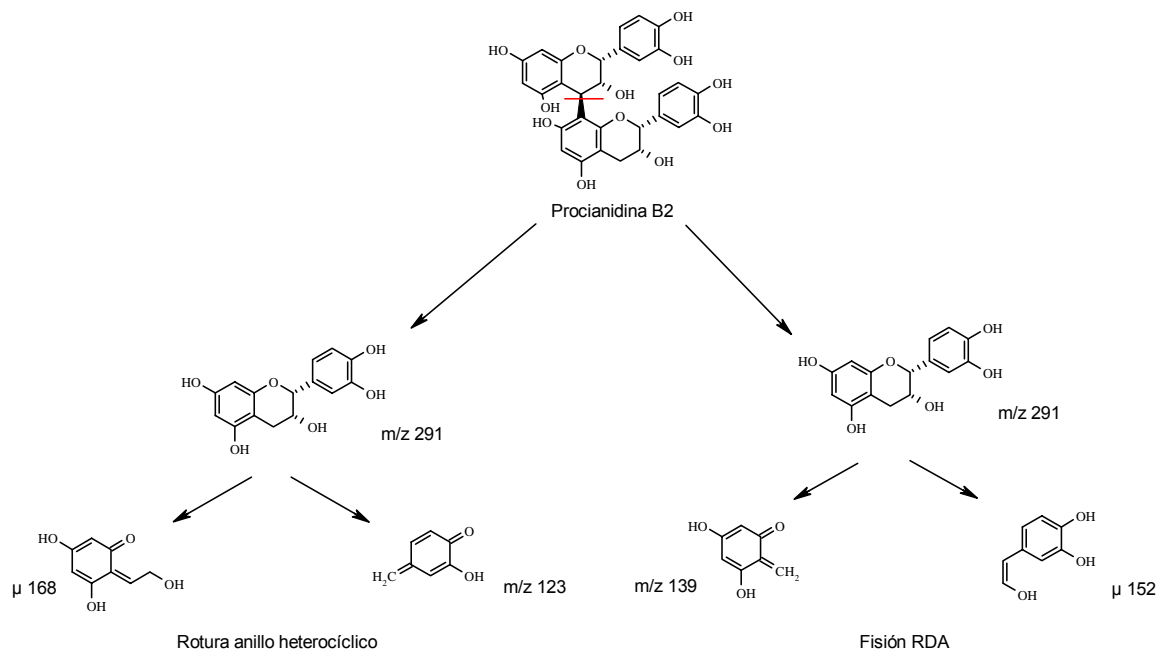


Figura 68. Fragmentos generados en la interfase del espectrómetro de masas por la procianidina B2 y la epicatequina. Se aprecia como la procianidina B2 da lugar a dos unidades epicatequina y éstas pueden sufrir dos tipos de rotura del anillo heterocíclico: simple apertura del mismo (representado a la izquierda de la figura) y fisión retro-Diels-Alder (parte derecha de la figura). Adaptado de Rohr *et col* (1999).

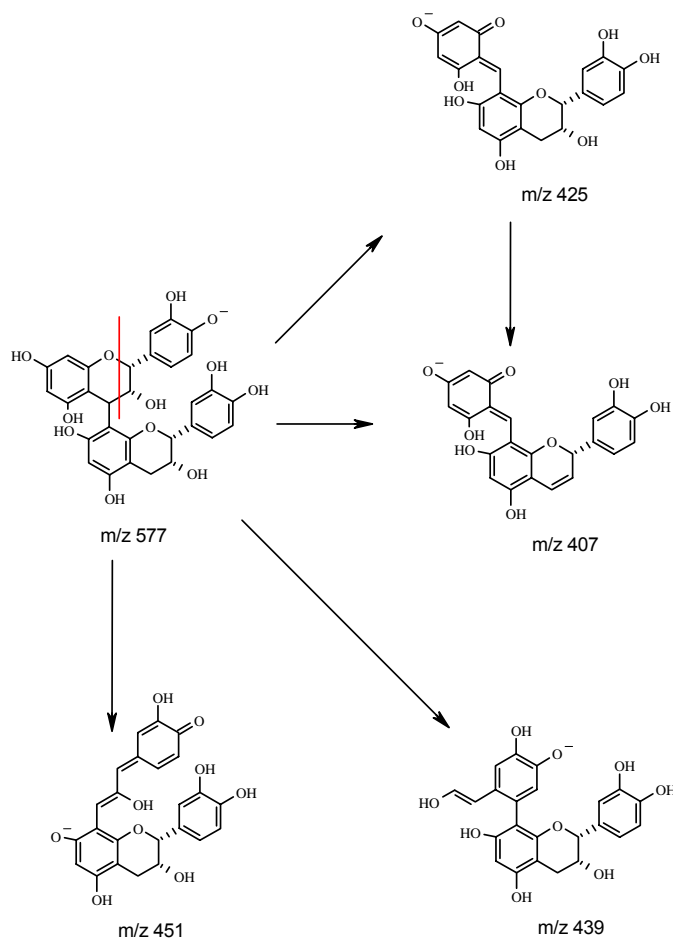


Figura 69. Fragmentos generados en la interfase del espectrómetro de masas por la rotura del anillo heterocíclico de la procianidina B2. Adaptado de Sun & Miller (2003).

La realización del análisis de la procianidina B2 patrón y de la epicatequina en el espectrómetro de masas permitió la obtención de las mismas señales descritas en la bibliografía. Para efectuar el análisis de la procianidina B2 fue necesario realizar ionización química. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 70. Debe hacerse constar que todos los análisis realizados mediante espectrometría de masas fueron realizados por los técnicos del Servei de Recursos Científics de la URV.

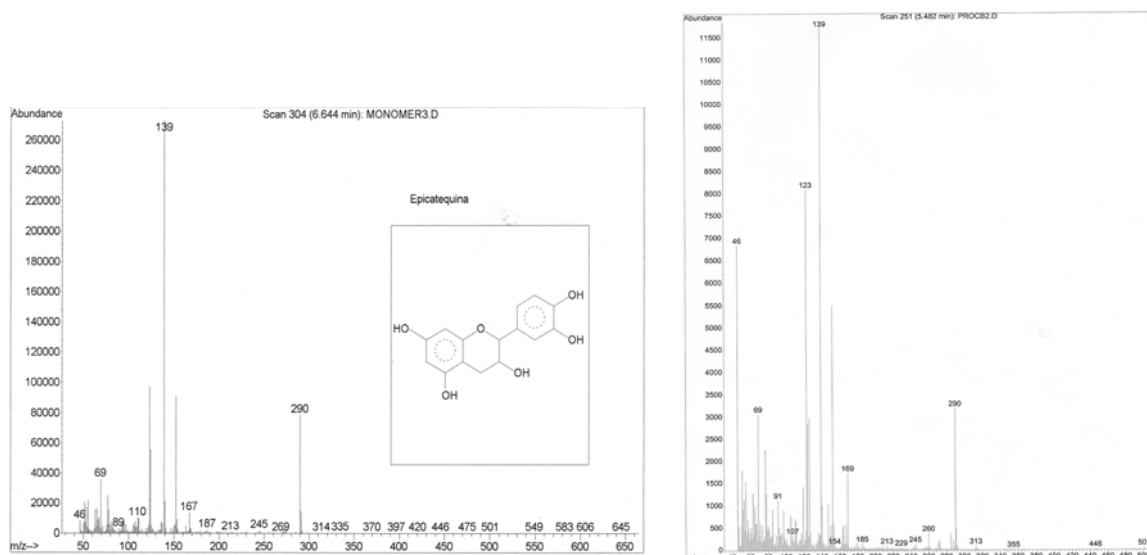


Figura 70. Resultados obtenidos del análisis de la procianidina B2 y de la epicatequina en el espectrómetro de masas. La única diferencia entre ambos compuestos es que la procianidina B2 genera el doble de abundancia en las señales m/z (debido a que la rotura del enlace  $4\beta \rightarrow 8$  genera dos epicatequinas).

El compuesto más pequeño que podía sintetizarse en los medios de reacción era un dímero de epicatequina. Éste consistía en dos epicatequinas unidas a través de un puente de acetaldehído. Las procianidinas diméricas naturales poseen enlaces  $4\alpha \rightarrow 8$ ,  $4\beta \rightarrow 8$  ó  $4\beta \rightarrow 6$  entre las unidades monoméricas que la componen. No obstante, este tipo de enlaces no son los mismos que se obtienen entre las unidades monoméricas (catequina, epicatequina y malvidina) y el acetaldehído durante el proceso de maduración o envejecimiento de un vino. En este caso, las uniones puente realizadas por el acetaldehído entre un monómero y otro son a través de los carbonos C8–C8, C6–C6 y C8–C6 (dando éste último lugar a una mezcla racémica de productos de conformación R y S) como representa la figura 71 (Timberlake & Bridle, 1976; Baranoski & Ángel, 1983; Bishop, 1984; Roggero, 1987; Baker, 1993; Rivas Gonzalo, 1995; Fulcrand, 1996; Escribano–Bailón, 1996; Dallas, 1996; Francia–Aricha, 1997; Es–Safi, 1996 y 1999; Vivar–Quintana, 1999; Remy, 2000; Nanjo, 2000).

Por otra parte, debido a las características del espectrómetro de masas utilizado en el análisis de las muestras, solamente era posible la detección de estructuras diméricas, imposibilitando este hecho el análisis de estructuras con mayor grado de condensación. Por tanto, la existencia de dímeros de epicatequina en el medio de reacción y su posterior análisis mediante espectrometría de masas hacía necesaria la aplicación del mismo patrón de fragmentación de la procianidina B2 y de la epicatequina, pero teniendo en cuenta la presencia de un puente de acetaldehído, ya que la presencia de éste variaría las relaciones masa/carga obtenidas para los patrones. En consecuencia, aplicando el mismo patrón de fragmentación comentado anteriormente a los posibles dímeros presentes en el medio de reacción, se obtenían las relaciones masa/carga presentadas en la figura 72. Del mismo modo, la aplicación sobre los dímeros sintetizados del patrón de fragmentación descrito por Sun & Miller (2003) para la procianidina B2, proporcionaban otras relaciones masa/carga de los fragmentos obtenidos (descritos en la figura 73) que fueron de gran utilidad para caracterizar a estos compuestos mediante espectrometría de masas. Las relaciones masa/carga obtenidas para los fragmentos de los dímeros con puente de acetaldehído en la interfase del espectrómetro de masas son

independientes de los carbonos implicados en el enlace (C8–C8, C6–C6 y C8–C6), aunque en las figuras 72 y 73 solamente se ha aplicado el patrón de fragmentación sobre el dímero que posee el puente de acetaldehído entre los carbonos C8–C8.

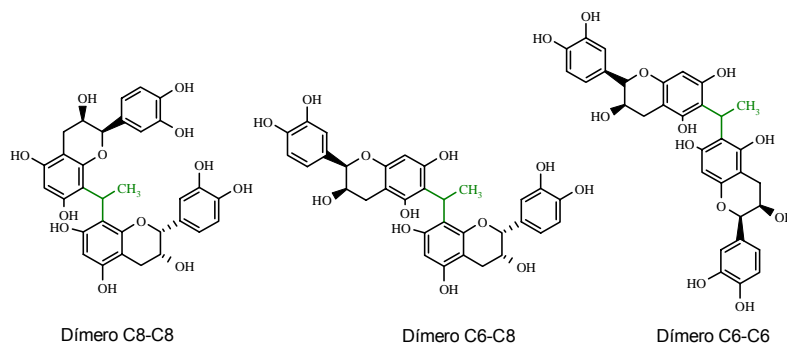


Figura 71. Estructura de los dímeros de epicatequina formados durante el proceso de envejecimiento de un vino. Solamente se han tenido en cuenta los dímeros formados con epicatequina, ya que es ésta el único compuesto utilizado en los medios de polimerización.

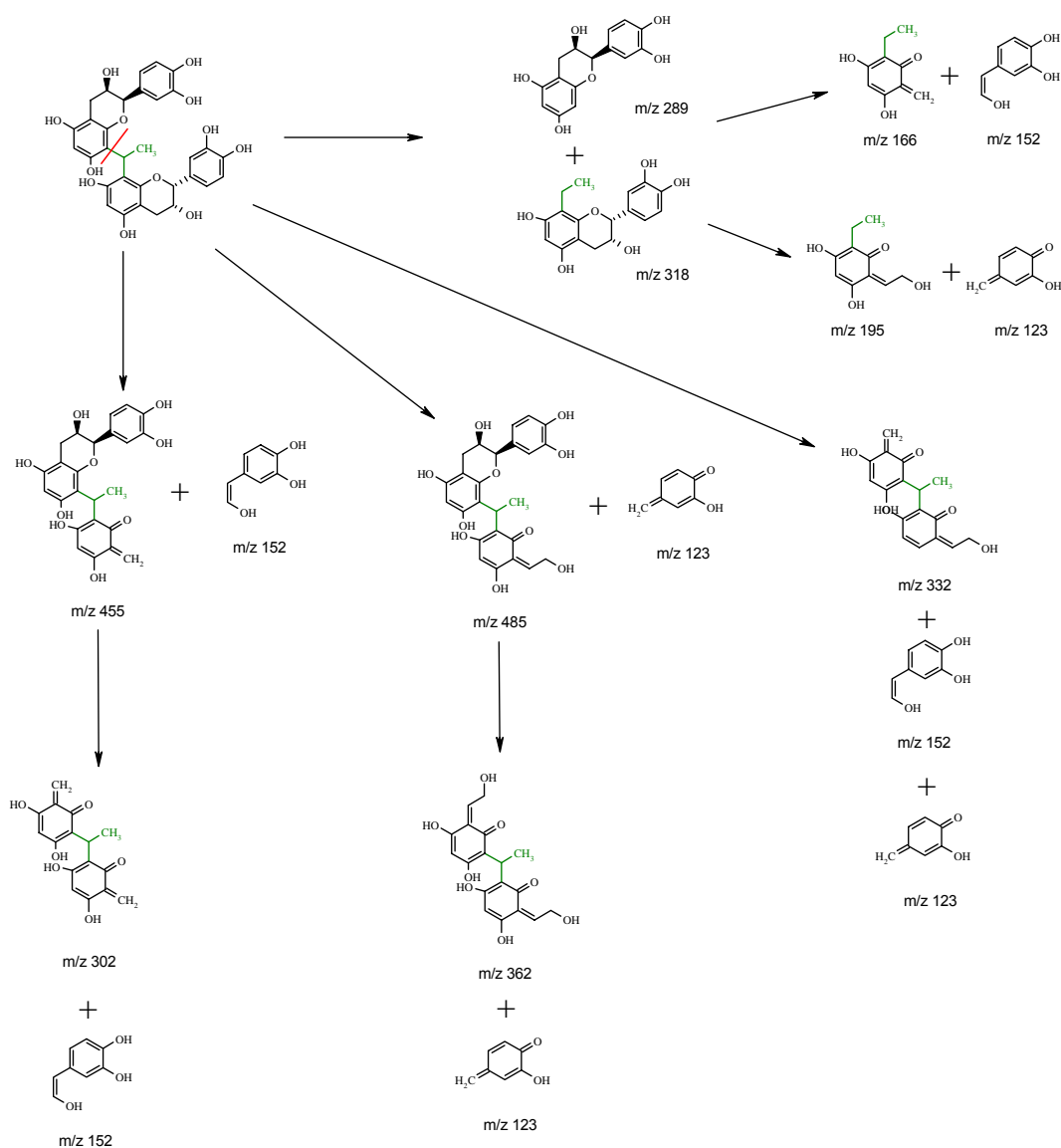


Figura 72. Patrón de fragmentación en la interfase del espectrómetro de masas de los dímeros de epicatequina sintetizados en medio ácido. Para simplificar el esquema, solamente se ha representado como ejemplo el dímero C8–C8.

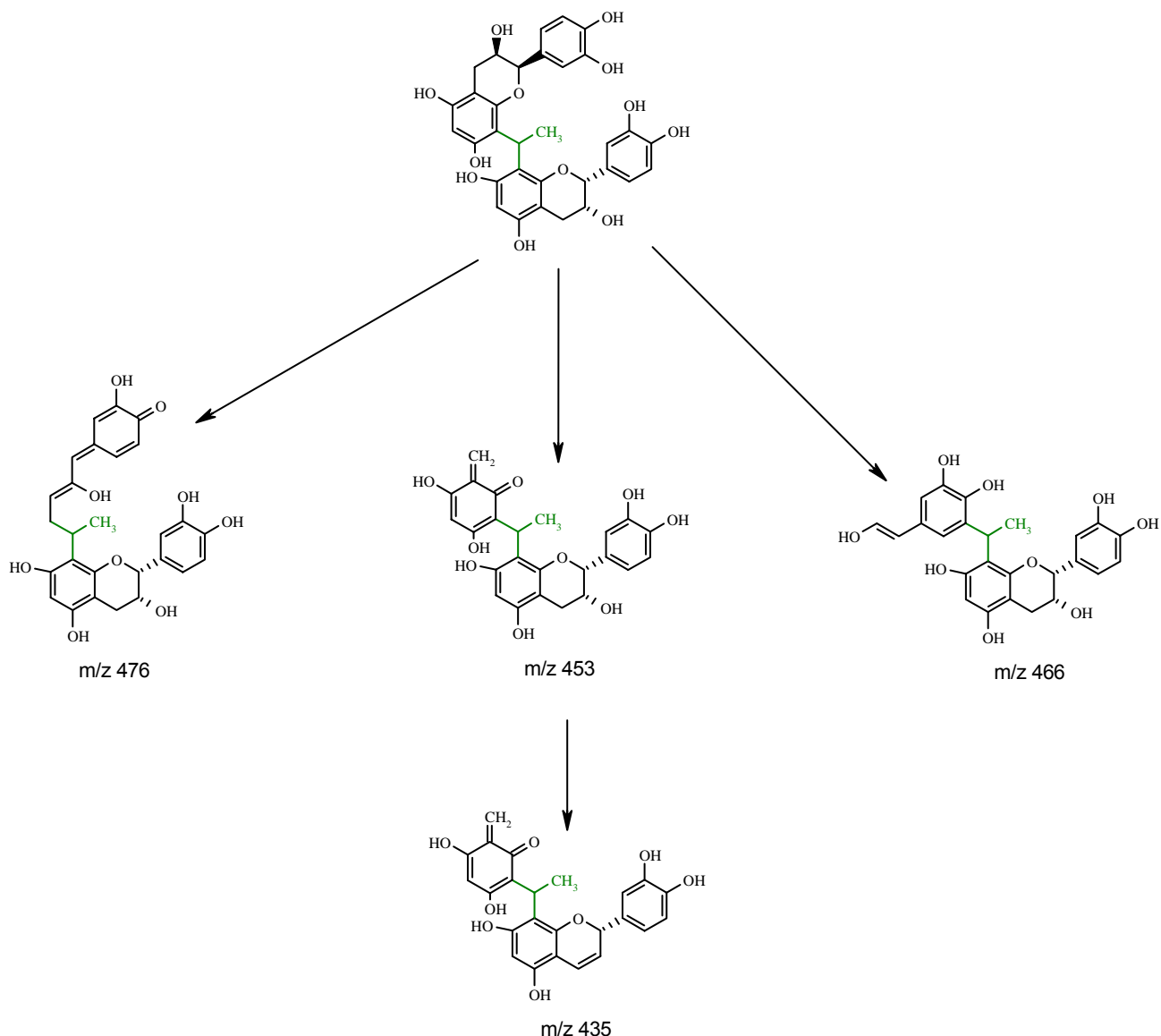


Figura 73. Patrón de fragmentación propuesto por Sun & Miller (2003) de la procianidina B2 aplicado a un dímero sintético C8-C8.

De este modo, el análisis de diferentes alícuotas de los medios de polimerización mediante espectrometría de masas permitió la identificación de los compuestos que generaban los cromatogramas de cromatografía líquida presentados anteriormente. De esta forma, el compuesto cuyo pico cromatográfico poseía un tiempo de retención de 2.4 minutos generaba unos fragmentos con unas relaciones masa/carga de 64, 70 y 149 al ser analizado mediante espectrometría de masas. De forma similar, el compuesto cuyo tiempo de retención en la cromatografía líquida era de 34 minutos en un medio de polimerización con acetaldehído en exceso y que no proporcionaba ninguna señal cromatográfica cuando el acetaldehído se añadía al medio en defecto, generaba unos fragmentos con las siguientes relaciones masa/carga: 71, 89, 99 y 115. En la figura 74 se muestran los espectros de masa de ambos compuestos.

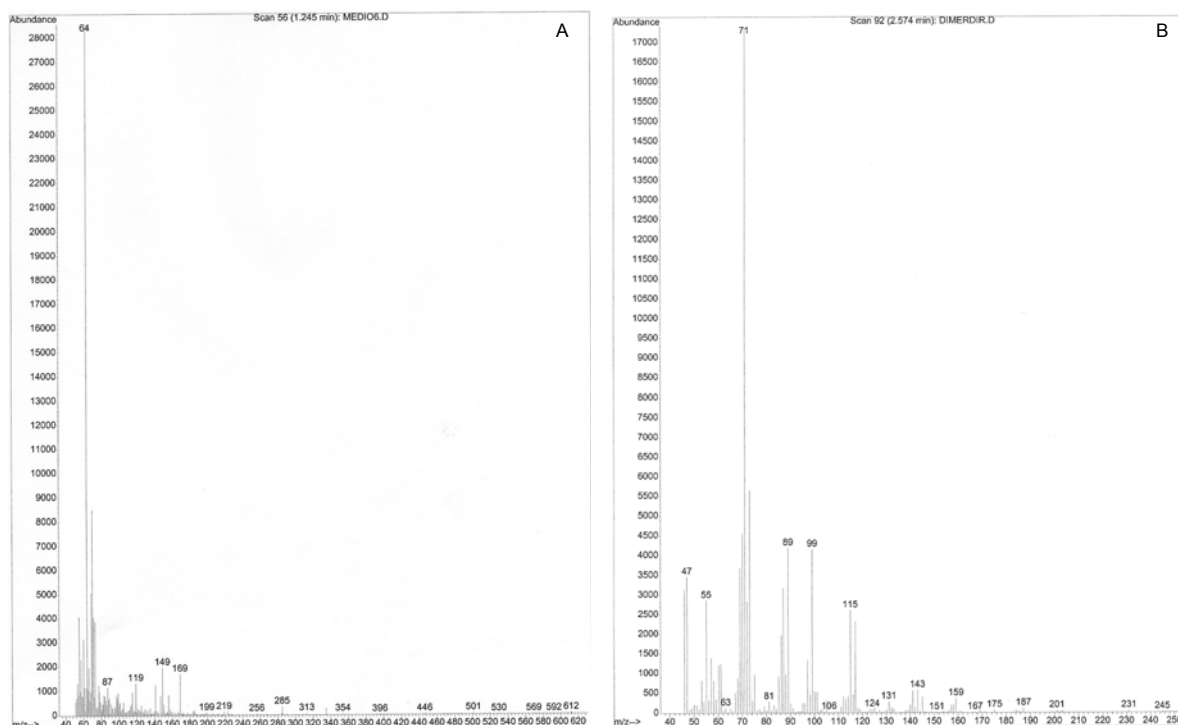


Figura 74. Espectros de masas obtenidos para: (A) compuesto cuyo tiempo de retención en HPLC era de 2.4 minutos y (B) compuesto cuyo tiempo de retención en HPLC era de 34 minutos.

El análisis de estos datos revelaban que estos dos compuestos no eran derivados de la epicatequina, ya que las señales generadas por los fragmentos que provenían de estos compuestos en los espectros de masas eran demasiado pequeñas (la señal  $m/z$  de mayor valor es del orden de 140–150). Las relaciones masa/carga más pequeñas generadas por la ruptura del anillo heterocíclico de la epicatequina son 166, 152, 195 y 123 (teniendo en cuenta la existencia de un puente de acetaldehído). Ninguna de estas señales aparecía en los espectros de masas generados por los fragmentos formados en la interfase del espectrómetro por los compuestos de tiempo de retención 2.4 y 34 minutos.

Además, debe tenerse en cuenta que el acetaldehído es un reactivo de una elevadísima reactividad en medio ácido. En estas condiciones, este compuesto es capaz de reaccionar consigo mismo o con otros aldehídos que pudiera haber en el medio de reacción. En términos de Química Orgánica, a esta reacción se le conoce con el nombre de condensación aldólica. De esta manera, en el medio de reacción (cuyo pH era ácido), el acetaldehído podría reaccionar consigo mismo para formar dímeros, trímeros, tetrameros, etc. Estos compuestos generarían unos fragmentos en la interfase del espectrómetro de masas con unas relaciones masa/carga muy diferentes de aquellas que proporcionan los fragmentos provenientes de los flavan-3-oles. La figura 75 muestra el mecanismo de la condensación aldólica del acetaldehído presente en el medio de reacción consigo mismo. Además, la realización de un espectro de absorbancia de una solución acuosa (100  $\mu\text{M}$ ) de acetaldehído indicaba que este compuesto poseía su máxima absorbancia a 284 nm, longitud de onda a la que la absorbancia de una solución de epicatequina (100  $\mu\text{M}$ ) era también máxima. Consecuentemente, las señales generadas por el acetaldehído podrían confundirse en los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía líquida con aquellos compuestos en los que estuviera implicada la epicatequina y que eran objeto de nuestro interés.

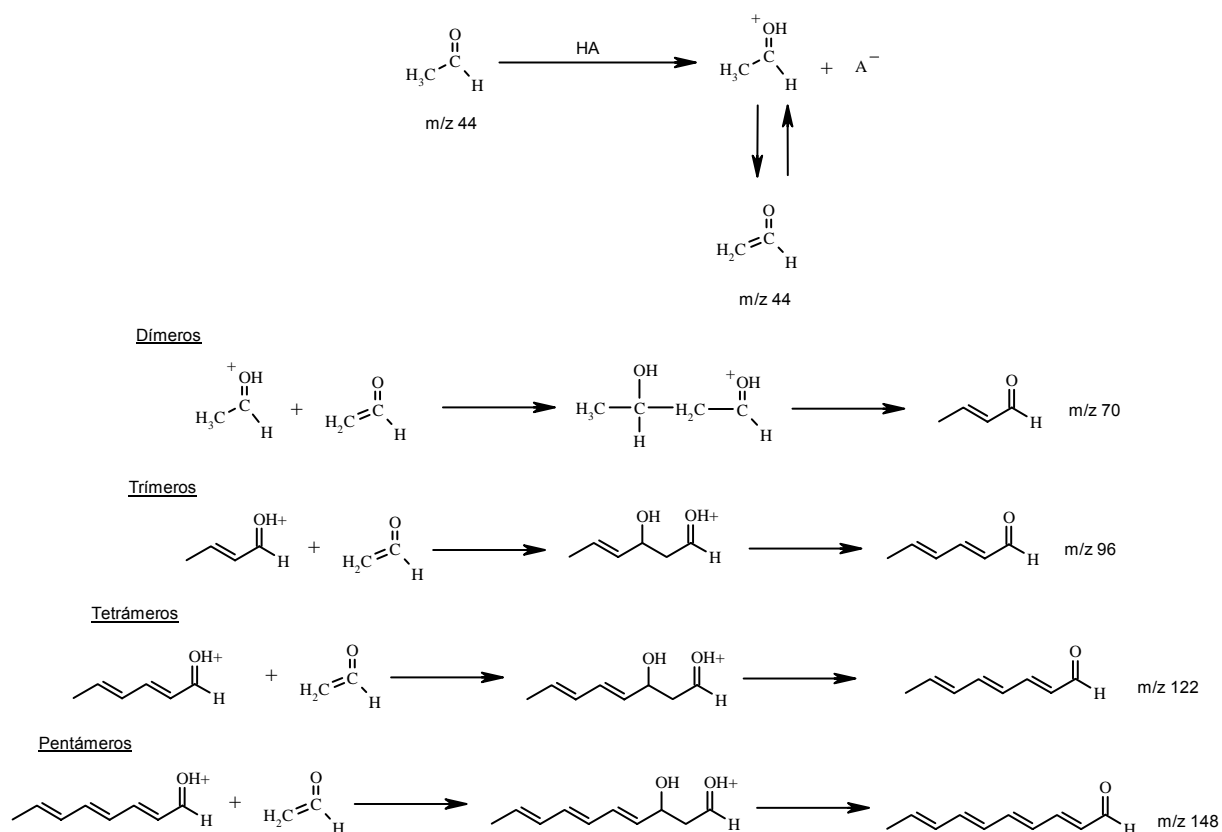


Figura 75. Condensación aldólica del acetaldehído presente en el medio de polimerización consigo mismo.

A tenor de los datos obtenidos, el compuesto de tiempo de retención 2.4 minutos podría tratarse de un dímero de acetaldehído, mientras que el compuesto cuyo tiempo de retención era de 34 minutos podría ser un trímero de acetaldehído. La falta de material bibliográfico que hiciera referencia a este tipos de compuestos y a su análisis mediante espectrometría de masas, hizo que se tuviera en cuenta solamente el peso molecular del compuesto ya que no se conocía el patrón de rotura que estos compuestos siguen en la interfase del espectrómetro de masas. Además, al no tratarse de compuestos derivados de la epicatequina, no fueron estudiados a fondo. Análogamente, un medio de polimerización que constaba de ácido acético, etanol, agua y acetaldehído en exceso (sin añadir epicatequina al mismo) generaba el cromatograma representado en la figura 76.

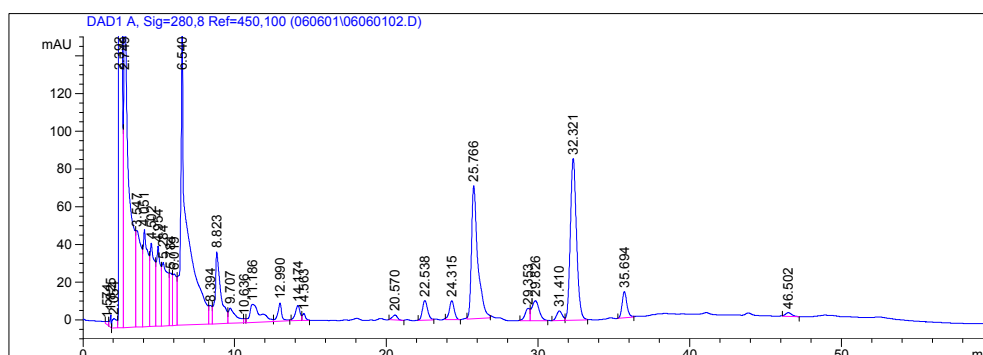


Figura 76. Cromatograma generado por un medio de polimerización al que no se le añadió epicatequina. Todas las señales obtenidas en el cromatograma provienen de la condensación aldólica del acetaldehído consigo mismo.

Como refleja este cromatograma, se obtenían dos picos cromatográficos cuyos tiempos de retención eran 2.39 y 32.3 minutos, respectivamente. Estos tiempos de retención coincidían con los tiempos de retención obtenidos en el perfil cromatográfico del medio de polimerización que poseía epicatequina y acetaldehído en exceso. Así, parecía evidente que los compuestos que generaban estos picos cromatográficos a estos tiempos de retención, provenían de la autocondensación del acetaldehído y no de la rotura de la estructura de la epicatequina.

Por otra parte, la preparación de un medio de polimerización al que todavía no se le había añadido acetaldehído proporcionaba un perfil cromatográfico (ver figura 77) en el que se apreciaba claramente un pico cromatográfico mayoritario con un tiempo de retención de 29–30 minutos correspondiente a la epicatequina disuelta en el medio y otros dos picos cromatográficos de tiempo de retención 15 y 38 minutos. Los compuestos que generaban estas señales podrían ser catequina (cuyo tiempo de retención para el patrón comercial está en torno a 15 minutos), pudiendo tratarse de impurezas en el patrón comercial de epicatequina, cuya pureza es del 99% y una estructura dimérica (tiempo de retención 38 minutos) que podría tratarse de una autocondensación de la epicatequina en medio ácido. El análisis de este compuesto por espectrometría de masas (ver figura 78) revelaba la aparición de algunas señales, producto de la rotura del anillo heterocíclico de la epicatequina ( $m/z$  152 y 169). Este hecho indicaría que este compuesto podría derivar de la epicatequina y además parecía tratarse de un compuesto no demasiado estable ya que no generaba la totalidad de señales  $m/z$  que solían obtenerse para la epicatequina patrón. La existencia de este compuesto permanecía en el medio siempre que hubiera epicatequina disuelta en el mismo. La bibliografía describe como los flavan-3-oles y los antocianos disueltos en medio ácido pueden experimentar reacciones de isomerización y de autocondensación (Jurd, 1967 y 1969; Jurd & Somers, 1970; Somers, 1971; Baranowski & Ángel, 1983; Liao, 1992; Bishop & Angel, 1994; Santos-Buelga, 1995 y 1996; Saucier, 1997; Es-Safi, 1999).

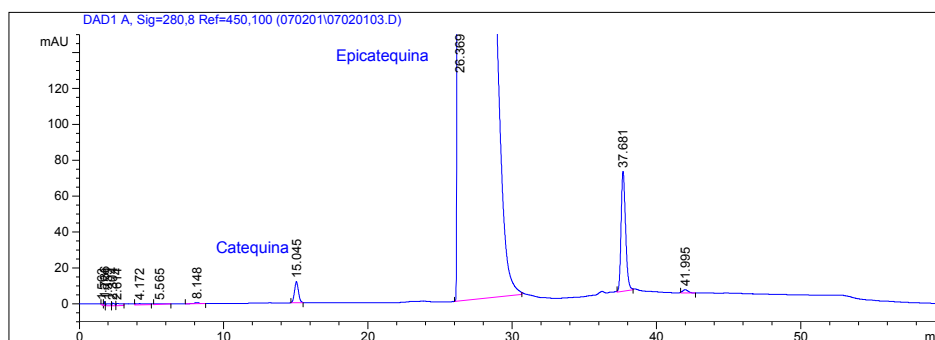


Figura 77. Cromatograma generado por un medio de polimerización al que no se le añadió acetaldehído. Todas las señales obtenidas en el cromatograma provienen de la epicatequina.

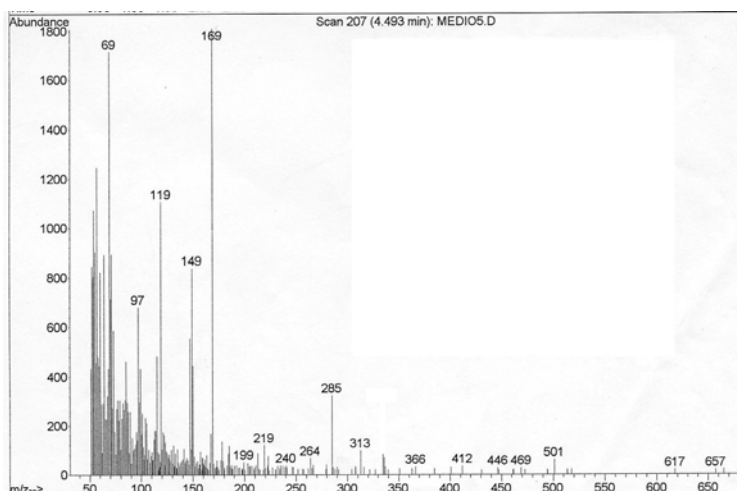


Figura 78. Espectro de masas obtenido para el compuesto de tiempo de retención 37–38 minutos en un medio de polimerización sin acetaldehído.



La comparación de los cromatogramas de la figura 65 con el cromatograma A de la figura 55 revelaba la aparición de un pico cromatográfico con tiempo de retención 42–43 minutos. Este pico poseía un hombro, indicando que podría tratarse de dos compuestos distintos que no se habrían separado correctamente. El espectro de masas generado por este compuesto (representado en la figura 79) indicaba la aparición de numerosas relaciones masa/carga pronosticadas para un dímero sintético compuesto de epicatequina–acetaldehído–epicatequina.

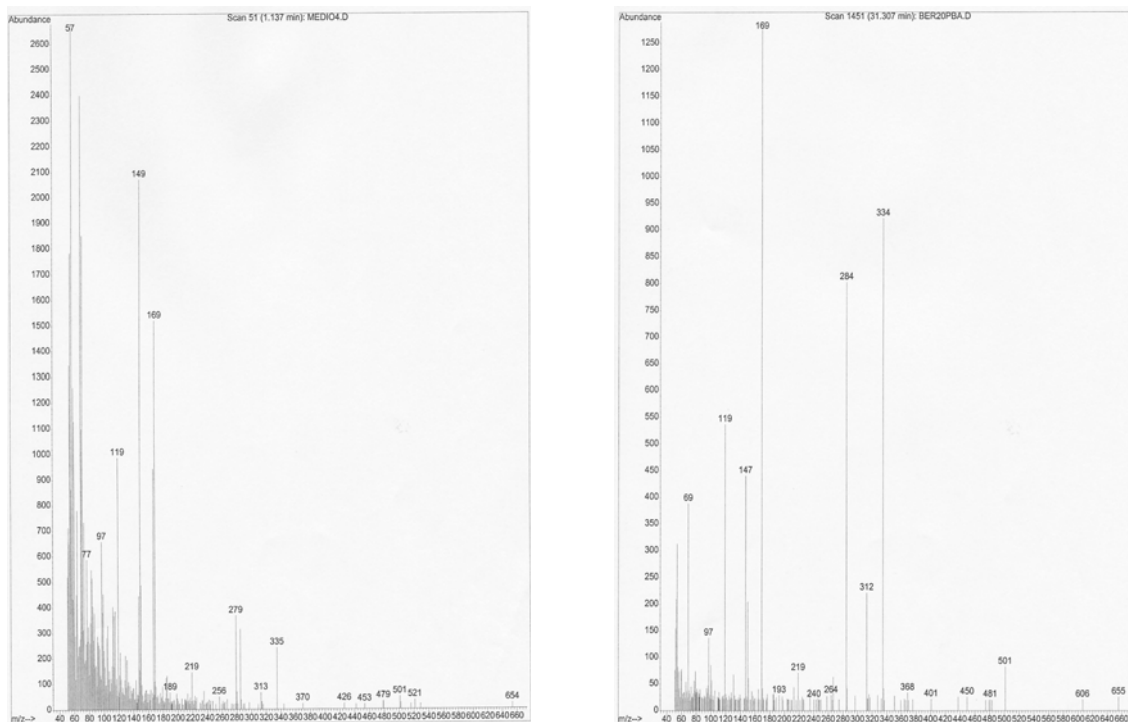


Figura 79. Espectro de masas obtenido para el compuesto de tiempo de retención 42–43 minutos en un medio de polimerización tanto con acetaldehído en exceso como en defecto. El cromatograma de la izquierda está realizado con ionización química y proporciona el peso molecular del compuesto estudiado ( $m/z$  606) que se corresponde con un dímero de epicatequina.

Las señales  $m/z$  479 y 453 correspondían a fragmentos obtenidos de la rotura de uno de los heterociclos de una unidad epicatequina aplicando el patrón de rotura descrito por Sun & Miller (2003), pero teniendo en cuenta la presencia de un puente de acetaldehído enlazando dos epicatequinas. Además, la aparición del fragmento  $m/z$  453 conllevaba la aparición de un fragmento de relación  $m/z$  152 que también aparecía en el espectro de masas. Del mismo modo, se producía una rotura retro–Diels–Alder del anillo heterocíclico del compuesto en cuestión proporcionando las señales  $m/z$  166 y la anteriormente mencionada  $m/z$  152. El fragmento que generaba una señal  $m/z$  335 era producto de una doble fisión de los anillos heterocíclicos, sufriendo uno de ellos una rotura retro–Diels–Alder, mientras que el otro sufría una apertura del anillo y posterior rotura del mismo. Este tipo de fisión también generaba un fragmento de relación  $m/z$  123, presente en el espectro de masas. Del mismo modo, la aparición de dos señales cuyas relaciones  $m/z$  eran 290 y 317 indicaban la existencia de una estructura dimérica en la que dos epicatequinas están unidas a través de un puente de acetaldehído, ya que el fragmento que generaba la relación  $m/z$  290 era una unidad de epicatequina, mientras que el fragmento que generaba la señal 317 se trataba de una unidad de epicatequina unida a una molécula de acetaldehído (Epicatequina–acetaldehído). Además, la relación masa/carga 606 se correspondía con el peso molecular del compuesto, indicando este dato que se trataba de un dímero de epicatequina. Asimismo, por el aspecto que presentaba el pico cromatográfico (el cual poseía un hombro) y los datos descritos en la bibliografía, podrían tratarse de los tres dímeros de epicatequina con diferentes carbonos implicados en los enlaces (C6–C6, C8–C8 y C6–C8). La gran similitud en la estructura de estos compuestos dificultaría su separación cromatográfica para poder ser estudiados por separado.

Paralelamente, el Centro de Formación e Investigación en Enología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Montpellier analizó una muestra de un medio de polimerización con acetaldehído en defecto durante los primeros días de reacción. Los resultados obtenidos revelaban la presencia en las muestras de catequina, epicatequina y procianidina dímero B2. Este último compuesto podría tratarse de los dímeros sintetizados o del compuesto que generaba un pico cromatográfico con un tiempo de retención de 38 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Compuesto	Área (mAU*s)	Concentración (mg/L)
Epicatequina	41793	2234,92
Catequina	235	12,7
Procianidina B2	105,17	10,03

Tabla 22. Resultados de los análisis realizados a un medio de polimerización con acetaldehído en defecto para determinar los compuestos presentes. Centre de Formation et de Recherche en Oenologie. Faculte de Pharmacie. Montpellier.

Adicionalmente, se analizaron los precipitados obtenidos de dos medios de reacción diferentes (uno con acetaldehído en exceso y otro con el mismo en defecto) en el Laboratorio de Analítica, Investigación y Materias Primas de la empresa Dérives Résiniques et Terpéniques situada en la localidad de Dax (Francia) con la finalidad de conocer el grado de polimerización obtenido en cada medio. Los resultados obtenidos se representan en la tabla 23.

Tiempo de retención (min)	% área	Muestra	Masa molecular	Grado de polimerización
16,8	83,13	Oligómero de ep en defecto	2919	9
19,7	7,43		1126	4
21	6,91		860	3
23	2,53		529	2
15,8	96,36	Oligómero de ep en exceso	5075	16
20,48	3,64		963	3

Tabla 23. Grados de polimerización obtenidos para los precipitados de los medios de reacción con acetaldehído en defecto y en exceso.

El cálculo aproximado del grado de polimerización se realizó mediante una sencilla ecuación que correlacionaba a éste con el peso molecular del compuesto. Teniendo en cuenta, a modo de ejemplo, la estructura de un trímero (figura 80) se podía comprobar como este compuesto estaba formado por tres estructuras de epicatequina y dos puentes de acetaldehído. Si se designaba N a las estructuras de epicatequina y (N-1) a los puentes de acetaldehído y se tenían en cuenta los pesos moleculares de ambos, era posible relacionar el peso molecular del compuesto con el grado de polimerización del mismo:  $(289 * 2) + 288 * (N-2) + 28 * (N-1) = MW$ . Resolviendo esta ecuación se obtenía:

$$N = \frac{MW + 26}{316}$$

donde : N = grado de polimerización del compuesto  
MW = peso molecular del compuesto.

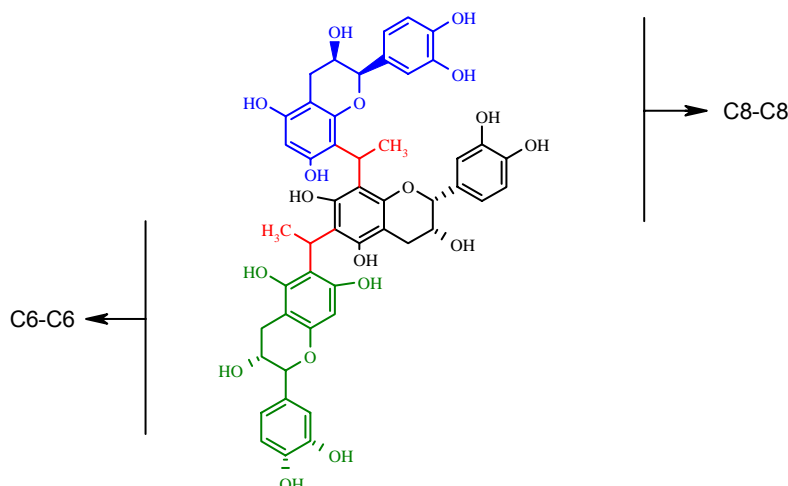


Figura 80. Estructura de un trímero de epicatequina (en color azul, negro y verde) formado con puentes de acetaldehído (en color rojo).

Los resultados obtenidos indicaban que el grado de polimerización alcanzado para un medio de reacción en el que se había utilizado acetaldehído en exceso era mayor que cuando éste fue utilizado en defecto. Además, casi la totalidad del compuesto formado en un medio de polimerización con acetaldehído en exceso era un polímero de 16 unidades. Por el contrario, el grado de polimerización obtenido para un medio de polimerización realizado con acetaldehído en defecto era menor, estando repartido entre oligómeros de 9 unidades (compuesto mayoritario) y dímeros (compuesto minoritario). Estos resultados concordaban con la tendencia observada en la cromatografía en capa fina.

### **2.2.3 Marcaje radiactivo de los oligómeros de epicatequina**

La utilización de acetaldehído como reactivo para enlazar monómeros de epicatequina y sintetizar oligómeros y polímeros de ésta era un proceso viable en el laboratorio, simulando un determinado tipo de reacciones que tiene lugar durante el proceso de almacenamiento y envejecimiento de los vinos en la bodega. Sin embargo, uno de los grandes problemas encontrado por los investigadores cuando trabajan con compuestos fenólicos es la gran dificultad existente en los procesos de extracción de estos compuestos de matrices biológicas como plasma y determinados tejidos. Actualmente, los trabajos publicados sobre el proceso de absorción de los compuestos fenólicos presentes en el vino son escasos, desconociéndose como estos compuestos penetran en el organismo, cuales son los compuestos que se absorben mayoritariamente y cual es el grado de polimerización de los mismos. No obstante, la utilización de productos marcados radiactivamente podría simplificar los problemas metodológicos existentes con los procesos de extracción de estos compuestos, ya que la detección de los compuestos radiactivos es muy sensible y del mismo modo, podría ser tremendamente útil en el estudio de la absorción intestinal de estos compuestos.

Como se ha descrito anteriormente, la síntesis de catequina o epicatequina radiactivas era posible a partir de compuestos simples como KCN. Sin embargo, este tipo de reacciones involucra una gran cantidad de etapas y de reactivos, para finalmente obtener unos rendimientos del producto final no demasiado elevados. Además, en cada etapa de la síntesis era necesaria la separación (no siempre sencilla) del intermedio sintetizado que era el punto de partida de la siguiente etapa. Por tanto, era interesante buscar alguna técnica alternativa de marcaje radiactivo de los flavan-3-oles. En nuestro caso, se aprovechó la puesta a punto de un medio de polimerización donde tenía lugar la condensación de la epicatequina con acetaldehído, ya que la sustitución de acetaldehído frío por acetaldehído marcado radiactivamente permitiría la obtención de oligómeros y polímeros de epicatequina con marcaje radiactivo. En este sentido, el acetaldehído radiactivo utilizado (American Radiolabeled Chemicals) estaba marcado

radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  en los dos carbonos. La actividad específica del producto era de 55 mCi/mmol, su concentración de 1 mCi/ml y su pureza un 99%.

El medio de reacción donde se realizó el marcaje radiactivo de los oligómeros de epicatequina era idéntico a los medios anteriores con la única diferencia de la sustitución del acetaldehído frío por el acetaldehído radiactivo. La concentración de éste en el medio fue de 6.82  $\mu\text{moles}$ , con una radiactividad total de 378  $\mu\text{Ci}$ . Paralelamente a este medio de polimerización, se realizó un medio de reacción frío (sin marcaje radiactivo) análogo al radiactivo para realizar un seguimiento de la evolución temporal de la concentración de la epicatequina en el medio.

La escasa cantidad de acetaldehído añadida al medio ( $\approx 7\mu\text{moles}$ ) era consecuencia de que este reactivo estaba saturado con agua. American Radiolabeled Chemicals lo suministraba en estas condiciones debido a la elevada volatilidad del mismo. Esta es una forma de asegurar que el producto no se evaporaría fácilmente durante su traslado, llegando a su destino en óptimas condiciones. La tabla 24 muestra los datos obtenidos del seguimiento de la variación temporal de la concentración de epicatequina en el medio de reacción.

Tiempo (meses)	[Ep] (mg/L)	% Ep que ha reaccionado
0	12000	-
3	7594	37
6	6736	44
8	492	96
10	365	97

Tabla 24. Datos obtenidos del estudio de la evolución temporal de la concentración de epicatequina en un medio frío análogo al medio radiactivo.

El hecho de que en este medio se utilizaran solamente 7  $\mu\text{moles}$  de acetaldehído radiactivo hacía que la evolución del mismo hacia la formación de oligómeros de epicatequina fuera extremadamente lenta, ya que, como puede apreciarse en la tabla anterior, transcurridos seis meses desde el comienzo de la reacción no había reaccionado todavía ni el 50% de la epicatequina inicial, cuando en este intervalo de tiempo, incluso aquellos medios en los que se utilizaba acetaldehído en defecto se había agotado totalmente la epicatequina. En este punto, se decidió añadir acetaldehído frío (0.024M) para acelerar el proceso de polimerización y obtener la aparición de precipitado, ya que se supuso que todo el acetaldehído radiactivo que se añadió al medio, habría reaccionado con la epicatequina. Como se aprecia en la figura 81, a partir de este punto, la concentración de la epicatequina disminuye rápidamente, apareciendo precipitado en el medio en pocos días.

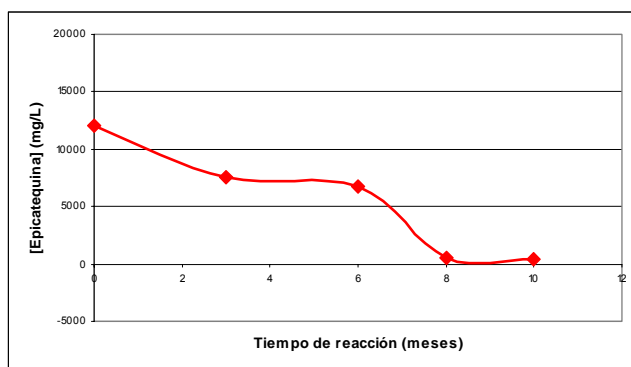


Figura 81. Evolución temporal de la concentración de epicatequina en un medio frío análogo al medio radiactivo. Se observa como el acetaldehído radiactivo solamente reacciona con el 44% de la epicatequina presente en el medio de reacción en un periodo de tiempo de seis meses. En este punto, la adición de acetaldehído frío al medio facilita que el resto de epicatequina reaccione con éste, elevándose el porcentaje de epicatequina que ha reaccionado a un 97%.

La inyección de una alícuota de la fase acuosa de este medio radiactivo (la mayoría de los compuestos presentes en el precipitado no pasan a través de la columna debido a su tamaño) en un cromatógrafo líquido con detector de radiactividad en el laboratorio de Recursos Científicos de la Universitat de Barcelona permitió la obtención de dos picos cromatográficos que poseían radiactividad con tiempos de retención 2.4 y 13.58 minutos, respectivamente (ver figura 82). Sin embargo, estos tiempos de retención no coincidían con los tiempos de retención obtenidos para los dímeros de epicatequina sintetizados en frío. El pico cromatográfico con tiempo de retención 2.4 minutos correspondía a acetaldehído residual que no había reaccionado, mientras que el otro pico cromatográfico (13.58 minutos) podría tratarse de algún dímero de acetaldehído, aunque este hecho no se confirmó. Esto hizo pensar en que, o bien no existían dímeros en fase acuosa o los que se habían sintetizado no poseían marca radiactiva o si la poseían, era tan pequeña que no podía ser detectada. Un inconveniente del cromatógrafo líquido con detector de radiactividad es que poseía un loop donde la cantidad máxima de muestra que podía inyectarse era 20  $\mu\text{L}$ . La inyección de esta misma cantidad en el cromatógrafo de nuestro laboratorio, no generaba picos cromatográficos que se correspondieran con los tiempos de retención de los dímeros de epicatequina buscados (42–43 minutos).

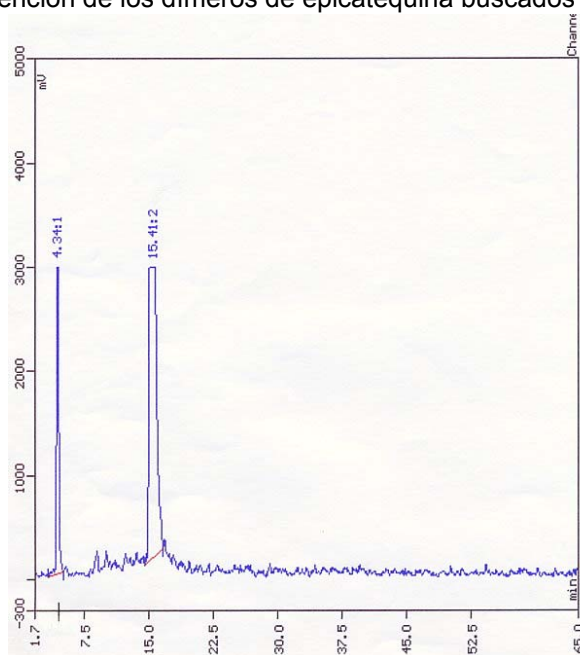


Figura 82. Cromatograma obtenido al inyectar una alícuota del medio de polimerización radiactivo en un cromatógrafo con detector de radiactividad.

No obstante, la inyección de una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de medio de polimerización permitía visualizar claramente los picos cromatográficos generados por estos compuestos diméricos. Quizás la imposibilidad de inyectar una mayor cantidad de muestra en el cromatógrafo líquido con detector de radiactividad hacía imposible la detección de radiactividad en los dímeros sintetizados ya que se trabajaba muy cerca del límite de detección. El medio de reacción con acetaldehído radiactivo se filtró, separando el precipitado de la fase acuosa. El precipitado se secó en una estufa a 30°C y posteriormente, se depositó durante 24 horas en un desecador de vacío para eliminar tanto el agua como el acetaldehído residual que pudiera contener. La cantidad total de oligómero de epicatequina sintetizado fue de 0.0966 g con una radiactividad global de 4.4  $\mu\text{Ci}$ . La inyección de una alícuota del oligómero radiactivo sintetizado en una capa fina permitió evaluar el grado de condensación alcanzado. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 83. El grado de polimerización obtenido oscilaba entre monómero y oligómeros mayores de 5 unidades de epicatequina. Como se aprecia en la figura, no se consiguió una separación neta de la muestra en los diferentes grados de polimerización alcanzados. No obstante, aquellos Rf's que coincidían con las manchas de los patrones fueron rascadas y analizadas en un contador de radiactividad Beta para evaluar su marca radiactiva, obteniéndose los resultados presentados en la tabla 25.

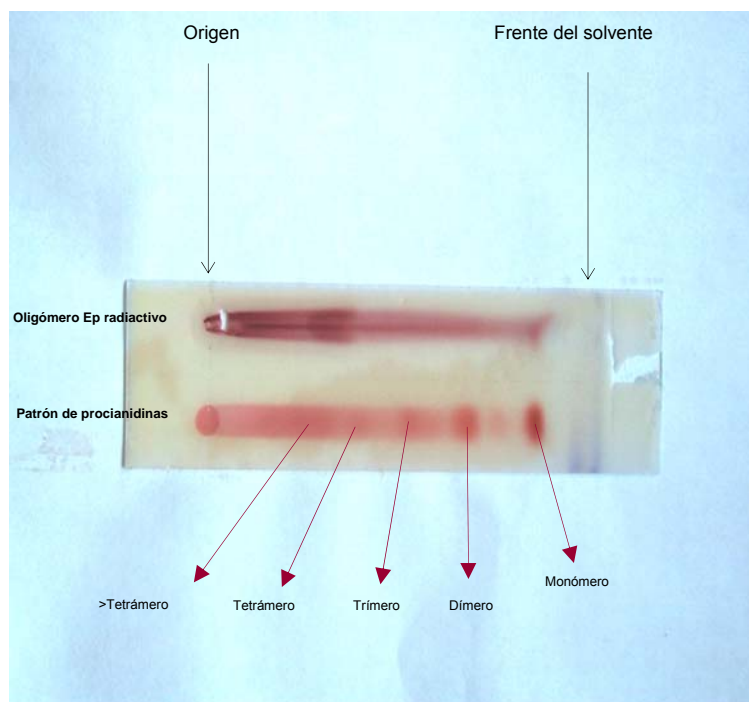


Figura 83. Cromatografía en capa fina del oligómero de epicatequina radiactivo.

Rf	Grado Polimerización	Radiactividad (dpm)
0,83	1	14044
0,70	2	3123
0,57	3	2552
0,46	4	1709
0,34	≥ 5	21012

Tabla 25. Radiactividad de las manchas obtenidas para el oligómero de epicatequina radiactivo en la cromatografía en capa fina.

Estos datos revelaban la existencia de radiactividad en el oligómero de epicatequina sintetizado y contrastaban con los resultados obtenidos al analizar la muestra mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de radiactividad. Una explicación a estos datos obtenidos podría ser que parte de la radiactividad medida en la cromatografía en capa fina pudiera deberse a acetaldehído residual que no hubiera sido eliminado totalmente de la muestra, mientras que los resultados obtenidos tras realizar el análisis mediante cromatografía líquida podrían explicarse debido a la competencia existente entre el acetaldehído radiactivo y el acetaldehído frío utilizados en el ensayo. Esta competencia estaba favorecida hacia el acetaldehído sin marca radiactiva debido a que estaba más concentrado que el acetaldehído radiactivo, teniendo mayor probabilidad para unirse a la epicatequina. De este modo, si se tomaba como muestra un trímero de epicatequina (Epicatequina-acetaldehído-epicatequina-acetaldehído-epicatequina) podría haberse dado el caso de que los dos puentes de acetaldehído fueran radiactivos (en este caso la radiactividad medida hubiera sido máxima), que solamente fuera radiactivo uno de ellos (la radiactividad medida hubiera sido menor) o que ninguno de los puentes de acetaldehído fuera radiactivo (no detectándose radiactividad). Al estar el acetaldehído radiactivo más diluido que el acetaldehído frío, la reacción estaría desplazada hacia la formación de oligómeros con mayor número de puentes de acetaldehído frío, hecho que haría que la radiactividad puntual medida en un determinado compuesto fuese mínima, mientras que la radiactividad medida para el conjunto del precipitado obtenido fuese apreciable. Este razonamiento se cumpliría para cada uno de los compuestos sintetizados.

Finalizado el estudio de la reacción de polimerización entre el acetaldehído y la epicatequina en medio ácido, se comprobó que era posible la síntesis de oligómeros y polímeros de epicatequina en una solución modelo. Asimismo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió utilizar acetaldehído en exceso en las soluciones modelo debido principalmente a dos razones: la primera se basa en la velocidad de polimerización de los dos reactivos implicados, ya que la utilización de acetaldehído en exceso hace posible la obtención de una gran cantidad de oligómeros y polímeros de epicatequina en muy poco tiempo. De hecho y como ya se ha comentado, en 24 horas se dispone de una cantidad suficiente de precipitado como para llevar a cabo un estudio de la absorción *in vivo* de estos compuestos. Además, la evolución de los compuestos sintetizados en estas condiciones parece ser más rápida, es decir, en menor tiempo se obtiene una variación de la coloración de los polímeros y de la fase acuosa del medio. La segunda razón se basa en la uniformidad que presenta el precipitado sintetizado en la solución modelo con acetaldehído en exceso. Los datos expuestos anteriormente reflejan que el grado de polimerización obtenido en un medio de reacción con acetaldehído en defecto oscila entre 2 y 9, siendo éste último el compuesto mayoritario (83%). Sin embargo, cuando a la solución modelo se le añade acetaldehído en exceso, el grado de polimerización obtenido solamente es de 16 y 3, si bien el compuesto mayoritario es un polímero de epicatequina de 16 unidades (96%). Por tanto, la composición del precipitado sintetizado cuyo proceso de absorción fue estudiado es un 3.6% de trímeros y un 96.3% de un polímero de 16 unidades de epicatequina.





## 2.3 Bibliografía

- Abia, R.; Fry, S.C. Degradation and metabolism of  $^{14}\text{C}$ -labelled proanthocyanidins from carob (*Ceratonia siliqua*) pods in the gastrointestinal tract of the rat. *J Sci Food Chem*, 2001; 81: 1156–1165.
- Adlercreutz, CHT.; Goldin, BR. Gorbach, SL.; Hockerstedt, KAV.; Watanabe, S.; Hamalainen, EK.; Markkanen, MH.; Makela, TH.; Hase, TA.; Fotsis, T. Soyabean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.* 1995, 125, 757–770.
- Alonso, E; Bourzeix, M.; Revilla, E. Suitability of water/ethanol mixtures for the extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seeds contained in a winery by-product. *Seed Sci. Technol.* (1991), 19, 545–552.
- Andreasen, M.F.; Christensen, L.P.; Meyer, A.S.; Hansen, A. Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. *J. Sci. Food Agric.* 1999, 79, 411–413.
- Arnaudinaud, V.; Nay, B.; Vergé, S.; Nuhrich, A.; Deffieux, G.; Mérillon, J-M.; Monti, J-P.; Vercauteren, J. Total synthesis of isotopically labelled flavonoids, Part 5: Gram-scale production of  $^{13}\text{C}$ -labelled (–)-procyanidin B3. *Tetrahedron Letters.* 2001; 42: 5669–5671.
- Arnold, R.M.; Noble, A.C. Bitterness and astringency in a model wine solution. *Am. J. Enol. Vitic.* 1978, 29, 150–152.
- Arnold, R.M.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 675–678.
- Asen, S.; Stewart, R.N.; Norris, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on colour. *Phytochemistry.* 1972, 11, 1139–1144.
- Bakker, J.; Bridle, P.; Honda, T.; Kuwano, H.; Saito, N.; Terahara, N.; Timberlake, C.F. Isolation, identification and identification of a new anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry.* 1997; 44: 1375–1382.
- Bakker, J.; Picinelli, A.; Bridle, P. Model wine solutions: colour and composition changes during ageing. *Vitis*, 1993; 32: 111–118.
- Bakker, J.; Timberlake, C.F. Isolation, identification and characterisation of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 35–43.
- Banwart, W.L.; Porter, M.P.; Granato, T.C.; Hasset, J.J. *J. Chem. Ecol.* 1985, 11, 383.
- Baranowski, E. S.; Nagel, C. W.; Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white Riesling wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1981, 32, 5–13.
- Baranowski, E. S.; Nagel, C. W.; Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model system. *J. Food Sci.* 1983; 48: 419–429.
- Bartolomé, B.; Williamson, G.; Faulds, C.B. Enzymatic release of ferulic acid from barley spent grain. *J. Cereal Sci.* 1997, 25.
- Bartsch H; Ohshima H; Pignatelli B. Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat Res* 1988 Dec; 202 (2), pp. 307-24.
- Beecher, G.; Phytonutrients' role in metabolism: effects on resistance to degenerative processes. *Nutr. Rev.* 1999, 57, (II) S3–S6.



- Benasi, M.T.; Cecchi, H.M. Method development for the simultaneous determination of carboxylic acids, phenolic compounds and sorbic acid in white wines. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 1998, 21, 491–501.
- Bendz, G.; Martensson, O.; Nilsson, E. Studies of flavilium compounds. I. Some flavilium compounds and their properties. Arkiv. Kemi. 1967, 27, 67–77.
- Bennie, L.; Coetzee, J.; Malan, E.; Ferreira, D. Structure and stereochemistry of triflavanoids containing both ether and carbon–carbon interflavanyl bonds. Phytochemistry 57; 2001, 1023–1034.
- Bennie, L.; Malan, E.; Coetzee, J.; Ferreira, D. Structure and synthesis of ether–linked proteracacinidin and promelacacinidin proanthocyanidins from *Acacia Caffra*. Phytochemistry 53, 2000, 785–793.
- Beveridge, T.; Loubert, E.; Harrison, J.E. Simple measurement of phenolic esters in plant cell walls. Food Research International 2000, 33, 775–783.
- Bianco, A.; Buiarelli, F.; Cartón, G.; Coccioli, F.; Muzzalupo, I.; Polidor, A.; Uccella, N.; Analysis by HPLC–MS–MS of biophenolics in olives and Oils. Anal. Lett. 2001, 34, 1033–1051.
- Bishop, P.D.; Nagel, C. W. Characterization of the condensation product of malvidin 3, 5–diglucoside and catechin. J. Agric. Food Chem. 1984, 32: 1022–1026.
- Blouin RA; Huang Chandler MH; Guttendorf RJ; Wedlund PJ Simultaneous quantitation of d- and l-hexobarbital in rat blood by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1987 Aug 7; 419, pp. 426-32.
- Blouin, F.A.; Zarins, Z.M. J. Chromatogr. 1988, 441, 443.
- Borzillo, A.; Ianmotta, N.; Uccella, N. Oinotria table olives: quality evaluation during ripening and processing by biomolecular components. Eur. Food Res. Technol. 2000, 212, 113–121.
- Boukharta, M.; Girardin, M.; Metche, M. Procyanidines galloylées de sarment de vigne (*Vitis vinifera*). Séparation et identification par HPLC and chromatographie en phase gazeuse. J. Chromatogr. 1988, 455, 406–409.
- Bourzeix, M.; Weyland, D.; Heredia, N. Bull. O. I. V. 1986, 669–670, 1171.
- Brouillard, R.; Dangles, O. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging? Food Chem. 1994, 51, 265–371.
- Brouillard, R.; Dangles, O. Flavonoids and flower colour. In *the flavonoids. Advances in research since 1986*; Harborne, J.B., Ed.; Chapman & Hall, London, 1984; pp 565–588.
- Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydratation and tautomeric reactions of malvidina–3–glucoside. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 8461–8468.
- Brouillard, R.; Wigand, M. C.; Cheminat, A. Loss of colour, a prerequisite to plant pigmentation by flavonoids. Phytochemistry, 1990; 29: 3457–3460.
- Buchanan, C.J.; Wallace, G.; Fry, S.C.; Eastwood, M.A.; In vivo released of <sup>14</sup>C-labelled phenolic groups from intact dietary spinach cell walls during passage through the rat intestine. J Sci Food Chem, 1996; 71: 549–469.
- Buffnoir S, Mestdagh H, Rolando, C Reactivity of Pentacoordinated Fluoro Organotin Species in Palladium-Catalysed Coupling Reaction with Aromatic Halide, Conference on Trends in Organic Chemistry (ECTOC-1), (1995).



Buffnoir, S.; Rolando, C. A new access to proanthocyanidin using organometallic coupling. 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2), 1998.

Buiarelli, F.; Cartoni, G.; Coccioli, F.; Levetsovitou, Z. Determination of phenolic acids in wine by HPLC with a microbore column. J. Chromatography A, 1995, 695, 229–235.

Bylak, W.; Matlawska, I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. Acta Pol. Pharm. 2001, 58, 69–72.

Cameira-dos-Santos, P-J.; Brillouet, J-M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Detection and partial characterisation of a new anthocyanin-derived pigments in wine. J. Sci. Food Agric. 1996; 70: 204–208.

Cantley LC Jr; Hammes GG Investigation of quercetin binding sites on chloroplast coupling factor 1. Biochemistry 1976 Jan 13; 15 (1), pp. 1-8.

Cartoni, G.P.; Coccioli, F.; Jasionawska, R.; Ramírez, D. HPLC analysis of the benzoic and cinnamic acids in edible vegetable oils. Ital. J. Food Sci. 2000, 12, 163–173.

Cheynier, V. Bull. Liason Groupe Polyphenols. 1990, 15, 275.

Cheynier, V.; Doco, T.; Fulcrand, H.; Guyot, S.; Le Roux, E; Souquet, J.M.; Rigaud, J.; Moutounet, M. ESI-MS analysis of polyphenolic oligómeros and polymers. Analysis. 1997, 25: M32–M37.

Cheynier, V.; Fulcrand, H.; Sarni, P. Moutounet, M.; Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification. Analisis, 1997; 25: M14–M21.

Cheynier, V.; Osse, C.; Rigaud, J. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. J. Food Sci. 1988, 53, 1729–1729.

Cheynier, V.; Ricardo-da-Silva, J.M. Oxidation of grape procyanidins in model solution containing *trans*-caffeoyl tartaric acid and polyphenoloxidase. J. Agric. Food Chem. 1991, 39: 1047–1049.

Coetzee, J.; Malan, E.; Ferreira, D. Oligomeric flavonoids. Part 29. Structure and synthesis of novel ether-linked [4-O-4]-bis-teracacidinins, Tetrahedron 1998b, 54, 9153–9160.

Coetzee, J.; Malan, E.; Ferreira, D. Oligomeric flavonoids. Part 28. Structure and synthesis of ether-linked (4-O-3)-bis-ter-acacidinins, a novel class of naturally occurring proanthocyanidins. Journal of Chemical Research 1998a, (S), 526–527, (M), 2287–2296.

Coetzee, J.; Mciteka, L.; Malan, E.; Ferreira, D. Structure and synthesis of the first procassinidin dimmers based on epicatechin and gallo- and epigallocatechin. Phytochemistry 53; 2000, 795–804.

Conde, E.; Cadahía, E.; García-Vallejo, M.C. HPLC analysis of flavonoids and phenolic acids and aldehydes in *Eucalyptus* spp. Chromatographia, 1995, (11/12), 657–660.

Cremin, P.; Kasim-Karakas, S.; Waterhouse, A.L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 1747–1750.

Czchanska, Z.; Foo, L.Y.; Newman, R.H.; Porter, L.J.; Thomas, W. A.; Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. J. Chem. Soc. Com., 1979, 375.

Da Silva, E.L. Piskula, M.; Terao, J. Enhancement of antioxidant ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. Free Rad. Med., 1998, 24, (7/8), 1209–1216.

- Da Silva, J.M.R. Separation and Quantitative determination of grape and wine procyanidins High Performance Reversed Phase Liquid Chromatography. J. Sci. Food Agric., 1990, 53, 85–93.
- Dallas, C.; Hipólito–Reis, P.; Ricardo–da–Silva, J. M.; Laureano, O. Influence of acetaldehyde, pH and temperature on transformation of procyanidins in model wine solutions. Am. J. Enol. Vitic. 2003, 54:2
- Dallas, C.; Ricardo–da–Silva, J. M.; Laureano, O. Degradation of Oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. Vitis. 1995, 34: 51–56.
- Dallas, C.; Ricardo–da–Silva, J. M.; Laureano, O. Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidina–3–glucoside and acetaldehyde. J. Sci. Food Agric. 1996b; 70: 493–500.
- Dallas, C.; Ricardo–da–Silva, J. M.; Laureano, O. Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. J. Agric. Food Chem. 1996a; 44: 2402–2407.
- Dalluge, J.J.; Nelson, B.C.; Brown, J.; Sander, L.C. Selection of a column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using HPLC. J. Chromatography A, 1998, 793, 265–274.
- Dangles, O.; Wigand, M. C.; Brouillard, R. Polyphenols in plant pigmentation: the copigmentation case. Bull. Liasion Groupe Polyphenols. 1992; 16: 209–216.
- Das NP Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. Biochem Pharmacol 1971 (12), pp. 3435-45.
- Das, D.K. Naturally occurring flavonoids: Structure, chemistry and HPLC methods for separation and characterisation. Meth. Enzymol., 1994, 234, 40, 410–420.
- Davies, A.P. Goodsall, C.; Cai, Y.; Davis, A.L. Lewis, J.R; Wilkins, J.; Wan, X.; Clifford, M.N.; Powell, C.; Parry, A.; thiru, A.; Safford, R.; Nursten, H.E.; Black tea dimeric and oligomeric pigments: structures and formation. In plant polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology; Gross, G.G., Wemingway, R.W.; Yoshida, T., Eds.; Kuwer Academic/Plenum Publishers: New York, 1999; pp 697–724.
- De Freitas, V.A.P.; Glories, Y.; Laguerre, M. Incidence of molecular structure in oxidation of grape seed procyanidins. J. Agric. Food Chem., 1998, 46, 376–382.
- Delage, E.; Bouhon, G.; Baron, A.;Drilleau, J.F.; HPLC of phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. J. Chromatogr. 1991, 555, 125–136.
- Delcour, J. A.; Ferreira, D.; Roux, D. G. Synthesis of Condensed Tannins. IX. The condensation sequence of leucocyanidin with (+)-catechin and with the resultant procyanidins. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1983; 1: 1711–1717.
- Déprez S; Mila I; Scalbert A. Carbon-14 biolabeling of (+)-catechin and proanthocyanidin oligomers in willow tree cuttings. J Agric Food Chem, 1999; 47, pp. 4219-30.
- DiCarlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, AA.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci. 1999; 65: 337–353.
- Dixon, R.A.; Steele, C.L. Flavonoids and isoflavonoids: a gold mine for metabolic engineering. Trends in plant Science. 1999; Vol. 4, nº 10; 1471–1475.
- Dondi, F.; Kahie, D.; Lodi, G.; Blo, G. J. Chromatogr. 1989, 461, 281.
- Donovan, J. L.; Bell, J. R.; Kasim–Karakas, S.; German, J. B.; Walzem, R. L; Hansen, R. J.; Waterhouse, A. L. J. Nutr. 129 (1999) 1662.



Dorothea, G. *Phenol derivatives*. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Barbara, E.; Stephen, H.; Gail, S., Eds.; VCH: Weinheim, 1991; Vol. A19.

Duarte MP; Laires A; Gaspar J; Oliveira JS; Rueff J. Genotoxicity of instant coffee and of some phenolic compounds present in coffee upon nitrosation. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000; 20 (4), pp.

Ellnain-Wojtaszek, M. Phenolic acids from *Gingko biloba* L. Part II. Quantitative analysis of free and liberated by hydrolysis of phenolic acids. *Acta Pol. Pharm.* 1997, 54, 229–232.

Escarpa, A.; González, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2001, 31, 57–139.

Escarpa, A.; González, M.C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta* 2001, 427, 119–127.

Escribano-Bailón, M.T.; Dangles, O.; Brouillard, R.; Coupling reactions between flavilium ions and catechin. *Phytochemistry*. 1996; 41: 1583–1592.

Escribano-Bailón, M.T. Estudio de la composición flavánica de la semilla de uva. Tesis Doctoral (1993). Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

Escribano-Bailón, M.T.; Gutiérrez, Y.; Ortega, M.D.; Rivas, J.C.; Santos Buelga, C. Identificación de algunos procianidoles dímeros y trímeros en semillas de uva. XIV Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros. Almendralejo, 4–8 de mayo de 1992, pp. 491–498.

Escribano-Bailón, M.T.; Gutiérrez, Y.; Rivas, J.C.; Santos Buelga, C. Analysis of flavan-3-ol from *Vitis vinifera* variety Tempranillo grape seeds. *Bull. Liason Groupe Polyphénols*, 1992, 16 (II), 129–132.

Escribano-Bailón, M.T.; Gutiérrez, Y.; Rivas, J.C.; Santos Buelga, C. Characterisation of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del país grape seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 1794–1799.

Escribano-Bailón, M.T.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Separation method of proanthocyanidins by their condensation degree. *Bull. Liason Groupe Polyphénols*, 1992, 16, 79–82.

Es-Safi, N. E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerisation of flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 2088–2095.

Es-Safi, N. E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin-3-O-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 2096–2102.

Es-Safi, N. E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M.; Hmamouchi, M.; Essassi, E. M. Kinetic studies of acetaldehyde-induced condensation of flavan-3-ols and malvidin-3-glucoside model solutions systems. In *polyphenols communications 96*; Vercauteren, V.; Cheze, C.; Dumon, M. C.; Weber, J. F., Eds.; Groupe Polyphenols: Bordeaux, France, 1996.

Es-Safi, N. E.; Le Guernevé, C.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. New polyphenolic compounds with xanthylum skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 5211–5217.

Fang, Y.; Smith, MA.; Pepin, M-F. Benzyl adenine restores anthocyanin pigmentation in suspension cultures of wild *Vaccinium pahaiae*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 1998, 54, 113–122.

Fechtal, M.; Riedl, B.; Calve, L. Modeling of tannins as adhesives. *Holzsforschung*, 1993; 47: 419–424.

Fernández de Simón, B.; Pérez-Illzarbe, J.; Hernández, T.; Gómez, C.; Estrella, I. HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatographia*, 1990, 30 (1/2), 35–37.

Ferreira D.; Bekker, R. Oligomeric proanthocyanidins. Naturally occurring O-heterocycles. *Natural product reports*. 1996, 13, 411–433.

Ferreira, D.; Li, X–C. Oligomeric proanthocyanidins. Naturally occurring O-heterocycles. *Natural product reports*. 2000, 17, 193–212.

Ferreira, D.; Nel, R.J.J., Bekker, R. 1999. In: Barton, D.H.R. Nakanishi, K. Meth–Cohn O., Pinto B.M. (Eds), Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 3. Elsevier, New York, p. 723.

Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Toki, K.; Saito, N. Dangles, O.; Brouillard, R. New aspects of anthocyanidin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry*, 1996; 41: 301–308.

Foo, L. Y.; Karchesy, J. J. Chemical nature of phlobaphenes. In: Hemingway, R. and Karchesy, W. ed. *Chemistry and significance of condensed tannins*. New York, Plenum, 1989;109–118.

Foo, L. Y.; Newman, R.; Waghorn, G.; McNabb, W. C.; Ulyatt, M. J. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry*, 1996; 41: 617–624.

Foo, L. Y.; Porter, L. J. The structure of tannins in some edible fruits. *J. Sci. Food Agric.*, 1981; 32: 711–716.

Foo, L.Y., Isolation of [4–O–4]–linked biflavonoids from *Acacia melanoxylon*: first examples of a new class of single ether–linked proanthocyanidin dimmers. *Journal of the Chemical Society*, 1989, 20, 1505–1506.

Forkman, G. Genetics of flavonoids. In: Harbourne, J. B. ed. *The flavonoids: Advances in research since 1986*. 1993; London, Chapman and Hall, 537–564.

Francia–Aricha, E. M.; Guerra, M. T.; Rivas–Gonzalo, J. C.; Santos–Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 2262–2266.

Friederich, S.; Maier, UH.; Deus–Neumann, B.; Asakawa, Y.; Zenk, MH. Biosynthesis of cyclic bis(bibenzyls) in *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry*, 1999; 50, 589–598.

Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 1998; 47: 1401–1407.

Fulcrand, H.; Cameira–dos–Santos, P–J.; Sarni–Manchado, P.; Cheynier, V.; Favre–Bombin, J.C. Structure of new anthocyanin–derived wine pigments. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1996, pp 735–739.

Fulcrand, H.; Docco, T.; Es–Safi, N.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of acetaldehyde induced polymerisation of flavan–3–ols by liquid chromatography–ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1996a; 752: 85–91.

Fulcrand, H.; Es–Safi, N.; Docco, T.; Cheynier, V.; Moutounet, M. LC–MS study of induced polymerisation of flavan–3–ols. In *Polyphenols Communications 96*; Vercauteren, V.; Cheze, C.; Dumon, M. C.; Weber, J. F., Eds.; Groupe Polyphenols: Bordeaux, France, 1996b.

Fuleki, Y.; Da Silva, J.M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 1156–1160.



Gagnon, H.; Seguin, J.; Bleichert, E.; Tahara, S.; Ibrahim, RK. Biosynthesis of white lupin isoflavonoids from [U-<sup>14</sup>C]L-phenylalanine and their release into the culture medium. *Plant Physiol.*, 1992; 100: 76–79.

Gao, C.; Patrick, M.; MacManus, D.; Vulfson, E. Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotech. and Bioeng.*, vol. 71; nº 3, 2001.

Gao, L.; Mazza, G.; Rapid method of complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by HPLC and capillary GLC. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 118–125.

García-Viguera, C.; Bridle, P.; Es-Safi, N.E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solutions containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde. *Vitis.* 1994, 33: 37–40.

Gaspar J; Laires A; Monteiro M; Laureano O; Ramos E; Rueff J. Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis* 1993 Jan; 8 (1), pp. 51-5.

Gioacchin, A.M.; Roda, A.; Galletti, G.C.; Bocchini, P.; Manetta, A.C.; Baraldini, M. HPLC–electrospray mass spectrometric analysis of phenolic acids and aldehydes. *J. Chromatogr. A.* 1996, 730, 31–37.

Goiffon, J.P.; Brun, M.; Bourrier, M.J. *J. Chromatogr.* 1991, 537, 101.

Goldstein, J.L.; Swain, T. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry.* 1963, 2, 371–383.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J.M.; Martínez-Cutillas, A.; Fernández-Fernández, J.I. Phenolic compounds and color stability of red wines: effect of skin maceration time. *Am. J. Enol. Vitic.* 2001, 52, 266–270.

González-Mancebo S; García-Santos MP; Hernández-Benito J; Calle E; Casado J. Nitrosation of phenolic compounds: inhibition and enhancement. *J Agric Food Chem* 1999 Jun; 47 (6), pp. 2235-40.

González-Mancebo, S.; Lacadena, J.; García-Alonso, Y.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. Nitrosation of phenolic compounds: effects of alkyl substituents and solvent. *Monatshefte für Chemie* 133, 2002; 157–166.

Grotewold, E.; Drummond, B. J.; Bowen, B.; Peterson, T. The *myh*-homologous *P* gene controls phlobaphenes pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, 1994; 76: 543–553.

Grusak, MA.; Rogers, RB.; Yousef, GG.; Erdman, JW.; Lila, MA. An enclosed chamber labelling system for the <sup>14</sup>C-enrichment of phytochemicals in plant cell suspension cultures. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* in press.

Guillén, D.A.; Barroso, C.G.; Pérez-Bustamante, J.A. Selection of column and gradient for the separation of polyphenols in sherry wine by HPLC incorporating internal standards. *J. Chromatogr. A.* 1996, 724, 117–124.

Guyot, S.; Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M. Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 2458–2462.

Guyot, S.; Marnet, M.; Laraba, D.; Sanoner, P.; Drilleau, J.F. Reserved-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterisation of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J agric. Food Chem.*, 1998, 46, 1698–1705.



- Hagerman, A.E.; Butler, L.G.; Tannins and lignins, in Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, 1991, vol1, Plenum Press, San Diego, 355–388.
- Hagerman, A.E.; Zhao, Y. Johnson, S. Methods for determination of condensed and hidrolizable tannins, in Antinutrients and Phytochemicals in food, 1997, 209–222.
- Häkkinen, S.H.; Kärenlampi, S.O.; Heinonen, I.M. Mykkänen, H.M.; Törrönen, A. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. J. Sci. Food Agric. 1998, 77, 543–551.
- Hara, S.; Ohnishi, S. J. Liq. Chromatogr. 1984, 7, 59
- Harborne, J.B. The flavonoids: advances in research from 1980, Chapman and Hall, London, 1988.
- Harborne, J.B. The flavonoids: advances in research from 1986, Chapman and Hall, London, 1993.
- Hashida, K.; Ohara, S. Formation of a novel catechinic acid stereoisomer from base-catalysed reactions of (+)-catechin. J. Wood Chem. Tech. 2002; 22(1), 11–23.
- Haslam, E. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. Phytochemistry 1980, 19: 1577–1582.
- Haslam, E. Polyphenols–proteins interactions. Biochem. J. 1974, 139, 285–288.
- Haslam, E. Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. Phytochemistry, 1977; 16: 1625–1640.
- Haslam, E.; Lilley, T. H. Natural astringency in foodstuffs—a molecular interpretation. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1988, 27, 1–40.
- Haslam, E.; Practical polyphenolics, from Structure to Molecular Recognition and Physiological Action; Cambridge University Press: Cambridge, U. K., 1998; pp 335–373.
- Hasler A; Sticher O; Meier B. High-performance liquid chromatographic determination of five widespread flavonoid aglycones. J Chromatogr 1990; 508 (1), pp. 236-40.
- Heller, W.; Forkman, G. Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne, J. B. ed. The flavonoids: Advances in research since 1986. 1993; London, Chapman and Hall, 499–536.
- Hemingway, R.W. In: Rowe, J.W. (Ed), Natural products of Woody Plants, Vol. 1. Springer-Verlag, 1989, New York, p. 571.
- Hemingway, R.W.; McGraw, G.W.; Karchesi, J.J.; Foo, L.Y.; Porter, L.J. Recent advances in the chemistry of condensed tannins. J. App. Polymer Sci.: Appl. Polymer Symp., 1983, 37, 967.
- Hergert, H. L. Biogenesis of condensed tannins: An overview In: Hemingway, R. and Karchesy, W. ed. Chemistry and significance of condensed tannins. New York, Plenum, 1989;71–82.
- Hernanz, D.; Núñez, V.; Sancho, A.; Faulds, C.B.; Williamson, G.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydromers in barley and precessed barley. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 4884–4888.
- Hirasuna, T.J.; Schuler, M.L.; Lackney, V.K.; Spanswick, R.M. Enhanced–anthocyanin production in grape cell cultures. Plant Sci, 1991, 78, 120–122.
- Hirata, T.; Hamada, H.; Aoki, T.; Suga, T. Phytochemistry, 21, 2209; 1982.
- Hirata, T.; Shimoda, K.; Gondai, T. Asymmetric hidrogenation of the C–C double bond of enones with the reductases from *Nicotiana tabacum*. Chemistry Letters, 2000.



Holten, T. A.; Cornish, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 1995; 7: 1071–1083.

Ishikura, N.; Murakami, H.; Fuji, Y. Conversion of (+)-dihydroquercetin to 3, 4-cis-leucocyanidin by a reductase from cell suspension cultures of *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol.*, 1988; 29: 795–799.

Jaworski, A.W.; Lee, Ch. Y. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric Food Chem.*, 1987, 35, 257–259.

Jerumanis, J. Quantitative analysis of flavonoids in barley, hops and beer by HPLC. *J Inst. Brew.*, 1985, 91, 250–252.

Jiménez-Ramsey, L.M.; Rogler, J.C.; Housley, T.L.; Butler, L.G.; Elkin, R.G. Absorption and distribution of <sup>14</sup>C-labelled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *J. Agric. Food Chem.* 1994; 42, 963–967.

Joseph, R. G.; Tanner, G. J.; Larkin, P. J. Proanthocyanidin synthesis in the forage legume *Onobrychis viciifolia*. A study of chalcone synthase, dihydroflavonol 4-reductase and leucoanthocyanidin 4-reductase in developing leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1998; 25: 271–278.

Jouve, C.; Cabanis, J.C.; Bourzeix, M.; Heredia, N.; Rosec, J.P.; Vialatte, C. Teneurs en catéchines et procianidols de vin blancs et rosé; effets du collage par la caséine. *Rev. Fr. Oenol.* 1989, 117, 14–20.

Jurd L. Anthocyanidins and related compounds. XV. The effects of sunlight on flavylum salt-chalcone equilibrium in acid solutions. *Tetrahedron* 1969 (11), pp. 2367-80.

Jurd, L. Anthocyanins and related compounds. XI. Catechin flavylum salt condensation reactions. *Tetrahedron* 1967; 23: 1057–1054.

Jurd, L. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. *Am. J. Enol Vitic.* 1969, 20: 195–197.

Jurd, L.; Somers, T. C. The formation of xanthylum salts from proanthocyanidins. *Phytochemistry*, 1970; 9, 419 – 427.

Justensen, U.; Knuthen, P.; Leth, T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Letters*, 1997, 165–167.

Kada, T.; Kaneko, K.; Matsuzaki, S.; Hara, Y. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens case of the green tea leaf factor. *Mutat. Res.* 1985; 150: 127–132.

Kato T; Kojima K; Hiramoto K; Kikugawa K. DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diazoquinone compounds. *Mutat Res* 1992 Jul; 268 (1), pp. 105-14.

Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. *J. Wood. Chem. Technol.* 9 (1989) 35.

Kiatgrajai, P.; Wellons, J.D.; Gollob, L.; White, J.D. Kinetics of polymerisation of (+)-catechin with formaldehyde. *J. Org. Chem.* 1982; 47: 2913–2917.

Kikugawa K; Kato T. Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite. *Food Chem Toxicol* 1988 Mar; 26 (3), pp. 209-14.

Koupai-Abyazani, M. R.; McCallum, J.; Muir, A.; Bohm, B A.; Towers, G. H. N.; Gruber, M. Y. Developmental changes in the composition of Proanthocyanidins from leaves of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) as determined by HPLC analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1993b; 41: 1066–1070.



- Koupai–Abyazani, M. R.; McCallum, J.; Muir, A.; Lees, G.; Bohm, B. A.; Towers, G. H. N.; Gruber, M. Y. Purification and characterization of a proanthocyanidin polymer from seed of alfalfa (*Medicago sativa* cv Beaver). J. Agric. and Food Chem. 1993a; 41: 565–569.
- Krisa, S.; Larronde, F.; Budzinski, H.; Decendit, A.; Deffieux, G.; Mérillon, J.M. Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and <sup>13</sup>C biolabelling. J. Nat. Prod. 1999a; 62, 1688–1690.
- Krisa, S.; Waffo Tégou, P.; Decendit, A.; Deffieux, G.; Vercauteren, J.; Mérillon, J.M. Production of <sup>13</sup>C-labelled anthocyanins by *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Phytochemistry. 1999b; 65, 651–656.
- Kristiansen, K. N. Biosynthesis of Proanthocyanidins in barley: genetic control of the conversion of dihydroquercetin to catechin and procyanidins. Carlsberg Res. Commun. 1984; 49: 503–524.
- Kristiansen, K. N. Conversion of (+) – dihydroquercetin to (+)–2, 3–trans–3, 4–cis–leucocyanidin and (+)–catechin with an enzyme extract from maturing grains of barley. Carlsberg Res. Commun. 1986; 51: 51–60.
- Kristiansen, K. N.; Rohde, W. Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavanol–4–reductase and molecular analysis of *Ant* 18 mutants blocked in flavonoid synthesis. Mol. Gen. Genet. 1991; 230: 49–59.
- Kroon, P.A.; Faulds, G.B.; Ryden, P.; Robertson, J.A.; Williamson, G. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 661–667.
- Krygier, K.; Sosulski, F.; Hogge, L. Free, esterified and insoluble bound phenolic acids. Extraction and purification procedure. J. Agric. Food Chem. 1982, 30, 330–334.
- Lam TB; Kadoya K; Iiyama K Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. Phytochemistry 2001; 57 (6), pp. 987-92.
- Landbo, A.K.; Meyer, A.S. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 3169–3177.
- Laparra, J.; Michaud, J.; Masquelier, J. Pharmacokinetic study of flavanolic oligomers. J Plant Med Phytother, 1977; 11: 133–142.
- Lea, A.G.H. Tannin and colour in English cider apple. Fluess. Obst. 1984, 8,1.
- Lea, A.G.H. The phenolics of cider: oligomers and polymers procyanidins. J. Sci. Food Chem. 1978, 29, 471–477.
- Lea, A.G.H.; Bridle, P.; Timberlake, C.F.; Singleton, V.L. The procyanidins of white grapes and wines. Am. J. Enol. Vitic. 1979, 30, 289–300.
- Lea, A.G.H.; Timberlake, C.F. The phenolics of cider: procyanidins. J. Sci. Food Chem. 1974, 25, 1537–1545.
- Lee, C.Y.; Jaworski, A.; Phenolics and browning potential of white grapes grown in New York. Am. J. Enol. Vitic. 1988, 39, 337–340.
- Lee, KH. Novel antitumor agents from higher plants. Med. Res. Rev. 1999; 19: 569–596.
- Leung, J.; Fenton, T.W.; Clandinin, D.R. Phenolic components of sunflower flour. J. Food Sci. 1981, p. 46.



- Li P; Zhang TY; Hua XA; Ito Y Studies on the preparative capability of the horizontal flow-through coil planet centrifuge and high-performance liquid chromatography in the separation of polar compounds from *Oxytropis ochrocephala* Bunge. J Chromatogr 1991 Jan 18; 538 (1), pp. 219-25.
- Liang, H.R.; Sirén, H.; Jyske, P.; Reikkola, M.L.; Vuorela, P.; Vuorela, H.; Hiltunen, R. Characterisation of flavonoids in extracts from four species of *Epimedium* by micellar electrokinetic capillary chromatography with diode-array detection. J. Chromat. Sci., 1997, 35, 117-125.
- Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. Polyphenols Interaction. Anthocyanins: copigmentation and colour change in red wines. F. Sci. Food Agric. 1992, 59: 299-305.
- Lijinsky, W.; Chemistry and Biology of N-nitroso compounds. Cambridge Monographs on Cancer Research. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- Lin JK; Lee SF. Enhancement of the mutagenicity of polyphenols by chlorination and nitrosation in *Salmonella typhimurium*. Mutat Res 1992 Oct; 269 (2), pp. 217-24.
- López, M.; Martínez, F.; Del Valle, C.; Orte, C.; Miró, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by HPLC. J. Chromatogr. A. 2001, 922, 359-363.
- Ludwing, S. R.; Wessler, S. R. Maize R gene family: tissue specific helix-loop-helix proteins. Cell. 1990; 62: 849-851.
- Madigan, D.; McMurrough, I.; Smyth, M.R. Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by HPLC with dual-electrode electrochemical detection. Analyst, 1994, 119, 863-868.
- Mahler, S.; Edwards, P.A.; Chrisholm, M.G. HPLC identification of phenols in Vidal Blanc wine using electrochemical detection. J. Agric. Food Chem. 1988, 36, 946-951.
- Maiani, G.; Serafini, M.; Salucci, M.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A. Application of a new HPLC method for measuring selected polyphenols in human plasma. J. Chromatography B, 1997, 692, 311-317.
- Malkov, A.V.; Spoor, P.; Vinader, V.; Kocovsky, P. J. Org. Chem. 1999, 64, 5308-5311.
- Markham, K.R. Flavones, flavonols and their glucosides. Plant phenolics, 1989, 1, Acad. Press, 197-235.
- Markham, K.R.; Frankee, A.; Molloy, P.J. Phytochem. 1990, 29, 501.
- Martin, C.; Gerats, T. The control of flower coloration. In: Jordan, B. R. ed. The Molecular Biology of Flowering. Wallingford, CAB International, 1993; 219-255.
- Martin, S.F.; Lopez, O.D.; Tetrahedron Letters. 1999, 40, 8949-8953.
- Marzo A; Arrigoni Martelli E; Bruno G; Martinelli EM; Pifferi G Assay of hydroxyfarrerol in biological fluids. J Chromatogr 1990 Dec 28; 535 (1-2), pp. 255-61.
- Masquelier, J. Efectos fisiológicos del vino: su parte en el alcoholismo. Simposio internacional "El vino y la salud". Noviembre, 1987, Mendoza, Argentina.
- Masquelier, J. L'alimentation et la consommation de vin. Proceedings, C.R. Symposium Int.; Verona, Italy, 1982; pp. 147-155.
- Masquelier, J. Physiological effects of wine. His share in alcoholism. Bull. O.I.V. 1988, 61, 554-578.

Mateus, M.; Silva, A.; Cantos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.; de Freitas, V. Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 2110-2116.

Matthäus, B. Isolation, fractionation and HPLC analysis of neutral phenolics compounds in rapeseeds. Nahrung-food, 1998, 42 (2), 75-80.

Mauri PL; Pietta PG; Pace M Automated high-performance liquid chromatographic assay of enzymatic activities. J Chromatogr 1991 May 31; 566 (2), pp. 327-32.

Mauri, M.M.; Romano, U.; Rivetti, F. Ing. Chim. Ital. 1985, 21, 1-3.

McGraw, G.W. Reactions at the A-ring of proanthocyanidins. In: Hemingway, R.W.; Karchesy, J.J. (eds) Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum, 1988; New York, pp 227-248.

McMurrough, I.; McDowell, J. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. Anal. Biochem. 1978, 91, 92-100.

Meirelles, C.; Sarni, F.; Ricardo da Silva, J.M.; Moutounet, M. Evaluation des procianidines galloylées dans les vins rouges issue de différents modes de vinification. Proceedings, International Polyphenolic Group Convention; Lisboa, 1992, Vol. 16, Tome II, pp. 175-178.

Meldgar, M. Expression of chalcone synthase, dihydroflavanol reductase and flavanone-3-hydroxylase in mutants of barley deficient in anthocyanidin and proanthocyanidin biosynthesis. Theor. Appl. Genet. 1992; 83: 695-706.

Memoli S; Selva M; Tundo P. Dimethylcarbonate for eco-friendly methylation reactions. Chemosphere 2001 Apr; 43 (1), pp. 115-21.

Metche, M. Bull. Liasion Groupe Polyphenols. 1988, 14, 119.

Meyer, A.S.; Jepsen, S.M.; Sørensen, N. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 2439-2446.

Michaud, M.J.; Margail, M.A. Étude analytique des tannins catéchiques. Les oligomères flavanoliques de l'Actinidia chinensis planchon. Bull. Soc. Pharm. Bourdeaux, 1977, 116, 52-64.

Mirvish SS. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. Toxicol Appl Pharmacol 1975 Mar; 31 (3), pp. 325-51.

Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. Cancer Lett 1995 Jun 29; 93 (1), pp. 17-48.

Mistry, T.; Cai, Y., Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol interactions. Part 5. Anthocyanin copigmentation. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2; 1991, 1287-1296.

Mol, J.; Grotwold, E.; Koes, R. How genes paint flowers and seeds. Trends in Plant Science, 1998; 3: 212-217.

Molnar, I.; Gober, H.; Christ, B. J. Chromatogr. 1991, 550, 39.

Moran E; O'Kennedy R; Thornes RD Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1987 Apr 24; 416 (1), pp. 165-9.

Moromoto, S.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I. Tannins and related compounds XXXIII. Isolation and characterisation of flavan-3-ol glucosides and procyanidins oligomers from Cassia Bark (Cinnamomum cassia, Blume). Chem. Pharm. Bull., 1986, 34, 633.



Morton, L.W.; Caccetta, R.A.; Puddey, I.B.; Croft, K.D.; Chemistry and viological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. Clin. Exp. Pharmacol Physiol; 2000; 27: 152–159.

Mueller–Harvey, I.; Reed, J.D.; Hartley, R.D. J. Sci. Food Agric. 1987, 39, 1–14.

Nagels, L.; Van Dongen, W.; De Brucker, J.; De Pooter, H.; HPLC separation of naturally occurring esters of phenolic acids. J. Chromatogr. 1980, 187, 181–187.

Nakamura, Y.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. Journal of health science. 2003, 49(1), 45–54.

Nay, B.; Arnaudinaud, V.; Peyrat, J–F.; Nuhrich, A.; Deffieux, G.; Mérillon, J–M.; Vercauteren, J. Total synthesis of isotopically labelled flavonoids, 2:  $^{13}\text{C}$ -labelled ( $\pm$ )-catechin from potassium [ $^{13}\text{C}$ ]-cyanide. Eur. J. Org. Chem. 2000, 1279–1283.

Nay, B.; Arnaudinaud, V.; Vercauteren, J. Gram-scale production and applications of optically pure  $^{13}\text{C}$ -labelled (+)-catechin and (–)-epicatechin. Eur. J. Org. Chem. 2001; 2379–2384.

Nay, B.; Arnaudinaud, V.; Vercauteren, J. Total synthesis of asymmetric flavonoids: the development and applications of  $^{13}\text{C}$ -labelling. C. R. Chimie. 2002; 5: 577–590.

Nay, B.; Collet, M.; Marjolène, L.; Chèze, C.; Vercauteren, V. Methods in synthesis of flavonoids. Part 3: Molybdenum (IV)-catalysed coupling of cinnamyl alcohols to phenol derivatives. Tetrahedron Letters 43, 2002; 2675–2678.

Nay, B.; Monti, J–P.; Nuhrich, A.; Deffieux, G.; Mérillon, J–M.; Vercauteren, J. Methods in synthesis of flavonoids. Part 2: High yield acces to both enantiomers of catechin. Tetrahedron Letters. 2000; 41: 9049–9051.

Nay, B.; Peyrat, J–F.; Vercauteren, J. Eur. J. Org. Chem. 1999; 9, 2231–2234.

Oguni, I.; Nasu, K.; Yamamoto, S.; Nomura, T. On the antitumor activity of fresh tea leaf. Agric. Biol. Chem. 1988; 52: 1879–1880.

Oh, H.I.; Hoff, J.E. Effect of condensed grape tannins on the *in vitro* activity of digestive proteases and activation of their zymogens. J. Food Sci. 1986, 51, 577–580.

Oh, H.I.; Hoff, J.E. Fractionation grape tannins by affinity chromatography and partial characterization of the fractions. J. Food Sci. 1979, 44, 87–89.

Ohara, S.; Hemingway, R.W. Condensed tannins: the formation of a diarylpropanol–catechinic acid dimer from base-catalysed reactions of (+)-catechin. J. Wood Chem. Tech. 1991; 11(2), 195–208.

Ohshima H; Friesen M; Malaveille C; Brouet I; Hautefeuille A; Bartsch H. Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products. Food Chem Toxicol 1989 Mar; 27 (3), pp. 193-203.

Okuda, T.; Mori, K.; Hatano, T. Relationship of the structures of tannins to the binding activities with hemoglobin and methylene blue. Chem. Pharm. Bull. 1985, 33, 1424–1433.

Oleszek, W.; Lee, C.Y.; Jaworski, A.W.; Price, K.R. Identification of some phenolic compounds in apples. J. Agric. Food Chem., 1988, 36, 430–432.

Omura, Y.; Taruno, Y.; Irida, Y.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y. Regioselective Mannich reaction of phenolic compounds and its application to the synthesis of new chitosan derivatives. Tetrahedron Letters, 2001 (42), 7273–7275.

- Ossipov, V.; Lopenen, J.; Ossipova, S.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. Gallotannins of birch *Betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997, 25 (6), 493–504.
- Oszmianski, J.; Lee, C.Y. Isolation and HPLC determination of phenolic compound in red grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1990, 41 (3), 204–206.
- Oszmianski, J.; Ramos, T.; Bourzeix, M. Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1988, 39, 259–262.
- Oszmianski, J.; Sapis, J.C. Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1293–1297.
- Oszmianski, J.; Sapis, J.C.; Macheix, J.J. Changes in grape seed phenols as affected by enzymic and chemical oxidation *in vitro*. *J. Food Sci.* 1985, 50, 1505–1506.
- Ouk, S.; Thiebaud, S.; Borredon, E.; Legars, P.; Lecomte, L. O-methylation of phenolic compounds with dimethyl carbonate under solid/liquid phase transfer system. *Tetrahedron Letters*, 2002, 43, 2661–2663.
- Pace M; Agnellini D; Lippoli G; Pietta PG; Mauri PL; Cinquanta S Purification of NAD glycohydrolase from *Neurospora crassa* conidia by a polyclonal immunoabsorbent. *J Chromatogr* 1991 Feb 22; 539 (2), pp. 517-23.
- Palma, M.; Piñeiro, Z.; Barroso, C.G. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *J. Chromatogr. A.* 2001, 921, 169–174.
- Patron, N.; Smith, P.; Mabry, J. *Int. Sugar. J.* 1985, 87, 213.
- Pérez-Illzarbe, F.J.; Marínez, V.; Hernández, T.; Estrella, I. Liquid chromatography determination of apple pulp procyanidins. *J. Liquid Chromatography*, 1992, 15 (4), 637–646.
- Perez-Maldonado, RA.; Norton, BW. Digestión of <sup>14</sup>C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *Br J Nutr*, 1996; 76: 501–513.
- Pietta P; Manera E; Ceva P Isocratic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of *Passiflora incarnata* L. and *Crataegus monogyna* flavonoids in drugs. *J Chromatogr* 1986 Apr 23; 357 (1), pp. 233-7.
- Ping, L.; Wang, X. Q.; Wang, H.Z.; Wu, Y.N. HPLC determination of phenolic acids in fruits and vegetables. *Biomed. Environ. Aci.* 1993, 6, 389–398.
- Piretti, M.V.; Doghieri, P. *J. Chromatogr.* 1990, 514, 334.
- Porter, L. J.; Flavans and Proanthocyanidins. In: Harbourne, J. B. ed. *The flavonoids: Advances in research since 1986.* 1993; London, Chapman and Hall, 23–56.
- Porter, L. J.; Flavans and Proanthocyanidins. In: *The flavonoids: Advances in research since 1980.* J. B. Harbourne, ed.. 1988; London, Chapman and Hall, 21–62.
- Porter, L.J. In Harborne, J.B. (Ed), The flavonoids. Advances in research since 1986. Chapman & Hall, 1994, London, p. 23.
- Porter, L.J.; Hrstich, L.N.; Chan, B.G. The conversion of proanthocyanidins and prodelfenidins to cyanidins and delphenidins. *Phytochemistry.* 1986, 25, 223–230.
- Porter, L.J.; Woodruffe, J. Haemalysis: the relative astringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry*, 1984, 23, 1255–1256.



Powers, J.R.; Nagel, C.W.; Weller, K. Protein removal from a wine by immobilized grape proanthocyanidins. Am. J. Enol. Vitic. 1988, 39, 117–120.

Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. Phytochemistry. 1994, 3, 781–784.

Puppo, A. Phytochemistry. 31 (1992) 85.

Putman, L.J.; Butler, L.G. Separation of high molecular weight sorghum procyanidins by HPLC. J. Agric. Food Chem., 1989, 37, 943–946.

Qimin, L.; Heuvel, V.D.; Delorenzo, O.; Corthout, J.; Pieters, L.A.C.; Vlietinck, A.J.; Claeys, M. J. Chromatogr. 1991, 562, 435.

Ragazzi, E.; Veronese, G.; Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation. J. Chromatogr. 1973, 77, 369–375.

Reddy, V.; Butler, L.G. Incorporation of  $^{14}\text{C}$  from [ $^{14}\text{C}$ ] phenylalanine into condensed tannin of sorghum grain. J. Agric. Food Chem. 1989; 37, 383–384.

Remy, S; Fulcrand, H; Labarbe, B; Cheynier, V; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin–tannin reactions. J. Sci. Food Agric. 2000, 80: 745–751.

Revilla, E.; Alonso, E.; Bourzeix, M.; Heredia, N.; Dosage des catéchines et des proanthocyanidols dans les vins. Bull. O.I.V. 1991, F. V. 829.

Ribereau–Gayon, P. Interpretation chimique de la couleur des vins rouges. Vitis 1973, 12, 119–142.

Ribereau–Gayon, P. The anthocyanins of grapes and wines, in Anthocyanins as food colors, Ed by Markakis P. Academic Press, New York, 1982, pp 209–244.

Ribereau–Gayon, P.; Pontallier, P.; Glories, Y. Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. J. Sci. Food Agric. 1983; 34: 505–516.

Ricardo da Silva, J.M.; Cheynier, V.; Souquet, J.M.; Moutounet, M.; Cabanis, J.C.; Bourzeix, M. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. J. Sci. Food Agric. 1991, 57, 111–125.

Ricardo da Silva, J.M.; Darmon, N.; Fernández, Y.; Mitjavila, S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 1549–1552.

Ricardo da Silva, J.M.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Cheminat, A.; Moutounet, M. Procyanidin dimmers and trimers from grape seeds. Phytochemistry. 1991, 4, 1259–1264.

Rigaud, J.; Escribano–Bailón, M.T.; Prieur, C.; Souquet, J.M.; Cheynier, V. Normal phase HPLC separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. J. Chromatography A, 1993, 654, 255–260.

Rigaud, J.; Pérez–Izarbe, J.; Ricardo da Silva, J.M.; Cheynier, V. Micro Method for the identification of proanthocyanidins using thiolysis monitored by HPLC. J. Chromatography, 1991, 540, 401–405.

Rivas–Gonzalo, J. C.; Bravo–Haro, S. Santos–Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin–3–monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. J. Agric. Food. Chem. 1995; 43: 1444–1449.



- Robards, K.; Antolovic, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst.* 1997, 122, 11R–34R.
- Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitiang, P.; Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 1999, 66, 400–436.
- Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (10), pp. 2866-87.
- Robichaud, J.L.; Noble, A.C.; Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.* 1990, 53, 343–353.
- Rodríguez-Delgado, M.A.; Malovaná, S.; Pérez, J.P.; Borges, T.; García Montelongo, F. J. Separation of phenolic compounds by HPLC with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A.* 2001, 912, 249–257.
- Roggero, J. P.; Coen, S.; Archier, P.; Rocheville-Divorne, C. Etude par C.L.H.P. de la réaction glucoside de malvidine-acétaldéhyde-composé phénolique. *Connaiss. Vigne Vin* 1987; 21 (3), 163–168.
- Roggero, J.P.; Archier, P.; Coen, S. Chromatography of phenolics in wine. In: *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*; American Chemical Society; Washington, D.C., 1997; 00. 6–11.
- Rogler, J.C.; Butler, L.C. Enhancement of high tannin sorghum utilisation: biological effects of dietary tannins, in *INTSORMIL: Fighting Hunger with Research*, Ed by Winn JF, University of Nebraska, Lincoln, NE, 1985.
- Rohde, W.; Barzen, E.; Marocco, A.; Schwarz-Sommer, Z.; Saedler, H.; Salamini, F. Isolation of genes that could serve as traps for transposable elements in *H. vulgare*. *Barley Genet.*, V. 1987; 533–541.
- Rommel, A.; Wrolstad, R.E. Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1237–1241.
- Rosenkranz HS; Klopman G; Ohshima H; Bartsch H. Structural basis of the genotoxicity of nitrosatable phenols and derivatives present in smoked food products. *Mutat Res* 1990 May; 230 (1), pp. 9-27.
- Rouseff RL; Ting SV. Quantitation of polymethoxylated flavones in orange juice by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1979; 176 (1), pp. 75-87.
- Saimoto, H.; Yoshida, K.; Muramaki, T.; Morimoto, M.; Sashiwa, H.; Shigemasa, Y. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 6768–6769.
- Saint Cricq de Gaulejac, N.; De Freitas, V.; Glories, Y.; Bourgeois, G.; Vivas, N. Fractionnement et dosage des procyanidines oligomères des raisins et des vins. Relation avec la qualité des vins. *Sci. Alim.*, 1998, 18, 59–76.
- Saito, A.; Nakajima, N.; Tanaka, A.; Ubukata, M. Synthetic studies of proanthocyanidins. Highly stereoselective synthesis of the catechin dimer, procyanidin-B3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66 (8), 1764–1767.
- Saito, A.; Nakajima, N.; Tanaka, A.; Ubukata, M. Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 2: Stereoselective gramm-scale synthesis of procyanidin B3. *Tetrahedron*, 2002, 58, 7829–7837.
- Saito, A.; Nakajima, N.; Tanaka, A.; Ubukata, M. Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 3: Stereoselective 3, 4-cis catechin and catechin condensation by TMSOTf-catalysed intramolecular coupling method. *Tetrahedron Letters*, 2003, 44, 5449–5452.



Salagoity–Auguste, M.H.; Bertrand, A. Wine phenolic analysis of low molecular weight components by HPLC. J. Sci. Food. Agric. 1984, 35, 1241–1247.

Sangwan, N.S.; Shanker, S.; Sangwan, R.S.; Kumar, S. Plant-derived products as antimutagens. Phytother Res. 1998; 12: 389–399.

Santos–Buelga, C.; Bravo–Haro, S.; Rivas–Gonzalo, J. C. Interactions between catechin and malvidin–3–monoglucoside in model solutions. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1995; 201: 269–274.

Santos–Buelga, C.; Francia–Aricha, E. M.; Rivas–Gonzalo, J. C. Role of flavan–3–ol structure on direct condensation with anthocyanins. In Polyphenols Communications 96; Vercauteren, V.; Cheze, C.; Dumon, M. C.; Weber, J. F., Eds.; Groupe Polyphenols: Bordeaux, France, 1996.

Sarkar, S.K.; Howarth, R.E. Specificity of the vanillin test for flavanols. J. Agric. Food Chem. 1976, 24, 317–320.

Saucier, C.; Bourgeois, G.; Vitry, C.; Roux, D.; Glories, Y. Characterization of (+)–catechin–acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols. F. Agric. Food Chem. 1997a; 45: 1045–1049.

Saucier, C.; Guerra, C.; Pianet, I.; Laguerre, M.; Glories, Y. (+)–catechin–acetaldehyde condensation products in relation to wine–ageing. Phytochemistry, 1997c; 46 (2): 229–234.

Saucier, C.; Little, D.; Glories, Y. First evidence of acetaldehyde–flavanol condensation products in red wine. Am. J. Enol. Vitic. 1997b, 48: 370–373.

Saucier, C.; Roux, D.; Glories, Y. Stabilité coloidale de polymères catéchiques. Influence des polysaccharides. In œnologie 95; Lonvaud, A., Ed.; Lavoisier: Paris, France, 1996; pp 395–400. Schiemenz, G. P.; Schmidt, U. Liebigs Ann. Chem. 1982; 1509–1513.

Schulz H; Albroscheit G. High-performance liquid chromatographic characterization of some medical plant extracts used in cosmetic formulas. J Chromatogr 1988 Jun 17; 442, pp. 353-61.

Schulz, J.M.; Herrmann, K. Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. Sample preparation and TLC. J. Chromatogr. 1980, 195, 85–94.

Schuster, B.; Herrmann, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. Phytochemistry. 1985, 24, 2761–2764.

Sendra JM; Navarro JL; Izquierdo L. C18 solid-phase isolation and high-performance liquid chromatography/ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juices. J Chromatogr Sci 1988, (9), pp. 443-8.

Shahzad, S.; Bitsch, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by HPLC. J. Chromatogr. A. 1996. 741, 223–231.

Sikorska M; Matławska I; Główniak K; Zgórk G. Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in Asclepias syriaca. L. Acta Pol Pharm 2000; 57 (1), pp. 69-72.

Singleton, V. L.; Trousdale, E. K. Anthocyanin–tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. Am. J. Enol. Vitic. 1992; 43; 63–70.

Singleton, V.L. Tannins and the qualities of wines. In: Plant Polyphenols synthesis, Properties, Significance; Plenum Press: New York, 1992; pp. 859–880.

Singleton, V.L.; Rossi, Jr J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 1965, 16, 144–158.

Smith, B.G.; Harris, P.J. Ferulic acid is esterified to glucuronarabinoxylans in pineapple cell walls. Phytochemistry. 2001, 56, 513–519.



- Solich, P.; Opletal, L.; Sovová, M. Comparison of different methods for the spectrophotometric determination of (–)-epicatechin. *Pharmazie*, 1996, 51 (12), 951–956.
- Somers, T. C. The polymeric nature of red pigments. *Phytochemistry*, 1971; 10 (9): 2175–2186.
- Somers, T.C. Wine tannins— isolation of condensed flavonoid pigments by gel-filtration. *Nature*. 1966, 209, 368–370.
- Spanos, G.A.; Wrolstad, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 1565–1571.
- Sparvoli, F.; Martin, C.; Scienza, A.; Gavazi, G.; Tonelli, C. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grapes (*Vitis vinifera*). *Plant Mol. Biol.* 1994; 24: 743–755.
- Stafford, H. A. Flavonoid metabolism. 1990. Boca Raton, FL., CRC Press, 298 p.
- Steenkamp, J. A.; Ferreira, D.; Roux, D. *Tetrahedron Lett.* 1985; 26: 3045–3048.
- Suárez Vallés, B.; Santamaría, J.; Mandas, J.J.; Blanco, D. HPLC of the neutral phenolic compounds of low molecular weight in apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, 2732–2736.
- Suga, T.; Hamada, H.; Hirata, H. *Chem. Letters.*, 1987, 471.
- Sun, B.; Leandro, C.; Da Silva, J.M.R.; Spranger, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 1390–1396.
- Sun, B.; Ricardo da Silva, J.M.; Spranger, I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4267–4274.
- Sun, L.; Burkitt, M.; Tamm, M.; Raymond, M.K.; Abrahamsson, M.; LeGourrierec, D.; Frapart, Y.; Magnuson, A.; Kenez, P.H.; Brandt, P.; Tran, A.; Hammarstrom, L.; Styring, S.; Akermark, B.; *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 6834–6842.
- Sun, R.C.; Sun, X.F.; Zhang, S.H. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber and fast-growing poplar wood. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5122–5129.
- Takagaki, A.; Gukai, K.; Nanjo, F.; Hara, Y. Reactivity of green tea catechins with formaldehyde. *J. Wood Sci.* 2000; 46: 334–338.
- Tanaka, T.; Betsumiya, Y.; Mine, C.; Kouno, I.; Theanaphthoquinone, a novel pigment oxidatively derived from theaflavin during tea-fermentation. *Chem. Commun.* 2000, 1365–1366.
- Tanaka, T.; Mine, C.; Inoue, K.; Matsuda, M.; Kouno, I. Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates and role of epicatechin quinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 50, nº 7, 2002.
- Tanaka, T.; Takahashi, R.; Kouno, I.; Nonaka, G. Chemical evidence for the de-astringency (insolubilization of tannins) of persimmon fruit. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*; 1994, 3013–3022.
- Tanner, G. J.; Abrahams, S.; Larkin, P. J. Biosynthesis of Proanthocyanidins (Condensed Tannins). *Proceedings of CSIRO Division of Plant Industry*, GPO Box 1600, Canberra, ACT, 2601.
- Tanner, G. J.; Kristiansen, K. N. Synthesis of 3, 4-cis-<sup>3</sup>H-leucocyanidin and enzymatic reduction to catechin. *Analytical Biochemistry*, 1993; 209: 274–277.
- Tedder, J. M. *Chem. Rev.* (1955) 787.



Terril, TH.; Waghorn, GC.; Woolley, DJ.; McNabb, WC.; Barry, TN. Assay and digestion of  $^{14}\text{C}$ -labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. Br J Nutr, 1994; 72: 467–477.

Thompson, R.S.; Jacques, D.; Haslam, E.; Tanner, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction: isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1972, 1387–1399.

Thorngate, JH.; Singleton, VL. Reactions of monomeric and polymeric flavan-3-ols with monomeric pigment in model wine solutions. Am J Enol Vitic 1994; 45: 349–352.

Tijburg, LBM.; Mattern, T.; Folts, JD.; Weisberger, UM.; Katan, MB. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1997; 37: 771–785.

Timberlake, C. F.; Bridle, P. Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. J. Sci. Food Agric. 1977, 28, 539–544.

Timberlake, C. F.; Bridle, P. Interactions between anthocyanins phenolic compounds and acetaldehyde. Am. J. Enol. Vitic. 1976; 27 (3):97–105.

Tits, M.; Poukens, P.; Angenot, L.; Dierckxsens, Y. Thin-layer chromatographic analysis of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves. J. Pharm. Biomed. Anal., 1992, 10 (10–12), 1097–1100.

Tobiason, F.L.; Hoff, L.A. Molecular orbital analyses of models for proanthocyanidin-methylolphenol reactions. In: Hemingway, R.W.; Karchesy, J.J. (eds) Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum, 1988; New York, pp 205–226.

Torres, A.M.; Mau-Lastovicka, T.; Rezaaiyan, R. Total phenolics and HPLC of phenolic acids in avocado. J. Agric. Food Chem. 1988, 39, 259–262.

Treutter, D. J Chromatogr. 1988, 436, 490.

Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Gutmann, M.; Kolodziej, H. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by HPLC and chemical reaction detection. J. Chromatography A, 1994, 667, 290–297.

Vande Castelee, K.; Geiger, H.; Van Sumere, C.F. J. Chromatogr. 1982, 240, 81.

Verzele M., Delahaye, P. High-speed and high-performance size-exclusion chromatography of proteins on a new hydrophilic polystyrene-based resin. J Chromatogr 1983; 391 (2), pp. 383-93.

Vidal, S.; Cartalade D.; Souquet, J.M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain-length in wine-like model solutions. J. Agric. Food Chem. 2002, 50: 2261–2266.

Vitrac, X.; Krisa, S.; Decendit, A.; Vercauteren, J.; Nährich, A.; Monti, J-P.; Deffieux, G.; Mérillon, J-M. Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Journal of Biotechnology. 95; 2002, 49–56.

Vivar-Quintana, A.M.; Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.; Rivas-Gonzalo, J.C. Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines. Food Sci. Technol. Int. 1999, 5 (4), 347–352.

Vogt TC; Killian JA; Demel RA; De Kruijff B. Synthesis of acylated gramicidins and the influence of acylation on the interfacial properties and conformational behavior of gramicidin A. Biochim Biophys Acta 1991 Nov 4; 1069 (2), pp. 157-64.

Waffo Tégou, P.; Decendit, A.; Vercauteren, J.; Deffieux, G.; Mérillon, J.M. Resveratrol-3-O- $\beta$ -glucoside (Piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Phytochemistry. 1996; 42, 1591–1593.

Wagner, H.; Farkas, L. In: The flavonoids (Eds.: J. B. Harborne, T. J. Mabry, H. Mabry), Chapman and Hall, London, 1975; 127–213.

Wakui Y; Yanagisawa E; Ishibashi E; Matsuzaki Y; Takeda S; Sasaki H; Aburada M; Oyama T Determination of baicalin and baicalein in rat plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr 1992 Mar 13; 575 (1), pp. 131-6.

Waterhouse, A.L.; Ignelzi, S.; Shirley, J.R. A comparison of methods for quantifying Oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. Am. J. Enol. Vitic. 2000, Vol. 51, N° 4.

Waterhouse, A.L.; Price, S.F.; Hemmingway, R.W. Reversed phase HPLC methods for analysis of wine polyphenols. Metho. Enzymol. 1998, 299, 113–121.

Weissenbock, G. Schnabl, H.; Scharf, H.; Sachs, C. *Planta*, 1987, 171, 88.

Williams, V.M.; Porter, L.J.; Hemmingway, R.W. Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers. Phytochemistry. 1983, 22, 569–572.

Williamson, G.; Kroon, P.A.; Faulds, C.B. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. Microbiology. 1998, 144, 2011–2023.

Wilson, E.L. High pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds. J. Sci. Food Agric., 1981, 32, 257.

Winter, M.; Hermann, K. Esters and glucosides of hidroxicinnamic acids in vegetables. J. Agric. Food Chem. 1986, 34, 616–620.

Yanase, E.; Nakatsuka, S. Synthesis of monomethyl and dimethyl derivatives of epicatechin gallate (ECg) and their photo-sensitivity. 1999, Vol. 5, N° 4.

Yokotsuda, K.; Singleton, V.L., Interactive precipitation between grape peptides from gelatin and specific grape tannin fractions in wine-like solutions. Am. J. Enol. Vitic. 1987, 38, 199–206.

Yousef GG; Seigler DS; Grusak MA; Rogers RB; Knight CT; Kraft TF; Erdman JW Jr; Lila MA. Biosynthesis and characterization of <sup>14</sup>C-enriched flavonoid fractions from plant cell suspension cultures. J Agric Food Chem, 2004; 52, pp. 1138-45.

Yu, J.; Vasanthan, T.; Temelli, F. Análisis of phenolic acids in barley by HPLC. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 4352–4358.

Zeng, L.; Zhang, R.Y.; Meng, T.; Lou, Z.C. *J. Chromatogr.* 1990, 513, 247.







### **3. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE OLIGÓMEROS DE EPICATEQUINA**

*"el vino contiene un componente que ejerce un efecto protector frente al infarto de miocardio".*

St-Leger





### 3.1 Introducción

Las funciones biológicas descritas para los polifenoles depende en gran medida de la biodisponibilidad de estos compuestos, siendo de gran importancia el conocimiento del proceso de absorción y metabolismo de los mismos. A pesar de los avances producidos en este campo en los últimos años, los conocimientos sobre la absorción de los polifenoles en humanos no son demasiado amplios, consecuencia de la dificultad que comporta llevar a cabo un experimento de este tipo.

La aparente biodisponibilidad de los flavonoides en humanos se cifra entre un 1–26%, poseyendo una amplia variabilidad interindividual, así como, entre los diferentes compuestos como es el caso de la quercetina, epicatequina e isoflavonas de la soja (Hollman, 1997; Lee, 1995; Karr, 1997). También es muy importante el papel que juega la estructura química del polifenol en el proceso de absorción, distribución, metabolismo, excreción y finalmente, las propiedades biológicas de los mismos (Scalbert, 2000; Spencer, 2001). La mayoría de los estudios existentes se han realizado con quercetina, catequina, epicatequina y procianidinas presentes en el té y el cacao (tanto con animales de experimentación como con humanos), siendo escasos los estudios realizados con las procianidinas presentes en el vino.

#### **3.1.1 Absorción de las procianidinas**

La biodisponibilidad y la disposición de los polifenoles es vital para poder explicar los efectos biológicos de éstos, ya que, para que estos compuestos puedan desarrollar una actividad biológica, deben pasar al torrente circulatorio, es decir, deben ser absorbidos. Del mismo modo, la concentración de los polifenoles en el plasma tiene que ser la suficiente para que puedan llevar a cabo estos efectos (Steinberg, 2003). Además, para mantener un determinado nivel de estos compuestos en sangre, se necesita un consumo frecuente de los mismos (Hollman, 1997). La mayoría de los polifenoles están presentes en los vegetales como ésteres de ácidos orgánicos o como glucósidos. Se considera que las formas glucosiladas no son absorbidas por el intestino, a menos que sean hidrolizadas por la microflora en el intestino grueso o en el íleo (Griffiths, 1972). Debido a que los microorganismos degradan extensivamente los polifenoles de la dieta, solamente tiene lugar una absorción limitada de los mismos. Esta afirmación ha sido cuestionada por diversos autores (Hollman, 1997; Boyle, 2000; Gee, 2000; Morand, 2000) ya que se ha detectado la absorción de formas glucosiladas intactas de quercetina a través de transportadores de glucosa del intestino delgado (Gee, 2000). Los efectos biológicos predecidos para los polifenoles *in vitro* son difícilmente extrapolables a situaciones *in vivo* si no se conoce el proceso de absorción de éstos en el tracto gastrointestinal y su metabolismo en el cuerpo. Varios autores afirman que las procianidinas son solo parcialmente absorbidas en ratas (Nakagawa, 1997; Okushio, 1999; Baba, 2000 y 2002) y en humanos (Richelle, 99; Rein, 2000; Wang, 2000).

Los diferentes estudios realizados *in vivo* tanto con ratas como con humanos indican que la biodisponibilidad de los polifenoles varía ampliamente dependiendo tanto del sistema experimental como de la estructura química del compuesto fenólico estudiado (Hollman, 1995 y 1997). La catequina parece ser absorbida en el hombre, aunque solamente un 10% del total es detectada en el suero tras practicarse una administración oral (Balant, 1979; Hackett, 1983). La mayoría de las investigaciones realizadas con humanos se centran básicamente en el estudio de la absorción de los polifenoles del chocolate, cacao y té, siendo muy limitados los estudios realizados sobre la absorción de los compuestos fenólicos presentes en el vino o en extractos de semilla de uva.

La administración de polvo de cacao a ratas permitió a Baba *et col* (2000) determinar el poder antioxidante del mismo, detectando en el plasma dos compuestos diferentes identificados como epicatequina y epicatequina metilada. La máxima concentración de los metabolitos de epicatequina en plasma se alcanzaba 1 hora después de que el animal de experimentación hubiera ingerido (+)–epicatequina pura o polvo de cacao. La biodisponibilidad de la epicatequina en ratas es dosis dependiente, ya que cuanto mayor es la concentración de epicatequina suministrada, mayor biodisponibilidad y mayor concentración plasmática de epicatequina. No obstante, la concentración de epicatequina en plasma tras la ingestión de cacao era menor que

cuando la rata ingería epicatequina pura (Baba, 2001). Del mismo modo, la administración oral a ratas de procianidina B2 permitió el estudio de su absorción, comprobando la presencia de procianidina B2, epicatequina y 3-O-metil-epicatequina en plasma y orina, alcanzando la máxima concentración en plasma (35  $\mu\text{M}$  para la epicatequina y 0.5  $\mu\text{M}$  para la procianidina B2) 60 minutos después de producirse la ingestión del compuesto (Baba, 2002).

Por otro lado, Tsuda *et al* (1999) estudiaron la absorción en ratas de cianidina-3-O- $\beta$ -D-glucósido encontrando una concentración máxima en plasma del mismo 30 minutos después de haberse producido la ingesta del compuesto. Asimismo, transcurridas cuatro horas después de la ingesta del compuesto no se detectó en plasma la aglicona del mismo, aunque si se encontró un metabolito de la cianidina-3-glucósido, como es el ácido procatecuico cuya concentración máxima se alcanzaba 1 hora después de la ingesta y era ocho veces superior a la máxima concentración de cianidina-3-glucósido encontrada.

El estudio de la absorción de las procianidinas también se ha realizado *in vitro* mediante la utilización de líneas celulares o trozos de intestino extraídos de animales de experimentación. En este sentido, Déprez *et al.* (2000) observaron que procianidinas diméricas y triméricas eran absorbidas a través de la línea intestinal humana CaCo 2, pero que oligómeros de procianidina con un grado de polimerización medio de 7 no eran absorbidos, hecho que implicaría que el proceso de absorción de las procianidinas depende en gran medida del grado de condensación de éstas. La misma línea celular fue utilizada por Rice-Evans *et al.* (2001) en el estudio de la absorción de procianidinas marcadas radiactivamente con  $^3\text{H}$ , comprobando que epicatequina, dímeros y trímeros eran absorbidos, mientras que oligómeros de grado de polimerización de hasta 7 no lo eran. Asimismo, al realizar una perfusión de un trozo de intestino de rata utilizando dímeros de epicatequina, la concentración de epicatequina en la cara serosa aumentaba considerablemente, sugiriendo que *in vivo* estos compuestos entrarían en el organismo vía vena porta (Rice-Evans, 2001). De forma similar, la perfusión de trozos de yeyuno de rata utilizando dímeros de procianidina B2 y B5 permitió encontrar epicatequina y los dímeros procianidina B2 y B5 metilados y no metilados en la cara serosa (Spencer, 2001). Carbonaro *et al.* (2001) utilizaron segmentos de intestino delgado de rata para estudiar la absorción de ácido tánico (polifenol de elevado peso molecular) y catequina (bajo peso molecular), comprobando que ambos compuestos interactuaban con el intestino, si bien, solamente la catequina era capaz de atravesarlo, siendo detectada al otro lado del saco intestinal. Además, la cantidad de catequina absorbida crecía de forma dosis dependiente cuando aumentaba la cantidad de la misma insertada en los segmentos de intestino de rata.

Baba *et al.* (2000) estudiaron la absorción en humanos de epicatequina presente en el cacao y en el chocolate comprobando que ésta se encontraba en el plasma como conjugados (sulfatada y glucuronidada) de epicatequina metilada y no metilada. El máximo nivel plasmático de epicatequina se alcanzaba dos horas después de que los voluntarios hubieran ingerido cacao o chocolate, no detectándose en plasma epicatequina sin conjugar. Análogamente, Wang *et col.* (2000) evaluaron la relación dosis-respuesta con la capacidad antioxidante en plasma humano de la epicatequina presente en el chocolate, comprobando como la mayor concentración de epicatequina observada en el plasma era de 562 nmoles/L (0.163 mg/L). Ésta se alcanzaba dos horas después de que los individuos consumieran 80 g de chocolate. La concentración media observada en plasma fue de 355 nmoles/L (0.103 mg/L), mientras que la línea base de la concentración de la epicatequina en plasma sin consumo de chocolate se cifró en 22 nmoles/L ( $6.38 \cdot 10^{-3}$  mg/L). La administración de 375 mg de cacao por kilo de peso corporal a un grupo de voluntarios permitió encontrar en plasma humano procianidina B2 (dímero), catequina y epicatequina (Holt, 2002). Para estos tres compuestos, la concentración máxima obtenida (0.041  $\mu\text{M}$  de procianidina B2, 0.16  $\mu\text{M}$  de catequina y 5.92  $\mu\text{M}$  de epicatequina) se alcanzaba dos horas después de que los voluntarios hubieran consumido cacao. Esta concentración obtenida para el dímero representaba menos del 1% de los flavonoides no metilados circulantes en plasma comparado con la concentración de epicatequina en el mismo punto (2 horas). Es importante comprobar que, aunque la relación existente en la preparación de cacao entre la epicatequina y la catequina es 1:1, el flavanol predominante en plasma es la epicatequina, con concentraciones plasmáticas de catequina de solo un 3% la concentración de epicatequina (Holt, 2002). Una observación similar fue realizada por Rein *et al.* (2000).

Van Het Hof *et al.* (1999) investigaron la absorción de catequina presente en el té en voluntarios humanos observando que tras un consumo repetitivo de este producto, los niveles plasmáticos de catequina aumentaban considerablemente. También se comprobó que la adición de leche tanto al té verde como al negro no afectaba en ninguna medida a la biodisponibilidad de la catequina presente en el té. En este mismo sentido, Amelsvoort *et col.* (2001) estudiaron la concentración plasmática de diferentes catequinas del té tras administrar una dosis oral de este producto a diversos voluntarios humanos. Los niveles de epigalocatequina aumentaban rápidamente en plasma, cifrándose el tiempo medio de eliminación de este compuesto en 1.7 horas. La epicatequinagalato no aumentaba tan rápidamente en plasma como la epigalocatequina. El tiempo medio de eliminación de la epicatequinagalato era de 6.9 horas. Otro de los compuestos presentes en el té y detectado en el plasma fue la epigalocatequinagalato cuyo aumento en plasma fue el más lento de los tres compuestos, teniendo un tiempo medio de eliminación de 3.9 horas. Los niveles máximos en plasma para estos tres compuestos se alcanzaban dos horas después de haberse producido la ingestión de té, mientras que 24 horas después de la ingestión del té, los niveles plasmáticos de epigalocatequina y de epigalocatequinagalato volvían a ser basales, aunque el nivel plasmático de epicatequinagalato era todavía elevado, observándose una interconversión de epicatequinagalato a epicatequina y de epigalocatequinagalato a epigalocatequina, hecho que sugeriría que la galoilación no es un parámetro requerido para la absorción (Amelsvoort, 2001). Los perfiles de absorción de epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC), epigalocatequinagalato (EGCg) y epicatequinagalato (ECg) fueron estudiados por Warden *et col.* (2001) durante un periodo de tiempo de 24 horas en individuos humanos a los que se les suministró té negro a intervalos durante 6 horas, observando que los mayores niveles plasmáticos se obtenían para la EGC y EC, mientras que el compuesto que menor nivel plasmático mostró fue la EGCg. La absorción, distribución y eliminación de EGCg presente en el té también fue estudiada por Ullmann *et al.* (2003), cuantificando en plasma una concentración de 5 ng/mL de plasma tanto de EGCg libre como conjugada. La absorción de EGCg era rápida, cifrándose en 1–3 horas para la EGCg libre y 1–5 horas para la EGCg total, en contraposición con los resultados obtenidos por Amelsvoort *et col.* (2001).

Por otra parte, Donovan *et col.* (1999) determinaron los niveles de catequina y sus metabolitos en plasma humano tras una consumición de vino tinto con y sin alcohol, consumiendo cada individuo entre 35 mg de catequina en 120 mL de vino, obteniendo los mayores niveles plasmáticos de catequina y sus metabolitos (50–176 nmoles/L) 1 hora después de haberse producido el consumo de vino y tras haber realizado un ayuno de 14 horas. La vida media de estos compuestos era mayor cuando se ingirió vino sin alcohol. De forma similar, Goldberg *et col.* (2003) estudiaron la absorción de tres compuestos fenólicos (resveratrol, catequina y quercetina) presentes en el vino, disueltos en diferentes matrices (un zumo comercial denominado V8, vino blanco y zumo de uva blanca), obteniendo unas concentraciones máximas en suero de 416–471 µg resveratrol/L, 38.6–141 µg catequina/L y 47.2–126.8 µg quercetina/L. La absorción de resveratrol y catequina (basada en sus concentraciones en suero) se mostró más efectiva cuando la matriz era zumo de uva que cuando era zumo V8 o vino blanco.

La concentración plasmática de la procianidina B1 resultó ser de 0.0106 µmoles/L cuando Sano *et col.* (2003) estudiaron la absorción de este dímero en un extracto rico en procianidinas extraído de la semilla de la uva al administrar a cada individuo una cápsula que contenía 2 g del extracto, compuesto por un 89% de procianidinas, incluyendo un 0.9% de procianidina B1, un 6% de monómeros y un 5% de otros compuestos.

### **3.1.2 Digestión de las procianidinas**

Gran parte de los trabajos realizados sobre la biodisponibilidad de las procianidinas se centran principalmente en el proceso de absorción y conjugación de estos compuestos. A pesar de todo, es importante conocer el proceso de digestión de las procianidinas en el estómago para saber el estado en el que llegan al intestino. Se sabe que los flavonoides de las plantas son fácilmente degradados en soluciones alcalinas (Zhu, 1997; Yoshiro, 1999). Generalmente, el plasma, los fluidos biliares y los jugos pancreáticos e intestinales son débilmente alcalinos en los mamíferos, como se refleja en la tabla 26.

	pH
Plasma humano	7.4 - 7.5
Bilis humana	7.1 - 8.5
Jugo intestinal humano	8.3
Jugo pancreático humano	7 - 8.5

Tabla 26. Rango de pHs de diferentes fluidos biológicos humanos.

Rice–Evans *et al* (2000) estudiaron la estabilidad *in vitro* de oligómeros de procianidina en jugo gástrico y en medio ácido (pH  $\approx$  2). En ambos medios los oligómeros de procianidina no eran estables, rompiéndose y generando compuestos de menor grado de condensación. A pH=2 la descomposición de los oligómeros de tres a seis unidades es tiempo dependiente con una progresiva aparición de dímeros y monómeros. Así, los tetrámeros son degradados en un 70–80% formándose principalmente dímeros y algunos monómeros tras 2.5 horas de incubación. Los trímeros eran digeridos en un 70% dando lugar a dímeros y monómeros (epicatequina principalmente). Los dímeros eran más estables que los trímeros en este ambiente ácido, degradándose lentamente (solo un 15% del total) hacia la formación de monómero, mientras que la incubación de epicatequina en este ambiente ácido no tuvo ningún efecto sobre su concentración. Análogamente, Keen *et col* (2002) examinaron la estabilidad *in vitro* de catequina, epicatequina, procianidina B2 y procianidina B5 al ponerlas en contacto con un medio que contenía jugo gástrico e intestinal, llegando a resultados concordantes con los obtenidos por Rice–Evans. En este tipo de ensayos, se excluyen las enzimas digestivas como la tripsina y la pepsina (en el jugo gástrico) debido a la facilidad con la que los flavonoides se unen a las proteínas (Yoshiro, 1999; Sazuka, 1996). Al disolver catequina y epicatequina en jugo gástrico no se aprecia ninguna variación en la concentración de estos flavan–3–oles, llegando a la conclusión de que éstos son estables a este pH ácido. Por el contrario, tanto epicatequina como catequina se muestran inestables a pHs básicos (jugo intestinal), si bien, es ésta última la que muestra menor estabilidad, siendo degradada totalmente en 8 horas. Ambos compuestos dan reacción de epimerización a pH básico (Keen, 2002; Donovan, 2002). En el caso de las procianidinas B2 y B5, ambas se muestran vulnerables siendo degradadas tanto en medio ácido como en medio básico. Al disolver estos dos compuestos en medio ácido se observa la aparición de epicatequina en el medio, así como isomerización, ya que al incubar durante 30 minutos la procianidina B2 en jugo gástrico, aparece en el medio procianidina B5 y viceversa (la procianidina B2 en jugo gástrico genera epicatequina y procianidina B5) (Keen, 2002). La incubación de procianidina B2 y B5 en jugo intestinal durante 2 horas provoca la completa degradación de estos compuestos, proporcionando unos productos de degradación que aún permanecen desconocidos. En este caso, no se detecta fenómeno de isomerización. La degradación potencial de estos dímeros, tanto en el estómago como en el intestino, explicaría la baja concentración plasmática de los mismos (Keen, 2002).

Rios *et col* (2002) suministraron bebida de cacao (que contenía 733 mg de polímeros de procianidinas y 351 mg de monómeros) a voluntarios humanos para examinar si la depolimerización de las procianidinas se produce en el estómago *in vivo*, siendo el tránsito gástrico de todos los individuos de 50–60 minutos. En este caso, la mayoría de las procianidinas ingeridas alcanzan el intestino delgado intactas estando disponibles para ser absorbidas o metabolizadas, resultados que indican la ausencia significativa de depolimerización en el estómago de las procianidinas presentes en el cacao, no apoyando la hipótesis propuesta por Rice–Evans. El hecho de que las procianidinas del cacao alcancen el intestino delgado en humanos sin experimentar cambio alguno concuerda con los resultados obtenidos por Donovan *et al* (2002) que no encontraron catequina en la orina o en plasma de ratas alimentadas con una dieta suplementada con procianidina B3 pura. Estos resultados sugieren que las procianidinas no serían depolimerizadas en monómeros en el tracto gastrointestinal de ratas. La ausencia de degradación de las procianidinas en el estómago y su limitada absorción en el intestino delgado sugiere que pueden influenciar la digestión o la fisiología del intestino mediante interacciones directas con la mucosa intestinal y solutos del lumen intestinal (Plumb, 1988). Como agentes reductores, las procianidinas pueden limitar el estrés oxidativo en la mucosa intestinal participando en la prevención de varios cánceres del tracto gastrointestinal (Santos–Buelga, 2000; Clifford, 1996; Caderni, 2000).

### 3.1.3 Metabolismo de las procianidinas: degradación

Anteriormente se ha citado que las procianidinas no son depolimerizadas en el tracto gastrointestinal de ratas ni en humanos y además, las procianidinas oligoméricas con un grado de polimerización medio de 7 no son absorbidas en el intestino, de manera que estos compuestos llegarían intactos al intestino grueso, donde podrían ser metabolizados en varios ácidos aromáticos por la microflora intestinal (Both, 1957; Das, 1969; Groenewoud & Hunt, 1986; Scheline, 1991). Los metabolitos formados son, principalmente, derivados de ácido fenilpropiónico, fenilacético, fenilvalérico y benzóico con diferentes patrones de hidroxilación (Rice-Evans, 2001). Los estudios metabólicos realizados con catequina mostraron que ésta era convertida en varios ácidos fenólicos simples y en fenilvalerolactonas cuando se suministra oralmente catequina a conejos (Schelne, 1997). Asimismo, se ha descrito la biotransformación *in vitro* de catequinas y sus galatos por parte de bacterias fecales humanas y de rata, sufriendo las catequinas una fisión del anillo heterocíclico, seguida de una *para*-dehidroxilación (Meselhy, 1997).

Déprez *et al* (2000) comprobaron que las procianidinas con un grado de polimerización medio de 6 podían ser degradadas en ácidos aromáticos de bajo peso molecular tras ser incubadas durante 48 horas con la microflora presente en el colon de humanos. Los metabolitos formados por la acción de la microflora son fácilmente absorbidos a través de la barrera colónica, pudiendo ser transformados en los tejidos por conjugación con glicina, ácido glucurónico o grupos sulfato (Quick, 1931; Rechner, 2002). Estos metabolitos poseen actividad antioxidante contribuyendo a la eliminación de radicales libres, aunque su importancia cuantitativa no se ha estudiado *in vivo* (Das & Griffiths, 1969; Savaï, 1987; Rechner, 2002).

El principal ácido aromático encontrado en ratas alimentadas con catequina, proveniente de la acción de la microflora intestinal, es el ácido 3-hidroxifenilpropiónico, y en menor medida el ácido 3-hidroxibenzóico y el ácido 3-hidroxilupúrico, encontrándose también como metabolitos de catequina ácido fenilvalérico y fenilvalerolactonas (Griffiths, 1964; Harman, 1978; Goodwin, 1994; Gonthier, 2003). Estos metabolitos fueron previamente identificados pero no cuantificados en la orina de ratas y humanos alimentados con catequina (Griffiths, 1964; Das, 1971).

Wang *et col* (2001) aislaron una bacteria intestinal humana (*Eubacterium sp strain* SDG-2) capaz de degradar (+)-catequina y (+)-epicatequina mediante la fisión del heterociclo, obteniéndose como resultado un único metabolito [(2R)-1-(3', 4'-dihidroxifenil)-3-(2'', 4'', 6''-trihidroxifenil)-propan-2-ol)], mientras que (-)-catequina y (-)-epicatequina sufrían la misma rotura del mismo anillo pero generando como productos dos compuestos diferentes [(2S)-1-(3', 4'-dihidroxifenil)-3-(2'', 4'', 6''-trihidroxifenil)-propan-2-ol) y (2S)-1-(3'-hidroxifenil)-3-(2'', 4'', 6''-trihidroxifenil)-propan-2-ol)], uno de ellos debido a una *p*-dehidroxilación del anillo B. Asimismo, esta bacteria no muestra habilidad para transformar los ácidos gálico y 3, 4-dihidroxifenilacético mediante dehidroxilación. Este hecho contrasta con trabajos anteriores en los que el ácido 3, 4-dihidroxifenilacético era convertido en derivados *m*-hidroxilados tras su administración oral a conejos (Scheline, 1960; Pérez-Silva, 1966). Atendiendo a las diferencias estructurales entre (+)-catequina, (+)-epicatequina, (-)-catequina y (-)-epicatequina (ver figura 12) solamente se diferencian en la configuración de los carbonos C2 y C3. La configuración del C2 no posee ninguna influencia significativa ya que el centro quiral no existe tras la fisión del anillo. La configuración R en el C3 parece ser esencial para la *p*-dehidroxilación de (-)-catequina y (-)-epicatequina, dando como resultado (2S)-1-(3'-hidroxifenil)-3-(2'', 4'', 6''-trihidroxifenil)-propan-2-ol). De forma similar, esta bacteria muestra habilidad para eliminar un grupo hidróxido en el anillo B de (-)-galocatequina y (-)-epigalocatequina, ambos con configuración 3R (Wang, 2001). Meselhy *et col* (1997) mostraron como la (+)-catequina y sus galatos eran transformados a través de la fisión del anillo B y posterior *p*-dehidroxilación tras ser incubados con una mezcla de bacterias intestinales humanas (Meselhy, 1997).

Del mismo modo, se han encontrado trazas de ácido 4-hidroxibenzóico, 3, 4-hidroxifenilpropiónico, 3, 4-hidroxifenilacético y ferúlico. El ácido 3, 4-hidroxifenilacético podría resultar de la  $\alpha$ -oxidación previa del compuesto. Una  $\alpha$ -oxidación similar (ruta común para los polifenoles de las plantas) se ha descrito para la tirosina (Curtius, 1976). Sin embargo, el origen del ácido ferúlico es menos claro. Gonthier *et col* (2003) identificaron los mismos metabolitos en ratas alimentadas tanto con polifenoles del vino como con catequina, mientras que Li *et al* (2000)



identificaron en orina y sangre humana de individuos que habían consumido té dos derivados de fenilvalerolactonas [(–)-5-(3', 4', 5'-trihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona y (–)-5-(3', 4'-dihidroxifenil)- $\gamma$ -valerolactona]. Los metabolitos 4-hidroxilados no son frecuentemente descritos debido a que la microflora actúa sobre los grupos hidroxilo en posición para-, realizando una  $p$ -dehidroxilación. Así, el único metabolito 4-hidroxilado de catequina identificado hasta el momento es el ácido 4-hidroxifenilpropiónico en un estudio *in vitro* con microflora del ciego de rata (Groenewoud, 1984).

La incubación de catequina con microflora del ciego de rata también lleva a la formación de trazas de ácido 3-hidroxifenilvalérico y 3, 4-hidroxifenilvalérico (Scheline, 1970), mientras que Gonthier *et col* (2003) identificaron mediante GC-MS tanto fenilvalerolactonas como ácidos fenilvaléricos, identificando por primera vez un derivado metilado de fenilvalerolactona: 3-metoxifenilvalerolactona y 4-hidroxifenilvalerolactona. El metabolismo desarrollado por la microflora intestinal sobre las procianidinas de mayor grado de condensación permite la degradación de éstas en compuestos de menor peso molecular que podrían ser absorbidos contribuyendo a la capacidad antioxidante de los tejidos internos (Santos-Buelga & Scalbert, 2000).

Los metabolitos de las procianidinas conjugadas excretadas en la bilis también alcanzan el colon, siendo deconjugadas por las hidrolasas de la microflora que pueden formar metabolitos reductores (que podrían ser absorbidos), causando la fisión del anillo de las procianidinas. Por ejemplo, los lignanos presentes en la dieta son convertidos a enterodiol y enterolactonas en el colon, experimentando circulación enterohepática en la que son absorbidos, transportados al hígado y secretados a la bilis. Los compuestos que provienen de la fisión del anillo del polifenol (como es el caso de trihidroxifenil- $\gamma$ -valerolactona) pueden ser degradados a ácido propiónico o ácido carbónico (Hollman, 1997; Li, 2000).

#### **3.1.4 Metabolismo de las procianidinas: conjugación**

Se cree que el órgano más importante en el metabolismo de las procianidinas es el hígado, donde se producen la mayoría de las biotransformaciones que pueden experimentar estos compuestos al ser metabolizados: oxidación (introducción de grupos hidroxilos), reducción (introducción de grupos carbonilos), metilación y conjugación (Das, 1971; Manach, 1995, 1996 y 1997; Scalbert, 2000). Se ha propuesto la existencia de una actividad de conjugación en la mucosa intestinal aunque se desconoce la validez de esta suposición (Rice-Evans, 2001; Galijatovic, 2000), y una participación, aunque en menor medida, de los riñones (Hollman, 1995; Manach, 1996) en el metabolismo de las procianidinas.

La capacidad de las procianidinas para ser glucuronidadas parece depender de la posición de sus grupos hidroxilo. Se conoce que si solamente existe un grupo hidroxilo en la posición 5 (que puede ser también quelada), la glucuronidación se llevará a cabo en esta posición, mientras que en caso de haber grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7, el principal lugar de glucuronidación es 7, mientras que si hay tres, el principal lugar de conjugación es la posición 3 tanto *in vivo* como *in vitro* (Boutin, 1993).

Wermeille *et al* (1983) indican que la catequina puede ser hidrolizada por las bacterias intestinales, aunque hay también evidencias más recientes que indican que ésta puede ser metabolizada en el hígado de la rata, proporcionando el glucurónido de 3'-O-metil-(+)-catequina (Okushio, 1998). Se cree que éste es el conjugado mayoritario tanto en la bilis como en la orina de ratas, aunque también se han encontrado otros conjugados (4'-O-metilepicatequina, epicatequina-5-O- $\beta$ -glucurónido y 3'-O-metilepicatequina-5-O- $\beta$ -glucurónido) en la orina de ratas alimentadas con epicatequina (Okushio, 1998). Del mismo modo, Harada *et col* (1999) detectaron (+)-catequina-5-O- $\beta$ -glucurónido en plasma de ratas dos horas después de que éstas ingirieran catequina. Kuhnle *et col* (2000) estudiaron la absorción y el metabolismo de la catequina y epicatequina a través del yeyuno de ratas encontrando que el 45% de la catequina y epicatequina eran glucuronidadas en éste, mientras que un 30% de la catequina y de la epicatequina eran O-metiladas y un 20% de ambas eran metiladas y glucuronidadas. Además, la incubación de epigalocatequina, epicatequinagalato y epigalocatequinagalato por separado con homogenado de hígado de rata permite observar que

todos estos compuestos son 4''-O-metilados. Resultados similares fueron obtenidos por Baba *et col* (2001) al suministrar epicatequina o polvo de cacao a ratas, encontrando epicatequina 3-O-metilada en el plasma, postulando que la actividad enzimática para la conjugación y metilación se encuentra en la mucosa intestinal, hígado y riñones. Rice-Evans *et al* (2001) estudiaron la biodisponibilidad de dímeros de procianidina (B2 y B5) utilizando la línea celular humana CaCo 2, encontrando formas metiladas de ambas en el lado basolateral. Resultados similares fueron obtenidos por Baba *et col* (2002) que estudiaron la absorción y excreción urinaria de procianidina B2 *in vivo* en ratas, encontrando en la orina formas metiladas de este dímero y 3-O-metilepicatequina 18 horas después de haber suministrado a los animales el compuesto puro.

Los metabolitos de las procianidinas que circulan por el plasma se presentan como conjugados derivados (Manach, 1997). En humanos, se ha determinado la presencia de cantidades substanciales de epigallocatequina, epicatequina y epigallocatequinagalato en muestras de plasma de voluntarios humanos que habían consumido té verde. La mayoría de la epicatequina y de la epigallocatequinagalato del plasma estaba en forma de sulfatos, mientras que la epigallocatequina estaba glucuronidada (Lee, 1995). Similarmente, Amelsvoort *et col* (2001) encontraron formas metiladas de epigallocatequina, pero no de epicatequinagalato ni de epigallocatequinagalato, al suministrar catequinas presentes en el té a voluntarios humanos.

No se conoce muy bien si los metabolitos de las procianidinas poseen las mismas propiedades biológicas que éstas (Booth, 1956), aunque se ha comentado que los metabolitos de la quercetina poseen las mismas propiedades antioxidantes *in vivo* que la quercetina propiamente dicha y que la elevada facilidad de la quercetina para O-metilarse y/o adquirir grupos sulfatos o glucurónidos reduce la toxicidad de ésta (Aziz, 1998).

### **3.1.5 Excreción de las procianidinas**

Las vías de excreción de las procianidinas son tres: a través de la bilis y de la orina (en el caso de aquellas procianidinas que han sido absorbidas) y las heces (para aquellas procianidinas que no han sido absorbidas) (Manach, 1996). La cantidad de metabolitos de las procianidinas presentes en la orina y/o la bilis podría utilizarse como indicativo del porcentaje de absorción de estos compuestos en el tracto gastrointestinal (Das, 1971; Hollman, 1995; Gonthier, 2003). Las procianidinas que no han sido absorbidas se excretan, sin sufrir ningún tipo de modificación, en las heces (Manach, 1996). La concentración de las procianidinas intactas (compuesto madre y sus formas tisulares conjugadas) en plasma, raramente excede de 1 µmol/L y sus rangos de recogida en la orina se estiman entre un 1–25% de la dosis ingerida (Scalbert, 2000). Se ha comprobado que en humanos que han consumido chocolate y cacao, el 80% de los metabolitos de epicatequina son excretados en un periodo de 8 horas desde que se produjo la ingestión. Además, el tiempo medio de eliminación de la catequina se ha cifrado en 2–5 horas y el de la quercetina en 24 horas. La cantidad total de metabolitos de catequina y epicatequina excretados en la orina al cabo de 24 horas se cifró en un 30 y un 50% de la dosis oral ingerida, respectivamente (Baba, 2000).

Donovan *et col* (2002) estudiaron la excreción de los metabolitos de catequina en humanos que habían consumido vino tinto. La cantidad de catequina libre encontrada en orina fue muy baja (0.3% del total), mientras que la catequina sulfatada suponía un 40% del total. El porcentaje de catequina glucuronidada y sulfatada a la vez fue del 37%, mientras que la catequina solamente glucuronidada poseía unos niveles en orina muy bajos. Las muestras más concentradas se obtenían entre las 2 y 4 horas posteriores a la ingestión de vino, conteniendo un 48% de catequina glucuronidada, un 10% de catequina sulfatada y un 16% de catequina sulfatada y glucuronidada a la vez. Además, Amelsvoort *et col* (2001) comprobaron en humanos a los que se les había suministrado té, que el 13.6% de la EGC ingerida (en parte metilada) fue excretada en la orina, no detectándose en ésta ni ECg, ni EGCg, las cuales podrían haber sido eliminadas a través de la bilis (vía hígado) o haber sido metabolizadas por la microflora intestinal presente en el intestino grueso, siendo convertidas en otros metabolitos no detectados. Análogamente, al administrar oralmente a ratas procianidina B2, la suma de las cantidades recogidas en orina de procianidina B2, epicatequina y 3-O-metilepicatequina fue el 0.48% de la dosis oral, datos que indican que la biodisponibilidad de la procianidina B2 es menor que la de la epicatequina y catequina en ratas (Baba, 2002).

Gonthier *et col* (2003) detectaron catequina intacta y 3'-O-metilcatequina en orina y plasma de ratas que habían ingerido catequina, así como metabolitos procedentes de la degradación de catequina como ácido 3, 4-dihidroxifenilpropiónico y ácido 3, 4-dihidroxifenilacético. Asimismo, cuando un grupo de ratas consumía polifenoles de vino tinto, se detectaban pocas cantidades de catequina intacta en orina (0.5 g catequina/100 g polifenoles en vino ingerido), siendo el metabolito 3'-O-metilcatequina el más abundante (1.2 g/100 g polifenoles en vino ingerido), aunque también se detectaron metabolitos como ácido vainillínico, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido p-cumárico, ácido caféico y ácido hipúrico (este último era el metabolito más abundante cuando las ratas consumían vino tinto).

Hara *et col* (1997) administraron oralmente EGCg marcada radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  a ratas, recuperando en orina un 11.9% de la radiactividad total administrada y un 78.3% en las heces 96 horas después de haberse suministrado el compuesto. Kohri *et al* (2001) detectaron un 32.1% de radiactividad en orina y un 35.2% en las heces de ratas, 72 horas después de haberles suministrado oralmente EGCg marcada radiactivamente con  $^3\text{H}$ .

Natsume *et al* (2003) administraron oralmente a ratas y a un grupo de voluntarios humanos epicatequina, comprobando que tanto en plasma como en orina existían metabolitos de epicatequina, siendo la epicatequina-3'-O-glucurónido uno de los principales. Del mismo modo, se aislaron dos formas conjugadas diferentes monoglucuronidadas para humanos y ratas. En este sentido, Li *et al* (2001) también sugirieron que la estructura química de los metabolitos de epicatequina en orina humana y de rata eran diferentes. La glucuronización de la epicatequina en rata se produce en la posición 7 del anillo A, mientras que en humanos, se produce principalmente en la posición 3' del anillo B (Natsume, 2003).

Esta tesis se centra en el estudio de la absorción *in vivo* en la rata de los oligómeros y polímeros de epicatequina sintetizados. Asimismo se estudia el comportamiento de estos compuestos en un medio ácido (que simula el proceso digestivo que tiene lugar en el estómago) y en un medio básico (que simula el proceso de digestión que tiene lugar en el intestino).



### 3.2. Estudio de la biodisponibilidad de oligómeros y polímeros de epicatequina

Los oligómeros y polímeros de epicatequina sintetizados en una solución modelo se utilizaron para estudiar la biodisponibilidad de éstos *in vivo* en ratas. No obstante, antes de realizar este estudio se analizó el comportamiento de estos compuestos al ser sometidos a unas condiciones similares a las existentes en el estómago e intestino durante el proceso digestivo.

#### 3.2.1 Digestión ácida y básica de los oligómeros de epicatequina sintetizados

El objetivo propuesto es, por un lado estudiar el comportamiento de los oligómeros de epicatequina sintetizados en un medio ácido que simulara el proceso digestivo que tiene lugar en el estómago y, por otro lado, estudiar la estabilidad de los mismos en un medio básico que simulara un proceso digestivo intestinal.

Anteriormente se ha citado que oligómeros de procianidina con un grado de polimerización comprendido entre 3 y 6 no eran estables *in vitro* en soluciones ácidas, proporcionando compuestos de menor grado de condensación (Rice–Evans, 2000; Kenn, 2002), aunque en condiciones *in vivo* se ha comprobado que estos compuestos llegan al intestino intactos (Rios, 2002; Donovan, 2002). El entorno ácido existente en el estómago está generado por las grandes cantidades de ácido clorhídrico que secretan las células parietales. La concentración de ácido clorhídrico secretado por estas células oscila en torno a 0.16 M. Las concentraciones de ácido clorhídrico utilizadas para estudiar la estabilidad en medio ácido de los oligómeros de epicatequina fueron 0.32, 0.16 y 0.08 M, simulando de esta forma un entorno ácido más fuerte, similar y más débil que el existente en el estómago durante un proceso digestivo.

La concentración de compuestos fenólicos existente en un vino tinto oscila entre los 1.5–2 g/L. Teniendo en cuenta este factor, la concentración de oligómero de epicatequina sobre la que se trabajó fue 1.5 g/L, simulando a grandes rasgos el proceso que tiene lugar en el estómago durante la digestión de un determinado vino tinto. El proceso de digestión se realizó con oligómero de epicatequina sintetizado tanto con acetaldehído en exceso como en defecto, y se prolongó durante tres horas, manteniendo la muestra a una temperatura constante de 37°C y en constante agitación. Transcurrido este intervalo de tiempo, se realizó una cromatografía en capa fina y se inyectó una alícuota en el cromatógrafo líquido para observar el perfil cromatográfico generado. La figura 84 muestra el esquema del diseño experimental para estudiar el proceso de digestión de los oligómeros de epicatequina en medio ácido.

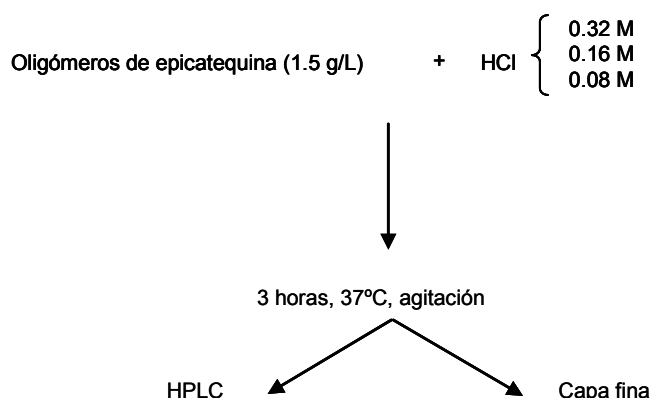


Figura 84. Esquema del diseño experimental para estudiar el proceso de digestión de los oligómeros de epicatequina sintetizados tanto con acetaldehído en exceso como en defecto.

La inyección de una alícuota de ambos oligómeros de epicatequina sin digerir en el cromatógrafo líquido permitió visualizar el perfil cromatográfico presentado en la figura 85. Puede comprobarse como el cromatograma obtenido no poseía ningún pico cromatográfico, obteniéndose una línea base similar a la que se obtiene cuando se inyecta una determinada cantidad de agua millipore para limpiar la columna. Estos resultados son debidos al elevado

grado de polimerización que poseía la muestra, ya que al filtrarla a través de un filtro de 0.45 micras la mayor parte de los oligómeros quedaban retenidos en éste.

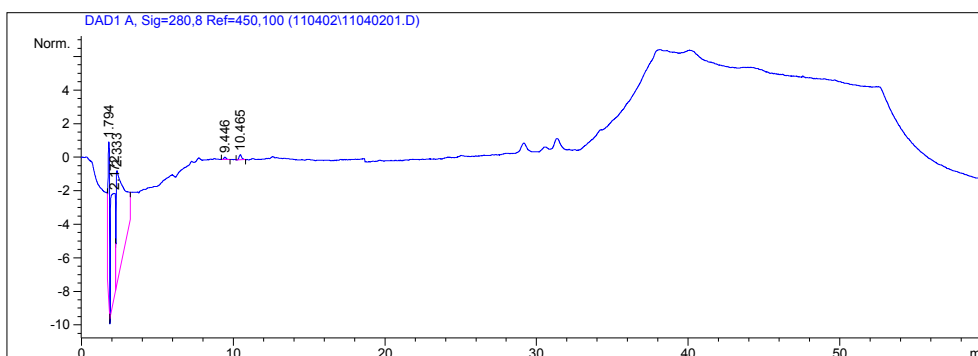


Figura 85. Cromatograma obtenido al inyectar en el cromatógrafo líquido una alícuota de oligómero de epicatequina sin digerir sintetizado con acetaldehído en defecto y en exceso.

De forma similar, al realizar una cromatografía en capa fina de ambas muestras sin digerir, se obtenía un resultado similar: la mayoría de la muestra no era desplazada por la fase móvil, quedando en el origen. Una pequeña parte de oligómeros parecía ser desplazada débilmente por la fase móvil dejando un pequeño carril rojizo junto al punto de partida de la muestra (ver figura 86). La muestra de los oligómeros de epicatequina se inyectó en el carril central, mientras que a su derecha se inyectó una alícuota de procianidina B2 patrón (dímero) y a su izquierda se inyectó una alícuota de extracto de procianidinas (compuestos de diferentes grados de condensación).

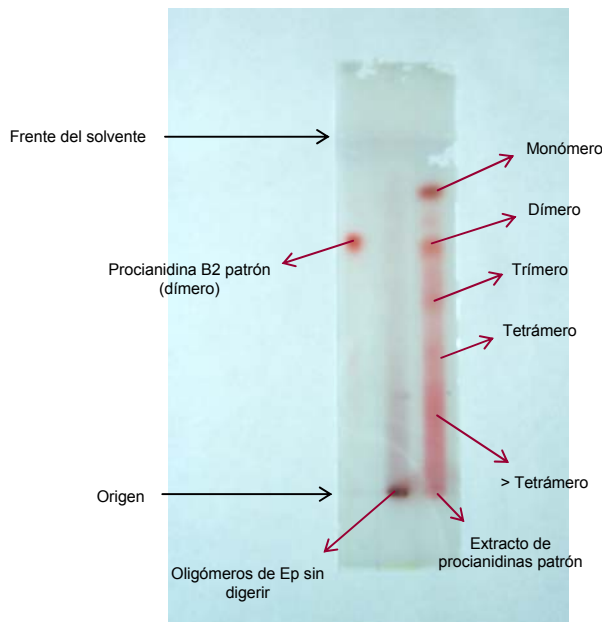


Figura 86. Cromatografía en capa fina obtenida para los oligómeros de epicatequina sin digerir.

Tras realizar la digestión ácida de ambas muestras e inyectar una alícuota en el cromatógrafo líquido se observaba una variación en el perfil cromatográfico al obtenerse un pico mayoritario cuyo tiempo de retención oscilaba entre los 29–30 minutos, como se representa en la figura 87. Este compuesto podría tratarse de epicatequina ya que al inyectar una alícuota de este compuesto en el cromatógrafo líquido se obtiene un pico cromatográfico con un tiempo de retención en torno a 30 minutos.

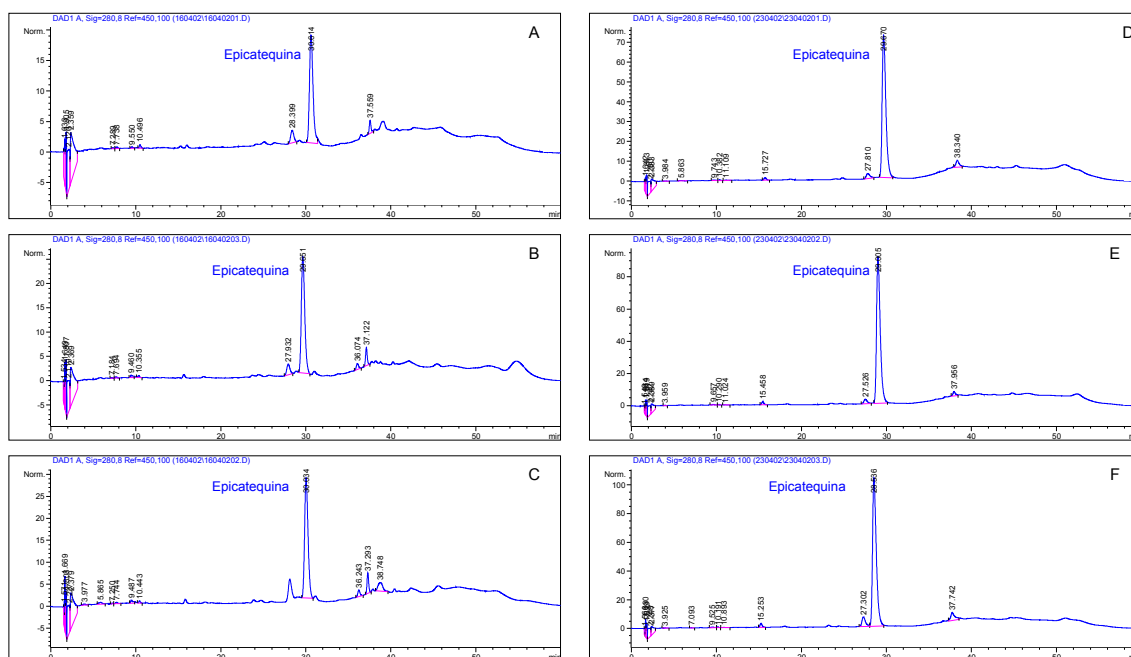


Figura 87. Cromatogramas obtenidos de la digestión de un oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en exceso digerido con HCl (A) 0.08M, (B) 0.16M, (C) 0.32M y de la digestión de un oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en defecto digerido con HCl (D) 0.08M, (E) 0.16M, (F) 0.32M.

Para comprobar si el pico cromatográfico obtenido en las digestiones realizadas con el oligómero de epicatequina era o no epicatequina, se añadió una determinada cantidad de epicatequina patrón a una de las muestras de oligómero que habían sido digeridas con ácido clorhídrico. Si al inyectar una alícuota, aparecía un solo pico cromatográfico que incrementaba su altura y área, significaba que el compuesto resultante de la digestión era epicatequina. Por el contrario, la aparición de dos picos cromatográficos con tiempos de retención diferentes, indicaría que el compuesto obtenido en las digestiones no se trataba de epicatequina. La figura 88 muestra tres cromatogramas correspondientes a (A) un patrón de epicatequina, (B) una muestra de oligómero de epicatequina digerido con ácido clorhídrico 0.08M y (C) adición de epicatequina patrón a la muestra (B) de oligómero de epicatequina digerida anteriormente con ácido clorhídrico 0.08M. Los resultados obtenidos indicaron que el tiempo de retención obtenido para la epicatequina patrón fue de 29 minutos, muy similar al tiempo de retención obtenido para el compuesto resultante de la digestión ácida del oligómero de epicatequina. El cromatograma que se obtuvo al añadir epicatequina patrón a una muestra de oligómero de epicatequina digerida anteriormente con ácido clorhídrico, solamente mostraba un pico cromatográfico con un tiempo de retención de 29 minutos, cuya área cromatográfica había aumentado casi un 48%. En consecuencia, parecía evidente que el compuesto obtenido tras realizar una digestión ácida del oligómero de epicatequina era epicatequina. Esto indicaba que en medio ácido, los oligómeros sintetizados eran degradados, liberando unidades monoméricas al medio. Estos resultados concordaban con los obtenidos por Rice–Evans *et al* (2000) en los que oligómeros de procianidina presentes en el cacao eran degradados *in vitro* en medio ácido, proporcionando al medio monómeros y dímeros.

En la figura 89 se muestran los resultados obtenidos al realizar una cromatografía en capa fina de los oligómeros de epicatequina digeridos en medio ácido. Puede comprobarse como el nivel de polimerización era aún bastante elevado, aunque se podían observar en ambos casos la aparición de una mancha correspondiente a un monómero y otra que podía corresponderse con un pentámero al compararla con el patrón de procianidinas.

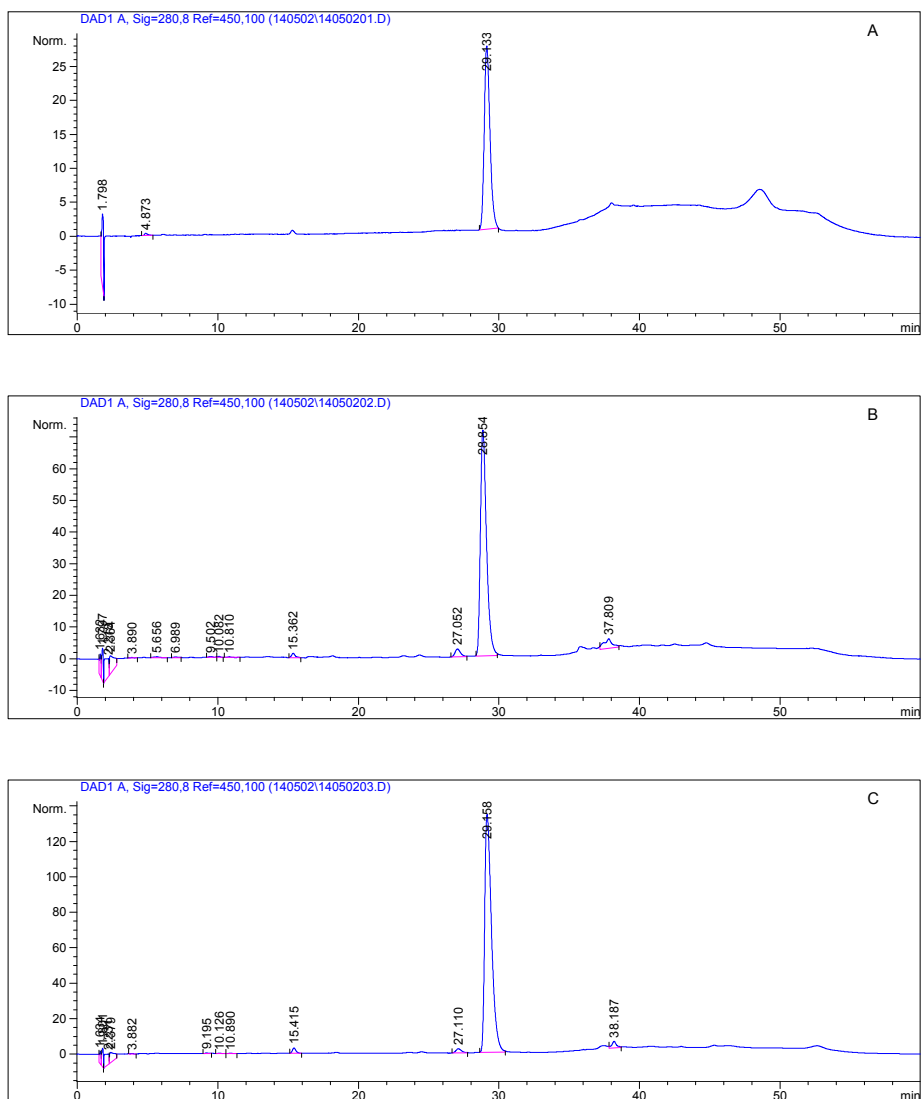


Figura 88. Cromatogramas obtenidos para una muestra de (A) epicatequina patrón (0.01875 mg/L), (B) oligómero de epicatequina digerido con HCl 0.08M y (C) oligómero de epicatequina digerido con HCl 0.08M al que se le añadieron 20  $\mu$ L de un patrón de epicatequina de concentración 1.5 g/L.

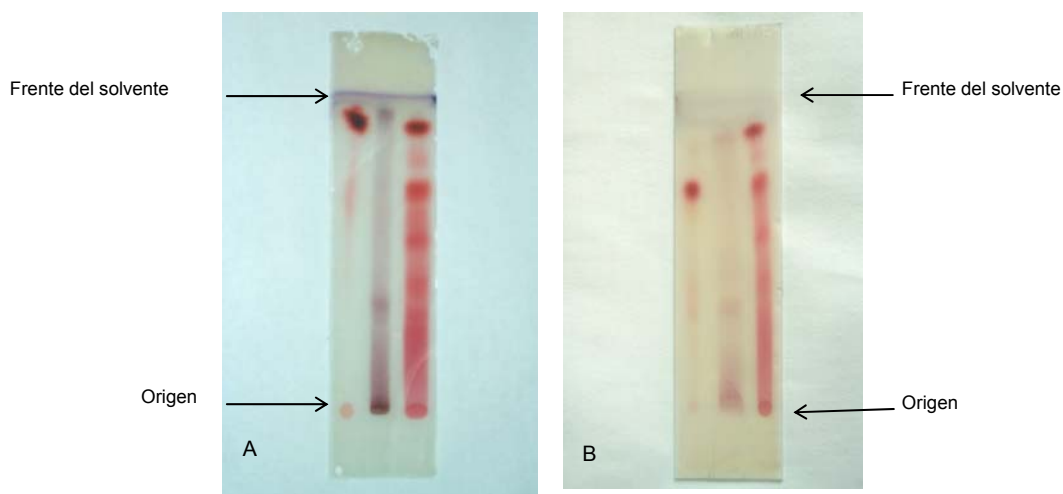


Figura 89. Cromatografía en capa fina de la digestión de dos oligómeros de epicatequina: (A) sintetizado con acetaldehído en exceso y (B) sintetizado con acetaldehído en defecto.

En ambas cromatografías se inyectaron los patrones en los carriles exteriores. En la fotografía (A), el carril de la derecha correspondía a un patrón de procianidinas, el carril central era el oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en exceso digerido en medio ácido y el carril de la izquierda correspondía a un patrón de epicatequina. En el caso de la fotografía (B), el carril de la izquierda correspondía a un patrón de procianidina B2 (dímero), el carril central era el oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en defecto digerido en medio ácido y el carril situado a la derecha correspondía a un extracto de procianidinas. La cuantificación de la epicatequina liberada al medio en las muestras de oligómeros de epicatequina digeridas en medio ácido, se muestra en la tabla 27, donde los resultados mostrados son la media de las tres réplicas realizadas para cada proceso digestivo (0.32, 0.16 y 0.08M).

Muestra	Acetaldehído en...	[HCl] (M)	Tr (minutos)	Área (mAU*s)	[epicatequina] (mg/L)	Error
Oligómero epicatequina	exceso	0.32	30,084	711,65	15,626	1,197
		0.16	29,853	621.21	13,644	0,910
		0.08	30,137	417.36	9,104	1,023
Oligómero epicatequina	defecto	0.32	30,017	3.148,56	69,061	2,133
		0.16	29,701	2.780,47	60,972	0,761
		0.08	30,202	2.251,91	49,386	1,538

Tabla 27. Cuantificación de la epicatequina liberada al medio al digerir en medio ácido los oligómeros de epicatequina sintetizados. El proceso de digestión se realizó por triplicado para cada proceso digestivo (HCl 0.32, 0.16 y 0.08 M). En la tabla se muestra el valor medio de las réplicas realizadas y el error de cada una de ellas.

Los resultados obtenidos indicaban que cuanto mayor era la concentración de ácido clorhídrico utilizado en la digestión, mayor era la cantidad de epicatequina liberada al medio. De este modo, la concentración de epicatequina que provenía de la degradación del oligómero era mayor cuando la concentración de ácido clorhídrico era 0.32M, y en consecuencia, menor si la concentración de ácido clorhídrico utilizada era 0.08M. Esta tendencia se mantenía tanto para el oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en exceso como en defecto. Además, un segundo dato de interés mostraba que el oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en defecto (y por tanto, con un grado de condensación menor), liberaba al medio una mayor cantidad de epicatequina al ser expuesto al medio ácido, indicando que, cuanto mayor era el grado de polimerización del compuesto, más estable se mostraba en medio ácido. El porcentaje de epicatequina liberada en las digestiones ácidas no sobrepasaba el 0.6% de la epicatequina total que había reaccionado con el acetaldehído en el medio de reacción (para el oligómero cuyo grado de polimerización era menor) como puede comprobarse en la tabla 28.

Muestra	[HCl] (M)	Porcentaje de Ep liberada
Oligómero de epicatequina act. en defecto	0.32	0.6
	0.16	0.52
	0.08	0.43
Oligómero de epicatequina act. en exceso	0.32	0.13
	0.16	0.109
	0.08	0.068

Tabla 28. Porcentaje de epicatequina liberada tras la realización de las digestiones de los oligómeros de epicatequina en medio ácido.

De este modo, el grado de depolimerización de la muestra en medio ácido no parecía ser lo suficientemente elevado como para fragmentar todo el oligómero en unidades menores. Si extrapolamos estos resultados obtenidos *in vitro* a un hipotético caso *in vivo*, los oligómeros de epicatequina podrían alcanzar el intestino prácticamente inalterados y ser absorbidos o metabolizados es éste. Estos resultados concordaban con los obtenidos por Rios *et al* (2002)

que comprobaron como los oligómeros de cacao que habían ingerido un grupo de voluntarios alcanzaban el intestino sin ser depolimerizados.

Paralelamente, también se estudió la estabilidad de los oligómeros de epicatequina sintetizados al ser expuestos a un medio básico, simulando de este modo, el proceso digestivo que tendría lugar en el intestino. Se utilizó una solución de hidrógeno carbonato sódico al 1.5% como reactivo análogo al jugo intestinal. El pH de la solución básica utilizada era de 8.4. La concentración de oligómeros utilizada en estas digestiones básicas fue la misma concentración (1.5 g/L) que se utilizó en las digestiones ácidas. El proceso de digestión duró también tres horas. Durante este periodo de tiempo se mantuvo la temperatura de la muestra constante a 37°C, agitándose la muestra continuamente. Finalizado el proceso de digestión, se analizó la muestra mediante cromatografía líquida, obteniéndose los cromatogramas presentados en la figura 90.

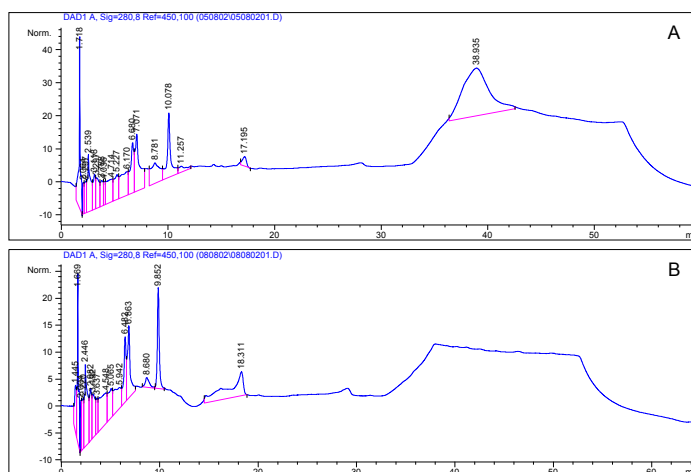


Figura 90. Cromatogramas obtenidos de la digestión en medio básico de (A) oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en exceso y (B) oligómero de epicatequina sintetizado con acetaldehído en defecto.

Los resultados obtenidos en ambos cromatogramas mostraban unos perfiles en los que no se encontraban picos cromatográficos que pudieran corresponderse con epicatequina o con estructuras diméricas de flavan-3-oles. Solamente se observaba un pequeño pico cromatográfico (cercano al límite de detección) con tiempo de retención en torno a 17–18 minutos, que podría tratarse de catequina. Estos resultados indicaban que, o bien el oligómero de epicatequina permanecía estable en este tipo de soluciones básicas, o bien era depolimerizado y los compuestos resultantes de esta depolimerización eran inestables en el medio, degradándose sin proporcionar ningún pico cromatográfico. Del mismo modo, al realizar la digestión en medio básico de un patrón de epicatequina (ver figura 91), no se obtuvo ninguna señal característica de ésta, obteniéndose un pequeño pico cromatográfico con tiempo de retención de 16 minutos, que coincidía con el tiempo de retención de la catequina patrón.

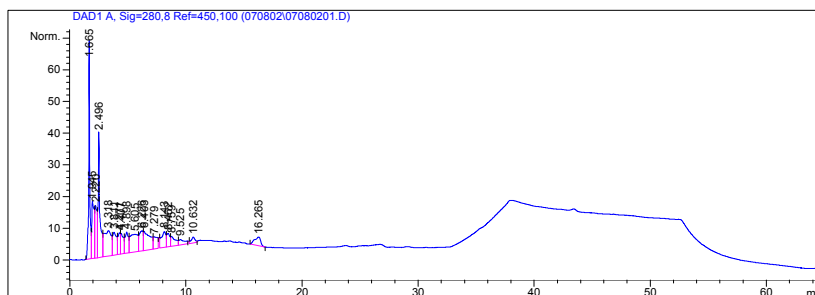


Figura 91. Cromatogramas obtenidos de la digestión en medio básico de un patrón de epicatequina.

Por tanto, la epicatequina no se mostraba estable en el medio básico en el que se llevó a cabo el experimento, estando de acuerdo con los resultados obtenidos por Zhu *et col* (2002) que describieron como la catequina, en medio básico, epimerizaba hacia epicatequina, y ésta, en el mismo medio, se descomponía y en ocasiones mostraba reacciones de epimerización hacia catequina. Este hecho permitiría explicar la aparición del pico cromatográfico anterior pudiendo tratarse de una epimerización de la epicatequina que provenía de los oligómeros sintetizados hacia catequina.

### **3.2.2 Estudio de la absorción *in vivo* en la rata de los oligómeros de epicatequina sintetizados sin marcaje radiactivo**

Los estudios realizados sobre absorción de procianidinas en ratas son numerosos, si bien la mayoría de ellos se centran en las procianidinas presentes en el cacao, chocolate y el té principalmente, siendo minoritarios los ensayos realizados con las procianidinas presentes en el vino. La simulación del proceso de envejecimiento que tiene lugar en el vino permitió (como se ha comentado anteriormente) la síntesis de oligómeros de epicatequina, cuya similitud con los oligómeros formados en el vino es elevada. Asimismo, se comprobó la estabilidad *in vitro* de estos oligómeros sintetizados en soluciones ácidas y básicas. Este apartado se centra en el estudio de la absorción *in vivo* en ratas de los oligómeros de epicatequina sintetizados con acetaldehído sin marcaje radiactivo. Estos compuestos solamente presentaban formas oligoméricas y poliméricas de epicatequina, hecho que simplificaría enormemente la obtención de información mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas, ya que las señales que se obtuvieran solamente podrían provenir de la epicatequina. Por esta razón, no se utilizó un extracto comercial de procianidinas para estudiar la absorción de estos compuestos, ya que dicho extracto comercial está formado de catequina, epicatequina, ácido gálico, dímeros y trímeros que involucran unidades de epicatequina y catequina, etc., suponiendo esto una mezcla heterogénea de compuestos que proporcionarían, al ser analizados mediante las técnicas anteriormente mencionadas, señales que provendrían de diferentes compuestos, dificultando esto la obtención de resultados concretos.

Para estudiar la absorción de los oligómeros de epicatequina se utilizaron ratas Wistar macho (Charles River Laboratories) con un peso comprendido entre los 225–250 gramos. Las ratas utilizadas en esta experiencia se ayunaron durante un periodo de tiempo de 12 horas, tras el cual, fueron canuladas oralmente con 500 µL de una solución de oligómeros y polímeros de epicatequina que contenía 50 miligramos de dichos compuestos, esperando una hora a que éste fuera absorbido por los animales. Transcurrido este tiempo, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (Sigma), con una concentración de 60 miligramos de pentobarbital por kilogramo de peso corporal animal. Posteriormente, se realizó una extracción total de la sangre del animal de la arteria aorta abdominal, así como el hígado. La obtención de plasma a partir de la sangre extraída se realizó mediante centrifugación a 1000 g durante un periodo de tiempo de 10 minutos, manteniendo la temperatura de la muestra constante a 4°C. Tanto el plasma como el hígado extraído a los animales se guardaron a –80°C hasta su utilización.

El plasma obtenido fue tratado con 1000 unidades de β–glucuronidasa (Sigma) y 100 unidades de sulfatasa (Sigma) durante un periodo de tiempo de tres horas, manteniendo la muestra a una temperatura constante de 37°C y en continua agitación. El tratamiento del plasma con estas enzimas se realizó para eliminar los grupos glucurónidos y sulfatos que los posibles compuestos que hubieran sido absorbidos pudieran presentar, como consecuencia de las reacciones de conjugación que tienen lugar, por ejemplo, en el hígado. Además, la presencia de estos grupos conjugados en las procianidinas dificultan la detección de las mismas mediante las técnicas habituales, siendo por tanto necesario la obtención de la aglicona. Finalizado el tratamiento con las enzimas deconjugadoras, se realizó la extracción de los compuestos presentes en el plasma mediante la adición de acetonitrilo, agitando la muestra durante cinco minutos para, posteriormente, añadir el volumen necesario de acetato de etilo para extraer los compuestos a esta fase orgánica. El protocolo representado en la figura 92 refleja el proceso de extracción de los compuestos presentes en el plasma mediante la utilización de acetato de etilo.

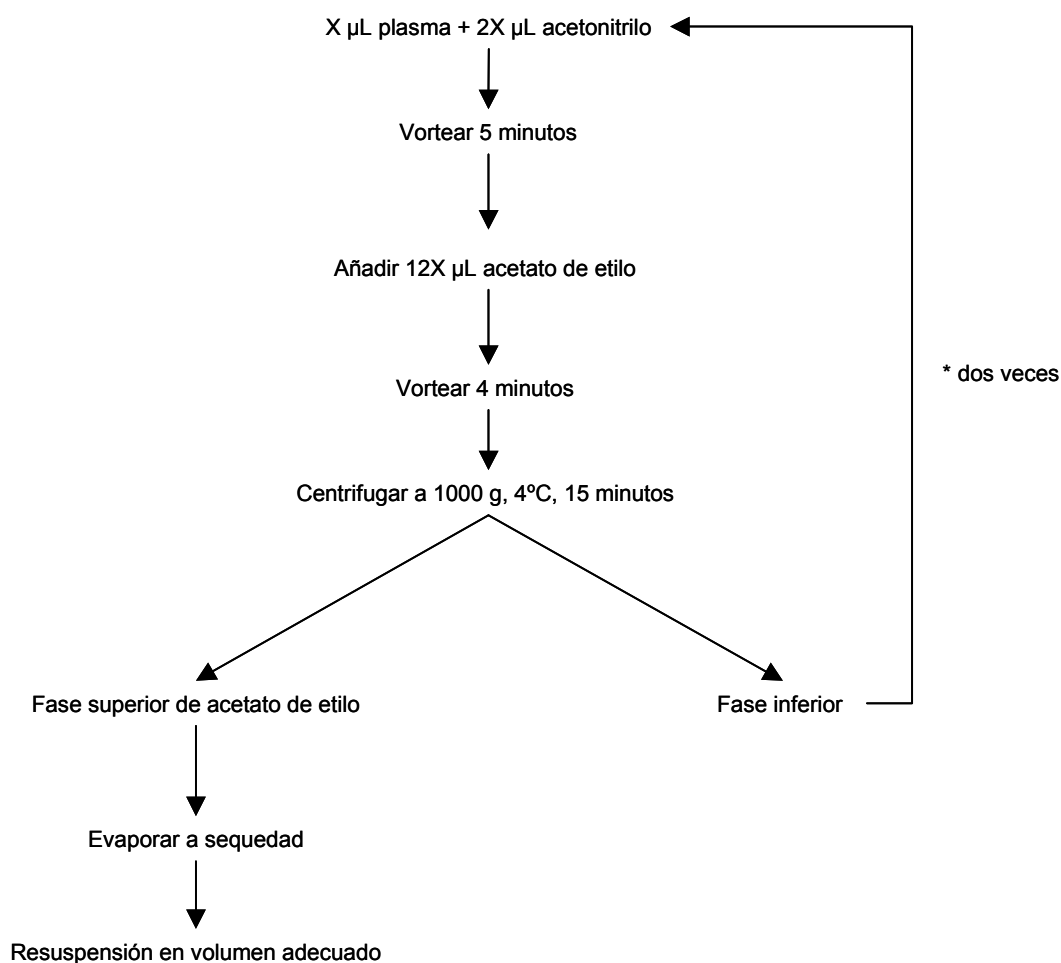


Figura 92. Protocolo utilizado en la extracción con acetato de etilo de los compuestos fenólicos presentes en el plasma de las ratas.

La fase orgánica de acetato de etilo obtenida se evaporó a sequedad mediante el paso de una corriente de nitrógeno, redisolviendo el extracto resultante en un determinado volumen de solución hidroalcohólica al 20%. Por regla general, se utilizaba todo el plasma obtenido para realizar la extracción, redisolviendo el extracto seco obtenido en el mínimo volumen posible, de manera que el contenido en los compuestos presentes en el plasma inicial se concentraran el máximo número de veces posible. Una vez redisoluelto el extracto obtenido se almacenaba a menos 80°C hasta su utilización.

La inyección de una alícuota en el cromatógrafo líquido de la sonda de oligómeros de epicatequina suministrada a las ratas (ver figura 93) permitió establecer un perfil cromatográfico donde solamente se detectaba una pequeña cantidad de epicatequina muy cercana al límite de detección, pudiéndose afirmar que la existencia de epicatequina en la sonda suministrada a los animales era prácticamente nula.

Del mismo modo, el análisis del extracto de plasma obtenido en aquellas ratas que consumieron los oligómeros de epicatequina sintetizados sin marcaje radiactivo permitió obtener el perfil cromatográfico presentado en la figura 94, mientras que, también en la misma figura, se representa el cromatograma obtenido al inyectar en el cromatógrafo líquido una alícuota de un extracto de plasma de rata a la que se le suministró agua en lugar de oligómeros de epicatequina.



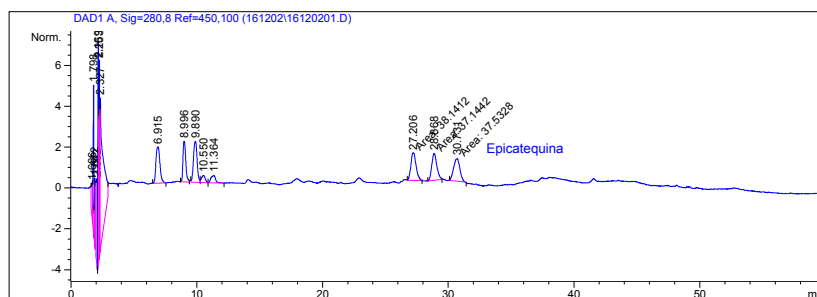


Figura 93. Cromatograma obtenido al inyectar una alícuota de la sonda de oligómeros de epicatequina sin marcaje radiactivo suministrada a las ratas.

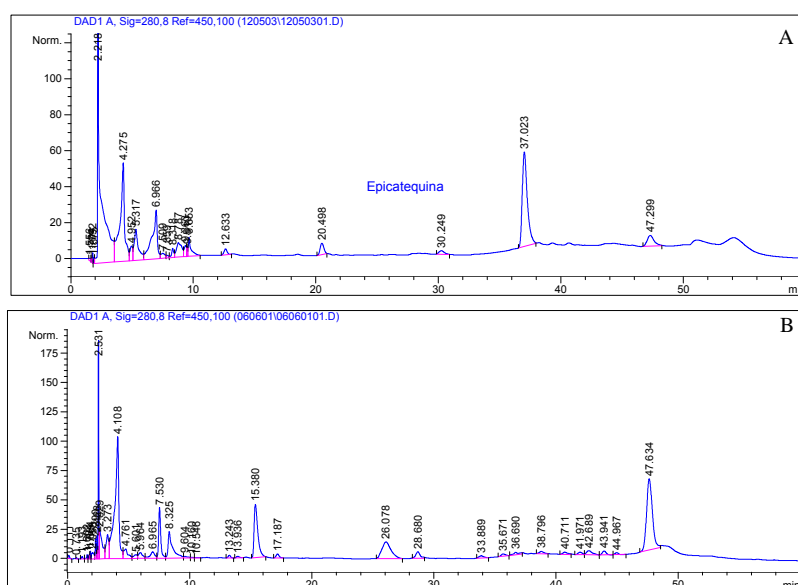


Figura 94. Cromatogramas obtenidos para (A) plasma de rata a la que se le suministró una sonda de oligómeros de epicatequina y (B) extracción de un plasma de rata control (sin haber ingerido oligómero de epicatequina).

En ambos cromatogramas se observa como el perfil cromatográfico durante los primeros 10 minutos es similar. Asimismo, en el cromatograma (A) de la figura 94 se observa un pico cromatográfico con un tiempo de retención de 38–39 minutos que no aparece en el cromatograma correspondiente a la sonda de oligómeros proporcionada a las ratas y que tampoco aparece en el cromatograma obtenido para el plasma de una rata control. Por tanto, el compuesto que generaba este pico cromatográfico no provenía de ningún compuesto que formase parte de la composición del plasma.

Para la identificación de este compuesto era necesaria la utilización de otra técnica, como la espectrometría de masas acoplada a un cromatógrafo líquido. En este sentido, se inyectó una alícuota de extracto de plasma de una de las ratas en el un cromatógrafo líquido que poseía acoplado un espectrómetro de masas, analizando todos los picos cromatográficos existentes en la muestra, si bien, el único pico cromatográfico que poseía una estructura que pertenecía a una procianidina era el pico con tiempo de retención de 38–39 minutos. El análisis de las señales obtenidas hizo necesario tener en cuenta las consideraciones realizadas con anterioridad al analizar el dímero de epicatequina (con puente de acetaldehído), pero siendo conscientes de que, si bien los grupos de conjugación como sulfatos y glucurónidos habían sido eliminados, no ocurría lo mismo con los grupos metilo y, por tanto, este compuesto encontrado en plasma podría estar metilado. Este hecho podría modificar algunas de las relaciones m/z

obtenidas y, en consecuencia, debía ser tenido en cuenta. El espectro de masas obtenido para este compuesto presente en el plasma se muestra en la figura 95.

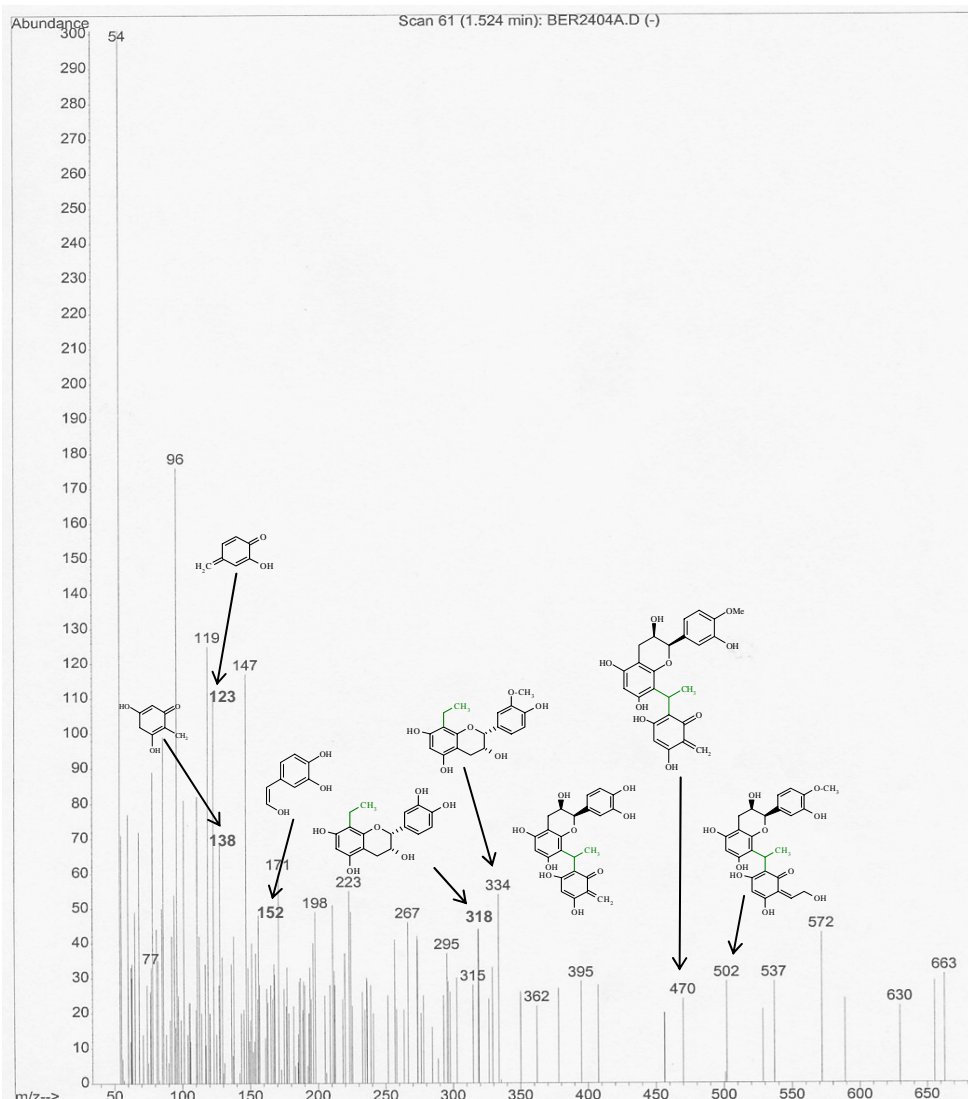


Figura 95 Resultados obtenidos al analizar el pico cromatográfico con tiempo de retención 38 minutos mediante espectrometría de masas.

El análisis de las relaciones masa/carga obtenidas reveló la existencia de dos fragmentos ( $m/z$  152 y 138) correspondientes a la fisión retro-Diels-Alder sufrida por una epicatequina, mientras que la relación  $m/z$  123 indicaba la rotura de una molécula de epicatequina mediante la apertura del anillo pirano de ésta. Del mismo modo, la señal  $m/z$  290 indicaba la existencia de una molécula de epicatequina, mientras que  $m/z$  304 señalaba que la epicatequina se encontraba metilada. Además, la existencia de una relación  $m/z$  334 era producto de la existencia de una epicatequina metilada unida a un puente de acetaldehído; la presencia de este fragmento también era confirmada por la presencia de la relación  $m/z$  318 que correspondía a una epicatequina unida a un puente de acetaldehído.

Por otro lado, la existencia de relaciones masa/carga de valores elevados indicaban la existencia de fragmentos de grado de condensación más complejo que la epicatequina. Así, la señal  $m/z$  470 se correspondía con un dímero de epicatequina metilado que había sufrido una fisión retro-Diels-Alder de una de las epicatequinas que lo formaban, hecho que quedó contrastado con la existencia de una señal  $m/z$  456 que correspondía al mismo compuesto pero sin metilar. Igualmente, este compuesto metilado también sufrió en la interfase del

espectrómetro de masas una rotura del anillo pirano de una de las epicatequinas ( $m/z$  502) y, posteriormente, la misma rotura en la otra epicatequina que formaba parte del compuesto ( $m/z$  362). Finalmente, la relación masa/carga 663 indicaba el peso molecular del compuesto, indicando que se trataba de dos epicatequinas dimetiladas enlazadas a través de un puente de acetaldehído, es decir, un dímero de epicatequina tetrametilado.

Todas las relaciones  $m/z$  excepto la 663 hacían pensar que el compuesto encontrado en plasma podría estar mono o dimetilado, sin embargo, la relación  $m/z$  correspondiente al peso molecular del compuesto indicaba que el compuesto encontrado poseía cuatro grupos metilo. Estas diferencias de apreciación entre lo que indicaban las relaciones  $m/z$  de los diferentes fragmentos encontrados al fragmentarse el compuesto inicial y la relación masa/carga que indicaba la masa molecular del compuesto podrían deberse a la debilidad del enlace establecido entre el grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) y el grupo OH de la epicatequina en la posición 3' y/o 4'. Este enlace se rompería fácilmente cuando el compuesto era fragmentado en la interfase del espectrómetro de masas, provocando la pérdida de algunos grupos metilo. La figura 96 muestra la estructura del compuesto encontrado en el plasma de rata.

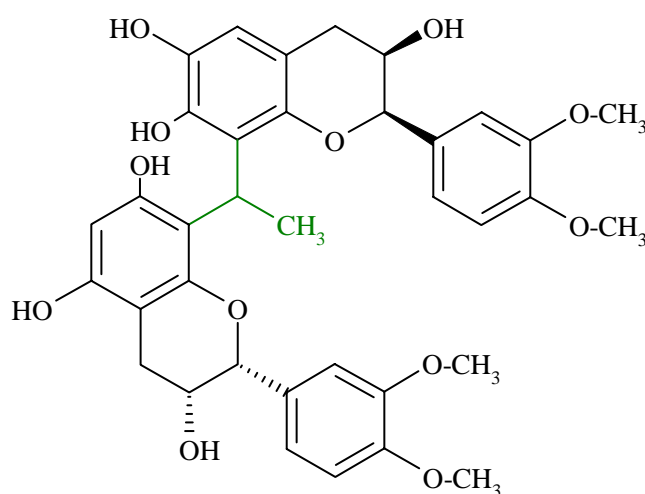


Figura 96. Estructura del compuesto encontrado en el plasma de varias ratas que habían ingerido oligómero de epicatequina sin marca radiactiva.

Conocida la estructura del compuesto hallado en el plasma de las ratas analizadas, se estudió el tiempo óptimo de absorción de los oligómeros y polímeros de epicatequina de manera que la concentración en plasma del dímero encontrado fuera máxima. Las ratas utilizadas en este nuevo objetivo se canularon oralmente utilizando la misma cantidad de oligómeros de epicatequina citada anteriormente (500  $\mu\text{L}$  de una solución de oligómeros y polímeros de epicatequina que contenía 50 miligramos de dichos compuestos). Suministrada la sonda a las ratas, se esperaron 1, 2, 3 y 4 horas para que los oligómeros de epicatequina fueran absorbidos. Este experimento se realizó por duplicado. Transcurridos estos intervalos de tiempo, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (utilizando la misma concentración citada con anterioridad) y se les extrajo toda la sangre de la arteria aorta abdominal, así como el hígado.

La obtención de plasma se realizó en las mismas condiciones comentadas anteriormente y las muestras se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que fueran utilizadas. Las muestras de plasma fueron tratadas con las mismas unidades de  $\beta$ -glucuronidasa y sulfatasa citadas anteriormente como paso previo a la realización de la extracción con acetonitrilo y acetato de etilo de los compuestos fenólicos presentes en el plasma (consultar el protocolo de la figura 92). En la figura 97 se representa el protocolo utilizado para establecer el tiempo de absorción al cual el compuesto encontrado en plasma presentaba una concentración máxima.

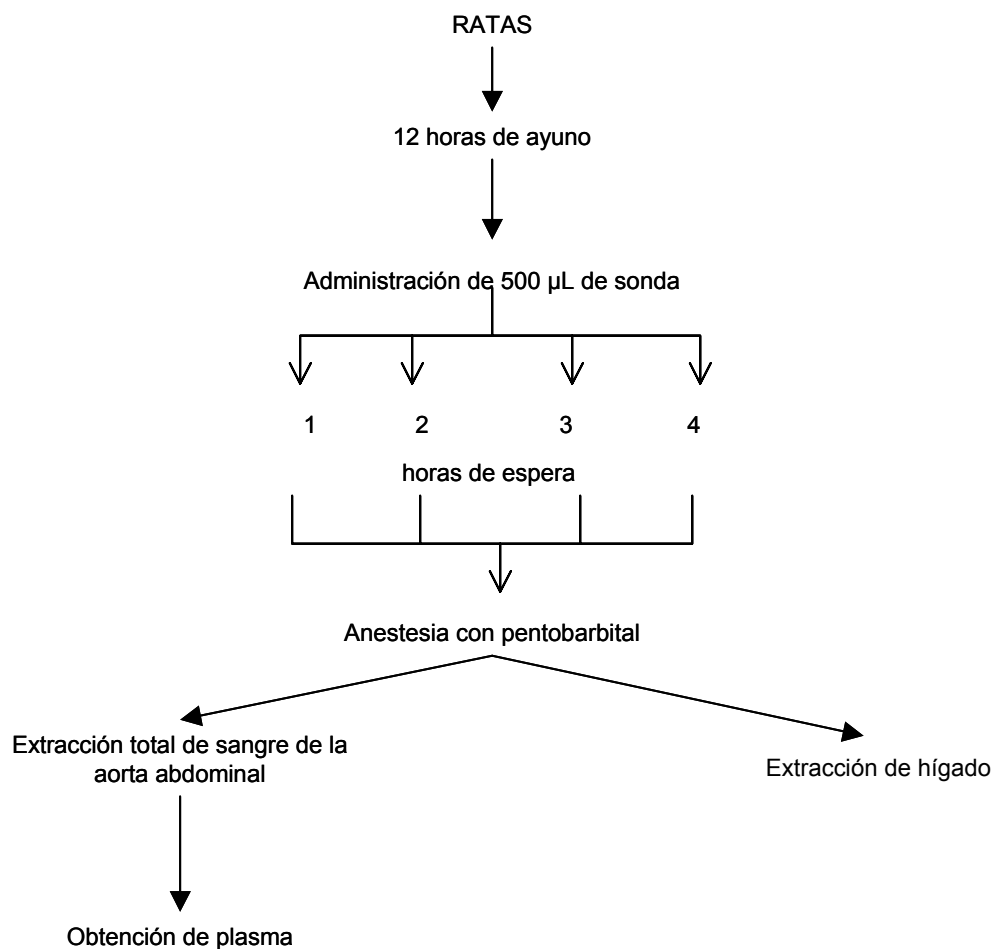


Figura 97. Protocolo utilizado en el establecimiento del tiempo óptimo de absorción de los oligómeros de epicatequina.

El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución de todos los plasmas extraídos permitió la obtención de una serie de cromatogramas (ver figura 98) que mostraban un perfil idéntico al presentado en la figura 94 (A). En todos los cromatogramas se apreciaba la aparición de un pico cromatográfico de tiempo de retención en torno a 38–39 minutos, que presentaba una mayor altura y área en aquellas muestras de plasma que habían sido recogidas dos y tres horas después de la ingestión oral, por parte de las ratas, de los oligómeros de epicatequina. Las muestras plasmáticas recogidas una y cuatro horas después de la ingestión de dichos oligómeros y polímeros de epicatequina poseían el mismo pico cromatográfico con el mismo tiempo de retención, pero con una altura y una área inferior a las muestras obtenidas a las dos y tres horas de la ingestión de la sonda. No obstante, la cuantificación en términos de equivalentes de epicatequina de estos picos cromatográficos indicaban lo que se ha apuntado anteriormente: la concentración del compuesto encontrado en el plasma de las ratas era más elevada cuando habían transcurrido 2–3 horas desde la administración de los compuestos de epicatequina a las ratas. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 29, y expresan el valor medio de todas las experiencias realizadas para cada tratamiento.

Tiempo de absorción (horas)	Área (mAU*s)	Concentración (g/L) en equivalentes de epicatequina
1	763	17,79
2	1990	37,28
3	1733	32,36
4	1398	25,95

Tabla 29. Concentración (g/L) en equivalentes de epicatequina de los dímeros encontrados en los plasmas de las diferentes ratas estudiadas tras un tiempo de absorción de 1, 2, 3 y 4 horas.

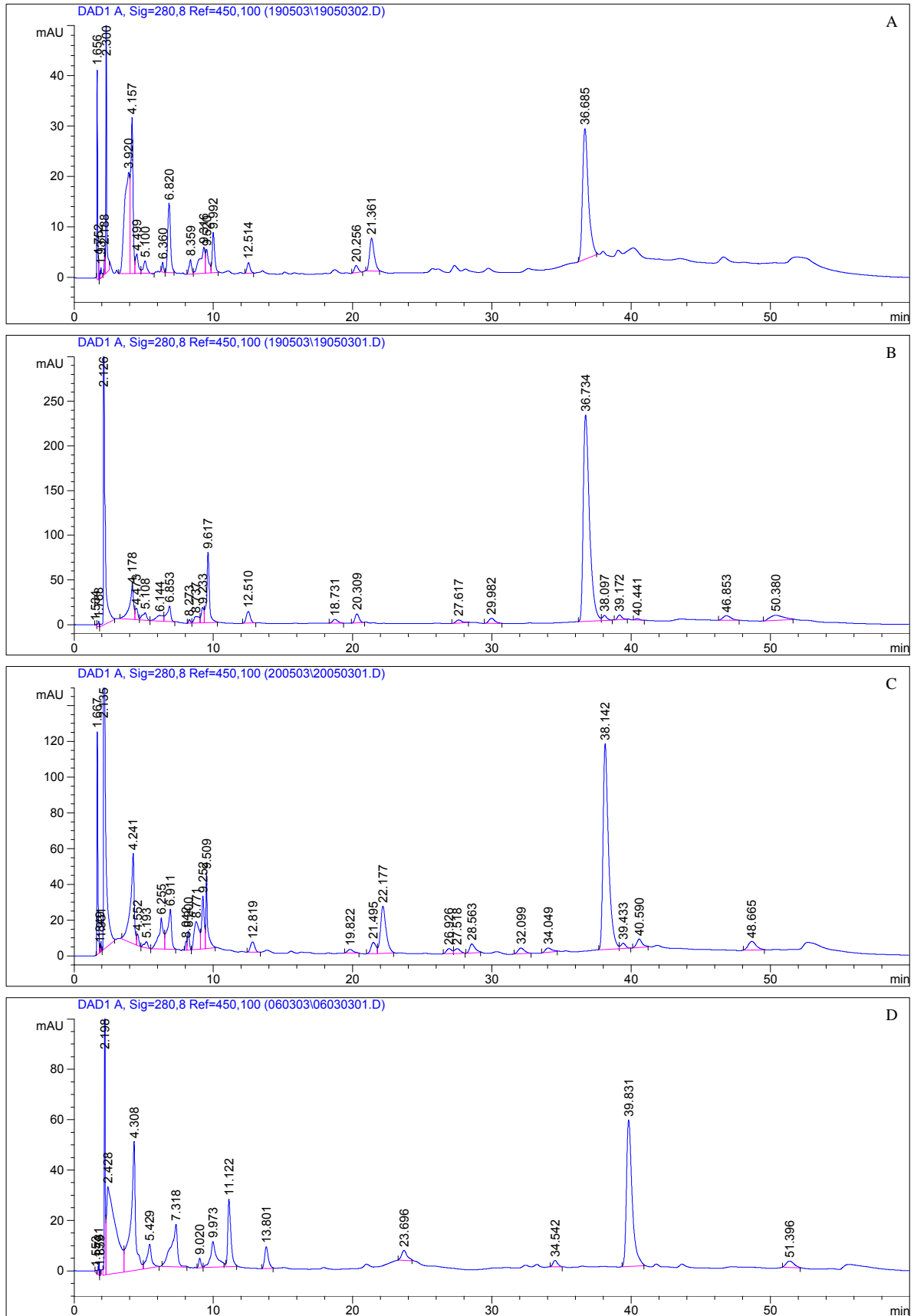


Figura 98. Cromatogramas obtenidos para (A) plasma de rata que ha ingerido oligómero de epicatequina con un tiempo de absorción de 1 hora, (B) plasma de rata que ha ingerido oligómero de epicatequina con un tiempo de absorción de 2 horas, (C) plasma de rata que ha ingerido oligómero de epicatequina con un tiempo de absorción de 3 horas y (D) plasma de rata que ha ingerido oligómero de epicatequina con un tiempo de absorción de 4 horas.

La figura 99 muestra la evolución de la concentración del dímero de epicatequina tetrametilado encontrado en el plasma de las ratas analizadas. Se observa como la mayor concentración de este compuesto se alcanza dos horas después de que los animales de experimentación ingiriesen la dosis de oligómeros de epicatequina, y como ésta va disminuyendo paulatinamente hasta las cuatro horas. Además, el aumento de la concentración en plasma de este compuesto es muy marcada entre la primera y la segunda hora, mientras que la disminución entre la segunda y tercera hora, y la tercera y cuarta hora es suave. Estos datos insinuarían que las ratas sacrificadas tres y cuatro horas después de haber ingerido los oligómeros de epicatequina habrían alcanzado la concentración máxima del dímero de epicatequina tetrametilado a las dos horas y a partir de este punto, la concentración plasmática del compuesto iría disminuyendo lentamente hasta desaparecer por completo.

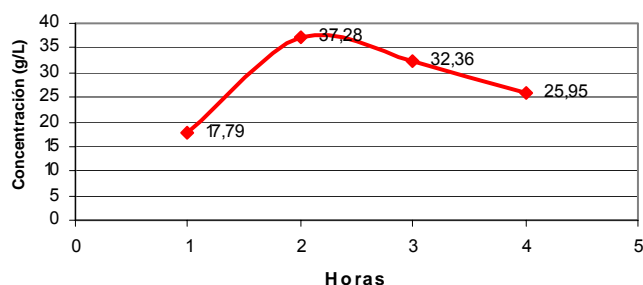


Figura 99. Evolución de la concentración plasmática del dímero de epicatequina encontrado en las ratas que habían consumido oligómeros de epicatequina.

Paralelamente, se analizaron todos los hígados que habían sido extraídos de las ratas, realizando una homogeneización de los mismos. En el proceso de homogeneización de estas muestras se utilizó 1 gramo de hígado y 4 gramos de solución salina. Durante el proceso de homogeneización del hígado, éste se mantuvo en todo momento a una temperatura no superior a 4°C; posteriormente, el homogenado obtenido se filtró a través de una gasa y se destinó la mitad de éste para realizar una extracción con acetonitrilo y acetato de etilo utilizando el mismo protocolo representado en la figura 92, y la otra mitad del homogenado de hígado obtenido se trató con enzimas deconjugadoras  $\beta$ -glucosidasas (1000 unidades) y sulfatasas (100 unidades), siguiendo el mismo protocolo que se aplicó para el plasma de rata. Finalmente, se realizó la extracción con acetonitrilo y acetato de etilo. En ambos casos, la fase orgánica de acetato de etilo obtenida se evaporó a sequedad mediante el paso de una corriente de nitrógeno. El extracto seco obtenido se disolvió en el mínimo volumen posible de una solución hidroalcohólica al 20% para concentrar el mayor número de veces la muestra.

La inyección de una alícuota de ambos extractos en el cromatógrafo líquido permitió obtener dos cromatogramas por cada hígado analizado. Cuando el homogenado de hígado no era tratado con enzimas deconjugadoras se obtenía el perfil cromatográfico presentado en la figura 100, comprobándose como solamente aparece un pico cromatográfico con un tiempo de retención de 40.092 minutos y un área de 619.6 mAu\*s. Sin embargo, cuando el homogenado de hígado era tratado con enzimas deconjugadoras, el perfil cromatográfico obtenido (ver figura 98) era diferente, ya que no aparecía el pico cromatográfico de tiempo de retención 40.092 minutos, sino que aparecía un pico cromatográfico con un tiempo de retención de 38.073 minutos y un área de 506.3 mAu\*s. Este tiempo de retención era el mismo que se encontró en los plasmas analizados. Por tanto, el compuesto encontrado en plasma (dímero de epicatequina), también estaba presente en el hígado de las ratas. La utilización de una recta de calibrado permitió la cuantificación de este compuesto en equivalentes de epicatequina. La concentración obtenida para el dímero de epicatequina en hígado fue de 44  $\mu$ g de dímero/g de hígado. El hecho de encontrar un dímero de procianidinas en el hígado, a una concentración significativa, confirma que éste es un órgano diana de las procianidinas, sugiriendo que los efectos desarrollados por estos compuestos y que nuestro grupo ha determinado *in vivo*, sobre cambios metabólicos y a

nivel de expresión génica hepática pueden ser consecuencia de una interacción directa de las procianidinas con proteínas reguladoras y/o señalizadoras en el hígado, hecho que condicionaría los cambios observados.

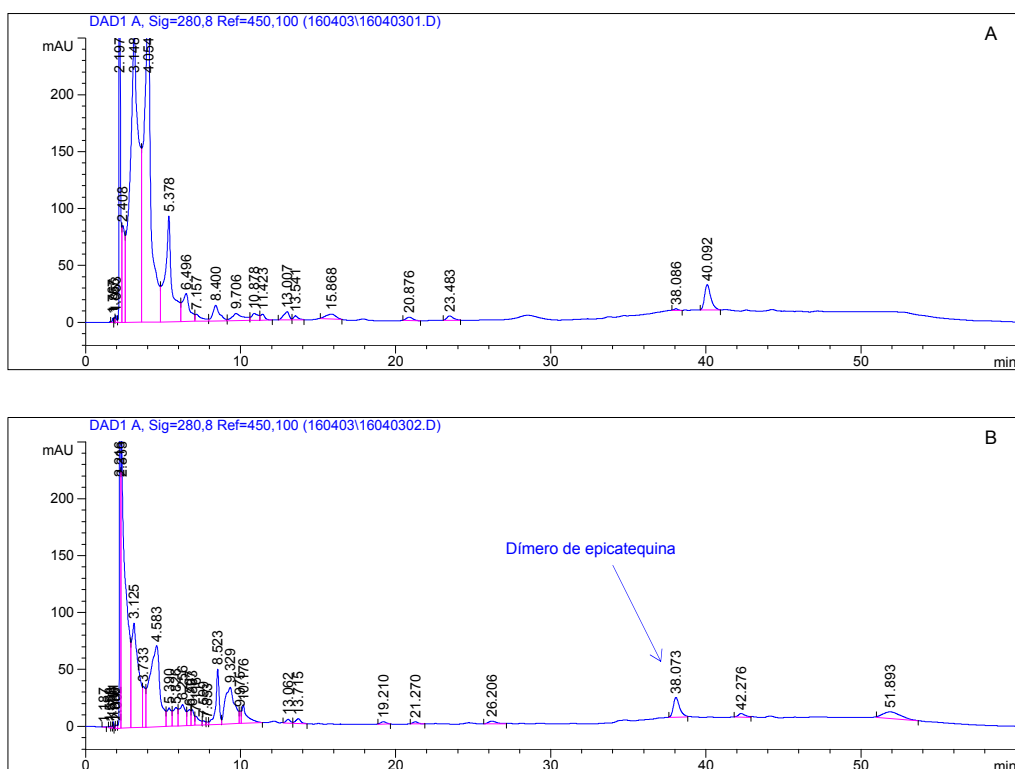


Figura 100. Cromatogramas obtenidos para (A) homogenado de hígado de rata sin tratamiento con enzimas deconjugadoras y (B) homogenado de hígado de rata con tratamiento con enzimas deconjugadoras.

### 3.2.3 Estudio de la absorción *in vivo* en la rata de los oligómeros radiactivos de epicatequina

Caracterizado el compuesto extraído del plasma e hígado de rata y determinado el tiempo de absorción necesario para que la concentración plasmática de éste fuera máxima, se estudió la absorción *in vivo* de los oligómeros de epicatequina marcados radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  a través de puentes de acetaldehído. Anteriormente se ha comentado que la cantidad total de oligómero radiactivo de epicatequina sintetizada fue de 0.0966 gramos, con una radiactividad total de 4.4  $\mu\text{Ci}$  (medidas en un contador beta). El estudio de la absorción de estos compuestos oligoméricos se realizó de la misma manera que se explicó en el apartado anterior (se suministró a las ratas 1.14  $\mu\text{Ci}$ ), aunque es este caso el periodo de tiempo existente entre la administración oral de los compuestos a las ratas y el sacrificio de las mismas fue de 2 horas. Igualmente, el plasma obtenido también se trató con  $\beta$ -glucuronidasa (1000 unidades) y sulfatasa (100 unidades) para eliminar los posibles grupos conjugados (glucurónidos y sulfatos) que pudiera poseer el compuesto absorbido.

Tras realizar la extracción de los compuestos presentes en el plasma con acetonitrilo y acetato de etilo, se inyectó una alícuota en el cromatógrafo líquido obteniéndose el cromatograma presentado en la figura 101. El perfil cromatográfico obtenido era idéntico a los obtenidos cuando se estudió la absorción de los oligómeros de epicatequina sin marcaje radiactivo, comprobando la existencia de un pico cromatográfico de tiempo de retención 38.143 minutos.



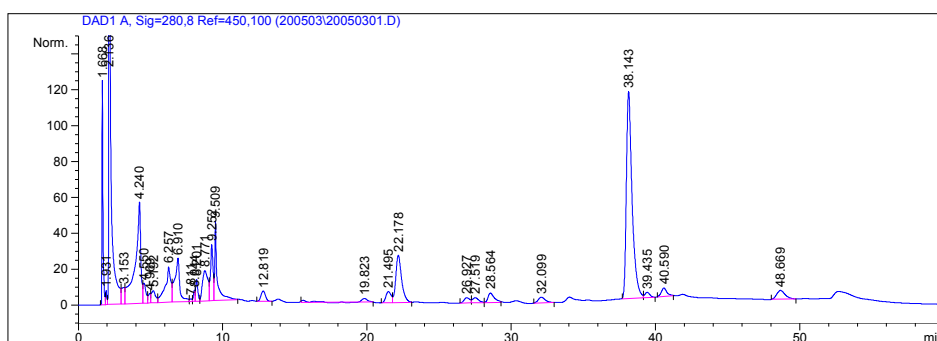


Figura 101. Cromatograma obtenido al inyectar en el cromatógrafo líquido una alícuota de un extracto de plasma de rata que había ingerido oligómero de epicatequina radiactivo.

La inyección de una alícuota del extracto de plasma obtenido en el cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas permitió de nuevo el análisis de todos los picos cromatográficos existentes en el cromatograma, aunque solamente el pico con tiempo de retención de 38 minutos poseía naturaleza fenólica. Los espectros de masas obtenidos en el análisis de este pico cromatográfico se presentan en la figura 102. La presencia de una señal de relación masa/carga 289 indicaba la existencia de una unidad de epicatequina que al fraccionarse en la interfase del espectrómetro de masas proporcionaba una serie de fragmentos cuyas relaciones  $m/z$  eran 123, 169 (indicando la rotura del anillo pirano de la epicatequina) y 151 (debido a la fisión retro-Diels-Alder de la epicatequina). Además, la relación masa/carga 334 era generada por una epicatequina metilada unida a un puente de acetaldehído, mientras que la relación  $m/z$  304 era consecuencia de la presencia de una epicatequina metilada.

Por otra parte, las relaciones  $m/z$  superiores a 400 indicaban la presencia de estructuras de mayor grado de condensación que una epicatequina. En este sentido, la relación  $m/z$  455 correspondía a un fragmento de dos epicatequinas unidas mediante un puente de acetaldehído en el que una de las subunidades de epicatequina había sufrido una rotura retro-Diels-Alder en su estructura, mientras que la señal  $m/z$  470 se correspondía con el mismo fragmento pero indicando que la epicatequina estaba metilada. De forma similar, la relación masa/carga 502 indicaba la presencia de dos epicatequinas (una de ellas metilada) unidas mediante un puente de acetaldehído, donde una de las subunidades de epicatequina había sufrido la rotura del anillo pirano. Consecuentemente, estas señales parecían indicar que el compuesto hallado en el plasma de ratas que consumieron oligómeros de epicatequina marcados radiactivamente era una estructura dimérica.

Asimismo, las relaciones masa/carga 435 y 477 provienen de la aplicación del patrón de rotura estudiado por Sun & Miller (2003) para la procianidina B2 a un dímero de epicatequina con puente de acetaldehído. Además, la señal  $m/z$  435 indica que la subunidad de epicatequina que no había sufrido rotura, había perdido el grupo OH en posición C3. Del mismo modo, las señales  $m/z$  450, 465 y 496 provienen de la aplicación del mismo patrón de rotura citado anteriormente, pero indicando que estos fragmentos poseían una metilación ( $m/z$  450) o dos metilaciones (como es el caso de las señales  $m/z$  465 y 496) en las posiciones 3' y 4' del anillo B de una subunidad epicatequina.

Finalmente, la relación masa/carga 636 correspondía al peso molecular del compuesto, indicando que se trataba de una estructura dimérica de epicatequina (dos epicatequinas unidas mediante acetaldehído) con dos metilaciones en las posiciones indicadas anteriormente. En consecuencia, la estructura de este compuesto podría ser una de las representadas en la figura 103, ya que si bien se podía conocer el número de metilaciones que poseía el compuesto, no se podía conocer, con las técnicas utilizadas, las posiciones exactas en las que el compuesto había sido metilado. Estos resultados concordaban con los obtenidos anteriormente en el estudio de la absorción de los oligómeros de epicatequina sin marca radiactiva.



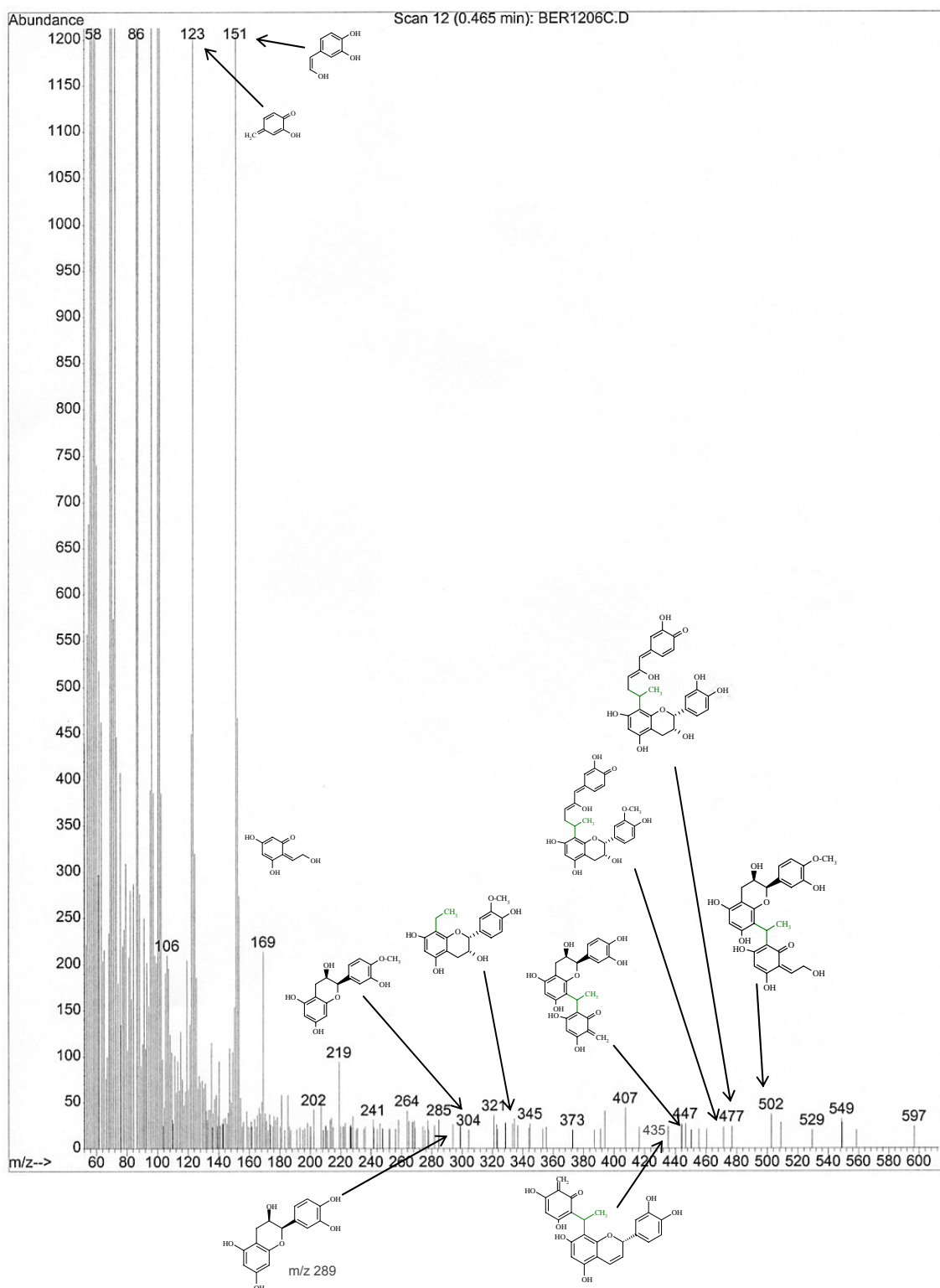


Figura 102. Relaciones masa/carga obtenidas al inyectar en el cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas una alícuota de un extracto de plasma de rata que había ingerido oligómero de epicatequina radiactivo. El espectro de masas muestra las relaciones masa/carga obtenidas hasta m/z 600.

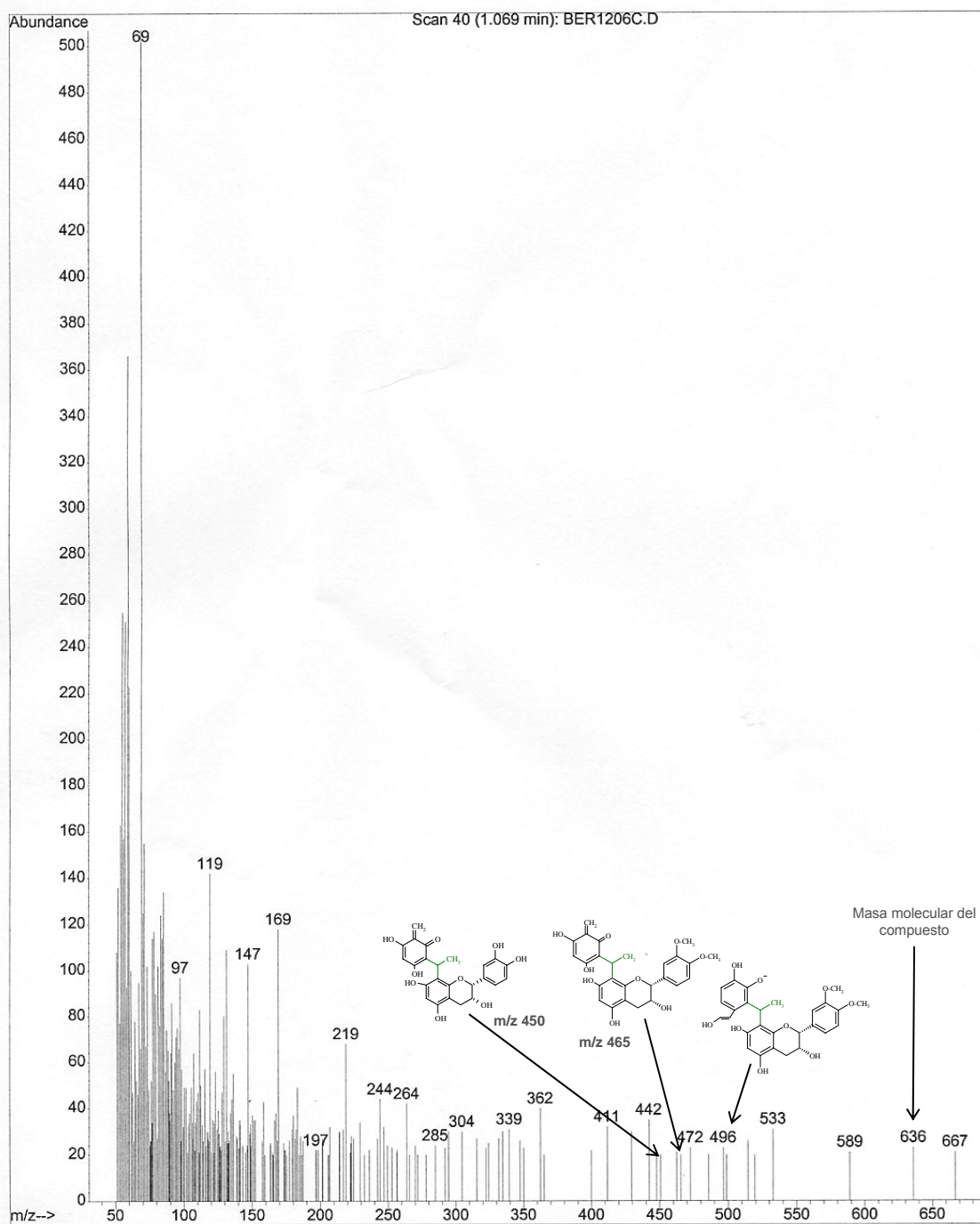


Figura 102 (continuación). Relaciones masa/carga obtenidas al inyectar en el cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas una alícuota de un extracto de plasma de rata que había ingerido oligómero de epicatequina radiactivo. El espectro de masas muestra las relaciones masa/carga obtenidas m/z hasta 650.

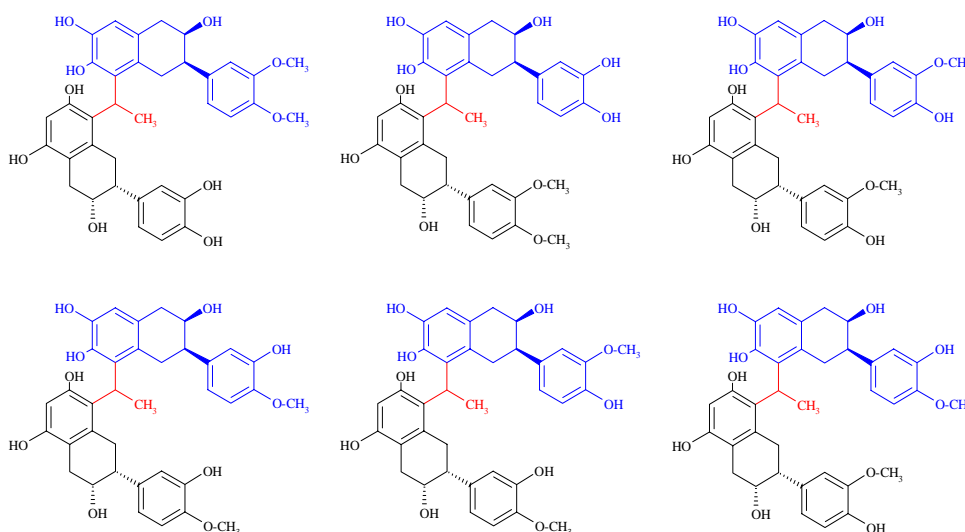


Figura 103. Relación de las posibles estructuras (al no conocer exactamente las posiciones metiladas) del dímero de epicatequina encontrado en el plasma de ratas que ingirieron oligómeros de epicatequina radiactivos.

Por otra parte, se inyectó una alícuota de un extracto de plasma de una rata que había consumido oligómeros radiactivos de epicatequina en un cromatógrafo líquido con detector de radiactividad de la Unidad de Recursos Científicos de la Universitat de Barcelona obteniéndose el cromatograma presentado en la figura 104.

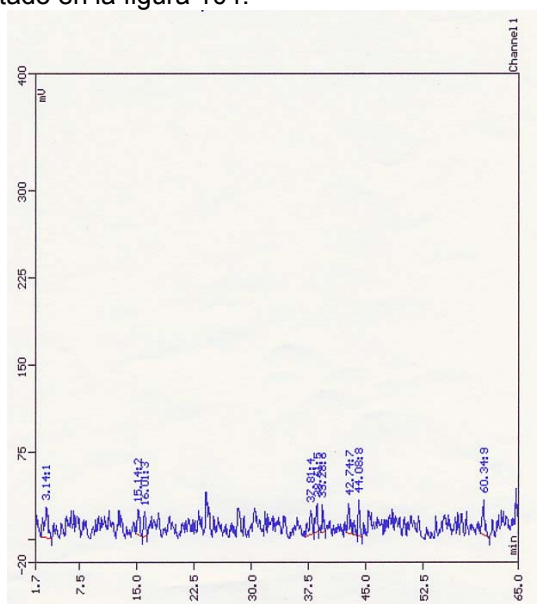


Figura 104. Cromatograma obtenido al inyectar en un cromatógrafo líquido con detector de radiactividad una alícuota de un extracto de plasma de una rata que ingirió oligómeros radiactivos de epicatequina.

En este caso, se obtenía un cromatograma con una línea base bien definida y algunos posibles picos cromatográficos que se encontraban muy cercanos al límite de detección, puesto que se confundían con la línea base. Parecía, entonces, que este cromatograma se caracterizaba por la ausencia de picos cromatográficos que indicasen la presencia en la muestra de algún compuesto radiactivo. Los tiempos de retención de estos posibles compuestos radiactivos eran 1.44, 13.44, 14.31, 36.11, 37.58, 41.04, 42.38 y 58.64 minutos. Debe tenerse en cuenta que el cromatógrafo líquido con detector de radiactividad no disponía de inyector automático y por tanto, la muestra debía ser inyectada manualmente al mismo tiempo que debía ejecutarse el programa cromatográfico para que los posibles compuestos presentes en la

muestra pudieran ser detectados. Esto generaba un desfase de tiempo en el cromatograma (en este caso era de 1.7 minutos). No obstante, no existía ninguna relación clara entre los picos cromatográficos obtenidos en el cromatograma de la figura 104 y los picos cromatográficos obtenidos en mediante la utilización de un detector UV/visible, ya que los tiempos de retención no coincidían en ambos cromatogramas. Este hecho indicaba que, si bien la utilización de acetaldehído radiactivo era un método fácil de marcaje de las moléculas de epicatequina mediante una reacción de polimerización, no era un método válido para el estudio de la absorción de estos compuestos ya que no presentaban marca radiactiva cuando eran extraídos de la matriz biológica (en este caso, plasma de rata), debido a que, como se ha comentado anteriormente en el capítulo 2, los oligómeros y los polímeros sintetizados no poseen todos los puentes de acetaldehído marcados con  $^{14}\text{C}$ , como consecuencia de la competencia existente en el medio de reacción entre el acetaldehído frío y el acetaldehído marcado con  $^{14}\text{C}$  (competencia favorecida hacia el primero). De esta manera, un tetrámero de epicatequina podría poseer los tres puentes de acetaldehído marcado con  $^{14}\text{C}$ , podría tener solamente dos puentes marcados o incluso ninguno. Esta falta de homogeneidad en el marcaje radiactivo de estos compuestos hace que sea complicado encontrar en plasma una concentración de compuestos que posean el número necesario de puentes de acetaldehído marcados con  $^{14}\text{C}$  como para que puedan ser detectados en un cromatógrafo líquido con detector de radiactividad.

El presente estudio se da por finalizado en este punto, aunque, debido a su importancia e interés, sería conveniente que tuviera continuación en el futuro. De este modo, una propuesta de trabajo podría ser la síntesis de moléculas monoméricas de epicatequina o catequina marcadas radiactivamente. Así, podría estudiarse la absorción de compuestos de bajo grado de condensación por un lado, y por otro, utilizando el proceso de polimerización antes analizado, podría estudiarse el proceso de absorción de los oligómeros de estos compuestos. En este caso, como todas las moléculas de catequina o epicatequina estarían marcadas radiactivamente, serían detectables mediante la utilización de un cromatógrafo líquido con detector de radiactividad. Esta podría ser una futura vía de continuación de este trabajo.

### 3.3. Bibliografía

- Abu–Amsa, RC.; Croft, KD.; Beilin, LJ.; Puddey, IB. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability. Am J Clin Nutr 2000; 71: 61–71.
- Ale–Agha, N.; Stahl, W.; Sies, H. (–)–epicatechin effects in rat liver epithelial cells: stimulation of gap junctional communication and counteraction of its loss due to the tumor promoter 12–O–tetradecanoylphorbol–13–acetate. Biochem Pharmacol 2002; 63: 2145–2149.
- Arteel, GE.; Sies, H. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenols oligomers. FEBS Lett 1999; 462: 167–170.
- Arts, ICW.; Hollman, PCH.; Kromhout, D.; Chocolate as a source of tea flavonoids. Lancet, 1999, 354, 488.
- Arunachalam, M.; Mohan, N.; Sugadev, R.; Chellapan, P.; Mahadevan, A. Degradation of (+)–catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127. Biochem Biophys Acta 2003; 1621: 261–265.
- Auger, C.; Caporiccio, B.; Landrault, N.; Teissedre, PL.; Laurent, C.; Cros, G.; Besançon, P.; Rouanet, JM. Red Wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). J Nutr 2002; 132: 1207–1213.
- Aura, MA.; O’Leary, KA.; Williamson, G.; Ojala, M.; Bailey, M.; Puup–ponen–Pimia, R.; Nuutila, AM.; Aksman–Caldentey, KM.; Poutanen, K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal microflora *in vitro*. J Agric Food Chem 2002; 50: 1725–1730.
- Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Muto, Y.; Takizawa, T.; Terao, J. *In vivo* comparison of the bioavailability of (+)–catechin, (–)–epicatechin and their mixture in orally administered rats. Am Soc Nutri Sci, 2001; 2885–2891.
- Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Muto, Y.; Takizawa, T.; Terao, J. Absorption and urinary excretion of (–)–epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (–)–epicatechin in rats. J Agric Food Chem 2001; 49: 6050–6056.
- Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Terao, J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 in rats. Free Radical Biology & Medicine, 2002; 33: 142–148.
- Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Yasuda, A.; Takizawa, T.; Nakamura, T.; Terao, J. Cocoa powder enhances the level of antioxidative activity in rat plasma. British Journal of Nutrition. 2000; 84: 673–680.
- Baba, S.; Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Takizawa, T.; Nakamura, T.; Terao, J. Bioavailability of (–)–epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. Free Radic Res. 2000; 33: 635–641.
- Bae, YS.; Foo, LY.; Karshesy, JJ.; GPC of natural procyanidin oligomers and polymers. Holzforshung 1994; 48: 4–10.
- Bate–smith, EC. Astringency in foods. Food Process Pack 1954; 23: 124–135.
- Bate–smith, EC. Haemanalysis of tannins. Phitochemistry, 1973; 12: 907–912.
- Bell, J. R. C.; Donovan, J. L.; Wong, R.; Waterhouse, A. L.; German, J. B.; Walzem, R. L.; Kasim–Karakas, S. E. (+)–catechin in Human Plasma after Ingestion of a single serving of reconstituted Red Wine. Am. J. Clin. Nutr. (2000), 71: 103–108.

Boersma, MG.; van der Woude, H.; Bogaards, J.; Boeren, S.; Vervoort, J.; Cnubben, NH.; van Ierssen, ICMH. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl-transferases. Chem Res Toxicol 2002; 15: 662–670.

Booth, AN.; Emerson, OH.; Jones, FT.; DeEds, F. Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. J Biol Chem 1957; 229: 51–59.

Boyle, SP.; Dobson, VL.; Duthie, SJ.; Kyle, JAM.; Collins, AR. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. Eur J Nutr 2000; 39: 213–223.

Brouillard, R. in: The flavonoids (Harborne, JB., Ed.), pp. 525–538, Chapman and Hall, London.

Butter, NL. Dawson, JM.; Wakelin, D.; Buttery, PJ. Effect of dietary condensed tannins on gastrointestinal nematodes. Journal of Agric Sci 2001, 137: 461–469.

Carbonaro, M.; Grant, G.; Pusztai, A. Evaluation of polyphenol Bioavailability in rat small intestine. Eur J Nutr 2001; 40: 84–89.

Chen, L.; Lee, MJ.; Li, H.; Yang, C. Absorption, distribution and elimination of tea polyphenols in rats. Drugs, Metabolism and Disposition. 1997; 1045–1050.

Cheyrier, V. Tannins in grape and grape products. J Agric Food Chem 2000; 100–104.

Czochanska, Z.; Foo; Newman, RH.; Porter, LJ.; Thomas, WA.; Johnes, WT. Direct proof of homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. J Chem Soc., Chem Commun 1979; 375–377.

Da Silva, E.; Piskula, M.; Terao, J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (–)-epicatechin. Free Rad Biol Med 1998, vol. 24, N° 7/8, 1209–1216.

Da Silva, RJM.; Rigaud, J.; Cheyrier, V.; Cheminat, A.; Moutounet, M. Procyanidins dimmers and trimers from grape seeds. Phytochemistry 1991; 30: 1259.

Das, NP.; Griffiths, LA. Studies on flavonoid metabolism. Metabolism of (+)-(U-<sup>14</sup>C)catechin in the rat and guinea pig. Biochem J. 1969; 115: 831–836.

Das, NP.; Sothy, SP. Studies on flavonoid metabolism. Biliary and urinary excretion of metabolites of (+)-(U-<sup>14</sup>C)catechin. Biochem J. 1971; 125: 417–423.

Das, NP.; Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. Biochem Pharmacol. 1971; 20: 3435–3445.

Das, NP.; Studies on flavonoid metabolism. Degradation of (+)-catechin by rat intestinal contents. Biochem Biophys Acta. 1969; 20: 51–59.

Day, A.; DuPont, MS.; Ridley, S.; Rhodes, MJC.; Morgan, MRA.; Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. FEBS Lett. 1998, 436: 71–75.

De Freitas, V.; Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. J Agric Food Chem 2001; 49: 940–945.

Del Bas JM, Fernandez-Larrea J, Blay M, Ardevol A, Salvado MJ, Arola L, Blade C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. FASEB J. On line, 2005.

Deprez, S.; Brezillon, C.; Rabot, S. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. J. Nutr. 2000; 130:2733–8.



Deprez, S.; Mila, I.; Huneau, JF.; Tomé, D.; Scalbert, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 957-967.

Donovan, J. L.; Bell, J. R.; Kasim-Karakas, S.; German, J. B.; Walzaem, R. L.; Hansen, R. J.; Waterhouse, A. L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J. Nutr.* (1999), 129: 1662-1668.

Donovan, JL.; Bell, JR.; Kasim-Karakas, SE.; German, JB.; Waterhouse, AL.; Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. *British J Nutr* 2002; 87: 31-37.

Donovan, JL.; Luthria, DL., Stremple, P., Waterhouse, AL. Analisis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3' and 4'-O-methylated analogs. A comparision of sensitive methods. *J Cromatogr B* 1999; 726: 277-283.

Donovan, JL.; Manach, C.; Rios, L.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3. *Br J Nutr* 2002; 87: 299-306.

Dulloo, AG.; Duret, C.; Rohrer, D., Girardier, L.; Mensi, N.; Fathi, M. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 1040-1045.

Dulloo, AG.; Seydoux, J.; Girardier, L.; Chantre, P.; Vandermander, J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 252-258.

Galijatovic, A.; Walle, UK.; Walle, T. Induction of UDP-glucuronosyl-transferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharm Res* 2000; 17: 21-26.

Gee, J. M.; Dupont, M. S.; Day, AJ.; Plumb, GW.; Williamson, G.; Johnson, IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 2000; 130: 2765-2771.

Glories, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges, Ph D Thesis, University Vistor Segalen, Burdeos, Francia, 1978.

Goldberg, DM.; Yan, J.; Soleas, GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy volunteers. *Clin Biochem* 2003; 36: 79-87.

Gonthier, MP.; Cheynier, V.; Donovan, JL.; Manach, C.; Morand, C.; Mila, I.; Lapiere, C.; Rémésy, C.; Scalbert, A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J Nutr* 2003; 133: 461-467.

Goodwin, BL.; Ruthven, CRJ.; Sandler, M. Gut microflora and the origin of some urinary aromatic phenolic compounds. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 2294-2297.

Gott, DM.; Griffiths, LA. Effects of antibiotic treatments on the metabolism and excretion of [U-14C](+)-catechin and its metabolite, 3'-O-methyl-(+)-catechin. *Xenobiotica*, 1972; 17: 423-434.

Griffiths, L. A.; Smith, G. E. Metabolism of Apinegin and related compounds in the Rat. Metabolite formation *in vivo* by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* (1972), 128: 901-911.

Griffiths, LA. Mammalian metabolism of flavonoid. In: *The flavonoids, Advances in research* (Harborne, JB.; Marbry, TJ.; Eds), p. 681-718. Chapman and Hall, New York, London.

Griffiths, LA. Studies on flavonoid metabolism. Identification of the metabolites of (+)-catechin in the rat urine. *Biochem J* 1964; 92: 173–179.

Griffiths, LA.; Barrow, A. The fate of orally and parenterally administered flavonoids in the mammal. *Angiologica*, 1972; 9: 162–174.

Groenewoud, G.; Hundt, HKL. The microbial metabolism of (+)-catechin to two novel diarylpropan-2-ol metabolites *in vitro*. *Xenobiotica*, 1984; 14: 711–717.

Groenewoud, G.; Hundt, HKL. The microbial metabolism of condensed (+)-catechins by rat-caecal microflora. *Xenobiotica*, 1986; 16: 99–107.

Hackett, A. M.; Griffiths, L. A.; Broillet, A.; Wermeille, M. The metabolism and excretion of (+)-[14C]cyanidol-3 in man following oral administration. *Xenobiotica*. (1983), 13: 279-286.

Hackett, AM.; The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In *Plant flavonoids in Biology and Medicine* (Cody, V.; Middleton, E.; Harborne, J., Eds.) pp. 177–194, A.R. Liss, New York.

Hara, Y. Influence of tea catechins on the digestive tract. *J Cell Biochem Suppl* 1997; 27: 52–58.

Harada, M.; Kan, Y.; Naoki, H.; Fukui, Y.; Kageyama, N.; Nakai, M.; Miki, W., Kiso, Y. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999; 63 (6), 973–977.

Harman, MF.; Blanquet, P. The fate of total flavanolic oligomers (OFT) extracted from *Vitis vinifera* L. in the rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1978; 3: 15–30.

Haslam, E. Polyphenol-protein interactions. *Biochem J* 1974; 139: 285–288.

Hollman, P. C. H.; de Vries, J. H. M.; van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J. B.; Katan, M. B. Absorption of dietary Quercetin glycosides and Quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* (1995), 62: 1276-1282.

Hollman, PCH.; de Vries, JHM.; Katan, MB. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS lett*; 1997; 418: 152–156.

Hollman, PCH.; Katan, MB. Summary of the 2<sup>nd</sup> International Conference on Food Factors (IcoFF), Kyoto, Japan, pp. 43.

Hollman, PCH.; Tijburg, LBM.; Yang, CS. Bioavailability of flavonoids from tea. *Critical Reviews in Food Science*. 1997; 37: 719–738.

Holt, R.; Lazarus, S.; Cameron, M.; Zhu, Q.; Schramm, D.; Hammerstone, J.; Fraga, C.; Schmitz, H.; Keen, C.L. Procyanidin dimer B2 [epicatequin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 76: 798–804.

Izumi, T.; Piskula, M.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 2000; 130: 1695–1699.

Jiménez-Ramsey, LM.; Rogler, JC.; Housley, TL.; Butler, LG.; Elkin, RG. Absorption and distribution of <sup>14</sup>C-labeled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *J Agric Food Chem*. 1994; 42: 963–967.

Juskiewicz, J.; Wroblewska, M.; Zhaki, K.; Zdunczyk, Z.; Hussein, L. Biological activity of faba beans proanthocyanidins. *Acta Alimentaria*, 2001; 30: 63–69.



Juskiewicz, J.; Zdunczyk, Z.; Wroblewska, M.; Oszmianski, J.; Hernández, T. The response of rats to feeding with diets containing grapefruit flavonoid extract. Food Research International 2002, 35: 201–205.

Karim, M.; McKormick, K.; Kappagoda, CT.; Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. J Nutr. 2000; 130: 2105S–2108S.

Karr, SC.; Lampe, JW.; Hutchins, AM.; Slavin, JM. Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy protein consumption. Am J Clin Nutr 1997; 66: 46–51.

Keen, CL.; Holt, RR.; Polagruto, JA.; Wang, JF.; Schmitz, HH. Cocoa flavanols and cardiovascular disease. Phytochem Rev 2002; 1: 231–240.

Kim, DH.; Jung, EA.; Sohng, IS.; Han, JA.; Kim, TH.; Han, MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. Arch Pharm Res 1998; 21: 17–23.

Kobayashi, Y.; Suzuki, M.; Satsu, H.; Arai, S.; Hara, Y.; Suzuki, K.; Miyamoto, Y.; Shimizu, M. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. J Agric Food Chem. 2000, 48, 5618–5623.

Koga, T.; Moro, K.; Nakamori, K.; Yamakoshi, J.; Hosoyama, H.; Kataoka, S.; Ariga, T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. J Agric Food Chem 1999; 47: 1892–1897.

Kohri, T.; Matsumoto, N.; Yamahawa, M.; Suzuki, M.; Nanjo, F.; Hara, Y. Metabolic fate of (–)-[4-<sup>3</sup>H]epigallocatechin gallate in rats after oral administration. J Agric Food Chem 2001; 49: 4102–4112.

Kuhnle, G.; Spencer, JPE.; Chowrimootoo, G.; Schroeter, H.; Debnam, E.; Srai, S.; Rice–Evans, C.; Hahn, U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. Biochem Biophys Research Commun 2000, 272: 212–217.

Kuhnle, G.; Spencer, JPE.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Debnam, E.; Srai, S.; Rice–Evans, C.; Hahn, U. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. Biochem Biophys Research Commun 2000; 277: 507–512.

Labarbe, B.; Cheyrier, V.; Brossaud, F.; Souquet, JM.; Moutounet, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerisation. J Agric Food Chem 1999; 47: 2719–2723.

Laparra, J.; Michaud, J.; Masquelier, J. Etude pharmacocinetique des oligomeres flavanoliques. Plant Med Phytother 1977; 11: 133–142.

Lea, A.G.H.; Arnold, GM. The phenolics of ciders, bitterness and astringency. J Sci Food Agric 1978; 29: 478–483.

Lee, MJ.; Wang, ZY.; Li, H.; Chen, L.; Sum, Y.; Gobbo, S.; Balentine, DA.; Yang, CS. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4: 393–399.

Li, C.; Lee, MJ.; Sheng, S.; Meng, X.; Prahbu, S.; Winnik, B.; Huang, B.; Chung, JY.; Yang, S.; Ho, CT.; Yang, CS. Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. Chem Res Toxicol 2000; 13: 177–184.

Li, C.; Meng, X.; Winnik, B.; Lee, M.; Lu, H.; Sheng, S.; Buckley, B.; Yang, CS. Analysis of urinary metabolites of tea catechins by liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. Chem Res Toxicol 2001; 14: 702–707.

Lotito, SB.; Actis-Goretti, L.; Renart, ML.; Caligiuri, M.; Rein, D.; Schmitz, HH.; Steinberg, FM.; Keen, CL.; Fraga, CG. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 945–951.

Manach, C.; Texier, O.; Morand, C.; Crespy, C.; Régéat, F.; Demigné, C.; Rémésy, C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 1259–1266.

Mathews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Herve du Penhoat, CLM.; Rolando, C.; Donnelly, DMX. Method for the estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *J Agric Food Chem*, 1997; 45: 1195–1201.

Matsumoto, H.; Yamane, T.; Inagake, M.; Nakatani, H.; Iwata, Y.; Nishimura, H.; Nishino, H.; Nakagawa, K.; Miyazawa, T. Inhibition of mucosa lipid hyperoxidation by green tea extract in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colonic carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1996; 104: 205–209.

Morand, C.; Manach, C.; Crespy, V.; Rémésy, C. Respective Bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors* 2000; 12: 169–174.

Munday, JS.; Thompson, KG.; James, KA.; Manktelow, BW. The effect of moderate alcohol consumption as either red or white wine in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Coron Artery Dis* 1999; 10:97–102.

Nakagawa, K.; Miyazawa, T. Absorption and distribution of tea catechin, (–)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 1997; 43: 679–684.

Nardini, M.; Natella, F.; Gentili, V.; Di Felice, M.; Scaccini, C. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an *in vivo* study. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 157–160.

Natsume, M.; Osakabe, N.; Oyama, M.; Sasaki, M.; Baba, S.; Nakamura, Y.; Osawa, T.; Terao, J. Structures of (–)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (–)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Rad Biol Med* 2003; 34: 840–849.

Okushio, K.; Suzuki, M.; Matsumoto, M.; Nanjo, F.; Hara, Y. Methylation of tea catechins by rat liver homogenates. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63: 430–432.

Okushio, K.; Suzuki, M.; Matsumoto, N.; Nanjo, F.; Hara, Y. Identification of (–)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat. *Am Soc Pharm Exp Therap* 1999; 27: 309–316.

Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, JC. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 5331–5337.

Peng, Z.; Hayasaka, Y.; Iland, PG.; Sefton, M.; Hoj, P.; Waters, EJ. Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins (tannins) from grape seeds by reverse phase HPLC. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 26–31.

Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A.; García-Viguera, C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic acids, anthocyanins and vitamin C. *J Agric Food Chem* 2002, 50 (8): 2308–2312.

Pietta, P.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Brusamolino, A.; Morazzoni, P.; Bombardelli, E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem Biol Mol* 1998; 46: 895–903.

Pinent M; Blay M; Bladé MC; Salvadó MJ; Arola L; Ardévol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 2004; 145 (11), 4985-90.

- Piskula, MK.; Terao, J. Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998, 128: 1172–1178.
- Raneva, V.; Shimasaki, H.; Ishima, Y.; Ueta, N.; Niki, E. Antioxidative activity of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid and caffeic acid in rat plasma. *Lipids* 2001; 36: 1111–1116.
- Rechner, AR.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, GP.; Moore, KP.; Rice–Evans, CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. 2002; 33: 220–235.
- Rein, D.; Lotito, S.; Holt, RR.; Keen, CL.; Schmitz, HH.; Fraga, CG. Epicatechin in human plasma: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr.* 2000; 130: 2109S–2114S.
- Rein, D.; Paglieroni, T.; Wung, T.; Pearson, DA.; Schmitz, HH.; Goselin, R.; Keen, CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 72: 30–35.
- Renaud, S; De Lorgeril, M. Wine, Alcohol, platelets and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *The Lancet* (1992), 339; 1523-1526.
- Richelle, M.; Tavazzi, I.; Enslin, M.; Offord, E.A. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr.* 1999, 53, 22–26.
- Rigaud, J.; Escribano–Bailón, M.T.; Prieur, C.; Souquet, J.M.; Cheynier, V. Normal phase HPLC separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *J. Chromatography A*, 1993, 654, 255–260.
- Rimm, EB.; Klatsky, A.; Brobbee, D., Stampfer, MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine or spirits. *BMJ* 1999; 312: 731–736.
- Rozman, KK.; Klaasen, CD. Absorption, distribution and excretion of toxicans. In Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons, pp. 91–112 [KK Klaasen editor]. New York, NY: McGraw–Hill.
- Rumpler, W.; Seale, J.; Clevidence, B.; Judd, J.; Wiley, E.; Yamamoto, S.; Komatsu, T.; Sawaki, T.; Ishikura, Y.; Hosoda, K. Oolong tea increases metabolic rate and fat oxidation in men. *Am Soc Nutri Sci* 2001, 2848–2852.
- Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T.; Kataoka, S.; Yamaji, N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 1460–1454.
- Sano, A.; Yamakoshi, J.; Tobe, K.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67: 1140–1143.
- Santos–Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidin and tannin–like compounds–nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1094–1117.
- Sarni–Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 42–47.
- Saucier, C.; Mirabel, M.; Daviaud, F.; Longieras, A.; Glories, Y. Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 5732–5735.
- Sawai, Y.; Kohsaka, K.; Nishiyama, Y.; Ando, K. Serum concentrations of rutinoid metabolites after oral administration of a rutinoid formulation to humans. *Arzneimittelforschung* 1987; 37: 729–732.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols J Nutr 2000; 130: 2273S–2285S.

Scheline, RR. CRC handbook of mammalian metabolism of plant compounds. CRC Press, Boca Ratón, FL.

Scheline, RR. The metabolism of (+)-catechin to hydroxyphenylvaleric acids by the intestinal microflora. Biochem Biophys Acta 1970; 222: 228–230.

Solanky, KS.; Bailey, NJC.; Holmes, E.; Lindon, JC.; Davis, AL.; Mulder, TPJ.; van Duynhoven, JPM.; Nicholson, JK. NMR-based metabonomic studies on the biochemical effects of epicatechin in the rat. J Agric Food Chem 2003; 51: 4139–4145.

Soleas, GJ.; Grass, L.; Josephy, PD.; Goldberg, DM.; Diamandis, EP. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. Clin Biochem 2002; 35: 119–124.

Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Rechner, AR.; Rice-Evans, C. Bioavailability of flavanol-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. Antiox Redox Signal 2001; 3: 1023–1039.

Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Srai, S.K.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Epicatequin is the primarily bioavailable form of the procyanidins dimmers B2 and B5 after across the small intestine. Biochem Biophys Res Commun 2001; 285: 588–93.

Spencer, J.P.; Chaudry, F.; Pannala, A.S.; Srai, S.K.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Descomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 272, 236–241.

Spencer, J.P.; Chowrimootoo, G.; Choudhury, R.; Debnam, E.; Srai, S.; Rice-Evans, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. FEBS Lett. 1999, 458: 224–230.

Steinberg, F.; Bearden, M.; Keen, C.L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. American Dietetic Association 2003; Volume 103, number 2.

Sun, W.; Miller, J.M. Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (–)-epicatechin. J Mass Spectrom. 2003; 38: 438–446.

Terril, TH.; Waghom, GC.; Woolley, DJ.; McNabb, WC.; Barry, TN. Assay and digestion of <sup>14</sup>C-labeled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. Br. J. Nutr. 1994; 72: 467–477.

Tsuda T; Ohshima K; Kawakishi S; Osawa T. Oxidation products of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside with a free radical initiator. Lipids 1996; 31 (12), pp. 1259-63.

Tsuda, T.; Horio, F.; Osawa, T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-β-D-glucoside in rats. FEBS Lett. 1999; 449: 179–182.

Ullmann, U.; Haller, J.; Decourt, JP.; Girault, N.; Girault, J.; Richard-Caudron, AS.; Pineau, B.; Weber, P. A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. J Intern Med Res 2003; 31: 88–101.

Van Amelsvoort, JMM.; van het Hof, KH.; Mathot, J.N.J.J.; Mulder, TPJ.; Wiersma, A.; Tijburg, LBM. Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. Xenobiotica, 2001; 31. 891–901.

Van het Hof, K.; Wiseman, S.; Yang, CS.; Tijburg, L. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. Proc. Royal Soc Exp Biol Med. 1999; 220: 203–209.

Van het Hof, KH.; Kivits, JA.; Tijburg, LBM. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. Eur J Clin Nutr 1998; 52: 356–359.

Wang, JF.; Schramm, DD.; Holt, RR.; Ensusa, JL.; Fraga, CG.; Schmitz, HH.; Keen, CL. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. J Nutr 2000; 130: 2115S–2119S.

Wang, LQ.; Meselhy, MR.; Li, Y.; Nakamura, N.; Min, BS.; Qin, GW.; Hatori, M. The heterocyclic ring fission and dehydroxylation of catechins and related compounds by *Eubacterium* sp Strain SDG-2, a human intestinal bacterium. Chem Pharm Bull 2001; 49: 1640–1643.

Warden, BA.; Smith, LS.; Beecher, GR.; Balentine, DA.; Clevidence, BA. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. J Nutr 2001; 131: 1371–1737.

Williams, VM.; Porter, Porter, LJ.; Hemingway, RW. Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers. Phytochemistry 1983; 22: 569–572.

Wu, Q.; Wang, M.; Simon, JE. Determination of procyanidins in grape products by liquid chromatography/mass spectrometric detection under low collision energy. Anal Chem 2003; 75: 2440–2444.

Yang, C. Formation and identification of 4'-O-methyl-(–)-epigallocatechin in humans. Am Soc Pharm Exp Therap 2001; 29: 789–793.

Yang, CS.; Wang, ZY. Tea and cancer. J Natl Cancer Inst. 1993; 85 (13), 1038-49.

Yoshino, K.; Suzuki, M.; Sakaki, K.; Miyase, T.; Sano, M. Formation of antioxidants from (–)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as simulated intestinal juice and mouse plasma. J Nutr Biochem 1999; 10: 223–229.

Zdunczyk, Z.; Frejnagel, S.; Amarowicz, R.; Juskiwicz, J. Effect of faba bean tannins on nutrient absorption in the small intestine of rat. Acta Alimentaria, 1996; 25: 37–46.

Zdunczyk, Z.; Frejnagel, S.; Juskiwicz, J. Influence of proanthocyanidins from faba bean on utilisation of protein by rats and absorption of nutrients in the small intestine. Pol J Food Nutr Sci. 2000, 50: 95–98.

Zhu, BT.; Patel, UK.; Cai, MX.; Conney, AH. O-methylation of tea polyphenols catalysed by human placental cytosolic catechol-O-methyltransferase. Drug Metabolism and Disposition, 2000; 28: 1024–1030.

Zhu, QY.; Holt, RR.; Lazarus, SA.; Ensusa, JL.; Hammerstone, JF.; Schmitz, HH.; Keen, CL. Stability of the flavan-3-oles epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. J Agric Food Chem 2002; 50: 1700–1705.

Zhu, QY.; Zhang, A.; Tsang, DSC.; Huang, Y.; Chen, ZY. Stability of tea green catechins. J Agric Food Chem 1997; 45: 4624–4628.









## CONCLUSIONES

*"el vino protege contra las enfermedades coronarias  
y también contra muchos cánceres"*  
Serge Renaud.



## CONCLUSIONES

- I. Es posible la reacción de polimerización entre la epicatequina y el acetaldehído utilizando un medio de reacción adecuado. Esta reacción simula el proceso de envejecimiento que tiene lugar en los vinos tintos.
- II. No se puede controlar el grado de polimerización de los oligómeros y polímeros obtenidos. La elevada reactividad existente entre la epicatequina y el acetaldehído no puede modificarse mediante la variación de la temperatura del medio de reacción, ya que, si bien a bajas temperaturas la reactividad entre ambos reactivos disminuye, el aumento de ésta acelera el proceso de condensación de los mismos. La modificación del pH del medio de reacción tampoco sirve para controlar el grado de condensación final, ya que el acetaldehído se muestra igualmente reactivo con la epicatequina tanto en medio ácido como en medio básico. No obstante, la adición de bisulfito sódico detiene la reacción de polimerización al reaccionar con el acetaldehído e impedir que éste reaccione con la epicatequina. Sin embargo, el complejo bisulfito sódico-acetaldehído formado no puede separarse de los oligómeros de epicatequina sintetizados.
- III. El grado de polimerización alcanzado en los oligómeros y polímeros de epicatequina sintetizados depende de la relación molar de acetaldehído utilizada, obteniéndose dímeros, trímeros, tetrámeros, nonámeros y un polímero formado por 16 unidades de epicatequina.
- IV. Es posible la obtención de oligómeros y polímeros de epicatequina con marca radiactiva al utilizar acetaldehído marcado radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  para enlazar los monómeros de epicatequina. El precipitado final obtenido de oligómeros y polímeros de epicatequina posee marca radiactiva. Sin embargo, debido a la gran cantidad de oligómeros formados, esta marca radiactiva no es suficiente para detectar algún oligómero marcado en un cromatógrafo líquido con detector de radiactividad.
- V. Los oligómeros y polímeros sintetizados liberan monómeros de epicatequina cuando son expuestos a un entorno ácido similar al existente en el estómago humano, si bien, cuanto mayor es el grado de polimerización del oligómero de epicatequina, menor cantidad de ésta se libera al medio y viceversa. Además, estos compuestos no son estables al ser expuestos a un medio básico similar al jugo intestinal. Del mismo modo, la epicatequina patrón tampoco es estable en este tipo de medio sufriendo una rotura total de su estructura, hecho que imposibilita la captación de señales características a través de un cromatógrafo líquido.
- VI. Se detectó la presencia de un dímero de epicatequina metilado en el plasma de ratas que habían consumido una mezcla de oligómeros y polímeros de epicatequina. Debido al bajo contenido en dímeros de la muestra suministrada a las ratas, el compuesto hallado en el plasma podría provenir de la absorción de los pequeños fragmentos obtenidos de la ruptura de los oligómeros de epicatequina en el tracto gastrointestinal. Debido a que la utilización de la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida solamente permite la detección de estructuras triméricas como máximo, no se puede descartar que sean absorbidas formas oligoméricas mayores que un dímero.
- VII. No se encontró radiactividad en el dímero de epicatequina encontrado en el plasma de ratas que ingirieron oligómero de epicatequina radiactivo, debido a que la gran cantidad de oligómeros y polímeros formados disminuye en gran medida el marcaje radiactivo individual de los compuestos sintetizados.
- VIII. Se detectó la presencia en el hígado del mismo dímero hallado en el plasma. Este hallazgo indicaría que estos compuestos también alcanzan el hígado, donde podrían realizar una acción directa sobre las células hepáticas y modificar el metabolismo y la expresión génica de las mismas.





