



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Diseño, desarrollo y evaluación clínica de un  
producto rico en polifenoles

**D. Luis Manuel Sánchez Siles**  
2015

*A Isa, Beatriz y Luis*

*A mis padres Nani y Mariano*

*A los que se han ido pero siempre están en mi mente: mis abuelos Luis, Isabel y Carmen, y a mi  
querida amiga Meme*



## AGRADECIMIENTOS



*Diversas personas han hecho posible que, tras 11 años desde que comencé esta gran aventura investigadora, haya podido finalizarla con éxito:*

*Primero mis Directores de Tesis. Luis Carbonell, es imposible escribir todo lo que te diría pero tú muy bien sabes lo que significas para mí. Gracias por enseñarme a ser crítico, guiarme en todos los aspectos tanto científicos como humanos y sobre todo gracias por haberte convertido en un miembro más de mi familia. Sin tu apoyo incondicional desde el comienzo este trabajo nunca habría visto la luz. María Jesús, gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, por tu dedicación, esfuerzo, consejos y paciencia. Gracias por hacer fácil trabajar contigo.*

*Al Grupo Hero y a Hero España por la financiación del proyecto, y en especial a Pedro Abellán por tu confianza y compartir tu gran conocimiento conmigo, a Stefan Bodenstab por tu persistencia y apoyo para finalizar esta investigación, a René Bänziger por tu participación en el estudio y tus buenos consejos a lo largo de estos años, a Pablo Serrano por tu incondicionalidad para apoyar este proyecto y trabajar en el ensayo clínico, a Juan Francisco Haro por la gran ayuda prestada en esta última etapa, a Raquel López por todo el trabajo realizado en desarrollo del producto y logística del ensayo clínico.*

*Al resto de compañeros del ensayo: Jorge Martínez Escribano, Elena Román, Enrique Serrano, y Manuel Avilés. Gracias por todo vuestro trabajo, conocimiento y sobre todo por disfrutar como disfrutamos durante la ejecución del ensayo clínico.*

*A los compañeros y amigos que han participado en esta Tesis: Karin Jacobs, Pilar Truchado, Ingrid Wiswedel, Encarna Vázquez, Inmaculado Ortuño, Fernando Granados y a los cuarenta voluntarios que han participado en el ensayo clínico.*

*A mis amigos en Hero: María José, Esther, Marisol, Isabel Vasallo, Luis Miguel, Marisa, Fernando, Toñi, Ana, Manuel Ángel, Felipe y resto de "United Local Heros".*

*También quiero dedicar unas palabras a un círculo de amigos muy especial en mi vida, que sirven como referencia para ser una mejor persona tanto a nivel humano como profesional. Gracias Ricardo, Manolo, Alberto, Carlos, Marta, Bea, Kiko Navarro, Toni Sanchez, Olivares, Michel, Fabien, Gaspar, Ivan, por vuestro optimismo, humildad y profesionalidad. Sois una gran inspiración para hacer el mundo un lugar mejor!*

*Por último, gracias a Isa, Sergio, mamá, papá, y a mis hermanos Mariano e Isabel. Gracias por vuestra infinita paciencia, persistencia, apoyo, cariño, consejos a lo largo de los años, y sobre todo gracias por hacer que finalice lo que yo nunca hubiera terminado en busca de la perfección no existente. Espero que esta Tesis os proporcione la misma satisfacción que a mí y compense la renuncia a uno de los bienes más valiosos y difíciles de recuperar: el tiempo en compañía de las personas queridas.*



# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>2A. ALIMENTOS FUNCIONALES</b>	<b>4</b>
<b>1. ALIMENTOS FUNCIONALES</b>	<b>5</b>
1.1. CONCEPTO	5
1.2. HISTORIA	7
1.3. MARCO LEGAL EN EUROPA	10
1.4. EL MERCADO Y LOS FACTORES CLAVE DE SU EVOLUCIÓN	13
1.5. LOS CONSUMIDORES	15
<b>2. PROCESO DE DISEÑO, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE ALIMENTOS FUNCIONALES</b>	<b>17</b>
2.1. FASE 1. DISEÑO DE ALIMENTOS FUNCIONALES. LA IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE INGREDIENTES	21
2.2. FASE 2. DESARROLLO DEL ALIMENTO FUNCIONAL	26
2.3. FASE 3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA	27
<b>2B. ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>32</b>
<b>1. ESTRÉS OXIDATIVO Y HOMEOSTASIS REDOX</b>	<b>33</b>
<b>2. ESPECIAS REACTIVAS: RADICALES LIBRES Y DERIVADOS</b>	<b>36</b>
2.1. FUENTES ENDÓGENAS	38
2.2. FUENTES EXÓGENAS	40
<b>3. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE</b>	<b>41</b>
3.1. SISTEMA ENZIMÁTICO	41
3.2. SISTEMA NO ENZIMÁTICO	42
<b>4. ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>44</b>
<b>5. BIOMARCADORES DE ESTRES OXIDATIVO</b>	<b>46</b>
5.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES	47
5.2. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL	47
5.3. BIOMARCADORES DE DAÑO A MOLECULAS (Peroxidación lipídica)	49
5.3.1 MDA (Malondialdehido)	50
5.3.2 F2-Isoprostanos	51
5.3.3 LDL oxidada	52
5.4. BIOMARCADORES DE OXIDACIÓN PROTEICA (PROTEÍNAS CARBONILO)	53
5.5. LA PROTEÍNA C REACTIVA COMO MARCADOR DE INFLAMACIÓN	54
<b>6. LA PIEL COMO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN NUTRICION</b>	<b>55</b>
6.1 ESTRUCTURA Y SISTEMA DE DEFENSA DE LA PIEL	56
6.2 LUZ SOLAR	59
6.3 EFECTOS DE LA LUZ SOLAR SOBRE LA PIEL	60

## **2C. POLIFENOLES Y TÉ VERDE** **68**

<b>1. POLIFENOLES. CLASES, BIODISPONIBILIDAD Y EFECTOS SOBRE LA SALUD</b>	
1.1. DESCRIPCIÓN, CLASES E INGESTA DE POLIFENOLES	69
1.1. BIOSIPONIBILIDAD Y METABOLISMO D LOS COMPUESTO FENÓLICOS	75
1.3. POLIFENOLES Y SALUD	77
1.3.1. Polifenoles y estrés oxidativo	79
1.3.2. Polifenoles y salud cardiovascular	82
1.3.3. Polifenoles y Cáncer	83
1.3.4. Polifenoles y fotoprotección	84
<b>2. TE VERDE</b>	
2.1. DESCRIPCIÓN	86
2.2. COMPOSICIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS	86
2.3. TÉ VERDE Y SALUD	89
2.3.1. Té verde y estrés oxidativo	89
2.3.2. Té verde y cáncer	92
2.3.3. Té verde y enfermedades cardiovasculares	93
2.3.4. Té verde y enfermedades neurodegenerativas	93
2.4. SEGURIDAD	94

## **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS** **98**

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4A. DISEÑO DEL PRODUCTO RP / DISEÑO EXPERIMENTAL** **100**

<b>1. DISEÑO Y DESARROLLO DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES</b>	<b>101</b>
1.1. FASE 1. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE FRUTAS-EXTRACTOS ANTIOXIDANTES	102
1.2. FASE 2. SCREENING DE EXTRACTOS COMERCIALES DE TE VERDE	103
1.3. FASE 3. DISEÑO Y DESARROLLO DEL PRODUCTO	104
<b>2. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>106</b>
2.1. ESTUDIO 1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CATEQUINAS EN INFUSIONES DE TE VERDE.	106
2.2. ESTUDIO 2. CONTENIDO EN CATEQUINAS, POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS COMERCIALES DE TE VERDE.	107
2.3. ESTUDIO 3. COMPOSICIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL PRODUCTO. ESTABILIDAD Y ACEPTACIÓN SENSORIAL A LO LARGO DEL TIEMPO	108
2.4. ESTUDIO 4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES	108
2.4.1. Diseño del ensayo	109
2.4.2. Participantes (Selección de los sujetos)	109
2.4.3. Intervenciones (Producto rico en polifenoles y placebo)	110
2.4.4. Variables principales y secundarias del estudio	112
2.4.5. Tamaño muestral	113
2.4.6. Aleatorización y asignación de los sujetos a los grupos de tratamiento	114
2.4.7. Protocolo experimental	116

<b>4B. METODOLOGÍA ANALÍTICA/ ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>120</b>
<b>1. METODOLOGÍA ANALÍTICA: FASE DE DISEÑO Y DESARROLLO</b>	<b>123</b>
<b>1.1. DETERMINACIÓN DE CATEQUINAS Y CAFÉINA EN INFUSIONES Y EXTRACTOS DE TÉ VERDE (ESTUDIOS 1 Y 2)</b>	<b>123</b>
1.1.1 Contenido en hojas, Infusiones y extractos de té	123
1.1.2 Capacidad antioxidante (TEAC) en extractos de té verde	124
1.1.3 Compuestos fenólicos totales en extractos de té verde	124
<b>1.2. CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES (ESTUDIO 3)</b>	<b>125</b>
1.2.1 Análisis Nutricional	125
1.2.2 Determinación de vitamina C	125
1.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC <sub>FL</sub> )	126
1.2.4 Evaluación del color	126
1.2.5 Análisis sensorial	127
1.2.6 Determinación y caracterización de compuestos bioactivos	127
<b>2. METODOLOGÍA ANALÍTICA: FASE DE EVALUACIÓN CLÍNICA</b>	<b>129</b>
<b>2.1 DETERMINACIONES EN SANGRE (ESTUDIO 4.1)</b>	<b>129</b>
2.1.1 Obtención de muestras biológicas	129
2.1.2 Daño oxidativo a ADN	130
2.1.3 Daño oxidativo a proteínas	130
2.1.4 Daño oxidativo a lípidos	130
2.1.4.1 Determinación de LDL oxidada (oxLDL)	130
2.1.4.2 Determinación de F2-Isoprostanos	130
2.1.4.3 Determinación de Malondialdehído (MDA)	131
2.1.5 Determinación de Proteína C Reactiva como marcador de inflamación	132
2.1.6 Valoración del estado redox	132
2.1.6.1 Determinación de los valores de glutatión total.	132
2.1.6.2 Determinación del glutatión oxidado (GSSG)	133
2.1.7 Determinación de parámetros bioquímicos generales, lipídicos y del metabolismo del hierro.	134
<b>2.2 DETERMINACIONES EN PIEL (ESTUDIO 4.2)</b>	<b>136</b>
2.2.1 Determinación de la dosis mínima de eritema (MED)	136
2.2.2 Evaluación de la calidad de la piel	139
2.2.3 Biopsias y análisis histopatológico	142
<b>2.3 EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL Y DE SALUD</b>	<b>145</b>
2.3.1 Determinación de medidas Antropométricas	145
2.3.2 Determinación de Presión Arterial	146
2.3.3 Estudio Dietético (Evaluación de la dieta)	146
2.3.4 Historia Clínica	146
<b>3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>147</b>

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>5A. TÉ VERDE Y DISEÑO/DESARROLLO DEL PRODUCTO</b>	<b>150</b>
<b>1. CATEQUINAS EN INFUSIONES Y EXTRACTOS DE TÉ VERDE</b>	
1.1. CONTENIDO EN CATEQUINAS EN INFUSIONES DE TÉ VERDE	151
1.1.1. Contenido en catequinas en hojas de té verde	151
1.1.2. Efecto del tiempo y temperatura de infusión en el contenido final de catequinas.	153
1.1.3. Estimación del contenido típico de catequinas en infusiones.	154
1.2. CONTENIDO EN CATEQUINAS EN EXTRACTOS COMERCIALES DE TÉ VERDE	157
<b>2. DESARROLLO DEL PRODUCTO</b>	
2.1. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES	162
2.2. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL	168
2.2.1. Compuestos fenólicos	170
2.2.2. Vitamina C	175
2.2.3. Capacidad antioxidante	176
2.2.4. Color	177
2.3. ACEPTABILIDAD	178
<b>5B. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL PRODUCTO A NIVEL SISTÉMICO</b>	<b>180</b>
<b>1. FLUJO DE PARTICIPANTES</b>	<b>181</b>
<b>2. CARACTERÍSTICAS BASALES</b>	<b>183</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y PARAMETROS ANTROPOMÉTRICOS	183
2.2 BIOQUÍMICA GENERAL	186
2.3 FUNCIÓN RENAL Y HEPÁTICA	187
2.4 METABOLISMO DEL HIERRO	187
2.5 PARÁMETROS LIPÍDICOS	188
2.6 INGESTA DIETÉTICA	189
2.7 PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTADO REDOX	190
2.8 PARÁMETROS DE PIEL	193
<b>3. CAMBIOS DE LAS VARIABLES A LO LARGO DEL PERIODO DE ESTUDIO. DIFERENCIAS INTRAGRUPA-INTERGRUPO</b>	<b>194</b>
3.1 PARAMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y PRESIÓN ARTERIAL	194
3.2 BIOQUÍMICA GENERAL	195
3.3 FUNCIÓN RENAL Y HEPÁTICA	196
3.4 PARÁMETROS DEL METABOLISMO DEL HIERRO	198
3.5 PARÁMETROS LIPÍDICOS	199
3.6 INGESTA DIETÉTICA	201
<b>4. EFECTO SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>202</b>
4.1. F2-ISOPROSTANOS	203
4.2. MALONDIALDEHIDO	205
4.3. LDL OXIDADA	207
4.4. ESTATUS DE GLUTATION SANGUINEO	208
4.5. PROTEINA C REACTIVA	210

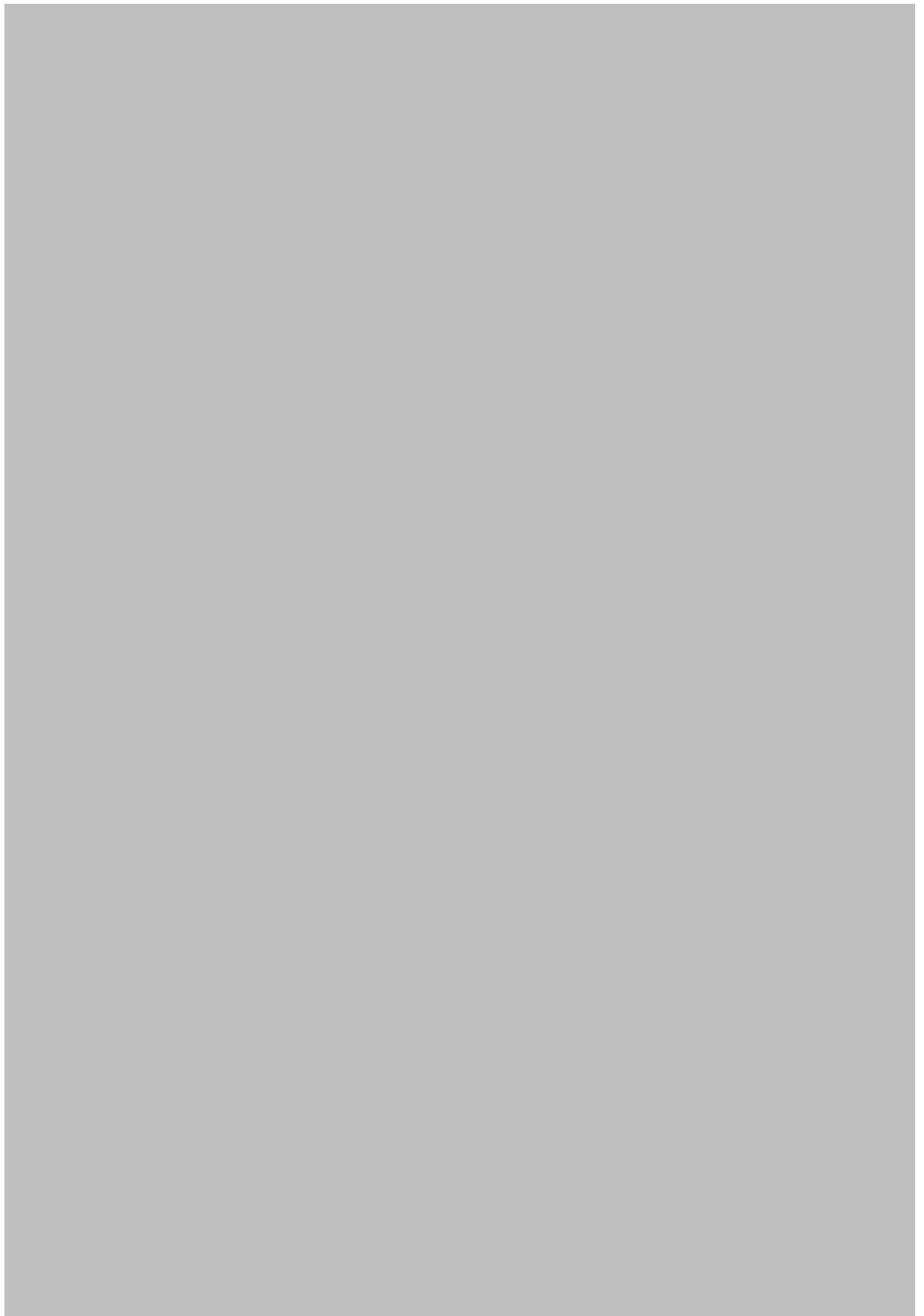


<b>5C. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL PRODUCTO EN PARÁMETROS CUTÁNEOS</b>	<b>214</b>
<b>1. EFECTO SOBRE LOS PARAMETROS RELACIONADOS CON LA CALIDAD Y ESTADO DE LA PIEL</b>	<b>214</b>
<b>2. EFECTO FOTOPROTECTOR Y ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO</b>	<b>218</b>
2.1 EFECTO FOTOPROTECTOR	219
2.2 ESTUDIO INMUNOHISTOLÓGICO	224
2.2.1 Efecto sobre el daño ADN (Recuento de dímeros de pirimidina (CPDs))	224
2.2.2. Efecto sobre la protección genómica	226
2.2.2.1 Expresión de p53	227
2.2.2.2 Recuento de <i>sunburn cells</i> (células apoptóticas)	228
2.2.3 Efecto inmunoprotector (Recuento de células de Langerhans)	229
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>232</b>
<b>7. RESUMEN / SUMMARY</b>	<b>236</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>240</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>284</b>
Información para el paciente	286
Consentimiento informado	292
Consentimiento informado para biopsia cutánea	293
Informe de la Comisión de Bioética	295

**#1**

# **INTRODUCCIÓN**

**DISEÑO,  
DESARROLLO Y  
EVALUACIÓN  
CLÍNICA DE UN  
PRODUCTO RICO  
EN POLIFENOLES**





En este contexto, existe cada vez una mayor evidencia que demuestra la relación entre el consumo de polifenoles y la prevención de enfermedades crónicas. En la literatura hay excelentes revisiones y metaanálisis tanto de ensayos epidemiológicos, como ensayos en humanos con alimentos ricos en polifenoles, evaluando sus posibles efectos beneficiosos sobre la prevención y el tratamiento de determinadas enfermedades tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Scalbert et al., 2005; Chong et al., 2010; Sies, 2010; Andriantsitohaina et al., 2012; Yang & Kortensniemi, 2015). El mecanismo de acción más estudiado de los polifenoles ha sido su actividad antioxidante (Chiva-Blanch & Visioli, 2012). Aunque, cada vez hay un mayor número de investigaciones que demuestran la participación de los polifenoles en la modulación de vías de señalización celular, entre otros mecanismos (Willians et al., 2004; Scalbert et al., 2005; Rahman et al., 2006).

La combinación de los avances en la ciencia de los alimentos, el incremento de la evidencia científica en materia de nutrición y salud, y el deseo de los consumidores por llevar una vida saludable, han creado un gran oportunidad para satisfacer los problemas de salud pública a través de la dieta y el estilo de vida. A su vez, esta oportunidad permite incrementar la investigación y desarrollo en las empresas de alimentación y la colaboración entre empresas-universidad para el desarrollo de proyectos en este ámbito. Por consiguiente, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido diseñar, desarrollar y evaluar la eficacia de un producto rico en polifenoles que reduzca el daño oxidativo en individuos sanos.

Para la consecución del objetivo general, este trabajo se ha estructurado en 3 grandes bloques que se dividen a su vez en diversos capítulos reflejados en la Figura 1. Los tres primeros, que constituyen la revisión bibliográfica, forman el primer bloque. Más específicamente, en el capítulo 2A (Alimentos funcionales), describimos el concepto, historia, marco legal y factores clave responsables de la evolución de los alimentos funcionales. Asimismo, se han analizado los aspectos metodológicos más importantes a considerar en relación al diseño, desarrollo y eficacia de un alimento funcional. En el segundo capítulo 2B (Estrés oxidativo), revisamos el estado del arte sobre el efecto fisiológico que queremos modificar con nuestro producto, describimos los biomarcadores seleccionados en nuestro ensayo clínico, y por último exponemos y justificamos el modelo experimental en piel que hemos utilizado en el estudio. En el tercer capítulo 2C (Polifenoles y té verde) se ha realizado una revisión de los ingredientes y compuestos bioactivos que se han utilizado para el diseño del producto (los polifenoles en general y de forma más específica el té verde).



**Figura 1.1. Estructura de la Tesis Doctoral**

El segundo bloque de este trabajo se destina a la descripción de los materiales y métodos de la investigación. En concreto, en el capítulo 4A explicamos cómo se ha diseñado y desarrollado el producto, así como el diseño experimental de los 4 estudios realizados. En el capítulo 4B describimos de forma general los métodos analíticos y centros de investigación donde se llevaron a cabo las determinaciones de las variables en las fases de diseño, desarrollo y evaluación clínica del producto.

En el tercer bloque relativo al apartado de Resultados y Discusión se ha estructurado en tres apartados. En el capítulo 5A se presentan los resultados de las catequinas en infusiones y extractos de té verde (estudios 1 y 2), además de las características y composición nutricional del producto rico en polifenoles, junto con los resultados obtenidos en el estudio de vida útil y aceptabilidad (estudio 3). Por su parte, en los capítulos 5B y 5C se presentan los resultados y discusión del ensayo clínico, realizado tanto a nivel sistémico como en el modelo de estudio de piel (estudio 4.1 y 4.2, respectivamente).

Para finalizar, se exponen las principales conclusiones e implicaciones científicas y sociales derivadas de la realización de esta investigación, así como las limitaciones del estudio, las líneas de investigación futuras y la bibliografía consultada.

**#2A**

**REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA**

**ALIMENTOS  
FUNCIONALES**

the 1990s, the number of people in the UK who are employed in the public sector has increased from 10.5 million to 12.5 million, and the number of people in the public sector who are employed in health care has increased from 1.5 million to 2.5 million (Department of Health 2000).

There are a number of reasons for this increase. One of the main reasons is the increasing demand for health care services. The population of the UK is increasing, and the number of people who are aged 65 and over is increasing rapidly. This has led to an increase in the number of people who are in need of health care services, and this has led to an increase in the number of people who are employed in health care.

Another reason for the increase in the number of people employed in health care is the increasing demand for health care services. The population of the UK is increasing, and the number of people who are aged 65 and over is increasing rapidly. This has led to an increase in the number of people who are in need of health care services, and this has led to an increase in the number of people who are employed in health care.

A third reason for the increase in the number of people employed in health care is the increasing demand for health care services. The population of the UK is increasing, and the number of people who are aged 65 and over is increasing rapidly. This has led to an increase in the number of people who are in need of health care services, and this has led to an increase in the number of people who are employed in health care.

A fourth reason for the increase in the number of people employed in health care is the increasing demand for health care services. The population of the UK is increasing, and the number of people who are aged 65 and over is increasing rapidly. This has led to an increase in the number of people who are in need of health care services, and this has led to an increase in the number of people who are employed in health care.

A fifth reason for the increase in the number of people employed in health care is the increasing demand for health care services. The population of the UK is increasing, and the number of people who are aged 65 and over is increasing rapidly. This has led to an increase in the number of people who are in need of health care services, and this has led to an increase in the number of people who are employed in health care.

A sixth reason for the increase in the number of people employed in health care is the increasing demand for health care services. The population of the UK is increasing, and the number of people who are aged 65 and over is increasing rapidly. This has led to an increase in the number of people who are in need of health care services, and this has led to an increase in the number of people who are employed in health care.

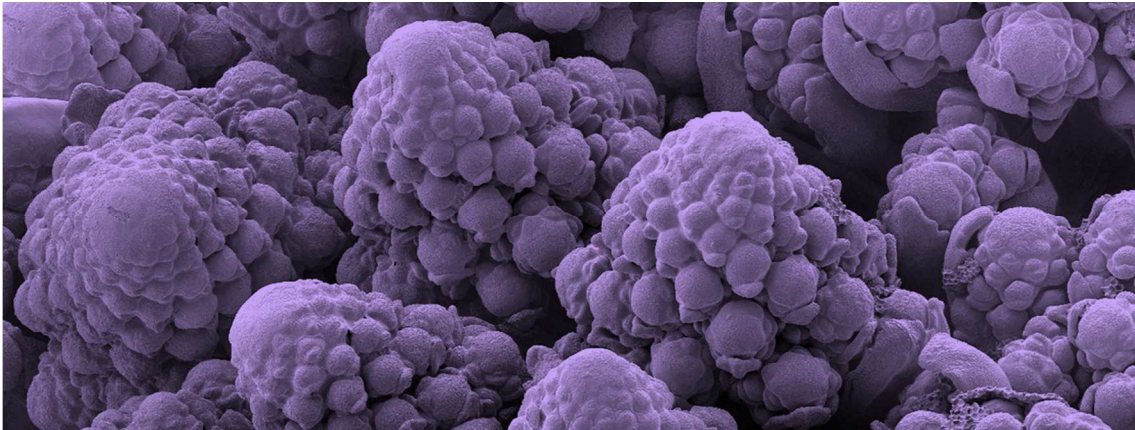
A seventh reason for the increase in the number of people employed in health care is the increasing demand for health care services. The population of the UK is increasing, and the number of people who are aged 65 and over is increasing rapidly. This has led to an increase in the number of people who are in need of health care services, and this has led to an increase in the number of people who are employed in health care.



# 2A

## Alimento Funcionales

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



#### 1. ALIMENTOS FUNCIONALES

p4

#### 2. PROCESO DE DISEÑO, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE ALIMENTOS FUNCIONALES

p17

##### 1.1. CONCEPTO p5

##### 1.2. HISTORIA p7

##### 1.3. MARCO LEGAL

p10

##### 1.4. MERCADO Y FACTORES DE

##### EVOLUCIÓN p13

##### 1.5. LOS CONSUMIDORES

p15

##### 2.1 FASE 1

##### DISEÑO DE ALIMENTOS FUNCIONALES. LA IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE INGREDIENTES

###### 2.1.1. Seguridad

###### 2.1.2. Evaluación del nivel de evidencia científica

###### 2.1.3. Biodisponibilidad

###### 2.1.4. Estabilidad

###### 2.1.5. Impacto Sensorial

###### 2.1.6. Coste

##### 2.2 FASE 2

##### DESARROLLO DEL ALIMENTO FUNCIONAL p26

###### 1. Formulación, prototipado y caracterización de los compuestos activos

###### 2. Determinación de la vida útil

##### 2.3 FASE 3

##### EVALUACION DE LA EFICACIA

p27

## 1. ALIMENTOS FUNCIONALES

### 1.1. CONCEPTO

En relación al concepto de alimentos funcional (AF) no existe una definición legal aceptada, sin embargo diferentes organizaciones y grupos de expertos han trabajado y descrito diversas definiciones para identificar estos productos, tal y como se refleja en la Tabla 2A.1.

**Tabla 2A.1. Definiciones de alimentos funcionales.**

Organización	Definición
<b>ADA (USA)</b> American Dietetic Association	<b>“Cualquier alimento que aporte un beneficio sobre la salud que pueda reducir el riesgo de enfermedad y/o promueva la salud óptima”</b> (Hasler, 2009)  Incluye alimentos convencionales (tomate, ajo), modificados (enriquecidos, fortificados.), y alimentos médicos (PKU formulas) y alimentos de usos dietéticos especiales (Alimentos infantiles, alimentos hipoalergénicos y control de peso)
<b>IFT (USA)</b> Institute of Food Technologists	<b>“Alimentos o compuestos que aportan un beneficio sobre la salud más allá de la nutrición básica. Estas sustancia proporcionan nutrientes esenciales en cantidades superiores a las necesarias para el normal mantenimiento, crecimiento y desarrollo y/o compuestos biológicamente activos que pueden proporcionar beneficios sobre la salud o efectos fisiológicos deseables”</b> (IFT, 2005)  Incluye alimentos convencionales, enriquecidos, fortificados o mejorados y suplementos dietéticos.
<b>FOSHU (JAPON)</b> Food for Specified Health Uses	<b>“Alimentos que contienen ingredientes con funciones sobre la salud y que son aprobados oficialmente por el Ministerio de salud y Bienestar”</b> (Hosoya, 1998)
<b>ILSI (EUROPA)</b> International Life Sciences Institute	<b>“Un alimento puede considerarse funcional cuando se demuestra adecuadamente que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de forma que mejora su estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad”</b> (Diplock et al., 1999)
<i>PKU: Productos para fenilcetonúricos</i> <i>FSMP: Alimentos de usos médicos especiales</i>	

Como se desprende de la Tabla 2A.1 las definiciones son muy similares y la principal diferencia entre Europa y los Estados Unidos es la inclusión de suplementos dietéticos y alimentos de usos médicos especiales dentro de la categoría de AF. En Europa, el documento de consenso de la acción concertada del IV programa Marco de Investigación, *Functional Food Science in Europe (FUFOSE)* (Diplock et al., 1999), que fue elaborado por el ILSI (*Internacional Life Science Institute*), determinó que los AF deben seguir siendo alimentos, por lo que no se incluyen los nutraceuticos, y que sus efectos beneficiosos deben alcanzarse con las cantidades que habitualmente se consumen en la dieta convencional.

De acuerdo al documento FUFOSSE, un alimento puede ser funcional de partida (ej; tomate) o transformarse en funcional mediante diversas estrategias, que describimos brevemente en la Tabla 2.

**Tabla 2A.2. Vías de transformación de alimentos a alimentos funcionales.**

Vía		Descripción	Ejemplo
1	↑	<b>Aumentar</b> la concentración de uno de sus componentes.	Incremento de la concentración de resveratrol en uva tinta mediante la aplicación de luz ultravioleta UV (Cantos et al., 2000; WO 02/085137; ES 2177465).
2	+	<b>Adición</b> de un componente que normalmente no está presente.	Adición de esteroides en leche fermentada para reducir los niveles de LDL colesterol en sujetos hipercolesterolémicos (Plana et al., 2008).
3	-	<b>Eliminación o reducción</b> de un componente que no es deseable.	Eliminación o reducción de lactosa en leche para mejorar la digestión de personas que sufren intolerancia a la lactosa o son sensibles a esta (Harju et al., 2012).
4	↑	<b>Aumento</b> de la biodisponibilidad y/o estabilidad del compuesto bioactivo.	Aumento de la solubilidad, biodisponibilidad y bioactividad de la curcumina mediante encapsulación (Yu y Huang, 2010).
5	CB	<b>Combinación</b> de las acciones descritas en los puntos anteriores	2+4: Adición de inulina y oligofruktosa para mejorar la biodisponibilidad del calcio (Griffin et al., 2002). 2+3: Adición de ácidos grasos omega-3 (EPA +DHA) y oleico, y reducción del contenido en ácidos grasos saturados (Fonollá et al., 2009).

Una de las definiciones que mejor delimita a los AF es proporcionada por Arai (1996), para quien la tercera función de los alimentos resulta clave en la conceptualización de los AF. Los AF además de nutrir (función primaria debida a su composición) y proporcionar placer (función secundaria debida a sus propiedades organolépticas), el AF debe tener un efecto beneficioso sobre la salud demostrado científicamente (función terciaria).

## 1.2. HISTORIA DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

A lo largo de la Historia de la humanidad, la medicina y la alimentación han estado estrechamente ligadas. Tanto en Oriente como en Occidente ha existido una enorme tradición terapéutica basada en los alimentos (Krishnaswamy, 2008). La visión de desarrollar AF refleja la filosofía oriental que establece que "la medicina y la alimentación tienen un origen común" (Arai et al., 2001).

En Oriente, tanto la medicina tradicional China (MTC) (206 a.C.) como la medicina tradicional India MTI (1000 a.C.) han atribuido propiedades curativas o terapéuticas a los alimentos (Patwardhan et al., 2005; Vaidya y Devasagayam., 2007). En Occidente, Hipócrates (siglo V-VI a.C.), basó su enfoque terapéutico en el poder curativo de la naturaleza, dejando en su legado la frase mítica, "que el alimento sea tu medicina y la medicina tu alimento".



Figura 2A.1. Sello FOSHU

El término AF se utilizó por primera vez en Japón en 1984, donde el Gobierno japonés propuso un Plan de Investigación en AF como estrategia para prevenir enfermedades y reducir los costes asociados a la salud (Shimizu, 2003; Arai., 1996). A partir de 1991, empezaron a comercializarse en Japón los *Foods for Specified Health Uses*, "alimentos de usos específico para la salud" (Hosoya, 1998). El consumidor japonés puede reconocer estos alimentos gracias a un sello de garantía que otorga el ministerio de salud y bienestar del gobierno japonés (Figura 2A.1).

En los Estados Unidos, el *Nutrition Labeling and Education Act* (NLEA), permitió en 1994 el uso de 8 alegaciones de salud en relación a varios grupos de alimentos que incluyeran ingredientes previamente aprobados científicamente por la Food and Drug Administration (FDA) (sodio e hipertensión; grasas, frutas y vegetales, fibra en cereales y cáncer; folatos y defectos del tubo neural; calcio y osteoporosis; grasa saturada, colesterol y enfermedad cardiovascular).

En Europa comenzó en 1996 gracias a la acción concertada del 4º Programa Marco de investigación de la UE, bajo la coordinación del ILSI. El proyecto FUFOSÉ (*Functional Food Science in Europe*) (Diplock et al., 1999) proporcionó las bases científicas para el desarrollo de AF. En este proyecto se trabajó en 6 áreas de desarrollo, que reflejamos en la columna izquierda de la Tabla 3. Con el objetivo de poner en práctica las conclusiones de FUFOSÉ, en 2001 se aprobó

un nuevo proyecto titulado PASSCLAIM (*Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods*), cuyo principal objetivo fue resolver los temas relativos a la validación científica de las alegaciones y la comunicación de estas al consumidor (Richardson et al., 2003). El proyecto fue desarrollado en base a 7 áreas temáticas (expuestas en la columna derecha de la Tabla 2A.3), donde investigadores de la industria y de los centros públicos de investigación y universidades trabajaron en conjunto para describir los requerimientos científicos necesarios para evaluar los efectos de los alimentos sobre la salud.

**Tabla 2A.3. Áreas de trabajo en propuestas en FUFOSÉ y PASSCLAIM.**

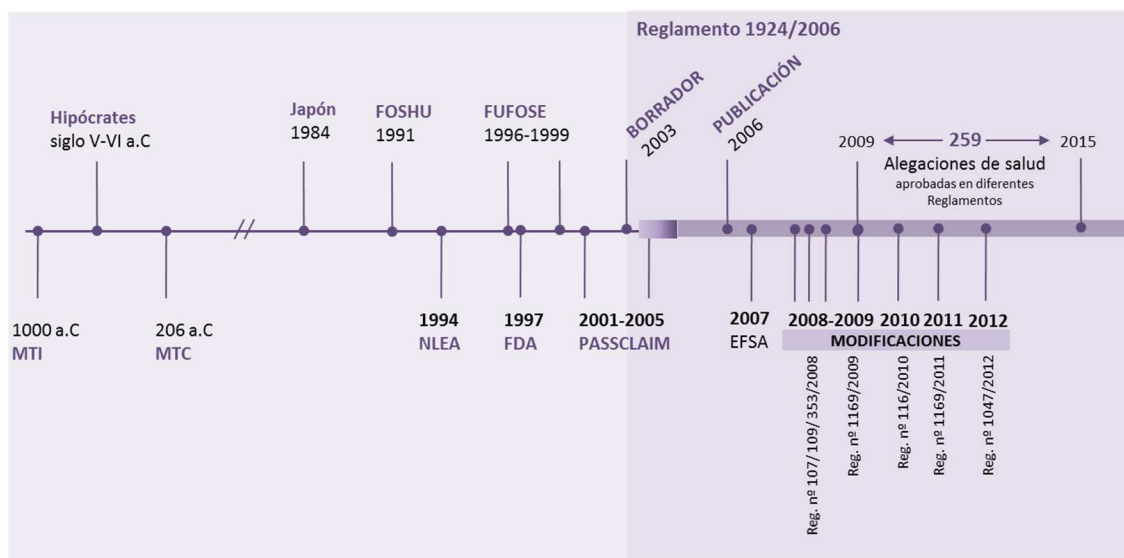
FUFOSÉ (Diplock et al., 1999)	PASSCLAIM (Agget et al., 2005)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento, desarrollo y diferenciación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Salud ósea</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulación del peso corporal, sensibilidad a insulina y diabetes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defensa contra las ROS (especies reactivas de oxígeno)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cáncer relacionado con la dieta</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema cardiovascular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patología cardiovascular</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fisiología y función gastrointestinal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Salud gastrointestinal e inmunidad</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectos de los alimentos o comportamiento y efecto psicológico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estado mental y rendimiento físico</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rendimiento y forma física</li> </ul>

En Julio de 2003 la Comisión presentó el primer borrador del Reglamento de declaraciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos, y tras una larga tramitación, el Reglamento 1924/2006 fue publicado en Diciembre del 2006 en el diario oficial de la Unión Europea. Durante los tres primeros años tras su publicación el Reglamento fue modificado en cuatro ocasiones (Reglamentos (CE) nº 107/2008; nº 109/2008; nº 353/2008; nº 1169/2009).

En el 2007, la EFSA publicó una guía para la presentación de alegaciones del artículo 14 y 13.5, donde básicamente se recogen los criterios publicados en el proyecto PASSCLAIM. El objetivo principal de la guía fue proporcionar un formato común bien estructurado para la solicitud de declaraciones nutricionales y propiedades saludables, facilitando la información que debe ser incluida, la escala de calidad de los diferentes tipos de estudios y los aspectos más relevantes para validar la alegación.

En 2010 y 2012 se publicaron nuevas modificación del Reglamento en las cuales se incluyen nuevas declaraciones nutricionales relativas a los ácidos grasos omega-3, insaturados, poliinsaturados y monoinsaturados (Reglamento (UE) N° 116/2010) y "sin sodio/sal añadidos" y "contenido reducido de un nutriente" (Reglamento (UE) N° 1047/2012). A Noviembre de 2015 hay autorizadas 30 alegaciones nutricionales y 259 alegaciones de propiedades saludables (Reglamento (UE) 432/2012).

La Figura 2A.2 muestra el cronograma histórico en la evolución de los AF, con un mayor detalle para la evolución de la AF en Europa.



**Figura 2A.2. Cronograma de la Historia de Alimentos Funcionales en Europa.**

**Reglamentos (CE) N° 107/2008:** Modificación de las competencias de Ejecución atribuidas a la Comisión. | **N° 109/2008:** Modificación del artículo 14 y 28.6. | **N° 353/2008:** Establece normas de desarrollo para las solicitudes de autorización con arreglo al art. 15. | **N° 1169/2009:** Modifica el Reglamento 353/2008, (desarrolla la responsabilidad de los Estados Miembros en la admisibilidad de solicitudes, y el procedimiento de retirada de solicitudes) | **N° 116/2010 y 1074/2012:** Nuevas declaraciones nutricionales. **N° 1169/2011:** Información alimentaria facilitada al consumidor.

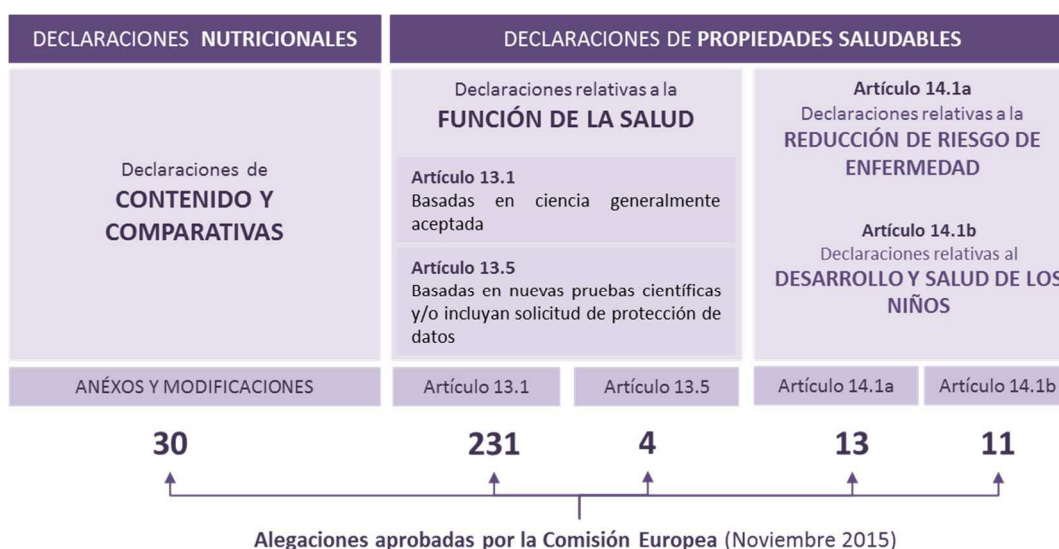
### 1.3. MARCO LEGAL EN EUROPA

El instrumento diferenciador de los AF frente los alimentos convencionales es la inclusión de alegaciones nutricionales y/o de salud. Como hemos apuntado anteriormente, en Europa, las alegaciones están reguladas por el Reglamento (CE) No 1924/2006, el cual armoniza y establece las reglas para comercializar alimentos que tengan alegaciones nutricionales y de salud, así como por los Reglamentos posteriores que han sido publicados y que incluyen las propiedades saludables aprobadas y científicamente contrastadas. El principal objetivo de la legislación en el ámbito de los AF es proteger e informar a los consumidores además de crear un escenario de competencia justo para la empresa alimentaria.

El reglamento define alegación/declaración como cualquier mensaje o representación (incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica), que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas. En él, se especifican las dos categorías de declaraciones que pueden ser utilizadas en el etiquetado, presentación y publicidad de alimentos:

- Las **declaraciones nutricionales** son definidas como cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales beneficiosas específicas de acuerdo a su aporte energético o al contenido en nutrientes u otras sustancias. El listado de declaraciones nutricionales autorizadas y sus condiciones de uso están recogidas en el anexo del Reglamento y sus modificaciones mencionadas anteriormente.
- Las **declaraciones de propiedades saludables** son cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud. Dentro de la categoría de declaraciones de salud se incluyen varios tipos (Figura 2A.3)

La Figura 2A.3 resume los diferentes tipos de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables descritas en junto con el número de declaraciones aprobadas a fecha de noviembre de 2015.



**Figura 2A.3.** Declaraciones nutricionales y de propiedades saludables aprobadas por la Unión Europea.

Todas los Reglamentos y Decisiones que haya adoptado la Comisión en relación a la autorización o denegación de las declaraciones mencionadas pueden ser consultadas en el Registro comunitario en la siguiente página web: <http://ec.europa.eu/nuhclaims/>

Las declaraciones de salud de los artículos 13.5 y 14 deben prepararse y presentarse de acuerdo a la guía científica y técnica para la preparación y presentación de solicitudes de autorización de declaraciones saludables elaborada por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011a). La guía recoge la información que se debe aportar así como los procedimientos a seguir y consta de 5 partes (Tabla 2A.4).

**Tabla 2A.4.** Estructura de la guía científico técnica para la presentación de alegaciones (EFSA 2011a).

Parte	Apartado	Descripción	
1	DATOS ADMINISTRATIVOS Y TÉCNICOS	Datos administrativos	Nombre y dirección de la compañía, persona de contacto.
		Naturaleza de la Alegación	Alegación que se va a solicitar (Art. 13.5, Art 14a o Art 14b).
		Evaluación científica previa	Indicar el estatus de evaluación y copia de la documentación del organismo evaluador.
		Relacionados con la alegación	Alimento/compuesto por el cual se hace la alegación. Describir relación Alimento-Salud. Propuesta de redacción de la Alegación. Condiciones de Uso (Población a la que va dirigida, cantidad del alimento requerida para obtener el efecto, aspectos de seguridad e instrucciones de uso).
		Resumen y Referencias	Apéndice B

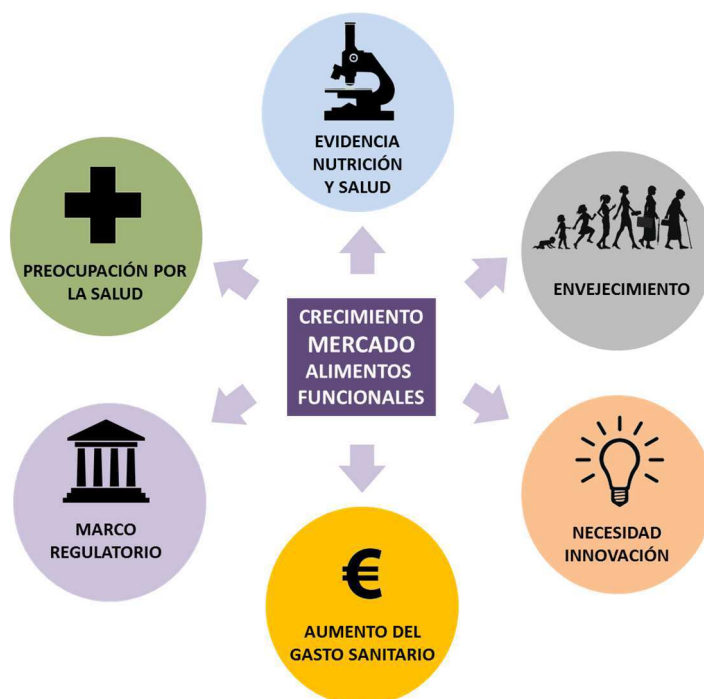


2	ALIMENTO	Características físico-químicas y composición	Variabilidad entre producciones, y descripción de métodos analíticos.
		Proceso de Producción	Descripción del proceso y sistema de calidad.
		Estabilidad	Estudios de estabilidad durante el procesado y vida útil.
		Biodisponibilidad	Datos de absorción del compuesto activo y factores que pueden afectar a la biodisponibilidad de este.
3	DATOS CIENTÍFICOS RESUMEN	Resumen de los estudios científicos identificados en la parte 4.	<p>Tabla resumen con todos los estudios identificados (Apéndice C).</p> <p>Tabla con los resultados de todos los estudios de intervención (Apéndice D) y observacionales (Apéndice E).</p> <p>Resumen escrito de los estudios.</p> <p>Estudios en animales e <i>in vitro</i>.</p> <p>Conclusiones Generales teniendo en cuenta la totalidad de la evidencia</p> <p>Datos y resumen de los estudios científicos realizados en humanos (Apéndice F), animales e <i>in vitro</i>.</p>
4	DATOS CIENTÍFICOS	Identificación y resumen de estudios científicos pertinentes relacionados con el alimento/ compuesto y la alegación	<p>Identificación de los estudios pertinentes en humanos.</p> <p>Realización de Revisión sistemática de los estudios realizados en humanos (Apéndice G).</p> <p>Organización y clasificación de los estudios de acuerdo al grado de evidencia.</p> <p>Resumen de los estudios de intervención y observacionales utilizando los modelos de la guía (Apéndices H e I).</p>
5	<b>GLOSARIO:</b> Lista de abreviaturas y copia de todos los artículos, revisiones, referencias e informes relacionados con la aplicación.		

Hay dos aspectos claves a tener en cuenta: la necesidad de presentar estudios controlados de intervención en humanos y la demostración de la plausibilidad biológica. Por ello los solicitantes deben aportar la evidencia científica disponible (Parte 3 y 4) que muestre el grado en el que se ha establecido la relación causa-efecto, entre el consumo del producto y el efecto que se quiere alegar al grupo de población al que va dirigido, y en las condiciones de uso propuestas para la alegación (Parte 1). Además, el solicitante deberá aportar información relativa a la caracterización de/los compuesto/s activo/s, estabilidad durante la vida comercial y en determinados casos, estudios de biodisponibilidad (Parte 2).

### 1.4. EL MERCADO Y LOS FACTORES CLAVE DE SU EVOLUCIÓN

En los últimos años, el mercado de los alimentos funcionales ha crecido en todo el mundo (Menrad, 2003; Datamonitor 2008; Euromonitor 2010). Hoy en día, los alimentos no son percibidos como vehículos de nutrientes para el correcto desarrollo y crecimiento, sino como una vía para mejorar la salud (Hasler & Brown, 2009). Hasler (2002) apunta que hay diversos factores que han permitido el crecimiento del mercado de alimentos funcionales (Figura 2A.4). Seguidamente, pasamos a comentar brevemente cada uno de ellos.



**Figura 2A.4.** Factores que han contribuido a la evolución de los Alimentos Funcionales.

#### 1.4.1. La evidencia creciente entre salud y alimentación

Aunque desde siempre los alimentos se han asociado a salud, en las últimas décadas, gracias a los espectaculares avances que han experimentado las ciencias de la alimentación y de la nutrición se ha reafirmado la importancia que tiene una alimentación adecuada como una de las mejores estrategias de promoción de la salud y del bienestar físico y emocional. Numerosos estudios científicos y documentos de consenso avalan que la alimentación juega un papel fundamental en el estado de salud (OMS, 2002; OMS 2004). En este sentido, uno de los hitos más importantes fueron los consistentes resultados encontrados de que el aumento de consumo de frutas y vegetales estaba relacionado con la reducción de riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Craig, 1997; de Lorgeril et al., 1998).

#### 1.4.2 La preocupación de la sociedad por la salud

El aumento del interés del consumidor por controlar su salud ha sido uno de los factores estimulantes más importantes del rápido crecimiento global de la industria de la alimentación funcional (Hasler, 2000). En este sentido se han realizado varios estudios (ADA, 2002; IFIC, 2008; IFIC, 2009) que ponen de manifiesto que los consumidores creen que ciertos alimentos pueden tener múltiples efectos beneficiosos sobre la salud.

#### 1.4.3 Incremento del gasto sanitario

Aunque existen numerosos estudios que estiman el coste sanitario de diversas enfermedades relacionadas con la dieta (Suhrcke et al., 2005; Yach et al., 2006; van Baal et al., 2008; Timothy et al., 2009), hay pocas investigaciones que relacionen directamente el impacto de los AF sobre la prevención de enfermedades y reducción del gasto sanitario. Por ejemplo, Gerber et al. (2006), estimaron un ahorro de 1.3 billones de euros/año mediante la ingesta de margarina enriquecida con fitosteroles en Alemania. Un estudio parecido realizado en Inglaterra por Phillips et al. (2000), mostró un ahorro de aproximadamente 2 billones de euros mediante la sustitución de margarina normal por margarina enriquecida por fitosteroles. En un informe realizado en Canadá sobre el potencial beneficio de los AF en la reducción del gasto sanitario, Holub (2002) pone como ejemplo que la sustitución de fármacos hipolipemiantes (ej., gemfibrozilo) por ácidos grasos omega-3 podría reducir en una quinta parte el gasto farmacéutico, suponiendo un ahorro potencial de 1.9 billones euros / año.

#### 1.4.4 Envejecimiento de la población y aumento de la población mayor de 65

Quizás los dos acontecimientos más importantes han sido el aumento de la población y su longevidad. A día de hoy, por primera vez en la historia, la mayoría de las personas puede aspirar a vivir más de 60 años (*World Economic and Social Survey*, 2007). En los países poco desarrollados, esto se debe en gran parte a la reducción de la mortalidad en las primeras etapas de la vida y a la reducción de la mortalidad por enfermedades infecciosas (Bloom, 2001). En los países más desarrollados, el aumento de la esperanza de vida se debe sobre todo al descenso de la mortalidad entre las personas mayores (Christensen et al., 2009). El continuo progreso en la reducción de la mortalidad observada en los países desarrollados es según Vaupel (2010) principalmente debidos a:

- Las mejoras sanitarias, fruto de los conocimientos aportados por la ciencia, y traducidos en avances de la medicina y políticas de salud pública.
- La prosperidad o aumento de la riqueza, que permite tener una mayor calidad de vida con posibilidades de educación y crecimiento.

Íntimamente ligado a la esperanza de vida se encuentra el aumento de población anciana por encima de los 60 años. Actualmente en Europa, el 23.4 % se encuentra en esta edad (*Global Age Watch Index*, 2015). Este incremento de la longevidad afecta al coste médico y a la demanda de servicios de salud, ya que los ancianos son más vulnerables a las enfermedades crónicas (Holliday, 1999).

#### **1.4.5 La necesidad de innovación por parte de la industria alimentaria**

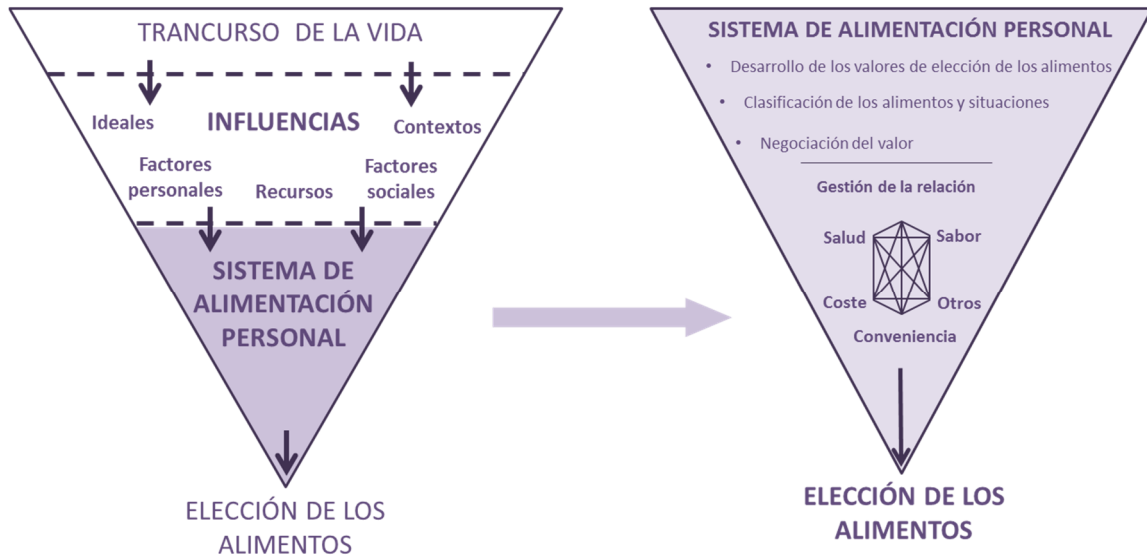
La innovación es el elemento clave que explica la competitividad. Porter (1990) se muestra rotundo al afirmar que la competitividad de una nación depende de la capacidad de su industria para innovar y mejorar y que las empresas consiguen ventajas competitivas mediante la innovación. En este sentido, la capacidad de adaptación del sector alimentario permite cubrir y satisfacer cualquier demanda o tendencia del consumo y así, dar valor añadido que contribuirá a la diferenciación, incremento de ventas y mejora de resultados. Dicho de otra forma, el principal objetivo en el desarrollo de nuevos productos es crear un producto con mayor valor para el consumidor (Slater & Narver, 2000).

El creciente aumento de la preocupación de la salud junto a los avances científico-tecnológicos, aportan a las empresas un oportunidad única para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales (Biström & Nordström, 2002; Van Kleef et al., 2002). Así, las alegaciones de salud son una fuerte incentivo para el marketing de las empresas alimentarias (Cheftel, 2005; Bech-Larsen & Scholderer, 2007), aportando oportunidades de diferenciación basadas en un posicionamiento relacionado con la salud.

### **1.5. LOS CONSUMIDORES**

Una vez descritos los factores que han facilitado el crecimiento del mercado de los AF no podemos olvidarnos de los consumidores. En concreto, los consumidores son el segmento más importante del sistema alimentario y los principales determinantes del éxito o fracaso de los productos (Asp, 1999; Cooper, 2003; Costa & Jongen, 2006). En el ámbito de la alimentación funcional, según Bleiel (2010) unos de los factores esenciales para el éxito de los AF es el entendimiento del comportamiento del consumidor, y muy especialmente de sus necesidades

y deseos. Por este motivo, aunque el desarrollo de este tipo de productos está claramente basado en la ciencia, las principales compañías alimentarias incluyen en las primeras etapas del desarrollo de nuevos productos distintas herramientas para conocer las necesidades de los consumidores (French, 2006; Bleiel, 2010; Kraus, 2015).

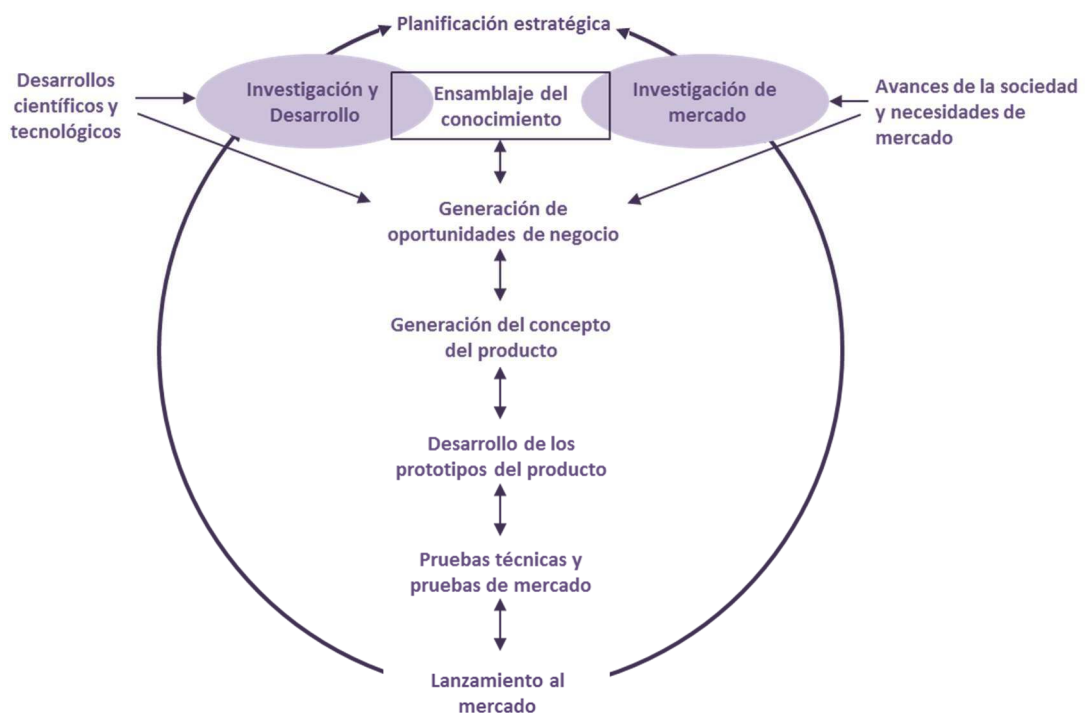


**Figura 2A.5.** Componentes claves en la selección de un alimento.

La **elección de un alimento** por parte del consumidor es un proceso muy complejo que depende de muchos factores y de las interacciones entre estos. Los componentes clave involucrados en la selección de alimentos vienen representados en la Figura 2A.5 (Falk *et al.*, 1996; Furst *et al.*, 1996; Connors *et al.*, 2001). Este modelo describe las partes más importantes del proceso que el consumidor utiliza a la hora de seleccionar un alimento. Por tanto para el desarrollo de un AF con éxito conviene tener en cuenta en las etapas iniciales del desarrollo tanto las necesidades del consumidor como las oportunidades que surgen del mundo científico (Van Kleef *et al.*, 2002; Costa & Jongen, 2006; Ares & Gámbaro, 2007).

## 1. PROCESO DE DISEÑO, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE ALIMENTOS FUNCIONALES

El diseño y desarrollo de nuevos productos es un factor clave para lograr el éxito empresarial (Ernst., 2002), este proceso engloba una serie de actividades con equipos multidisciplinares donde se incluyen e interactúan la mayoría de los departamentos de la empresa (Side, 2002). Desde un punto de vista genérico la Figura 2A.6, representa el diagrama de actividades más representativas en el proceso de diseño y desarrollo de nuevos productos.



**Figura 2A.6. Principales etapas en el desarrollo de nuevos productos.**  
Adaptado de Trott (2008).

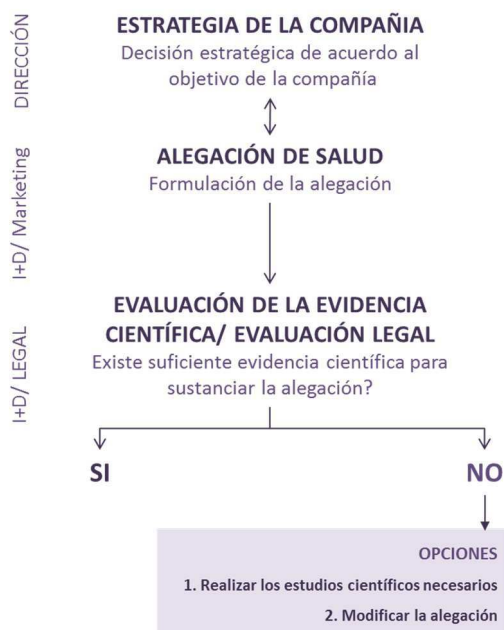
El proceso de diseño y desarrollo de AF es diferente al proceso de desarrollo de alimentos convencionales. Diversos autores han descrito el proceso DYDAF como un proceso complejo, caro y con alto riesgo (van Kleef et al., 2002; Siro et al., 2008). En este sentido, Khan et al., (2013) describen las principales diferencias entre el desarrollo de productos convencionales y AF (Tabla 2A.5).

**Tabla 2A.5. Comparación de los principales factores involucrados en el diseño y desarrollo de alimentos convencionales y AF.** Adaptado de Khan et al. (2013).

Factores	DNP tradicional	DNP de un Alimento funcional
<b>Orientación a la Innovación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Orientación al mercado.</li> <li>• Generating and disseminating market intelligence.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Más orientado a producto. Máxima explotación de la ciencia y la tecnología.</li> </ul>
<b>Generación de conocimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aprender haciendo (prueba y error).</li> <li>• Focalización en reducción de costes.</li> <li>• Generalmente orientados al consumidor.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mas focalizado en aprendizaje basado en investigación.</li> <li>• Creación de redes de conocimiento externo para construir competencias globales.</li> </ul>
<b>Desarrollo de recursos basados en la empresa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apoyo en los recursos y capacidades internos (innovación cerrada).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Innovación abierta.</li> <li>• Desarrollo de combinación de capacidades técnicas/médicas, de producción y de marketing.</li> </ul>
<b>Redes de colaboración</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generalmente, interacciones aisladas con proveedores.</li> <li>• Buscan soluciones tecnológicas de proveedores de ingredientes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Continua interacción con proveedores externo de conocimiento.</li> <li>• Alianzas estratégicas con farmacéuticas, proveedores de ingredientes y centros de investigación.</li> </ul>

Diversos autores identifican el “ensamblaje de conocimiento” como la primera actividad en el desarrollo de nuevos productos (Kotler, 2003; Brassington & Pettitt, 2003; Trott, 2008). Esto significa que el conocimiento de la organización se toma como base para la creatividad y la generación de nuevas ideas. Sin la continua generación de conocimiento, la empresa está limitada a la creación de nuevas ideas de producto (Du et al., 2014). Aunque el origen de nuevas ideas puede venir de varias fuentes, en el proceso de diseño y desarrollo de AF, los pilares de estas ideas son la ciencia/tecnología y el mercado. Los departamentos de I+D son los encargados de estar al día en los nuevos descubrimientos, tecnologías emergentes, estudios científicos y patentes relacionadas con la actividad de la empresa. Por otro lado los departamentos de marketing y ventas, estudian todo lo relacionado con el mercado y especialmente buscan cuales son las necesidades del consumidor (Khan et al., 2013).

Tanto si la idea viene del mercado como de la ciencia, todo alimento funcional lleva implícito un mensaje de salud y por tanto, el objetivo principal de esta primera fase es evaluar si ese mensaje está lo suficientemente contrastado a nivel científico o por el contrario necesita más estudios. La Figura 2A.7 muestra el proceso de generación de alegaciones y los departamentos involucrados en cada una de las fases.



**Figura 2A.7.** Proceso de generación de alegaciones nutricionales y de salud en empresas. Adaptado de Korver et al. (2004).

Para poder evaluar la idea/alegación de salud, el equipo de I+D trabaja en adquirir el conocimiento necesario para poder entender el mecanismo y causa del proceso biológico que queremos mejorar. Las principales actividades que se realizan en esta etapa son las revisiones bibliográficas de la literatura científica y el contacto con proveedores externos de conocimiento como las Universidades y Centros de investigación (Korver et al., 2004). Diversos autores han descrito este último punto como factor clave para el éxito del diseño y desarrollo de AF (Beckeman & Skjoldebrand, 2007; Siedlok et al., 2010; Khan et al., 2013).

Tras la etapa de adquisición de conocimiento, una vez entendido el mecanismo y causa del proceso fisiológico que queremos mejorar, se evalúa mediante el análisis de la evidencia disponible si el proceso fisiológico y/o enfermedad puede ser modificada a través de la alimentación o compuesto activos que se quieren añadir. La respuesta a esta pregunta es fundamental para pasar a etapas posteriores del diseño y desarrollo del producto.



Las etapas del diseño y desarrollo de AF comprenden el conocimiento de diversas disciplinas de la ciencia; desde la fisiología humana, pasando por la bioquímica, físico-química, biología molecular, genética, estadística, hasta la tecnología de los alimentos. En este sentido, Bigliardi & Galati (2013), describen de una forma simple las interrelaciones de las 3 áreas principales de conocimiento (Salud, Tecnología y Nutrición) en el proceso de diseño y desarrollo de AF (Figura 2A.8).



**Figura 2A.8.** Principales actores en el diseño y desarrollo de AF. Adaptado de Bigliardi & Galati, (2013)

Desde el punto de vista de I+D, el factor clave para el diseño y desarrollo de AF es la base científica, principalmente la seguridad, la estabilidad de los compuestos activos y la eficacia del producto sobre la población a la que vaya destinada. La empresa alimentaria es la responsable de garantizar que el compuesto activo permanece activo en el producto durante la cadena de distribución y una vez consumido es capaz de proporcionar al consumidor el efecto sobre la salud alegado (EFSA, 2011a).

En base a esta premisa, las etapas principales de este proceso comprenden la identificación y selección de ingredientes, el desarrollo del producto *per se*, los estudios de vida útil y la evaluación de la eficacia, en el caso de que el grado de evidencia existente no sea convincente sobre el potencial efecto positivo sobre la salud. A continuación pasamos a describir las etapas principales desde el punto de vista de I+D.

## **2.1 FASE 1. DISEÑO DE ALIMENTOS FUNCIONALES. LA IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE INGREDIENTES**

Comprende el conjunto de actividades científicas dedicadas a identificar y seleccionar los ingredientes candidatos a tener el efecto deseado. Las revisiones científicas elaboradas para la evaluación de la viabilidad de la alegación, sirven como base de partida para la identificación y selección de ingredientes.

Un buena estrategia de búsqueda y la selección, revisión y evaluación crítica de la información científica disponible (ej: meta-análisis, revisiones sistemáticas y ensayos clínicos en humanos) es clave en la identificación de ingredientes candidatos (Korver et al., 2004; Richardson et al., 2005). Tras la afirmación de que existen compuestos/ingredientes que pueden tener el impacto deseado sobre la salud, se identifican las dosis efectivas de los ingredientes y se evalúan/seleccionan en base a la seguridad en su utilización, el nivel de evidencia científica sobre el potencial beneficio que supone para la salud, la biodisponibilidad, la estabilidad durante el procesado y almacenamiento y el coste del ingrediente (Korver et al., 2004; Kotilainen et al., 2006).

### **2.1.1. Seguridad**

La seguridad es el primer aspecto a considerar en la selección del ingrediente (Kruger & Mann, 2003; Korver et al., 2004). A la hora de evaluar la seguridad de un ingrediente, es importante tener en cuenta diversos aspectos tales como:

- La historia de uso del ingrediente.
- La ingesta media del compuesto bioactivo en la población a la que va destinada.
- El consumo del compuesto bioactivo que se alcanzaría si se introdujese el producto en el mercado.
- La transformación de los compuestos bioactivos en otros compuestos debido al procesado, matriz donde se incorpora y/o el almacenamiento del producto.
- La posible interacción con otros nutrientes o medicamentos.

### **2.1.2. Evaluación del nivel de evidencia científica**

El análisis de la evidencia disponible constituye un pilar imprescindible en el desarrollo de alimentos funcionales. El término “nutrición basada en la evidencia” fue definido por Serra Majen a partir del concepto de la MBE (Medicina Basada en la Evidencia), concepto que puede ser parcialmente adaptado y utilizado a su vez en el desarrollo de alimentos funcionales. Sackett

et al. (1996) definieron la MBE como “la aplicación consciente, explícita y juiciosa de la mejor evidencia científica disponible para tomar decisiones sobre la atención de los pacientes, y cuya práctica integra la experiencia del clínico con la mejor evidencia externa disponible procedente de la investigación sistemática”.

El nivel de evidencia está basado en el tipo, la calidad, y número de estudios científicos disponibles (Richardson et al., 2005). En la literatura hay publicadas diferentes metodológicas para clasificar y evaluar la evidencia según el tipo de estudio, en especial para la toma de decisiones en la práctica clínica y recomendaciones de salud pública (Harbour & Miller, 2001; OCEBM, 2011). En nutrición hay descritas diferentes tipos de jerarquías como las utilizadas por la FDA (1999), o la utilizada para la evaluación de alegaciones por el Ministerio de Salud Holandés antes de que se implementara el Reglamento 1924/2006. (The Netherlands Ministry of Health, 2004). La Figura 2A.9, muestra una adaptación simplificada de la jerarquía de la evidencia de las fuentes mencionadas. Tras la identificación de los estudios publicados en relación al efecto que se quiere alegar y el compuesto/ingrediente (ej. reducción de colesterol y té verde), es de gran utilidad clasificar los estudios de acuerdo a su tipología para tener una idea del nivel de evidencia en el que se encuentra el ingrediente o alimento.



**Figura 2A.9. Jerarquía de la evidencia.** Adaptado de FDA (1999); The Netherlands Ministry of Health (2004); OCEBM (2011).

Una vez que los estudios han sido clasificados en base al nivel de evidencia, es recomendable evaluar la calidad de estos. Existen diversos documentos que describen los criterios para evaluar la calidad de los distintos tipos de estudios (Tabla 2A.6).

**Tabla 2A.6. Documentos de referencia en la evaluación de la calidad de estudios científicos.**

Tipo de Estudio	Evaluación de la calidad
Guías/documento de consenso (Ej: WHO, EFSA, ESPEN, FDA ..)	No necesaria
Meta-análisis/Revisiones sistemáticas	<b>QUOROM</b> QUALITY OF REPORTING OF META-ANALYSES (Moher et al., 2009) <b>PRISMA</b> PREFERRED REPORTING ITEMS FOR SYSTEMATIC REVIEWS AND META-ANALYSES (Moher et al., 2009)
Ensayos clínicos aleatorizados	<b>CONSORT</b> CONSOLIDATED STANDARDS OF REPORTING TRIALS (Altman et al., 2001)
Estudios no aleatorizados	<b>TREND</b> TRANSPARENT REPORTING OF EVALUATION WITH NONRANDOMIZED DESIGNS (Des Jarlais et al., 2004)
Metanálisis de de estudios observacionales	<b>MOOSE</b> META-ANALYSIS OF OBSERVATIONAL STUDIES IN EPIDEMIOLOGY (Stroup et al., 2000)
Estudios epidemiológicos (cohorte/ Casos controles)	<b>STROBE</b> STRENGTHENING THE REPORTING OF OBSERVATIONAL STUDIES IN EPIDEMIOLOGY (Vandenbroucke et al., 2007)

### 2.1.3. Biodisponibilidad

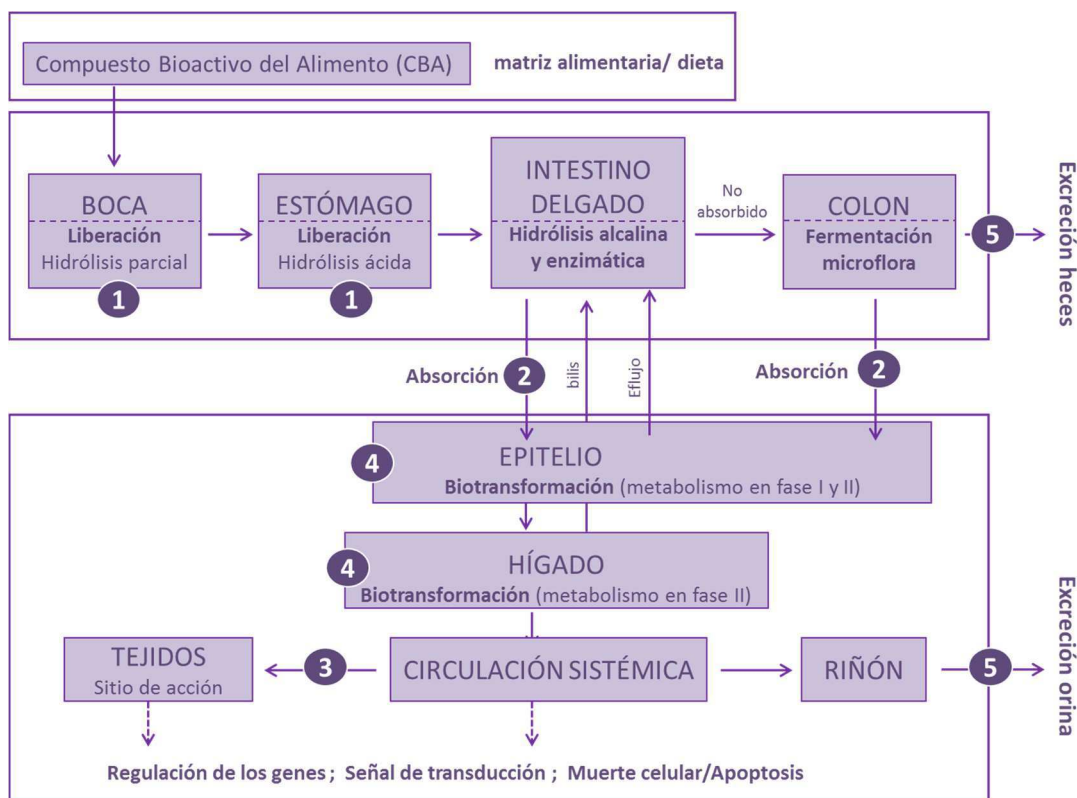
Existen distintas definiciones de biodisponibilidad pero, en general, este concepto se refiere a la proporción de un nutriente que nuestro organismo absorbe de los alimentos y que utiliza para las funciones corporales normales (Aggett, 2010; Hurrell & Egli., 2010). De forma general, la biodisponibilidad de un nutriente puede variar de acuerdo a dos tipos de factores; extrínsecos (relacionados con el alimento) o intrínsecos (relacionado con la persona que lo consume) (Tabla 2A.7).

**Tabla 2A.7. Factores que afectan a la biodisponibilidad de nutrientes.**

<b>Alimento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilidad y peso molecular del compuesto activo.</li> <li>• Estructura química del compuesto.</li> <li>• Cantidad ingerida</li> <li>• Matriz alimentaria-Interacción con otros compuestos</li> <li>• Procesado</li> <li>• Vida útil del producto</li> </ul>
<b>Persona</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbiota intestinal</li> <li>• Tasa de vaciado gástrico y tiempo de tránsito intestinal</li> <li>• Estado nutricional y fisiopatológico</li> <li>• Edad</li> <li>• Genética</li> </ul>
Fuente: Barberá & Farré, 1992; Fairweather-Tait, (1996); D'Archivio et al. (2010)	

Es importante que en la etapa de selección de ingredientes se revisen todos estos factores, ya que pueden surgir oportunidades en la identificación de posibles vías que puedan mejorar la biodisponibilidad del nuevo alimento a desarrollar (Lambert et al., 2004; Williamson & Manach, 2005)

Todos estos factores hacen que exista una gran variabilidad inter e intra-individual en la biodisponibilidad de algunos compuestos (Scholz, 2007). La biodisponibilidad de los macronutrientes (carbohidratos, proteínas y grasas) suele ser muy elevada, llegando a superar el 90% de la cantidad consumida. Sin embargo, en el caso de los micronutrientes y las compuestos bioactivos (ej. ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, glucosinolatos etc.) hay grandes diferencias en la proporción que puede ser absorbida en el intestino y por lo tanto en la cantidad que es utilizada en el metabolismo (Holst & Williamson, 2008). La Figura 2A.10 muestra las etapas básicas de la biodisponibilidad de alimentos, considerando las fases de liberación o digestión, absorción, distribución metabolismo y excreción.



**Figura 2A.10. Etapas básicas de la biodisponibilidad de alimentos.** Adaptado de Motilva et al. (2015).

- (1) LIBERACIÓN, proceso en el que el compuesto se convierte disponible para su absorción.
- (2) ABSORCIÓN, movimiento de un compuesto desde el sitio de administración al torrente sanguíneo.
- (3) DISTRIBUCION, proceso en el cual el compuesto es transportado desde la sangre hasta los tejidos.
- (4) METABOLISMO, conversión bioquímica o transformación de compuesto en otro.
- (5) EXCRECCION, la eliminación del compuesto o el metabolito a través de la vía renal, biliar o pulmonar.

#### **2.1.4. Estabilidad**

Aunque la estabilidad del compuesto activo se valida en la fase de desarrollo del producto, es importante buscar en la literatura científica los factores que afectan a los compuestos identificados a incorporar en el producto. Normalmente en mayor o menor medida todos estos compuestos son susceptibles de ser degradados o modificados por alguno o varios factores intrínsecos del alimento o factores extrínsecos asociados al procesado a las condiciones en las que se encuentra almacenados los mismos, tales como el pH, oxígeno, exposición a la luz, temperatura, tiempo, procesado, tipo de almacenamiento, etc. (IFST, 1993). A modo de ejemplo, los polifenoles son ampliamente inestables y susceptibles a la degradación (Bakowska et al., 2003). Así, la estabilidad de los polifenoles bajo diferentes condiciones, como temperatura, luz, oxígeno, presencia de enzimas, proteínas, iones metálicos o la asociación con otros constituyentes del alimento, se debe tener en cuenta para asegurar que los compuestos fenólicos mantengan sus propiedades biológicas y su actividad durante las diferentes etapas del procesado, (Castañeda-Ovando et al., 2009a; 2009b).

#### **2.1.5. Impacto Sensorial**

Una de las funciones de los alimentos, que afortunadamente en los países desarrollados no debemos sacrificar, es el papel fruitivo o placentero asociado a los alimentos y al proceso de alimentación. Por tanto es importante tener en cuenta en el desarrollo de un AF, que la dosis efectiva de estos compuestos activos no tenga un impacto significativo sobre la aceptabilidad del producto (Verbeke, 2006). Normalmente, no es posible mediante las herramientas utilizadas en la fase de identificación y selección de ingredientes conocer cómo influye la dosis efectiva en nuestra matriz, aunque el creciente aumento de artículos publicados sobre análisis sensorial puede aportar una idea aproximada de la posible influencia sobre las características sensoriales. En cualquier caso, la selección de los ingredientes en base al impacto sensorial suele formar parte de la etapa de desarrollo de producto.

#### **2.1.6. Coste**

Como hemos comentado anteriormente, investigaciones de mercado muestran como el precio del producto es uno de los factores más importantes que influye en la decisión de compra de alimentos (Glanz et al., 2003). Por consiguiente, tras la identificación de los ingredientes y la dosis efectiva, es imprescindible realizar ejercicios de cálculo para evaluar el impacto de los ingredientes seleccionados sobre el coste final del producto (Side, 2002) de cara a que el coste final del mismo no afecte negativamente a su aceptación por parte de los consumidores.

## 2.2. FASE 2. DESARROLLO DEL ALIMENTO FUNCIONAL

Una vez seleccionados los ingredientes se inicia la fase del desarrollo del producto, que incluye el conjunto de pruebas destinadas a formular y prototipar el producto con el objeto de ser validado nutricionalmente y sensorialmente.

### 2.2.1. Formulación, prototipado y caracterización de compuestos bioactivos

Es la etapa en la que se diseñan diversas formulaciones con las dosis efectivas de acuerdo a la literatura científica. Las formulaciones suelen realizar a cabo a escala de laboratorio, simulando condiciones similares a las industriales (Side, 2002).

Normalmente, la batería de prototipos son sometidos a varias evaluaciones sensoriales dentro de la empresa, e incluso en determinados proyectos también es necesario realizar con paneles de consumidores (Side, 2002; Lawless & Heymann, 2010). Actualmente, el análisis sensorial está considerado como una ciencia multidisciplinaria relacionada con diferentes áreas de conocimiento como la ciencia de los alimentos, psicología, fisiología humana, estadística, marketing y sociología entre otras. El análisis sensorial tiene como principal objetivo obtener una respuesta en relación a como el alimento es percibido por el cuerpo humano a través de sus cinco sentidos vista, olfato, sabor, tacto e incluso oído (Stone & Sidel., 2004). Resulta de vital importancia para la industria alimentaria ya que permite validar la calidad de los productos a lo largo de los procesos de desarrollo y posteriormente mejorar la calidad y la vida útil de los mismos (Lawless, & Heymann, 2010).

Una vez seleccionados el/los prototipo/s, se debe hacer una análisis completo para caracterizar los compuesto bioactivos del producto, para seguidamente evaluar su estabilidad a lo largo del tiempo así como la aceptabilidad del producto (EFSA, 2011a).

### 2.2.3 Determinación de la vida útil

Los consumidores demandan productos seguros, de alta calidad nutricional y con unas características sensoriales aceptables. En este sentido, las guías del *Institute of Food Science and Technology* (IFST, 1993) definen la vida útil como el periodo de tiempo en el que el producto permanece seguro cuando se almacena en las condiciones recomendadas en el envase; por lo tanto mantiene sus características sensoriales, físico-químicas y microbiológicas, a la vez que cumple con las relacionadas con la declaración nutricional.

En alimentos funcionales, además de garantizar la seguridad y las características físicas químicas, hay dos elementos clave que deben de ser garantizados durante la vida útil; la calidad sensorial y la estabilidad de los compuesto bioactivos.

- En alimentos funcionales, el sabor está considerado como un factor crítico (Tuorila & Cardello, 2002; Verbeke, 2006), debido a que muchos de los compuestos bioactivos que se añaden al producto afectan a las características organolépticas (ej. polifenoles: astringencia y amargor) (Lesschaeve & Noble, 2005).
- En cuanto a la estabilidad de los compuestos activos añadidos, aunque la fase de revisión bibliográfica nos puede dar una idea aproximada de si los compuestos bioactivos son estables a determinadas componentes intrínsecos y extrínsecos de los alimentos, hay que tener en cuenta que las matrices alimenticias son muy complejas y diversos compuestos pueden interaccionar entre sí disminuyendo o modificando las propiedades del producto (Valero et al., 2012). En alimentos funcionales es necesario validar la estabilidad de los compuestos activos y del producto en general en condiciones reales de procesado, envasado y almacenamiento (EFSA, 2011a; González-Ferrero & Saiz-Abajo, 2015).

En los últimos años, diferentes procedimientos han sido desarrollados para el establecimiento de la vida útil de un producto; basados principalmente en la detección de la alteración por microorganismos, así como por cambios físico-químicos y sensoriales (Koutsoumanis & Nychas, 2000; McMeekin, 2007; Van Boekel, 2008).

### **2.3 FASE 3. EVALUACION DE LA EFICACIA**

La etapa de evaluación de la eficacia es necesaria siempre que la evidencia científica disponible revisada en la Fase de diseño del alimento funcional (Fase 1) no sea lo suficientemente sólida para demostrar el efecto que se quiera alegar (Korver et al., 2004; Navas-Carretero & Martinez, 2015). A modo de ejemplo, si se quiere hacer una alegación que ya ha sido aprobada por la Comisión Europea como “La Vitamina C contribuye a proteger las células frente al estrés oxidativo” (Reglamento (UE) 432/2012), no es necesario confirmar el efecto con un ensayo clínico, y la empresa alimentaria tan solo debe cumplir con las condiciones de uso incluidas en el Reglamento. Sin embargo, si la evidencia científica de la alegación que se quiere abordar no es lo suficientemente sólida desde el punto de vista científico, es recomendable realizar ensayos clínicos de calidad para demostrar el beneficio.



La evaluación de la eficacia es una etapa clave en el ámbito de los alimentos funcionales (EFSA, 2011a). Para determinar la eficacia potencial de cualquier producto es necesario utilizar modelos de experimentación validados (Richardson et al., 2003). El modelo experimental con mayor valor científico para evaluar la eficacia de cualquier intervención es el ensayo clínico (Harbour & Miller, 2001). Aunque existen diversas definiciones de ensayo clínico, la OMS lo define como cualquier estudio de investigación que de forma prospectiva asigne personas o grupos de personas a una o más intervenciones para evaluar efectos relacionados con la salud. Los ensayos clínicos suelen denominarse también “estudios de intervención”. El ensayo clínico controlado-aleatorizado doble ciego es el método con más peso científico para determinar la eficacia de cualquier intervención experimental ya sea farmacológica, nutricional o comportamental (Harbour & Miller, 2001; OCEBM, 2011).

En la etapa de diseño de un ensayo clínico para demostrar la eficacia de un alimento funcional, hay varios documentos publicados que facilitan el diseño y cumplimiento de los criterios de calidad requeridos por la EFSA en el caso que se quiera solicitar una alegación.

- La guía PASSCLAIM publicada en el año 2005 (Aggett et al., 2005) establecía los criterios científicos necesarios para la validación de alegaciones en alimentos funcionales. La Tabla 2A.9 muestra los 6 criterios clave, que más tarde han sido utilizados por la EFSA para la realización de la guía científica y técnica para la preparación y presentación de solicitudes de autorización de declaraciones saludables (EFSA, 2011a).
- La declaración CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*), que surgió como incitativa para mejorar la calidad de las publicaciones de ensayos clínicos y se desarrolló en 1996 (revisada en el 2001 y 2010), comprende una lista de comprobación de 25 puntos (Tablas 2A.10 y 2A.11) (Altman et al., 2001; Frías-Navarro, D., 2010) para comunicar de forma efectiva un ensayo clínico controlado aleatorizado.

**Tabla 2A.8.** Criterios consensuados para la justificación científica de las declaraciones de salud de acuerdo al proyecto PASSCLAIM (Aggett et al., 2005).

<b>1</b>	<b>El alimento o componente del alimento al cual se atribuye el efecto beneficioso debe estar caracterizado.</b>
<b>2</b>	<p><b>La justificación de una declaración debe estar basada principalmente en datos obtenidos en estudios de intervención en humanos.</b></p> <p><b>El diseño de los estudios de intervención debe incluir las siguientes consideraciones:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Grupos de estudio</b> representativos de la población diana.</li> <li>• <b>Grupos de control</b> adecuados.</li> <li>• <b>Duración de la intervención</b> y seguimiento adecuados para demostrar el efecto propuesto.</li> <li>• <b>Caracterización de la dieta habitual</b> y aspectos más relevantes de los hábitos de vida de los participantes.</li> <li>• <b>Cantidad de alimento</b> o componente activo que se recomienda para conseguir el efecto.</li> <li>• Se ha de tener en cuenta el <b>efecto de la matriz</b> del alimento así como el contexto dietético del efecto funcional.</li> <li>• <b>Monitorización de la ingesta del producto</b> durante el estudio.</li> <li>• Se ha de <b>contrastar estadísticamente</b> la hipótesis.</li> </ul>
<b>3</b>	<b>Cuando el efecto beneficioso no puede evaluarse de forma directa, los estudios de intervención deben emplear biomarcadores.</b>
<b>4</b>	<p><b>Los marcadores deben ser:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Biológicamente válidos.</b> Se han de conocer su relación con el efecto final y la variabilidad dentro de la población.</li> <li>• <b>Metodológicamente válidos</b> en cuanto a sus características analíticas.</li> </ul>
<b>5</b>	<b>Dentro de un estudio de intervención, la variable principal debe cambiar de forma estadísticamente significativa y el cambio observado debe ser biológicamente relevante de acuerdo con la declaración a la que se pretende alegar.</b>
<b>6</b>	<b>Una declaración debe ser comprobada científicamente considerando la totalidad de los datos obtenidos y ponderando la evidencia acumulada.</b>

**Tabla 2A.9. LISTA CONSORT: Criterios necesarios en los apartados de título y resumen, introducción y métodos.**

N	Sección y tema	Descriptor
1	<b>TÍTULO Y RESUMEN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificar la metodología experimental en el título.</li> <li>• Resumen estructurado con métodos, resultados y conclusiones.</li> </ul>
2	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antecedentes científicos, explicación y razonamiento.</li> <li>• Especificar los objetivos o las hipótesis.</li> </ul>
<b>MÉTODOS</b>		
3	<b>Diseño del estudio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descripción del diseño incluyendo la tasa de asignación para cada grupo</li> <li>• Cambios importantes en los métodos después de que el estudio ha comenzado (como criterio de elegibilidad) , señalar las razones.</li> </ul>
4	<b>Participantes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Criterios de elección de los participantes.</li> <li>• Dispositivos y contextos donde los datos fueron recogidos.</li> </ul>
5	<b>Intervenciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precisar con detalle las intervenciones para cada grupo para permitir la replicación, incluir cuándo y cómo fueron realmente administradas.</li> </ul>
6	<b>Resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Definir claramente las evaluaciones de los resultados primarios pre-especificados y la de los secundarios, incluyendo cómo y cuándo se evaluaron.</li> <li>• Cambio en los resultados después de que el estudio ha comenzado, señalar las razones.</li> </ul>
7	<b>Tamaño de la muestra</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cómo fue determinado el tamaño de la muestra.</li> <li>• Cuando sea aplicable, explicar cualquier análisis intermedio y las reglas de finalización.</li> </ul>
8	<b>ALEATORIZACIÓN</b> • <b>Generación de la secuencia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método utilizado para generar la secuencia de asignación aleatoria.</li> <li>• Tipo de aleatorización: incluir detalles de cualquier restricción (como bloqueo y tamaño de bloque).</li> </ul>
9	• <b>Mecanismo de asignación oculta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mecanismo utilizado para implementar la secuencia de asignación aleatoria (como contenedores numerados secuencialmente).</li> </ul>
10	• <b>Implementación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quién genera la secuencia de la asignación aleatoria, quién inscribe a los participantes y quién asigna a los participantes a las intervenciones.</li> </ul>
11	<b>Enmascaramiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si se aplica, quién quedo ciego después de la intervención (por ejemplo, los participantes, los que administraron la intervención, los que evaluaron los resultados) y cómo se evaluó el éxito del proceso de la técnica de enmascaramiento.</li> </ul>
12	<b>Métodos estadísticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Métodos estadísticos utilizados para comparar a los grupos</li> <li>• Métodos para análisis adicionales como análisis de subgrupos o análisis ajustados.</li> </ul>

**Tabla 2A.9.cont. LISTA CONSORT: Criterios necesarios en los apartados de resultados, discusión y otra información necesaria.**

<b>RESULTADOS</b>		
13	Flujo de participantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para cada grupo, el número de participantes que son asignados aleatoriamente, recibiendo el tratamiento previsto y analizado para los resultados primarios.</li> <li>• Para cada grupo, señalar las pérdidas y las exclusiones después de la aleatorización junto con sus razones.</li> </ul>
14	Reclutamiento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fechas indicadoras de los períodos de reclutamiento y seguimiento.</li> <li>• Por qué se terminó el estudio o se detuvo.</li> </ul>
15	Datos de línea base	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Una tabla que muestre las características demográficas y clínicas de cada grupo.</li> </ul>
16	Números analizados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para cada grupo, el número de participantes (denominador) incluido en cada análisis y si el análisis fue realizado con los grupos asignados originalmente.</li> </ul>
17	Resultados y estimación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para cada resultado primario y secundario, los resultados para cada grupo y el tamaño</li> <li>• del efecto estimado y su precisión (como un intervalo de confianza de 95%).</li> <li>• Para resultados dicotómicos, se recomienda presentar tanto los tamaños del efecto</li> <li>• relativos como los absolutos.</li> </ul>
18	Análisis auxiliar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resultados de cualquier otro análisis realizado, incluyendo análisis de subgrupos y análisis ajustados, distinguiendo entre los pre-especificados y los exploratorios.</li> </ul>
19	Eventos adversos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todos los efectos adversos importantes o los efectos no deseados en cada grupo.</li> </ul>
<b>DISCUSIÓN</b>		
20	Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitaciones del estudio, considerar las fuentes de posibles sesgos, imprecisiones y, si es relevante, la multiplicidad de análisis.</li> </ul>
21	Generalización	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generalización de los hallazgos del estudio (validez externa, aplicabilidad).</li> </ul>
22	Interpretación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interpretación consistente con los resultados, equilibrando los efectos de las hipótesis y los posibles efectos de sesgo, y teniendo en cuenta otras pruebas relevantes.</li> </ul>
<b>OTRA INFORMACIÓN</b>		
23	Registro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Registrar el número y el nombre del estudio.</li> </ul>
24	Protocolo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuando el protocolo del estudio pueda consultarse, hacerlo accesible.</li> </ul>
25	Financiación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuentes de financiación y de apoyo (como el suministro de medicamentos) y papel de los financiadores.</li> </ul>

**#2B**

**REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA**

**ESTRÉS  
OXIDATIVO**

the 1990s, the number of people in the UK who are employed in the public sector has increased from 10.5 million to 12.5 million, and the number of people in the public sector who are employed in the health sector has increased from 2.5 million to 3.5 million (Department of Health 2000).

There are a number of reasons for the increase in the number of people employed in the public sector. One reason is that the public sector has become a more important part of the economy. Another reason is that the public sector has become a more attractive place to work. A third reason is that the public sector has become a more important part of the welfare state.

The increase in the number of people employed in the public sector has led to a number of changes in the way that the public sector is organized. One change is that the public sector has become more decentralized. Another change is that the public sector has become more market-oriented. A third change is that the public sector has become more customer-oriented.

The changes in the way that the public sector is organized have led to a number of challenges for the public sector. One challenge is that the public sector has become more complex. Another challenge is that the public sector has become more competitive. A third challenge is that the public sector has become more demanding.

The challenges that the public sector faces are a result of the changes in the way that the public sector is organized. The public sector must find ways to meet these challenges if it is to continue to provide the services that it is expected to provide.

One way that the public sector can meet these challenges is by increasing the number of people employed in the public sector. Another way is by increasing the efficiency of the public sector. A third way is by increasing the quality of the services that the public sector provides.

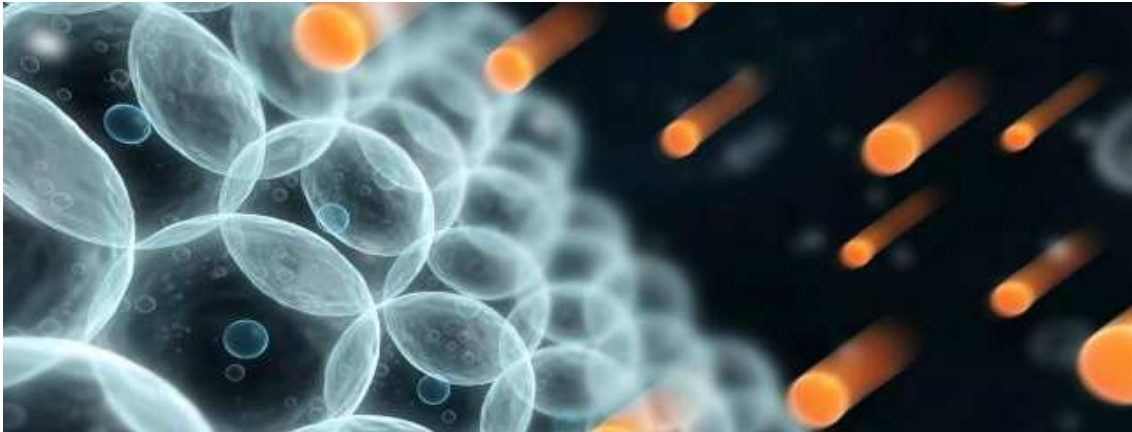
The public sector has a long way to go if it is to meet the challenges that it faces. The public sector must continue to find ways to improve itself if it is to continue to provide the services that it is expected to provide.

The public sector is a complex organization that is constantly changing. The public sector must continue to adapt to the changes that it faces if it is to continue to provide the services that it is expected to provide.

# 2 B

## Estrés oxidativo

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



<b>1. ESTRÉS OXIDATIVO Y HOMEOSTASIS REDOX</b> <i>p33</i>	→	<b>4. ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO</b> <i>p44</i>
<b>2. ESPECIAS REACTIVAS: RADICALES LIBRES Y DERIVADOS</b> <i>p36</i>		<b>5. BIOMARCADORES DE ESTRES OXIDATIVO</b> <i>p46</i>
<b>2.1. FUENTES ENDÓGENAS</b>		<b>5.1. CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES</b>
<b>2.2. FUENTES EXÓGENAS</b>		5.1.1 GSH y GSSG
<b>3. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE</b> <i>p41</i>		<b>5.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL</b>
<b>3.1. SISTEMA ENZIMÁTICO</b>		<b>5.3. BIOMARCADORES DE Peroxidación lipídica</b>
<b>3.2. SISTEMA NO ENZIMÁTICO</b>		5.3.1 MDA (Malondialdehído)
		5.3.2 F-2 Isoprostanos
		5.3.3 LDL oxidada
		<b>5.4. OXIDACIÓN PROTEICA (PROTEÍNAS CARBONILO)</b>
		<b>5.5. LA PROTEÍNA C REACTIVA COMO MARCADOR DE INFLAMACIÓN</b>
		↓
<b>6. LA PIEL COMO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN NUTRICION</b> <i>p55</i>		
<b>6.1 ESTRUCTURA Y SISTEMA DE DEFENSA DE LA PIEL</b>		
<b>6.2 LUZ SOLAR</b>		
<b>6.3 EFECTOS DE LA LUZ SOLAR SOBRE LA PIEL</b>		
6.3.1 Daño al ADN		
6.3.1.1 La proteína p53		
6.3.2 Inmunosupresión		
6.3.3 Eritema y respuesta inflamatoria		
6.3.4 Envejecimiento prematuro o fotoenvejecimiento		

## 1. ESTRÉS OXIDATIVO Y HOMEOSTASIS REDOX

El término estrés oxidativo fue empleado por primera vez por Sies en 1986, y lo definió como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a nivel celular o individual (Sies, 1986). Posteriormente, amplió su definición especificando que el estrés oxidativo es un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, que produce un daño en los tejidos (Sies, 1991) (Figura 2B.1).

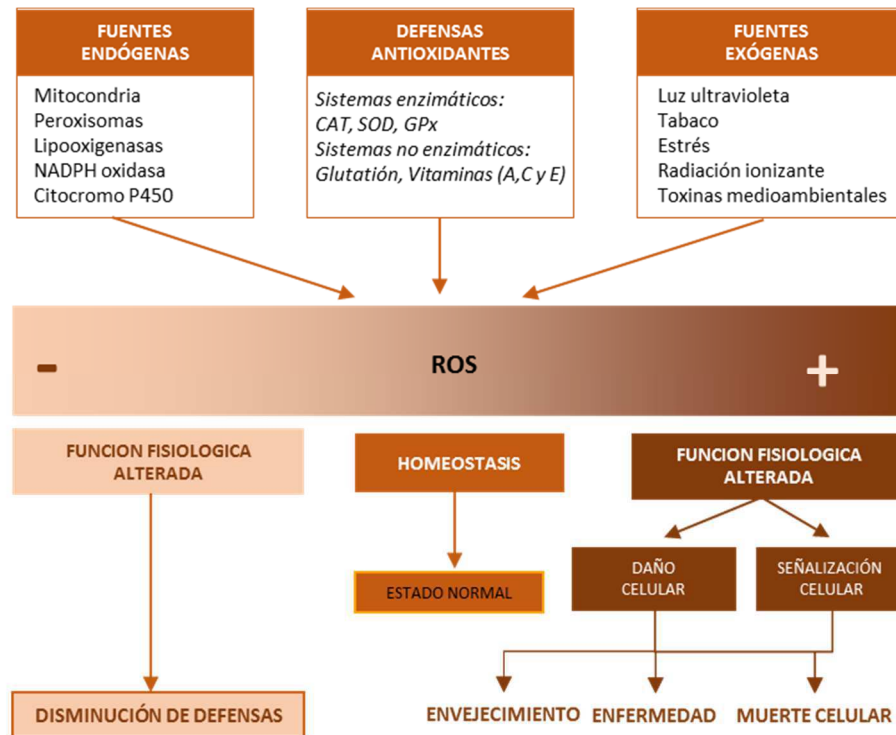


**Figura 2B.1.** Esquema general simplificado del estrés oxidativo.

El mantenimiento del equilibrio entre oxidantes (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) y antioxidantes, se le denomina «homeostasis redox» (Dröge, 2002), y su principal papel fisiológico es proteger a los organismos del estrés oxidativo.

El cuerpo humano está bien adaptado a las consecuencias de la vida aeróbica, pero la eliminación de oxidantes no es 100% efectiva, por lo que cuando hay una acumulación de agentes oxidantes se producen daños en componentes celulares como los lípidos (Girotti, 1998), proteínas (Berlett y Stadtman, 1997) y ADN (Beckman & Ames, 1997). Paradójicamente, es esencial que las células y tejidos del cuerpo produzcan un nivel apropiado de radicales libres (RL), ya que actúan como señalizadores celulares (Dröge, 2002; Valko et al., 2007), y en determinadas circunstancias, altas concentraciones de RL en lugares específicos, forman parte de nuestro sistema inmunitario. Por tanto, existe un complicadísimo mecanismo regulador que controla la síntesis y la eliminación de especies reactivas de oxígeno para mantener el correcto funcionamiento celular (Finkel & Holbrook 2000; Valko et al., 2007). La Figura 2B.2, adaptada de Finkel & Holbrook (2000), describe de una forma más detallada la importancia de los oxidantes en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos.





**Figura 2B.2.** Fuentes y respuestas celulares de los ROS (Especies Reactivas de Oxígeno). Adaptado de Finkel & Holbrook (2000).

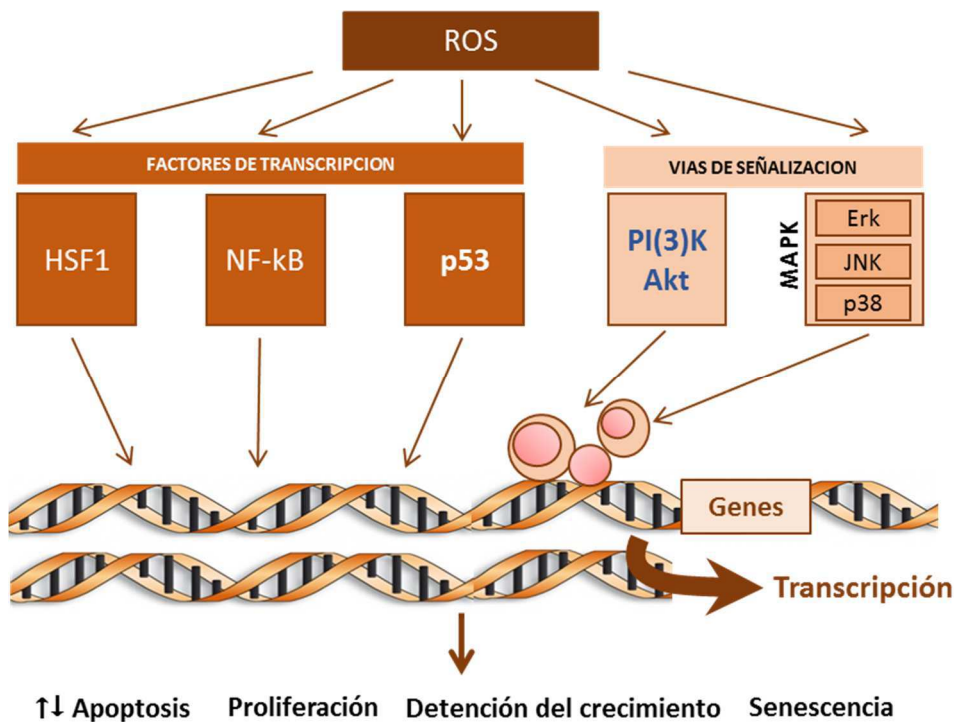
Finkel & Holbrook (2000) describen como en condiciones normales la cantidad de RL está controlada por el sistema antioxidante endógeno. Sin embargo, en diferentes situaciones el equilibrio se desplaza dando lugar a estrés oxidativo que puede comprometer el correcto funcionamiento de las células y consecuentemente iniciar diversos estados patológicos (Figura 2B.2). Según Halliwell y Whiteman (2004), el estrés oxidativo puede originarse bien por la disminución de los niveles de antioxidantes (ej.: alimentación deficiente, mutación de enzimas antioxidantes), o por incremento en la producción de especies reactivas (ej., exposición a sustancias tóxicas como el tabaco).

Cuando el estrés oxidativo es severo, la supervivencia de la célula depende de su capacidad a adaptarse, resistir el estrés y repararse. Pero también las células responden al daño produciendo apoptosis. Por tanto, según Halliwell (2005) las consecuencias del estrés oxidativo pueden originar diferentes escenarios:

- **Escenario 1. LA ADAPTACION.** La célula se adapta mediante la regulación de los sistemas de defensa antioxidante. En este caso la célula puede: 1) protegerse completamente; 2) parcialmente ó 3) sobreprotegerse y hacerse resistente a futuros niveles altos de estrés oxidativo.

- **Escenario 2. DAÑO CELULAR.** La célula no se pueda proteger y consecuentemente se produce un daño celular (daño oxidativo) en cualquiera o en todos los componentes celulares: lípidos, ADN, proteínas e hidratos de carbono.
- **Escenario 3. MUERTE CELULAR.** La célula muere, especialmente si se ha producido daño oxidativo en el ADN. La muerte puede ser por apoptosis (muerte celular programada) o por necrosis.

Estas respuestas celulares son producidas mediante diversos mecanismos que actúan de forma coordinada para preservar la célula a lo largo de la evolución (Finkel y Holbrook, 2000). Los principales mecanismos de señalización celular en respuesta al daño oxidativo se muestran en la Figura 2B.3.



**Figura 2B.3.** Mecanismos de señalización celular de los ROS (Especies Reactivas de Oxígeno). Adaptado de Finkel & Holbrook (2000).

En respuesta al estrés oxidativo, la célula activa rutas de señalización y factores de transcripción específicos que activan la expresión de proteínas antioxidantes encargadas de reestablecer los niveles redox intracelulares y de reparar los desperfectos causados por estos oxidantes (Valko et al., 2007). Cada vez hay más estudios publicados sobre los mecanismos por los cuales los ROS modulan las cascadas de transducción de señales y la expresión de genes ya que la comprensión de estas rutas puede ser de gran utilidad para entender mejor la fisiopatología de las enfermedades asociadas en estos.

Los principales protagonistas de estos procesos fisiológicos son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y nuestro sistema de defensa antioxidante. A su estudio dedicamos los dos siguientes epígrafes.

## 2. ESPECIAS REACTIVAS: RADICALES LIBRES Y DERIVADOS

Los Radicales Libres (RL) pueden ser definidos como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su órbita externa lo que le confiere una gran reactividad (Halliwell & Gutteridge, 1999). Los RL pueden provenir tanto del oxígeno (ROS) como del Nitrógeno (RNS), siendo los primeros la clase más importante de RL en organismos vivos (Miller, Buettner, y Aust, 1990). Los ROS y RNS pueden ser convertidos en especies no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipocloroso (HClO) y el peroxinitrito (ONOO-) (Diplock, 1991).

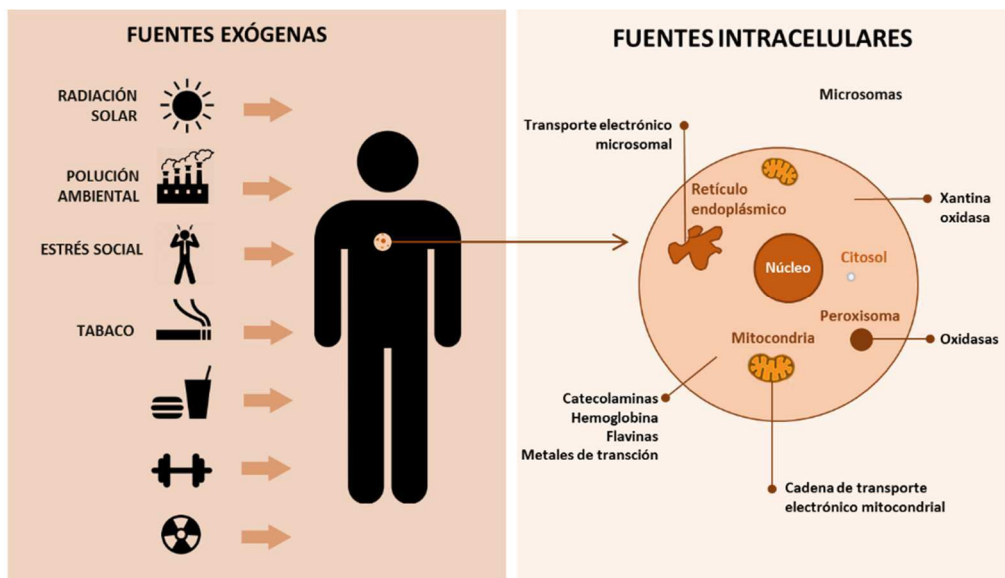
Tanto los ROS como los RNS y derivados son producidos por animales y humanos bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Los RL y derivados son productos del metabolismo celular y tienen la dualidad de ser tanto perjudiciales como beneficiosos (Valko et al., 2007), tal y como describimos en la Tabla 2B.1.

Los efectos beneficiosos de los RL se dan a concentraciones bajas/moderadas y tienen un papel fisiológico importante al actuar como mensajeros intracelulares y activar múltiples procesos fisiológicos (Hensley et al., 2000). Los efectos perjudiciales se producen cuando hay una sobreproducción de estos o nuestros sistemas de defensa antioxidantes son deficientes.

**Tabla 2B.1.** Ejemplos de algunos efectos positivos y negativos de los Radicales Libres.

Efecto	Papel fisiológico	Ejemplo
+	<b>Regulación del tono vascular y adhesión plaquetaria</b>	A finales de los 80 se descubrió el papel del NO como molécula implicada en el control del músculo liso y de la agregación plaquetaria (Moncada et al., 1991)
	<b>Modulación de la respuesta inmunológica</b>	El NO generado por macrófagos activa la respuesta inmunitaria (Freidovisc, 2009). En defensa de microorganismos externos, activación de la NAD(P)H de leucocitos para la producción de ROS (Thannickal et al., 1995)
-	<b>Oxidación de ADN</b>	El radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) es capaz de modificar las bases del ADN. Este daño está involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Valko et al., 2007)
	<b>Oxidación de proteínas</b>	El radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) es capaz de dañar las proteínas y alterar su conformación y funciones biológicas (actividades enzimáticas, transmisión de señales, etc. (Yu, 1990; Valko et al., 2007).
	<b>Oxidación de lípidos</b>	Alteración de la estructura, fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares. (Halliwell y Gutteridge, 1989)
	<b>Alteración de enzimas</b>	La radiación Luz ultravioleta (UV) altera la propiedades de SOD, aumentando el daño oxidativo en la células (Pence & Naylor, 1990)
	<b>Disfunción endotelial</b>	Los ROS pueden dañar la ruta de señalización del NO produciendo disfunción endotelial (Schulz et al., 2008)

Tal y como se representa en la Figura 2B.4, todas las células de nuestro cuerpo están continuamente expuestas a una gran cantidad de oxidantes (ROS y RNS) que provienen tanto de fuentes endógenas como exógenas (Frei, 1994). Al estudio de las primeras dedicamos el siguiente subepígrafe.



**Figura 2B.4.** Fuentes exógenas y fuentes intracelulares de ROS, RNS y derivados.

## 2.1 FUENTES ENDÓGENAS DE RADICALES LIBRES

Las RL pueden ser generados en muchos compartimentos celulares pero la fuente principal es la mitocondria (Boveris & Chance, 1973). En la mitocondria, del 1-5% del oxígeno que se utiliza para la obtención de energía deriva de la formación de distintas especies de ROS, tales como el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de oxígeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) (Valko et al., 2007)

La Tabla 2B.2 muestra los RL más relevantes, las características principales, el origen así como diversas manifestaciones de los procesos fisiológicos de los que forman parte.

**Tabla 2B.2. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) presentes en sistemas biológicos.**

Especia Reactiva	Características	Lugar/Enzimas implicadas	Papel Fisiológico
$O_2^-$ Anión Superóxido	Radical más abundante/Poco reactivo	Células fagocitarias Exógena NAD(P)H oxidasa Citocromo P450 NOX <sub>2</sub> Mitocondria	Control de ventilación Relajación muscular Señalización celular/aumento defensas inmunológicas Respuesta al estrés oxidativo y mantenimiento de la homeostasis redox
$OH\bullet$ Radical Hidroxilo	Radical más reactivo Vida muy corta	Mitocondria Exógena (Metales) Exógena (Radiación)	Daño ADN Mutagénesis Oxidación de lípidos, proteínas y ADN Carcinogénesis Envejecimiento
$H_2O_2$ Peróxido de Hidrogeno	No es un radical/ Muy estable / Capaz de atravesar membranas biológicas	Mitocondria Citocromo P450 (monoxigenasas) Peroxisomas Macrófagos/células inflamatorias	Defensa microbiana Control del ciclo celular Expresión de genes inflamatorios
$NO\bullet$ Óxido Nítrico	Es un gas/ Señalización y funciones protectoras	Células endoteliales, neuronas, Macrófagos, células inflamatorias  NOS (enzimática) NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (no enzimática)	Modulación del tono vascular Agregación Plaquetaria Angiogénesis Respuesta inmune Trasmisión Neuronal generación de lipoperóxidos
$ONOO^-$ Peroxinitrito	No radical/ efecto tóxico a largo plazo	$\bullet NO + \bullet O_2^- = ONOO^-$	Estimula diferentes procesos inflamatorios Daño oxidativo a lípidos, ADN y proteínas

Además de en la mitocondria, existen otras fuentes productoras de RL y derivados que a continuación pasamos a describir:

- Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos una vez activados) utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente anión superóxido ( $O_2^-$ ) (Babior, 1999). Además, estas células también producen óxido nítrico (NO) como mecanismo de defensa mediante la óxido nítrico sintasa inducible a partir de la arginina intracelular. La combinación del  $O_2^-$  con el NO da lugar a la formación del peroxinitrito  $ONOO^-$  (Halliwell & Gutteride, 1990). También generan HClO mediante la actividad de la mieloperoxidasa (van der Veen et al., 2009).
- En los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico. (ej; citocromo p450), las monoxigenasas contribuyen al aumento intracelular de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ .
- Algunas enzimas también generan RL durante su ciclo catalítico, especialmente las citosólicas. Por ejemplo, una importante fuente de RL es la xantina oxidasa. Esta enzima, en condiciones normales oxida xantina a ácido úrico utilizando  $NAD^+$  (Freeman & Crapo, 1982).
- La autoxidación de pequeñas moléculas como las catecolaminas, dopaminas, y tioles entre otros, pueden ser una importante fuente productora de ROS. En la mayoría de los casos, el producto resultante de la auto-oxidación es el anión superóxido (Thannickal & Fanburg, 2000).
- Los peroxisomas son organelas que consumen oxígeno y también contribuyen a la producción de RL. La producción de RL en los peroxisomas es producida por oxidasas, las cuales producen  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  (Schrader & Fahimi 2006).

## 2.2 FUENTES EXÓGENAS DE OXIDANTES

Las alteraciones en el equilibrio redox hacia procesos oxidativos pueden ser ocasionadas por diferentes circunstancias, muchas de las cuales son características del actual tipo de vida. En la Tabla 2B.3 se exponen las fuentes productoras de RL más comunes con varios ejemplos.

**Tabla 2B.3. Fuentes exógenas de radicales libres.**

Fuente	Ejemplos
<b>Tabaquismo</b>	Los fumadores tienen un nivel aumentado de isoprostanos en sangre debido a la inhalación voluntaria de oxidantes como los radicales tar (Pryor., 1993; van der Vaart et al., 2004).
<b>Exceso de exposición solar</b>	La luz ultravioleta B (UVB) produce directamente mutaciones del ADN que pueden favorecer la carcinogénesis cutánea y la luz ultravioleta A (UVA) aumenta la producción de RL que alteran la replicación celular (Rittié & Fisher, 2002; Sies & Stahl, 2004).
<b>Polución ambiental</b>	Diversas sustancias que encontramos diariamente en nuestro entorno como pesticidas, arsénico, mercurio y plomo entre otros, son mediadoras de una gran variedad de efectos tóxicos, tales como daño el daño a ADN o genotoxicidad (Franco et al., 2009).
<b>Hábitos alimenticios inadecuados</b>	Una dieta rica en grasas polinsaturadas y baja en antioxidantes alimentarios pueden debilitar el sistema de defensa antioxidante y consecuentemente aumentar la producción de RL (Sies et al., 2005).
<b>Ejercicio físico ocasional y agotador</b>	El ejercicio físico agotador aumenta la producción de RL (Vollaard et al., 2005).
<b>Estrés social</b>	El stress emocional está asociado a niveles más elevados de marcadores de estrés oxidativo. El estrés aumenta el metabolismo de catecolaminas, el cual aumenta la producción de RL. Por ejemplo, el estrés académico o falta de sueño están asociados a una menor concentración de antioxidantes en sangre. (Everson et al., 2005; Eskiocak et al., 2005).

Una vez descritas las fuentes endógenas y exógenas de oxidantes, a continuación nos centramos en los sistemas de defensa antioxidante.

### 3. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Halliwell et al., 1995). Las células, tejidos y fluidos biológicos de nuestro cuerpo están equipados con un potente sistema de defensa antioxidante que ayuda a contrarrestar el daño oxidativo. Como podemos ver en la Figura 2B.5, estos sistemas antioxidantes pueden clasificarse en dos grandes grupos: enzimáticos y no enzimáticos.

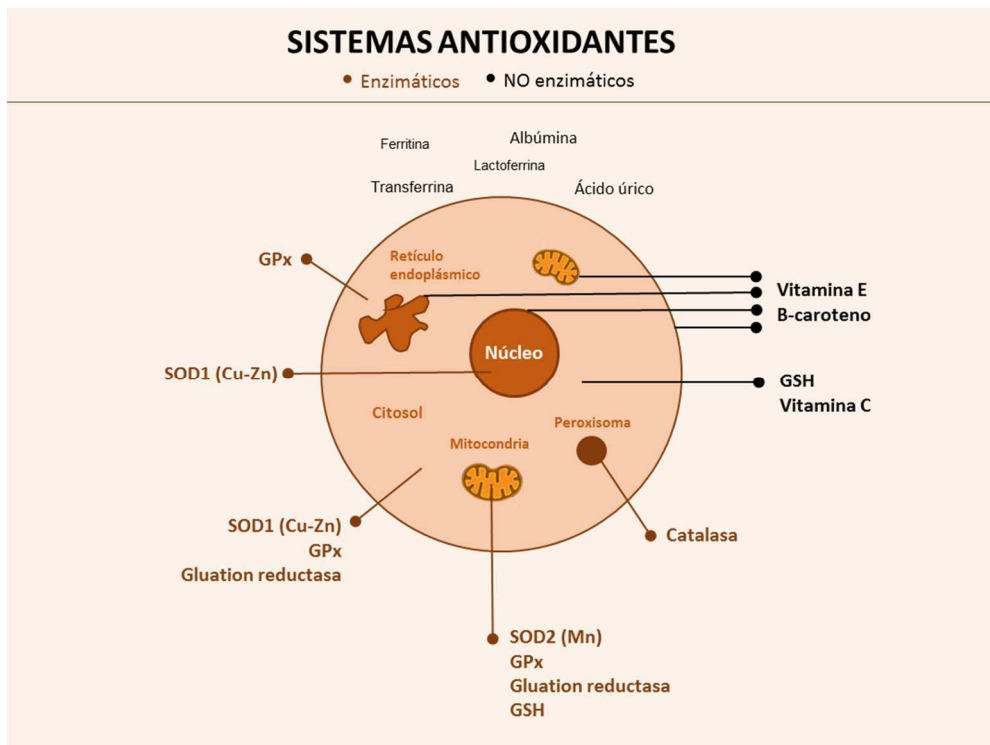


Figura 2B.5. Sistemas de defensa antioxidante.

#### 3.1 SISTEMA ENZIMÁTICO DE DEFENSA

Las células disponen de una serie de enzimas que disminuyen las concentraciones intra e intercelulares de los ROS, interviniendo en la homeostasis redox y que se describen a continuación.

- **Superóxido dismutasas (SOD).** Es una familia de proteínas enzimáticas que actúan sobre el anión superóxido, produciendo  $H_2O_2$  y oxígeno molecular (Kohen et al., 2002). Dentro de esta familia se distinguen tres isoenzimas que se diferencian en su contenido metálico y su localización en la célula (Tabla 2B.4).



**Tabla 2B.4.** Tipos de SOD en la célula.

	Contenido metálico	Localización celular
SOD <sub>1</sub>	Cu-Zn	Citoplasma
SOD <sub>2</sub>	Mn	Mitocondria
SOD <sub>3</sub>	Cu-Zn	Extracelular

- **Catalasa (CAT).** Se trata de una de las enzimas más abundantes en la naturaleza, que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. Su actividad varía en función del tejido, siendo más elevada en el hígado y los riñones. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, aunque en los eritrocitos se encuentra en el citosol (Chance y Maehly, 1955). La catalasa cataliza la degradación de dos moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar agua y oxígeno molecular.
- **Glutation peroxidasa (GPx).** La GPx es un complejo enzimático que contiene selenio en su centro activo y elimina los H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como otros peróxidos de origen lipídico. Las reacciones de reducción se acoplan a la oxidación de Glutation (GSH) y como resultado se produce GSSG (glutación reducido) que a su vez se regenera para reutilizarse en ciclos posteriores.
- **Glutation reductasa.** Se encarga de regenerar el Glutation (GSH) a partir de GSSG (glutación reducido).

### 3.2 SISTEMA NO ENZIMÁTICO DE DEFENSA

Numerosas moléculas han demostrado tener capacidad antioxidante *in vitro*. Estas pueden ser sintetizadas por el propio (ej: ácido úrico), mientras que otras son aportadas mediante la alimentación (ej: polifenoles).

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen el glutatión, las vitaminas A, C y E, los carotenoides, el ácido  $\alpha$ -lipoico, oligoelementos como el cobre, el zinc y el selenio, la coenzima Q10 (CoQ10), y cofactores, como el ácido fólico, ácido úrico, albúmina y vitaminas del grupo B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>. La dieta es la mayor fuente de este tipo de antioxidantes, así como de elementos que son utilizados para la síntesis de enzimas antioxidantes.

La definición *cualquier producto que inhibe la oxidación in vitro o reduce el estrés oxidativo in vivo* de antioxidante alimentario propuesta por el *Panel on Dietary Antioxidants and*

*Related Compounds of the Food and Nutrition Board* del Instituto de Salud Americano es “cualquier sustancia presente en los alimentos que significativamente reduce los efectos adversos de los ROS, RNS o ambos, bajo condiciones fisiológicas normales en humanos”. En clínica la definición de antioxidante es “cualquier producto que inhibe la oxidación in vitro o reduce el estrés oxidativo in vivo” (Cornelli, 2009). Esta definición incluye tanto los antioxidantes de alimentos como endógenos.

La Tabla 2B.5 muestra los principales antioxidantes no enzimáticos endógenos y exógenos, sus características y funciones principales:

**Tabla 2B.5. Principales antioxidantes no enzimáticos.**

Antioxidantes no enzimáticos		Descripción y funciones
ENDÓGENOS	Glutación	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tiol libre más abundante de las células.</li> <li>Elemento central de muchos sistemas detoxificadores enzimáticos (GSH peroxidasa y GSH reductasa, ligadas al selenio).</li> <li>Encargado de mantener el ambiente redox intracelular para el correcto funcionamiento de las proteínas celulares.</li> <li>Implicado en la síntesis de ADN.</li> </ul>
	Transferrina y Lactoferrina (extracelular)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glucoproteínas que secuestran hierro y lo transportan por la sangre.</li> <li>Puede actuar como prooxidante cuando están saturadas de hierro.</li> </ul>
	Ácido Úrico	<ul style="list-style-type: none"> <li>Captador de Oxígeno singlete y otros RL.</li> <li>Puede acomplejar metales de transición como hierro y cobre.</li> </ul>
	Bilirrubina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Captación de radicales peroxilo.</li> </ul>
	Albumina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transportan cobre en plasma.</li> <li>Inhibe generación de radicales hidroxilo.</li> </ul>
EXOGENOS	Polifenoles	<ul style="list-style-type: none"> <li>Actividad quelante de metales y captación de RL.</li> </ul>
	Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> <li>Protección de membranas neutralizando radicales superóxido hidroxilo y lipoperoxilo a formas menos reactivas.</li> <li>Existe en 8 formas diferentes, de las cuales <math>\alpha</math>-tocoferol es la forma más activa en los humanos.</li> </ul>
	Vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regeneración de tocoferoles e inactivación RL.</li> <li>En concentraciones altas puede actuar como prooxidante en presencia de hierro y cobre.</li> </ul>
	Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neutraliza diversos ROS, incluido el radical superóxido y radicales peroxilo</li> <li>En concentraciones altas pueden actuar como pro-oxidantes.</li> </ul>
	Selenio	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ayuda a la eliminación de radicales peróxidos.</li> </ul>
	Zinc	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neutraliza RL y elimina metales pesados.</li> </ul>

#### 4. ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un proceso fisiológico complejo que está relacionado con varias condiciones patológicas como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y envejecimiento (Valko et al., 2007).

El estrés oxidativo está estrechamente ligado a la inflamación (Bondia-Pons et al., 2012), y en algunas de estas patologías como la aterosclerosis, el estrés oxidativo juega un papel importante en su inicio y evolución (Witztum & Steinberg, 2001). Otras enfermedades como el cáncer y la diabetes forman parte de lo que es llamado “estrés oxidativo mitocondrial” donde oxidantes producidos en la mitocondria adquieren un rol relevante en la patogénesis de la enfermedad (Valko et al., 2007).

En relación al envejecimiento, diversos estudios sugieren que la eficiencia de eliminación de ROS disminuye con la edad (Ames y Shigenaga, 1992) aunque existe controversia en este sentido. De hecho, la teoría del envejecimiento asociada a los RL, sugerida por Harman en 1956, ha servido como base para la investigación de los antioxidantes. De acuerdo a esta teoría, los RL producidos durante el metabolismo del oxígeno causan daño a las células, lo cual conduce a alteraciones en el metabolismo y función celulares que se reflejan en alteraciones en las funciones fisiológicas del organismo. La idea general que propuso Harman es que nuestro sistema de defensa antioxidante no es capaz de detoxificar las especies reactivas de oxígeno que se generan a lo largo de la vida. Dicho de otra forma, el envejecimiento celular está asociado a estrés crónico.

Gracias a la gran cantidad de estudios realizados con marcadores de estrés oxidativo en sujetos sanos y sujetos con diferentes patologías, hay una evidencia cada más sólida entre la asociación de estrés oxidativo y enfermedad. La Tabla 2B.6 muestra diversos ejemplos de situaciones y enfermedades donde los niveles de marcadores de estrés oxidativo están alterados.

Tabla 2B.6. Situaciones con niveles de estrés oxidativo elevado

Enfermedad/Condición	Principal mecanismo involucrado	Marcador de estrés oxidativo	Referencias
<b>Envejecimiento</b>	Oxidación progresiva/continuada de lípidos, proteínas y ADN.	Proteínas carbonilo GSH	Gil et al., 2006 Finkel & Holbrook, 2000
<b>Enfermedades cardiovasculares/ Aterosclerosis</b>	Peroxidación lipídica. Oxidación de la LDL	F2-isoprostanes LDL ox MDA GSH/GSSG ratio	Roest et al., 2008 Dusting & Triggle, 2005 Viigimaa et al., 2010
<b>Cáncer</b>	Oxidación del ADN, proteínas y/o lípidos causando inestabilidad cromosómica, mutación genética y/o modulación del crecimiento celular.	MDA GSH/GSSG ratio 8-OH-dG F2-isoprostanes	Cheeseman., 1993 Navarro et al., 1999 Obtułowicz et al., 2010 Kong et al., 2014
<b>Diabetes</b>	Peroxidación lipídica.	MDA GSH/GSSG ratio F2-isoprostanes	Reardon et al., 1992 Samiec et al., 1998 Urakawa et al., 2003
<b>Enfermedades neurodegenerativas/ Alzheimer</b>	Peroxidación lipídica y oxidación de proteínas. Desregulación de la homeostasis del GSH y desactivación de enzimas dependientes de la GSH.	MDA Proteínas carbonilo GSH/GSSG ratio F2-isoprostanes	Greilberger et al., 2008 Montine et al., 2004 Cristalli et al., 2102
<b>Tabaquismo</b>	Peroxidación lipídica.	F2-isoprostanes	van der Vaart et al., 2004
<b>Obesidad</b>	Peroxidación lipídica.	MDA F2-isoprostanos	Van Gaal et al., 1998 Urakawa et al., 2003
<b>Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)</b>	Peroxidación lipídica.	MDA	de Vega et al., 2002

## 5. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Los marcadores biológicos son herramientas esenciales para demostrar el efecto de los alimentos funcionales (Agget et al., 2005). Un biomarcador se define como una característica que puede ser medida y evaluada objetivamente, e indica el estado de cualquier proceso biológico, patológico o respuesta a un tratamiento (Dalle-Done et al., 2006).

De acuerdo Pérez Gastell y Pérez de Alejo (2000), existen dos estrategias diferenciadas para medir el estrés oxidativo y que pueden ser utilizados como biomarcadores:

- Los métodos directos, los cuales miden la cantidad de antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) y la cantidad de RL (ROS/RNS). La detección directa de RL no se suele utilizar en clínica por la gran inestabilidad, reactividad, y corta vida de los RL, además del alto coste de los equipos necesarios para la detección. En cuanto a la estimación directa de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, también tienen problemas de interpretación (Dalle-Done et al., 2006).
- Los métodos indirectos son los más utilizados y determinan los subproductos originados por el ataque de los RL a las macromoléculas.

La Figura 2B.6 muestra los tipos de biomarcadores más utilizados en el campo del estrés oxidativo.

### BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

PRODUCTOS DE LA OXIDACIÓN	ANTIOXIDANTES
<p><b>Peroxidación lipídica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• F-2 isoprostanos</li> <li>• Malondialdehido</li> <li>• LDL oxidada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glutatión</li> <li>• Ascorbato</li> <li>• alfa-tocoferol</li> <li>• Carotenoides</li> <li>• Capacidad antioxidante</li> <li>• Superóxido dismutasa (SOD)</li> </ul>
<p><b>Oxidación de proteínas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteínas carbonilo</li> </ul>	<p><b>ESTADO REDOX</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• GSH/GSSG ratio</li> </ul>
<p><b>Oxidación de ADN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8-OH-dG</li> </ul>	

Figura 2B.6. Ejemplos de biomarcadores de estrés oxidativo

## 5.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES

La medición de los niveles de antioxidantes es útil para confirmar la presencia de los compuestos bioactivos, o para identificar una deficiencia; sin embargo la interpretación de estos datos es muy limitada debido a las complejas interacciones que se producen para mantener el equilibrio redox.

### 5.1.1 GSH y GSSG

Uno de los métodos directos más utilizados es la medida del **GSH** (y sus formas disulfido GSSG y GSSH) en sangre ya que está considerada como un índice del status redox intracelular y un buen indicador de riesgo de enfermedad (Schafer et al., 2001; Pastore et al., 2003; Rossi et al., 2002). El GSH está involucrado en varias enfermedades como aterosclerosis y artritis reumatoide, en las cuales su concentración normal es reducida y por otro lado la concentración de su forma oxidada (GSSG) está aumentada (Uhlir y Wendel, 1992).

## 5.2 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

En la Tabla 2B.7 hemos recogido los principales métodos para medir capacidad antioxidante, y que han sido revisados por diferentes autores (Sies, 2007; Huang et al., 2005, Prior et al., 2005; Bartosz, 2003). A pesar del alto número de publicaciones en ensayos clínicos humanos, a día de hoy hay controversia en cuanto a su utilidad en ensayos en humanos para determinar la efectividad de los alimentos antioxidantes (Sies, 2007; Halliwell, 2009; Niki, 2010).

**Tabla 2B.7. Métodos utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante.**

Método	Principio / (TÉCNICA)	Referencia
<b>FRAP</b> FERRIC REDUCING/ANTIOXIDANT POWER	Reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido. (ESPECTROFOTOMETRIA)	Benzie & Strain, 1996
<b>ORAC</b> OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY	Captación de radicales peroxilo generados a partir del AAPH y la oxidación de $\beta$ -Ficoeritrina. (FLUOROMETRIA)	Cao et al., 1993
<b>TEAC</b> TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY	Capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS. La captura produce un descenso en la absorbancia a 658 nm. (ESPECTROFOTOMETRIA)	van den Berg et al., 1999
<b>TRAP<sup>FL</sup> o CL</b> TOTAL RADICAL TRAPPING ANTIOXIDANT PARAMETER	Captación de radicales peroxilo generados a partir del ABAP y oxidación de $\beta$ -Ficoeritrina <sup>FL</sup> (FLUOROMETRIA) o lumino <sup>CL</sup> . (QUIMIOLUMINISCENCIA)	Ghiselli et al., 1995

ABTS: 2,2-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonato); AAPH:2, dihidrocloruro 2'-diazobis (2-amidinopropano); **ABAP** :2,2'-azobis (2-amidinopropano clorhidrato);

De cualquier forma, estos métodos carecen de especificidad debido a que no discriminan otras sustancias antioxidantes presente en mayor cantidad en el plasma como son el ácido úrico, ascorbato, bilirrubina, proteínas (albumina, ceruloplasmina y transferrina), enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), GSH y otros antioxidantes como carotenoides, vitamina E y compuestos fenólicos (Wayner et al., 1987; Halliwell y Whiteman, 2004). Dependiendo del método utilizado, los principales antioxidantes del plasma (albumina, urato y ascorbato) contribuyen en mayor o menor medida a la capacidad antioxidante total (Cao et al., 1993; Rice-Evans, 2000).

Sin embargo en alimentos, el método más utilizado para evaluar la capacidad antioxidante es el ORAC (Wu et al., 2004). En el año 2007, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) publicó la primera lista sobre el valor ORAC de 277 alimentos (Haytowitz et al., 2007). Tras la última actualización en el 2010, la lista contiene el valor ORAC de 326 alimentos (Haytowitz et al., 2010). No obstante, la capacidad antioxidante de un alimento no refleja ni las condiciones fisiológicas celulares ni la biodisponibilidad y metabolismo de sus componentes (Sies, 2007).

Como hemos comentado anteriormente, el estrés oxidativo ocasiona daños en diversos componentes biológicos como los lípidos, las proteínas y el ADN. Los subproductos obtenidos pueden ser medidos para evaluar los niveles de estrés oxidativo y son considerados como marcadores indirectos de estrés oxidativo (Pérez Gastell y Pérez de Alejo, 2000). A continuación nos centramos en los marcadores que hemos determinado en nuestro estudio.

### 5.3 BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los lípidos pueden ser oxidados por un gran número de ROS y otros radicales. El resultado del contacto de los lípidos de las membranas con un agente oxidante se denomina peroxidación lipídica, y es un proceso complejo que produce varios productos, incluidos los F2-isoprostanos, malondialdehído 4-hidroxi-2-nonenal y los alcanos, etano, pentano y isopreno en diferentes cantidades (Halliwell & Whiteman, 2004).

Este daño celular ocasionado por los RL trae como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, perturbando su fluidez, inactivando determinados receptores y enzimas, y provocando daño en su integridad) y por tanto alterando el funcionamiento de la célula (Halliwell & Whiteman, 2004).

La peroxidación lipídica es iniciada principalmente por radicales hidroxilo. Los productos primarios de esta son los hidroperóxidos, moléculas relativamente estables, pero se pueden descomponer mediante la reacción con iones metálicos (tales como el hierro y cobre) o proteínas (como la hemoglobina) (Repine et al., 1997).

La descomposición de hidroperóxidos genera una mezcla compleja de productos secundarios de peroxidación lipídica como el malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e hidrocarburos gaseosos (etano, pentano). Los aldehídos (MDA, 4-HNE) además de ser citotóxicos, son capaces de moverse fácilmente por la célula e incluso salir de ella para atacar sitios lejos del lugar de donde se han producido (Dalle-Donne et al., 2006), por lo que pueden ser considerados mensajeros secundarios citotóxicos (Uchida, 2003).

Además, la peroxidación lipídica puede incrementar el daño oxidativo a otros componentes celulares, principalmente proteínas, ADN y fosfolípidos, formando productos estables que tras varias reacciones, alteran las funciones celulares, contribuyendo a la patogénesis de varias enfermedades (Dalle-Donne et al., 2006).



### 5.3.1 MDA (Malondialdehído)

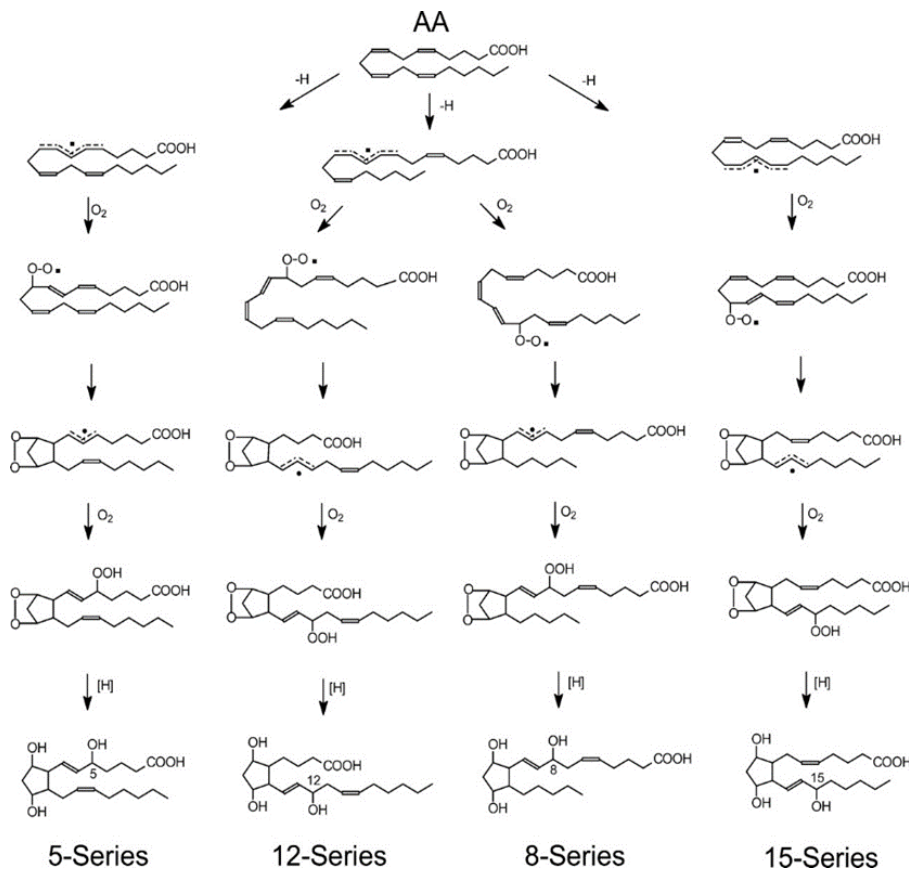
El Malondialdehído (MDA) es uno de los productos formados *in vivo* vía peroxidación de ácidos grasos polinsaturados y uno de los marcadores de peroxidación lipídica más utilizado (Niki, 2014). Durante la peroxidación, los peróxidos se descomponen en aldehídos como el MDA que es altamente tóxico. Su vida media y alta reactividad le permite actuar tanto en el interior como en el exterior de las células interactuando con proteínas y DNA (Del Rio et al., 2005) y consecuentemente está implicado en diferentes procesos fisiopatológicos. El MDA interacciona con proteínas como los residuos de lisina en la apolipoproteína B-100 dando lugar a la oxidación de LDL; contribuyendo, por tanto, al proceso de aterosclerosis. Así mismo, su interacción con el DNA muestra un potencial genotóxico (Del Rio et al., 2005), y genera aductos de ADN que originan mutaciones y alteran la expresión génica (Gönenc et al., 2001; Akbulut et al., 2003).

Existen diferentes métodos para determinar el MDA. En general, el método para la determinación del malondialdehído (MDA) se basa en la detección por la reacción con el ácido tiobarbitúrico en condiciones ácidas que lleva a la formación de un producto coloreado susceptible de ser medido directamente por espectrofotometría (Gutteridge & Halliwell, 1990). A pesar de ser un método poco específico y que pueden producirse artefactos durante los procesos analíticos, es uno de los métodos más utilizados como biomarcador de peroxidación lipídica debido a su sencillez y bajo coste (Lykkesfeldt, 2007). Con el objeto de mejorar la especificidad, diferentes métodos con HPLC han sido desarrollados. Por ejemplo, los aductos de MDA-TBA son medidos por HPLC con UV/VIS o HPLC-fluorescencia (Lykkesfeldt, 2007). También se han desarrollado métodos por GC-MS y electroforesis capilar de alta eficacia (Mateos & Bravo, 2007)

No existen niveles de referencia de MDA. En general los valores de MDA en plasma suelen ser mayores a 1  $\mu\text{M}$  (Lykkesfeldt, 2007). Se han descrito niveles aumentados de MDA en sujetos con cáncer de pecho (Akbulut et al., 2003; do Val Carneiro et al., 2009), glaucoma (Nucci et al., 20013), fibrosis quística y otras enfermedades pulmonares (do Val Carneiro et al., 2014), diabetes y aterosclerosis (Danne-Donne et al., 2006).

### 5.3.2 F<sub>2</sub>-Isoprostanos

Los F<sub>2</sub>-isoprostanos (F<sub>2</sub>-isoPs) son compuestos similares a las prostaglandinas (PG) que se producen mediante un mecanismo no enzimático de peroxidación del ácido araquidónico, inducido por RL, de los fosfolípidos de las membranas celulares o de las LDL circulantes (Roberts & Morrow, 1997; Morrow et al., 1999). Una vez formados, son liberados de los fosfolípidos de la membrana, circulan en el plasma y son excretados por la orina (Stephens et al., 2009). Se pueden dividir en 4 series dependiendo de los isómeros (Figura 2B.7)



**Figura 2B.7.** Mecanismo de formación de F<sub>2</sub>-isoprostanos a partir del ácido araquidónico.  
Fuente: Morrow (2005)

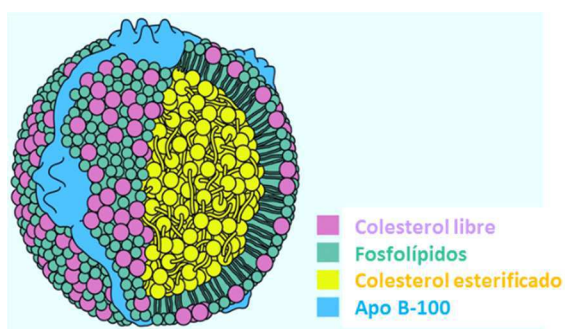
Los F<sub>2</sub>-isoprostanos fueron descubiertos en 1990 por Morrow y Roberts y están considerados como los biomarcadores más fiables en la evaluación del estrés oxidativo (Hallywell & Witeman., 2004; Frijhoff et al., 2015; Stephens et al., 2009). La principal ventaja de la técnica es el alto grado de especificidad y sensibilidad del GC-MC. Sin embargo el análisis es muy laborioso y tiene que ser realizado por un especialista.

Diversas investigaciones ponen de manifiesto la existencia de niveles elevados de isoprostanos en ciertas patologías como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, aterosclerosis, cáncer, obesidad, fibrosis quística, Alzheimer, esclerosis múltiple y enfermedades neurológicas entre otras (Dalle-Donne et al., 2006).

### 5.3.3 Oxidación de la LDL

Cada vez existe más evidencia que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeña un papel fundamental en desarrollo de la aterosclerosis (Witzum, 1994). Los niveles elevados de LDL oxidada muestran una correlación positiva con la severidad de los eventos coronarios agudos (Ehara et al., 2001) y se ha considerado como un marcador bioquímico de la enfermedad coronaria (Toshima et al., 2000).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son partículas esféricas con un parte central que está formada por colesterol esterificado y triglicéridos. Este núcleo central se encuentra rodeado por una monocapa formada principalmente por fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina) y colesterol libre. En la capa externa de la molécula se encuentra su componente proteico principal que recibe el nombre de apolipoproteína B-100 (apo B-100) (Figura 2B.8). Es importante destacar la presencia de diversos antioxidantes como la vitamina E, carotenos, compuestos fenólicos y ubiquinol-10 (Esterbauer et al., 1992).



**Figura 2B.8.** Estructura de la LDL

El proceso de oxidación de LDL da lugar a la modificación de la fracción proteica de las LDL y puede producirse por varios mecanismos:

- Directamente, a través de derivados del ácido hipocloroso (HOCl-) producido por la enzima mieloperoxidasa (Podrez et al., 2000).

- Indirectamente, a través de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la partícula de la LDL (Steinberg et al., 1989).

Cuando la LDL se oxida adquiere nuevas propiedades con diferentes respuestas biológicas claves en el desarrollo de la placa aterosclerótica (Libby et al., 2002)

#### 5.4. BIOMARCADORES DE OXIDACIÓN PROTEICA (PROTEÍNAS CARBONILO)

Las proteínas son los compuestos más abundantes de la mayoría de los sistemas biológicos y por tanto son altamente susceptibles al ataque de los RL (Stadtman, 1992).

Los principales resultados de esta oxidación son cambios conformacionales o fallos en el plegamiento de la proteína, que desembocan en una pérdida parcial o total de su función (Berlett & Stadtman, 1997), afectando el funcionamiento de receptores, enzimas y proteínas de transporte e incluso se ha descrito la generación de nuevos antígenos que pueden provocar respuesta inmunológica (Casciola-Rosen et al., 1997). Esto puede contribuir a un daño secundario a otras moléculas, como la inactivación de las enzimas reparadoras de ADN (Wiseman & Halliwell, 1996).

La oxidación de proteínas por RL está asociada tanto en la patogénesis del envejecimiento como a un gran número de enfermedades como Alzheimer, obesidad, diabetes, cáncer de hígado y sida entre otras (Yoritaka, 1996; Stadtman 2001).

El marcador de oxidación proteica más estudiado de la literatura son las proteínas carbonilo (Beal, 2002) y es aplicado tanto a tejido como a fluidos biológicos dando información sobre la media de proteínas modificadas (Halliwell & Whiteman, 2004). Los grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) son producidos principalmente en las cadenas de aminoácidos de las proteínas, principalmente colina, lisina, arginina y treonina (Dalle-Donne et., 2003). Además de la oxidación directa a los aminoácidos, las proteínas carbonilo pueden ser formadas a partir de subproductos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal (4-HNE1) (Mark, 1997). La determinación de la LDL oxidada se puede realizar por inmunohistoquímica, Western Blot y ELISA (Buss et al., 1997)

## 5.5. LA PROTEÍNA C REACTIVA COMO MARCADOR DE INFLAMACIÓN

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína de 120.000 daltons sintetizada por el hígado y cuya síntesis está modulada por citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$  (Ablij & Meinders, 2002). La PCR fue la primera proteína de fase aguda descrita y su nombre proviene de la capacidad unirse al polisacárido somático C de la pared de las células neumocócicas (Tillett & Francis, 1930). La PCR forma parte de la inmunidad innata y su síntesis es inducida como respuesta al daño por infecciones y/o inflamación, por lo que es extensamente utilizada en la práctica clínica como indicador de inflamación y de riesgo cardiovascular (Pearson et al., 2003; Abraham et al., 2007).

Como hemos comentado anteriormente, la inflamación y el estrés oxidativo están íntimamente ligadas (Bondia-Pons et al., 2012). Mientras las células inflamatorias producen RL, el estrés oxidativo produce efectos inflamatorios (Abramson et al., 2005). Por ejemplo, los ROS tiene la capacidad para de estimular el factor de transcripción nuclear Nf- $\kappa$ B, el cual regula la producción de moléculas que participan en el desarrollo de la placa aterosclerótica (Collins & Cybulsky, 2001). En sujetos sanos, algunos estudios han indicado que los marcadores de estrés oxidativo como los F-2 isoprostanos y la LDL-oxidada pueden estar asociados con la PCR (Davi & Guagnano, 2002; Hulthe et al., 2002) aunque la precisa asociación entre marcadores de estrés oxidativo y PCR no está firmemente establecida (Nanri et al., 2007).

En general, cuando la PCR es menor a 10 mg/L se corresponde con procesos inflamatorios leves como gingivitis o ejercicio intenso. Concentraciones moderadas (10-100 mg/L) se observan en infarto agudo de miocardio, pancreatitis y la mayoría de enfermedades reumáticas. Una concentración mayor a 100 mg/L se encuentran en infecciones bacterianas agudas graves, traumatismos graves o vasculitis sistémica (Amezcu-Guerra et al., 2007)

## 6. LA RADIACIÓN UV EN PIEL COMO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRÉS OXIDATIVO EN NUTRICIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo (1,5-2 m<sup>2</sup>) y es la primera barrera de protección del cuerpo frente a la luz solar, calor, infecciones y lesiones. Numerosos estudios han demostrado que la radiación ultravioleta solar induce la formación de RL que reaccionan con el ADN, proteínas y lípidos de las células (Ahmed et al., 1999; Yasui et al., 2000). La acumulación de lesiones a lo largo del tiempo tras exposición crónica o excesiva de luz solar es la responsable del deterioro prematuro de la piel o fotoenvejecimiento (Fisher et al., 2002; Pinnell, 2003), la inmunosupresión cutánea (Noonan et al., 1984) y sistémica (Nishigori et al., 1996) y el cáncer cutáneo (Sontag et al., 1995).

La radiación ultravioleta es la causante de la mayoría de los cánceres cutáneos en humanos, por lo que es considerado el mutágeno ambiental más importante (Matsumura & Ananthaswamy, 2002). El progresivo incremento de la incidencia de cáncer de piel en los últimos años (Erdmann et al., 2013) parece tener como principales causas el cambio de estilo de vida y el deterioro de la capa de ozono. Ambos tienen como resultado una mayor y más peligrosa exposición a los rayos del sol (Leffell, 2000).

Aunque frente a la agresión solar la piel tiene dos sistemas de protección (la pigmentación y un sistema antioxidante endógeno); una exposición excesiva o crónica puede disminuir estas defensas y conducir a una situación de estrés oxidativo (Sander et al., 2002). Por otro lado, el estado nutricional afecta la condición o estatus de la piel (Boelsma et al., 2003; Sies y Stahl, 2004). Diversos estudios han mostrado como varios compuestos bioactivos de los alimentos pueden actuar como fotoprotectores a nivel sistémico, entre ellos; licopeno del tomate (Stahl et al., 2001; Aust et al., 2005; Rizwan et al., 2011), la mezcla de carotenoides (Heinrich et al., 2003), las catequinas del té verde (Rhodes et al., 2013), los compuestos polifenólicos del vino (Moehrl et al., 2009) y mezcla de extracto de cítricos y romero (Pérez-Sánchez et al., 2014).

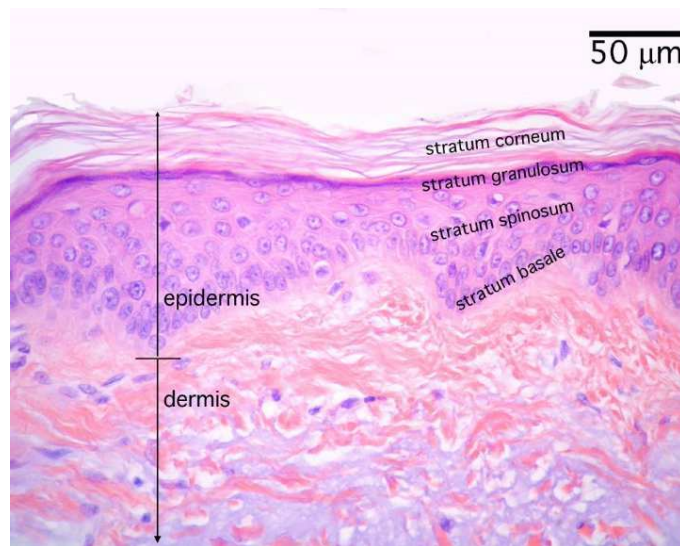
El hecho de que la piel sea la primera barrera de protección frente a la luz solar a la que estamos expuestos diariamente y que es una fuente de RL, que la nutrición pueda afectar a las defensas antioxidantes de la piel, y que podamos controlar mediante luz UV artificial el nivel de oxidación en cada individuo, hacen que la piel sea un buen modelo para demostrar la eficacia de productos antioxidantes sobre el estrés oxidativo causado por la luz UV (Sies & Stahl, 2004).

En este apartado describiremos por un lado la estructura de la piel y su sistema de defensa, y por otro la luz solar y sus efectos nocivos sobre la piel a corto y largo plazo.

## 6.1 ESTRUCTURA Y SISTEMA DE DEFENSA DE LA PIEL

### 6.1.1. Estructura de la Piel

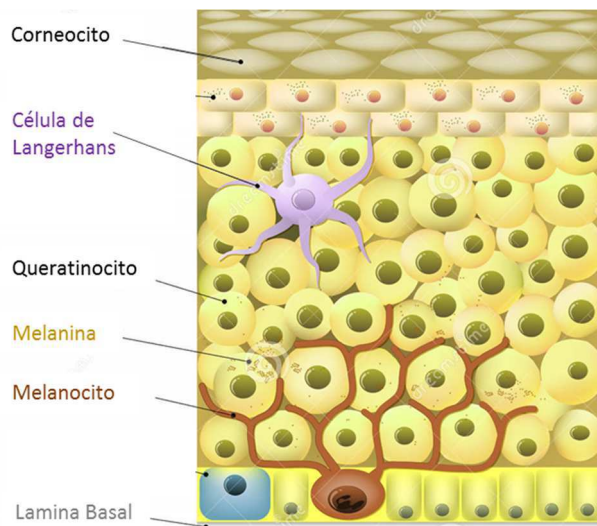
La piel está compuesta por diferentes tipos de células y organelas con funciones específicas y organizadas en 2 capas principales, que incluyen la epidermis y la dermis (Figura 2B.9).



**Figura 2B.9.** Estructura de la piel. Sección histológica de piel humana.

La epidermis es la capa externa y delgada de la piel y está en contacto directo con el exterior. Comenzando por la capa más externa, la epidermis se divide a su vez en las siguientes zonas: estrato córneo, capa granulosa, capa de Malpighi o de células espinosas y capa basal. Las principales tipos de células que se encuentran en la epidermis son los queratinocitos, los melanocitos y las células de Langerhans.

Los queratinocitos, son las células principales de la epidermis, representando el 90% de la población de células. Su función principal es la producción de queratina, que es una proteína filamentosa de función protectora. La capa córnea está constituida por capas de células muertas denominadas corneocitos, que forman un paquete celular denso que constituyen el último paso en la evolución de los queratinocitos desde su origen en la capa basal (véase la Figura 2B.10).



**Figura 2B.10. Tipos celulares en la piel**

Los melanocitos se encuentran en la capa basal y son células de forma estrellada con prolongaciones denominadas dendritas. Son las células responsables de la fabricación de la melanina, la cual es transferida a los queratinocitos. Asimismo, en la capa basal se encuentran células del sistema inmunológico (células de Langerhans) que constituyen el 3-5% de las células de esta capa, y son las encargadas de presentar los antígenos a los linfocitos, e iniciar así la respuesta inmune de defensa. Las células de Langerhans se encuentran normalmente dispersas entre los queratinocitos del estrato espinoso.

La dermis es el tejido de sostén de la piel y está formada principalmente por fibroblastos, que se encargan de producir: 1) las fibras de colágeno, que dan la firmeza y la resistencia a los tejidos y 2) las fibras de elastina, que le dan a la piel su elasticidad. En estas fibras se encuentran el ácido hialurónico, el cual interviene en la hidratación de la piel al fijar moléculas de agua.

### **6.1.2. Sistemas endógenos de protección de la piel frente a la radiación ultravioleta**

La radiación UV es un potente productor de ROS en la piel. Sin embargo, el tipo de ROS generado depende de la longitud de onda UV (Masaki, 2010). Así, las radiaciones UVB estimulan principalmente la producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ) a través de la activación de la NADPH oxidasa y la cadena respiratoria (Jurkiewicz & Buettner, 1996), mientras que los rayos UVA producen oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), a través de una reacción de fotosensibilización con cromóforos internos, tales como riboflavina y porfirina. También genera  $O_2^-$  radical a través de la activación de la NADPH oxidasa (Masaki et al., 1999) y la fotosensibilización de los productos de glicación avanzada (Valencia & Kochevar, 2008)



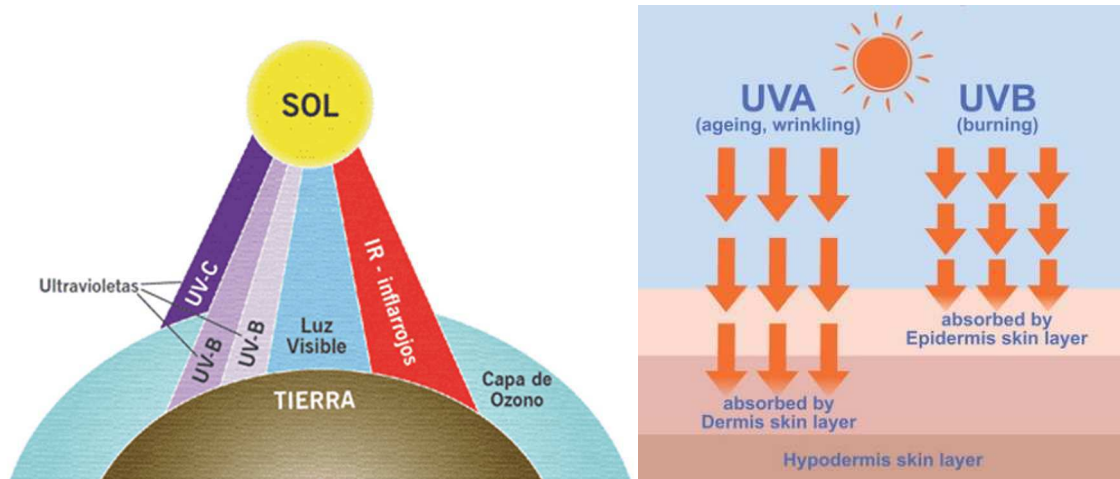
El tipo principal de ROS que produce en la superficie de la piel es el oxígeno singlete ( $-O_2$ ), que se genera por una reacción de fotosensibilización con UVA y porfirinas de la flora bacteriana que viven en la piel. El oxígeno singlete ( $-O_2$ ) oxida escualeno, colesterol, y restos acilo insaturados para dar hidroperóxidos. (Ryu et al., 2009)

El principal mecanismo de protección que tenemos frente a la radiación solar es la formación de la melanina (pigmentación), a partir de los melanocitos situados en la capa basal. La melanina es un pigmento que da lugar al bronceado de la piel y es estimulada por las radiaciones UVA y UVB. Además de ser una sustancia fotoprotectora, posee capacidad antioxidante (Wood et al., 1999). La radiación UVA produce un bronceado inmediato, que se origina unos 30 min después de la exposición al sol y se atenúa en poco tiempo. Esta radiación es la causante de la pigmentación directa de la piel. Por otro lado, la radiación UVB origina la pigmentación indirecta de la piel y un bronceado más duradero, que requiere varios días de exposición. La capacidad de pigmentación viene determinada genéticamente y se expresa como la capacidad de los melanocitos para producir melanina, la cantidad de melanina formada en cada melanosoma y la distribución y tamaño de estos. Otro mecanismo de protección es el engrosamiento de la capa córnea para evitar que las radiaciones penetren a través de la piel (Matsumura & Ananthaswamy, 2004)

Además de la pigmentación y el engrosamiento de la capa córnea, la piel cuenta con un sistema enzimático de defensa antioxidante formado principalmente por las enzimas superóxido dismutasa (CuZn-SOD, MnSOD), glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Pinnell, 2003). Estas enzimas mantienen el equilibrio redox entre las células y su concentración en piel está modulada por los rayos UVB y UVA. Esta modulación ha sido demostrada tanto en ensayos *in vitro* con fibroblastos dérmicos humanos (Leccia et al., 2001) como en estudios *in vivo* con animales (Okada et al., 1994) y humanos (Sander et al., 2002).

## 6.2 LUZ SOLAR

El sol emite luz solar que está compuesta principalmente por 3 tipos de radiaciones con diferentes longitudes de onda: rayos X, radiaciones ultravioleta (RUV) (200-400 nm) y luz visible (400-760 nm) (Figura 2B.11.).



**Figura 2B.11.** Tipos de radiaciones de la luz solar

El espectro ultravioleta (200-400 nm) se subdivide a su vez en tres bandas con diferentes longitudes de onda. Estas bandas se denominan UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm), y UVC (200–280 nm) y tienen diferentes respuestas biológicas de acuerdo al nivel de absorción de la piel (Lucas et al., 2006).

- La UVA es el mayor componente de la UV (90%), posee el mayor poder de penetración y es la causante del envejecimiento prematuro de la piel, estrés oxidativo e inmunosupresión, aunque en menor grado que la UVB.
- La UVB suele penetrar hasta la epidermis, es mutagénica y la principal responsable de la producción de eritema, la inmunosupresión y la inducción de cánceres de piel.
- La UVC es muy mutagénica pero de menor importancia ya que es absorbida por la capa de ozono.

### 6.3 EFECTOS DE LA LUZ SOLAR SOBRE LA PIEL

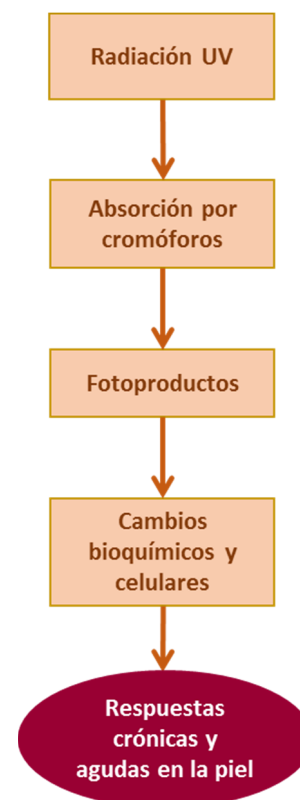
La absorción de radiación UV por la piel provoca una compleja secuencia de respuestas moleculares específicas que dañan la piel a corto y largo plazo, tal y como se representa en la Figura 2B.12.

El primer paso para que se inicien estas respuestas fotoquímicas y fotobiológicas en la epidermis es que la radiación ultravioleta sea absorbida por un cromóforo. Estas moléculas tienen un característico espectro de absorción que depende de su estructura molecular. Los principales cromóforos de la piel son el ADN, el ácido urocánico, vitaminas, precursores de melanina, porfirinas y proteínas entre otros (Young, 1997).

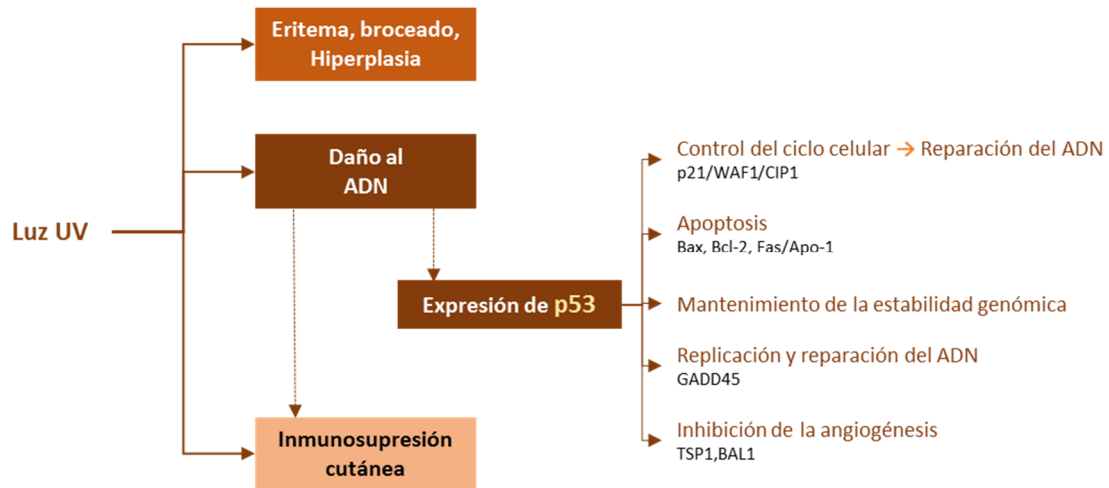
Después de absorber la energía de radiación, la molécula está en estado de excitación induce una respuesta bioquímica a la formación de fotoproductos. Los fotoproductos dependiendo del cromóforo que los formen pueden ser dímeros de pirimidina, fotoproductos 6-4 y radicales Libres (Sies & Stahl, 2004).

Los lípidos, proteínas y ADN son dianas celulares para la fotooxidación, y este daño está involucrado en la pato-bioquímica de la formación del eritema (a corto plazo), envejecimiento prematuro de la piel, desarrollo de fotodermatosis y cáncer de piel (a largo plazo) (Pinnell, 2003).

Los principales efectos clínicos tras la exposición aguda a radiación UV en piel son la inflamación (visible como eritema) y la pigmentación (aumento de la melanogénesis). Como se muestra en la Figura 2B.13, a nivel celular la exposición aguda a radiación UV da lugar principalmente a daño en el ADN y supresión inmunitaria (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).



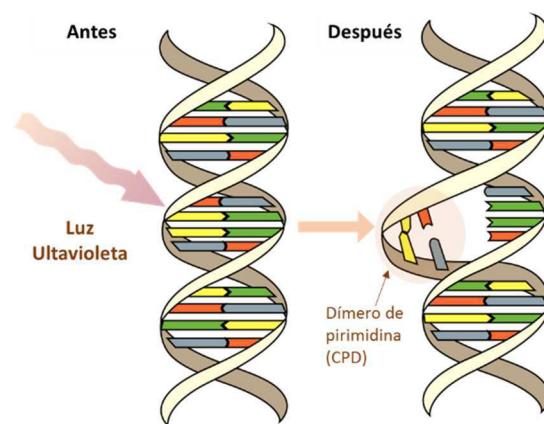
**Figura 2B.12.** Etapas generales de las respuestas moleculares de la piel expuesta a luz UV.



**Figura 2B.13.** Efectos de la luz UV a corto plazo. Modificado de Matsumura & Ananthaswamy (2004).

### 6.3.1 Daño al ADN

El ADN es el cromóforo más importante de la piel y puede absorber UVB (290-320 nm) produciendo directamente cambios en las bases pirimidínicas de ADN (2B.14). Los productos resultantes son dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y fotoproductos 6-4 (6-4PPs) (Chadwick et al., 1995). Aunque ambas lesiones (CPDs y 6-4PPs) son mutagénicas, parece que los CPDs contribuyen en mayor grado a las mutaciones en mamíferos, ya que los fotoproductos 6-4 son reparados mucho más rápido (Mitchell y Nairn, 1989). Por otro lado, cuando la piel se expone a radiación UVA (320–400 nm), se genera un aumento de ROS, principalmente oxígeno singlete ( $O_2$ ), el cual produce modificaciones oxidativas de las bases como la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxoG) (Ahmed et al., 1999; Cadet et al., 2005).



**Figura 2B.14.** Formación de dímeros de pirimidina en el ADN tras exposición a luz ultravioleta.

Dependiendo del tipo de fotoproducto formado, los cambios en el ADN son reparados por dos tipos de mecanismos celulares:

1. **El sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER)** se encarga de reparar los CPDs y los fotoproductos 6-4 (Bykov et al., 1999; Young et al., 1996). Tras una exposición de UV que produzca eritema en piel, se necesitan 24 h para poder eliminar el 50 % de CPDS, sin embargo el 50 % de los fotoproductos 6-4 son reparados en 30 min. El NER implica la acción de unas 20-30 proteínas que actúan de forma secuencial durante el reconocimiento del daño. Es decir, después del reconocimiento del daño, se retira el fragmento dañado, re-sintetiza la secuencia del fragmento que falta mediante ADN polimerasa y se cierra el hueco.
2. **El sistema de reparación por escisión de bases (BER)** se encarga de reparar modificaciones de las bases principalmente producidas por UVA (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) (Sancar et al., 2004). El proceso es muy efectivo ya que la mitad de 8oGua formada es reparada en 2 horas (Yarosh et al., 2005).

La Tabla 2B.8 resume los fotoproductos resultantes del daño al ADN, la fuente de UV que produce el daño y el mecanismo de reparación involucrado.

**Tabla 2B.8.** Fotoproductos del ADN, sus causas y modos de reparación.

Fotoproductos del ADN	UV	Directo (absorción UV) o indirecto (oxidación)	Porcentaje de frecuencia del daño del ADN	Mecanismo de reparación	Velocidad de reparación (tiempo para eliminar el 50% del daño)
Dímero de pirimidina ciclobutano	UVB	Directo	75%	NER (Reparación por escisión de nucleótidos)	24 h
6-4 fotoproductos de pirimidina	UVB	Directo	15%	NER (Reparación por escisión de nucleótidos)	30 min
8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	UVA	Indirecto	10%	BER (Reparación por escisión de bases)	2 h

### 6.3.1.1 La proteína p53

Las células de la piel tienen mecanismos muy eficaces para evitar que la célula dañada se convierta en cancerosa. Estos mecanismos están controlados por una proteína de 53kDa llamada p53 y también conocida como el guardián del genoma (Lane, 1992). La p53 tiene la capacidad de regular el ciclo celular en situaciones de estrés y contribuye a mantener la estabilidad del genoma (Lane, 1992). De acuerdo con Matsumura y Ananthaswamy (2004), las principales funciones de la proteína p53 son:

1. **La detención del ciclo celular**, la cual permite a los sistemas de reparación celulares eliminar las lesiones antes de que ocurra la síntesis de ADN durante la “fase S” del ciclo celular (Yonish-Rouach et al., 1991)
2. **La inducción de apoptosis** en las células que presenten un daño excesivo en el ADN (Li et al., 1997).

La p53 también es capaz de inhibir la angiogénesis, la cual es un factor crítico en la progresión de malignidad (Nishimori et al., 1997). En este sentido, la p53 juega un papel primordial en la protección genómica y celular tras la radiación UV.

### 6.3.2 Inmunosupresión

Respecto a la inmunosupresión, la piel es la primera barrera protectora contra agentes infecciosos y está considerada como el órgano inmunológico más grande. Tanto las radiaciones UVA como UVB deprimen el sistema inmunológico de la piel (Clydesdale et al., 2001). Está generalmente reconocido que la UV estimula a los queratinocitos a liberar mediadores solubles inmunosupresores como la IL-10 (Nishigori et al., 1996). Asimismo, estos mediadores pueden entrar en circulación y suprimir el sistema inmunológico sistémico (Clydesdale et al., 2001).

Las células de Langerhans se encuentran en la epidermis y son las responsables de la inmunidad cutánea. La radiación UV tiene como resultado la disminución del número de células de Langerhans y su dendricidad. Estos cambios suelen necesitar al menos 2MED (Novakovic et al., 2001) y son probablemente el resultado de la migración iniciada por la liberación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) por parte de los queratinocitos (Griffiths et al., 2005). Su densidad y función varían de acuerdo a la exposición solar (Novakovic et al., 2001).

Como hemos apuntado al inicio de este epígrafe, uno de los signos clínicos visibles más importantes tras la exposición aguda a radiación UV es la formación del eritema. A continuación

describiremos los aspectos más importantes y los principales cambios celulares y moleculares asociados a este.

### 6.3.3 Eritema y respuesta inflamatoria

La reacción aguda más temprana tras la exposición solar es el eritema. El eritema es una respuesta inflamatoria caracterizada por un enrojecimiento de la piel y a la que todos estamos expuestos en mayor o menor medida dependiendo de factores individuales y ambientales, que reflejamos en la Tabla 2B.9. Dentro de los factores individuales, el tipo de piel (o fototipo) es uno de los principales factores (Harrison & Young, 2002). Así, Fitzpatrick estableció un sistema de clasificación del tipo de piel basado en la sensibilidad de una persona a la luz solar (Pathak, 2004). Los 6 fototipos cutáneos depende de la cantidad de melanina en la piel y se presentan en la Figura 2B.15, ordenados de menor a mayor resistencia a la luz UV.

**Tabla 2B.9. Factores que influyen en el eritema.** Adaptado de Lucas et al. (2003)

FACTORES INDIVIDUALES	FACTORES AMBIENTALES
Tipo de piel (fototipo)	Longitud y dosis
Hidratación de la piel	Factores geográficos
Edad	Reflexión ambiental (arena, nieve)
Sitio Anatómico (grosor de la piel)	Factores climáticos

### Escala Fitzpatrick



**Figura 2B.15. Tipos de piel (fototipos) de acuerdo a la clasificación de Fitzpatrick.**

La aparición del enrojecimiento se puede apreciar desde minutos después de la exposición, llegando al umbral máximo tras 12-24 h y puede llegar a permanecer hasta varios

días (Farr et al., 1988). Según Vink y Roza (2001), probablemente la reacción es iniciada en las células de la epidermis, donde se producen citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL1b e IL-6 (Takashima, 1996) que por difusión causan dilatación de los vasos sanguíneos de la dermis. Seguidamente enumeramos los principales cambios moleculares y celulares asociados al eritema:

1. La aparición de células inflamatorias en la dermis (Hawk et al., 1988; Gilchrest et al., 1983).
2. La expresión del gen de supresión tumoral p53 (Burren et al., 1998).
3. La presencia de células apoptóticas en la epidermis (Sheehan and Young, 2002).
4. La expresión de genes y proteínas como citoquinas proinflamatorias (Barr et al., 1999; Brink et al., 2000), metaloproteinasas (MMPs), que degradan el colágeno de la matriz e inhibidores de MMPs (Lahmann et al., 2001; Fisher et al., 2002).

### 6.3.4 Envejecimiento prematuro o fotoenvejecimiento

El fotoenvejecimiento según Fisher et al. (2002) es el deterioro prematuro de la piel por la acción de la luz solar y es debido a la acumulación de lesiones a lo largo del tiempo. El exceso de exposición a la luz solar produce envejecimiento prematuro de la piel y se caracteriza macroscópicamente por la aparición acelerada de arrugas, deshidratación, falta de elasticidad y alteraciones en la pigmentación como la presencia de manchas hiperpigmentadas (Pinnell, 2003). A nivel microscópico, pueden apreciarse numerosas alteraciones (Tabla 2B.10).

**Tabla 2B.10. Cambios histológicos por fotoenvejecimiento** (Pinnell 2003).

EPIDERMIS	
Queratinocitos	Presentan formas irregulares.
Melanocitos	Se distribuyen de forma irregular, con zonas de mayor acumulación y zonas en las que son más escasos.
Células de Langerhans	Disminución en número.
DERMIS	
Fibras de colágeno	Acumulaciones amorfas y desestructuradas que se tiñen con una coloración basófila.
Fibras de elastina	Aumento y acumulaciones amorfas.
Glicosaminoglicanos	Aumenta su concentración.
Otros	Los vasos sanguíneos están dilatados y con formas tortuosas. Hay una mayor presencia de células inflamatorias en la dermis.



Uno de los mecanismos moleculares más importantes implicados en el fotoenvejecimiento es la producción de metaloproteinasas (MMPs). Pequeñas cantidades de radiación UV provocan la inducción de MMPs, incluyendo MMP-1, MMP-2, MMP-3, y MMP-9 (Fisher et al., 1996). Estas proteasas, de forma conjunta, son capaces de degradar la matriz de colágeno de la piel. Al mismo tiempo, se inhibe la síntesis de procolágeno (Rittie & Fisher, 2000). Además, La radiación UV también activa al factor de transcripción nuclear KB (NF-KB), el cual estimula la migración de los neutrófilos hacia el lugar de la irradiación aumentando la presencia de colagenasa neutrófila (MMP-8) y agravando de esta manera la degradación de la matriz de colágeno. En esta activación de AP-1 y NF-KB participan directamente las ROS, que son el denominador común de esta compleja interacción biológica (Siwik et al., 2001). La radiación UVA induce procesos de peroxidación lipídica en membranas, lo que puede alterar la fluidez de las membranas celulares (Gaboriau et al., 1993). Los ROS generados tras la exposición UV modifican las proteínas de la piel y forman proteínas carbonilo, las cuales se acumulan en la dermis de piel fotoenvejecida (Sander et al., 2002).

**#2C**

**REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA**

**POLIFENÓLES Y  
TÉ VERDE**



# 2C

## Polifenoles y té verde

### REVISION BIBLIOGRAFICA



#### 1. POLIFENOLES: CLASIFICACIÓN, BIODISPONIBILIDAD Y EFECTOS SOBRE LA SALUD

*p69*

#### 2. TE VERDE

*p86*

##### 1.1. DESCRIPCIÓN, CLASES E INGESTA DE POLIFENOLES *p69*

##### 2. BIOSIPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

*p75*

##### 1.3. POLIFENOLES Y SALUD *p77*

- 1.3.1. Polifenoles y estrés oxidativo
- 1.3.2. Polifenoles y salud cardiovascular
- 1.3.3. Polifenoles y cáncer
- 1.3.4. Polifenoles y fotoprotección

##### 2.1. DESCRIPCIÓN *p86*

##### 2.2. COMPOSICIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS *p86*

##### 2.3. TÉ VERDE Y SALUD *p89*

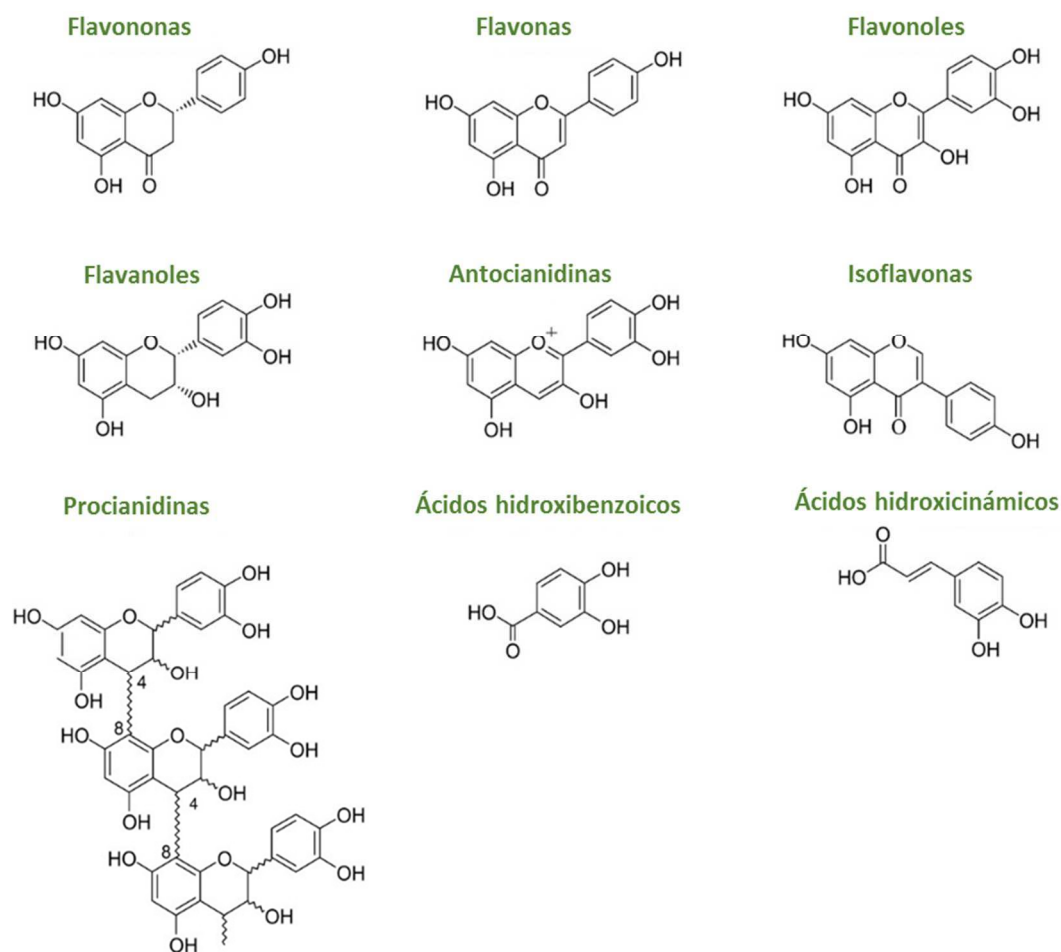
- 2.3.1. Té verde y estrés oxidativo
- 2.3.2. Té verde y cáncer
- 2.3.3. Té verde y enfermedades cardiovasculares
- 2.3.4. Té verde y enfermedades neurodegenerativas

##### 2.4. SEGURIDAD *p94*

## 1. POLIFENOLES: CLASIFICACIÓN, BIODISPONIBILIDAD Y EFECTOS SOBRE LA SALUD

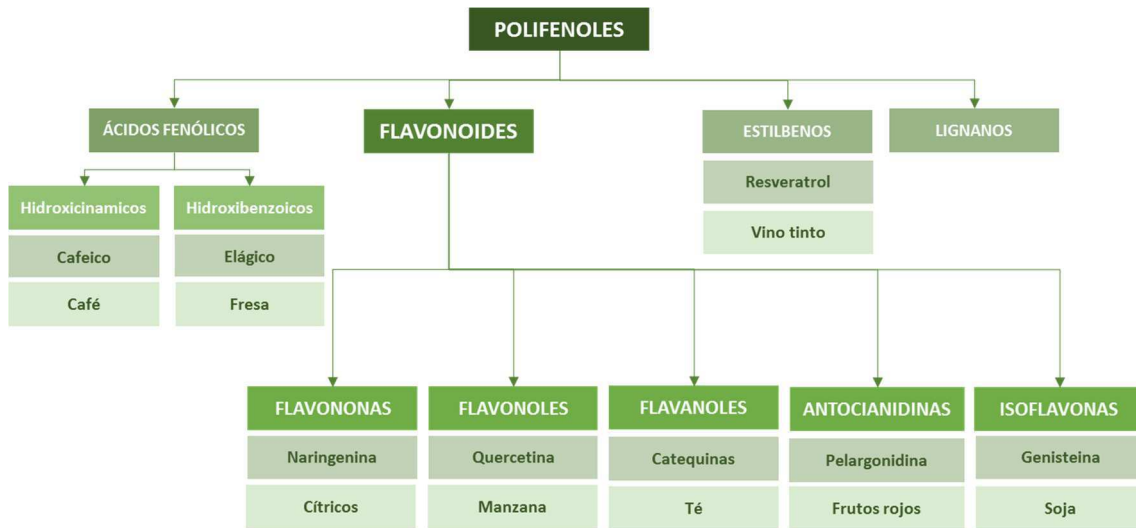
### 1.1 DESCRIPCIÓN, CLASES Y CONSUMO DE POLIFENOLES

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y son importantes antioxidantes presentes en los alimentos de origen vegetal. Comprenden una gran diversidad de estructuras químicas, desde moléculas sencillas, como los ácidos fenólicos, hasta moléculas altamente polimerizadas como los taninos. Su característica común es la presencia de al menos un grupo fenólico hidroxilo (Bravo, 1998) (Figura 2C.1).



**Figura 2C.1.** Estructura química de los polifenoles.

Se han identificado más de 8000 polifenoles diferentes y las principales fuentes de la dieta son las frutas, los vegetales, el chocolate, el té, vino tinto y el café (Bravo, 1998). Los principales grupos de compuestos fenólicos son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, y flavonoides (Figura 2C.2).



**Figura 2C.2. Clasificación de Polifenoles.**

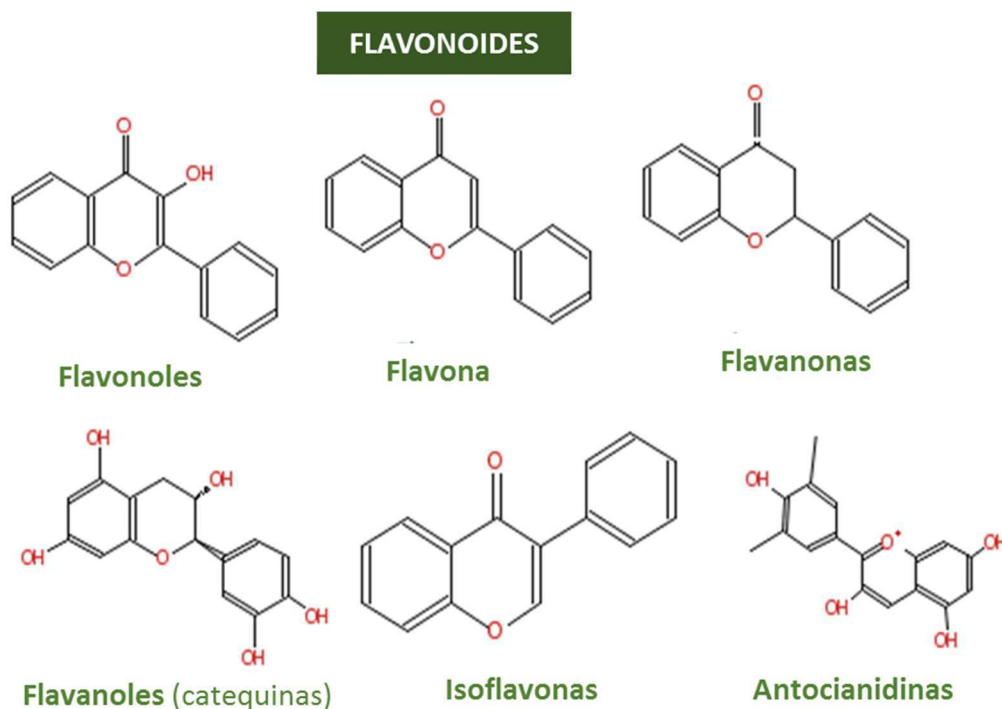
Ejemplos de compuestos pertenecientes a cada subfamilia y fuentes dietéticas.

La concentración de los compuestos fenólicos en vegetales, frutas y derivados depende de multitud de factores como la variedad y especie del fruto comestible (Tomás-Barberán et al., 2001; Meyers et al., 2003; Vrhovsek et al., 2004), el clima y prácticas de cultivo (Awad et al., 2001; Wang & Zheng, 2001), su estado de madurez en el momento de la cosecha (Williner et al., 2003), tipo de almacenamiento (Sahari et al., 2004) y tipo de procesado (Zafrilla et al., 2001; Asami et al., 2003; Patras et al., 2010).

En este sentido, gracias a la creciente investigación en este campo ya se han publicado varias bases de datos que permiten conocer tanto la composición de estos compuestos como los factores que afectan su contenido. En el año 2003, la USDA creó una base de datos con el contenido en flavonoides de 225 alimentos y tras sucesivas actualizaciones a día de hoy hay 506 alimentos (Bhagwat & Haytowitz, 2015). En Europa se creó en 2010 la primera versión de una base de datos de polifenoles llamada “Phenol-Explorer” (Neveu et al., 2010), que actualmente cuenta con datos de 458 alimentos y 501 polifenoles. Además, en la segunda versión, se incorporaron en la base los metabolitos que se generan tras la ingesta de polifenoles (Rothwell et al., 2012), mientras que en la tercera versión se incorporaron los factores de corrección de pérdidas durante el procesado (Rothwell et al., 2013).

A continuación, pasaremos a dar una breve explicación de los flavonoides y ácidos fenólicos ya que son los principales grupos de compuestos fenólicos en el producto diseñado y desarrollado en esta tesis.

Los flavonoides son la clase más común de polifenoles, de los cuales se han identificado más de 5000 compuestos diferentes (Ross & Kasum, 2002). A su vez, estos se pueden clasificar en varias subfamilias de acuerdo a su estructura química: Antocianinas, flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (Figura 2C.3).



**Figura 2C.3.** Estructura química de los flavonoides

La Tabla 2C.1 muestra las subclases de flavonoides y ácidos fenólicos relevantes en esta tesis, junto algunos ejemplos de fuentes alimentarias de los mismos. Los flavonoides suelen encontrarse asociados a distintos carbohidratos (formando glucósidos), que pueden estar ligados a través de átomos de oxígeno (O-glucósidos) o carbono (C-glucósidos), aunque también pueden aparecer en forma libre (agliconas). De todos ellos, los O-glucósidos son los mayoritarios (Del Rio et al., 2013).

**Tabla 2C.1. Principales clases, formas y fuentes dietéticas de polifenoles.**

CLASE	SUBCLASE	COMPUESTO	FUENTES	Características/Forma que se encuentran
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	Clorogenico, <i>p</i> -cumárico, cafeico	Manzana, café, patata, aronia, el cacao	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácidos fenólicos más comunes</li> <li>Están conjugados con azúcares, ácidos orgánicos u otros polímeros</li> </ul>
	Ácidos hidroxibenzoicos	Elágico	Frambuesa, fresa, uva rábanos, cebollas,	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glucósido</li> </ul>
Flavonoides	Antocianidinas	Pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina, malvidina	Arándanos. aronia, frutos rojos, vino tinto	<ul style="list-style-type: none"> <li>Responsables de los colores rojo, azul y púrpura de las frutas y verduras</li> <li>inestables y fácilmente oxidables</li> <li>Glucósidos.</li> </ul>
	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, Miricetina	Cebolla, manzana, alcaparras endivia, brócoli, col, arándanos, vino tinto.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grupo de flavonoides más ubicuo</li> <li>Glucósido</li> </ul>
	Flavanoles	Catequina, Epicatequina, EGCG	Té verde, Te negro. Vino tinto, chocolate, albaricoque	<ul style="list-style-type: none"> <li>Generalmente se encuentran en la naturaleza como aglicona</li> </ul>
		Proantocianidinas	Chocolate Uva Vino	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aportan astringencia y amargor</li> <li>Agliconas</li> </ul>

La ingesta de polifenoles varía enormemente según el tipo de dieta y hábitos culturales de cada país. Además, las dificultades en la cuantificación debido a los diferentes métodos utilizados ha hecho difícil la comparación entre estudios (Zamora-Ros et al., 2014). Aunque todavía no hay datos disponibles de todos los compuesto fenólicos, gracias a la creación de las bases de datos previamente mencionadas hoy es más fácil tener una idea más aproximada de la ingesta de este tipo de compuestos.



En España, Tresserra-Rimbau et al. (2013) estimaron a partir del estudio PREDIMED (PREvención con Dieta MEDiterránea), y mediante el uso de la base de datos ([www.phenol-explorer.eu](http://www.phenol-explorer.eu)), una ingesta media de polifenoles de  $820 \pm 323$  mg/día, de los cuales el contenido en flavonoides y ácido fenólicos fueron de  $443 \pm 218$  y  $304 \pm 156$  mg/día respectivamente. La Tabla 2C.2 muestra estos hallazgos.

**Tabla 2C.2.** Ingesta de polifenoles totales, flavonoides y ácidos fenólicos en diferentes grupos de alimentos en el estudio PREDIMED (n=7200). Adaptado de Tresserra-Rimbau et al. (2013)

Grupo de Alimentos	Polifenoles totales (mg/d)	Flavonoides (mg/d)	Ácidos fenólicos (mg/d)	Principales fuentes dietéticas (% de contribución a en cada grupo de alimentos)
Fruta	$360 \pm 217$	$255 \pm 167$	$72 \pm 61$	Naranjas (33%), manzanas (28%), olivas (15%), cerezas (8%)
Bebidas	$192 \pm 140$	$23 \pm 39$	$168 \pm 133$	Café (88%), zumo de naranja (7%), té (3%), otros zumos (1%)
Vegetales	$104 \pm 40$	$67 \pm 31$	$37 \pm 18$	Patatas (35%), espinacas (20%), cebollas (12%), lechuga (8%)
Bebidas alcohólicas	$67 \pm 126$	$52 \pm 101$	$10 \pm 18$	Vino tinto (95%), cerveza (3%), vino blanco y rosado (2%)
Cereales	$43 \pm 48$	$19 \pm 18$	$12 \pm 14$	Pan blanco (44%), pan integral (31%), galletas integrales (10%), cereales de desayuno (5%)
Aceites	$22 \pm 11$	$0.36 \pm 0.33$	$0.12 \pm 0.05$	Aceite de oliva virgen (62%), aceite de oliva (38%)
Cacao	$16 \pm 41$	$15 \pm 40$	$0.3 \pm 0.7$	Chocolate (73%), cacao en polvo (27%)
Frutos secos	$10 \pm 14$	$6.4 \pm 9.3$	$3.8 \pm 6.0$	Nueces (66%), otros frutos secos (34%)
Legumbres	$5.6 \pm 4.8$	$4.8 \pm 4.2$	$0.8 \pm 0.7$	Alubias (97%), lentejas (2%), guisantes (1%)
<b>Total</b>	<b><math>820 \pm 323</math></b>	<b><math>443 \pm 218</math></b>	<b><math>304 \pm 156</math></b>	<b>Café (18%), naranjas (16%), manzanas (12%), aceites de oliva (11%), vino tinto (6%)</b>

Por su parte, Perez-Jiménez et al. (2011), que utilizaron en Francia la base de datos anteriormente citada, y mediante estimaciones en una cohorte de 4942 participantes del estudio SU.VI.MAX (SUplémentation en Vitamines et Minéraux Anti-oxidante), mostraron un

consumo total de 337 polifenoles, de los cuales 98 aportaban 1 g/día. La ingesta media fue de 1193 mg/día (820 mg/día como agliconas)- La ingesta máxima fue de 1.8 g/día, y el café y las frutas fueron las principales fuentes. Asimismo, la reciente investigación de Zamora-Ros et al. (2015), esta vez sobre una cohorte del Estudio EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) de 36037 participantes en 10 países y con la base de datos Phenol-Explorer, estimaron una ingesta media de 1184 mg/día. La mayor ingesta fue en Dinamarca (1786 mg/día) y la más baja en Grecia (744 mg/día). La contribución de las diferentes clases de polifenoles fue diferente según la zona geográfica, aunque los ácidos fenólicos fueron los de mayor contribución, seguidos de los flavonoides.

Respecto a los flavonoides, el reciente estudio de Vogiatzoglou et al. (2014) utiliza la base de datos de consumo de alimentos de la EFSA junto a una base de datos de flavonoides del proyecto Europeo FLAVIOLA (<http://www.flaviola.org>). En sus resultados describen las cantidades y distribuciones en los 14 países europeos considerados. En concreto, la Tabla 2C.3 muestra las cantidades y distribuciones de los diferentes tipos de flavonoides en el Norte, Centro y Sur de Europa.

**Tabla 2C.3.** Ingesta media y mediana estimada de flavanol (mg/d) en adultos en tres regiones europeas. Adaptado de Vogiatzoglou et al. (2014).

Regiones	Flavanoles		Monómeros de flavanoles		Proantocianidinas		Teaflavinas	
	Media	Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana
<b>Sur</b>	240.5	36	35.2	5.6	160	30.4	45.3	0
<b>Centro</b>	448.9	235.2	99.5	56.9	114.5	26.2	234.9	152
<b>Norte</b>	282.6	42.3	58.8	8.9	110.5	25.5	113.2	7.9

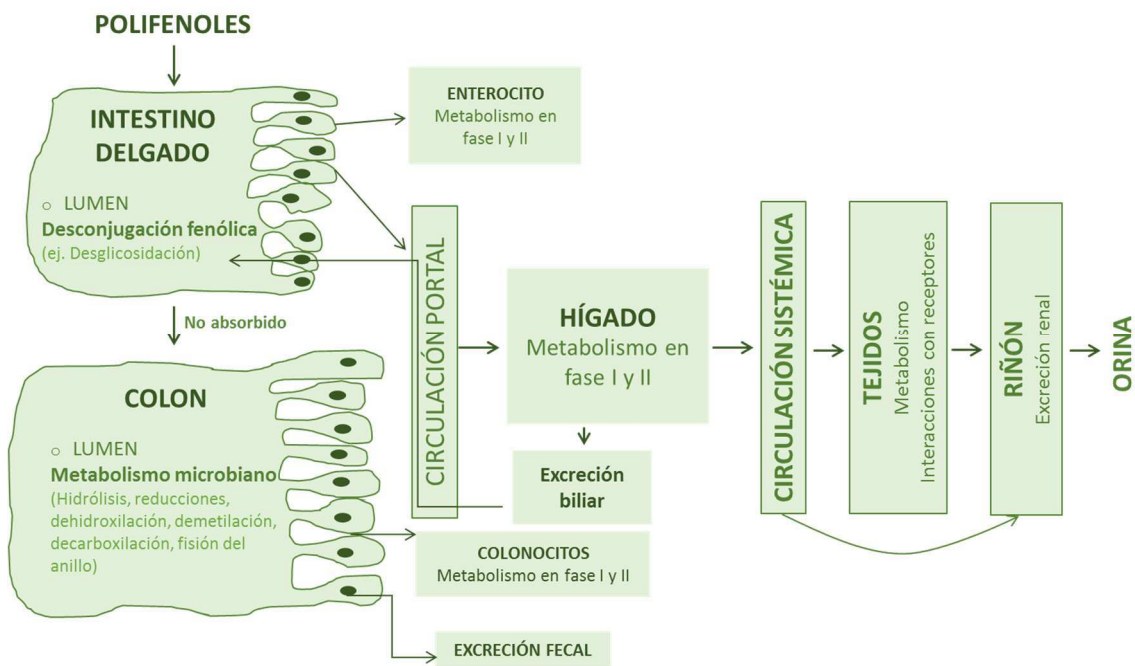
Sur: España, Francia e Italia

Centro: Bélgica, República Chequia, Alemania, Hungría, Irlanda, Letonia, Holanda y Reino Unido

Norte: Dinamarca y Suecia.

### 1.2. BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La biodisponibilidad de los polifenoles es un campo de investigación científica muy complejo, que en los últimos años ha avanzado notablemente, tal y como ponen de manifiesto las últimas revisiones sobre esta temática (D'Archivio et al., 2010; Del Rio et al., 2013). A continuación, explicamos de forma simplificada las principales etapas en el metabolismo de los polifenoles, y aportamos ejemplos concretos sobre la biodisponibilidad de las catequinas. La Figura 2C.4 muestra de forma gráfica diversas las rutas.



**Figura 2C.4.** Rutas para los polifenoles de la dieta y sus metabolitos en humanos.  
Adaptado de Cardona et al. (2013)

A día de hoy, gracias al avance de las técnicas analíticas resulta evidente que, tras la ingestión de polifenoles, estos son metabolizados y sus metabolitos están presentes en plasma en concentraciones de nmol/L (Hollman, 2014). Además, su estructura química determina el rango de absorción y la naturaleza de los metabolitos que van a circular por el plasma (Del Rio et al., 2013), aunque hay otros factores importantes mostrados en la Tabla 2C.4, que pueden afectar la biodisponibilidad de los polifenoles (D'Archivio et al., 2010).

**Tabla 2C.4. Principales factos que afectan la biodisponibilidad de los polifenoles.**

Adaptado de D'Archivio et al. (2010).

Factor	Ejemplos	Comentarios y ejemplos
<b>Procesado del alimento</b>	Tratamiento térmico, homogenización, almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tanto el tratamiento térmico como especialmente y el almacenamiento suelen reducir el contenido en polifenoles.</li> <li>La homogenización puede aumentar la biodisponibilidad (ej. licopeno del tomate).</li> </ul>
<b>Alimento</b>	<b>Matriz alimentaria:</b> presencia de otros polifenoles	<ul style="list-style-type: none"> <li>La grasa presente en el chocolate puede aumentar la digestibilidad de las proantocianidnas.</li> <li>La fibra dietética (pectina) puede aumentar la biodisponibilidad de la quercetina.</li> </ul>
<b>Interacciones con otros compuestos</b>	Estructura química, concentración	<ul style="list-style-type: none"> <li>La estructura química es uno de los principales factores que determinan la biodisponibilidad.</li> <li>Excepto las antocianidinas, en las que los glucósidos intactos pueden absorberse, todos los polifenoles son hidrolizados por las enzimas intestinales o modificados por la microbiota.</li> </ul>
<b>Humanos</b>	<p><b>Intestinales</b> Microbiota intestinal, actividad enzimática</p> <p><b>Sistémicos</b> genética, edad, sexo, patologías</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La producción de metabolitos específicos por parte de la microflora depende de la variabilidad inter-individual.</li> <li><b>Ejemplo:</b> La diadnezina es transformada a equol por la microbiota colónica. Los japoneses excretan un 60%, mientras los occidentales solo de un 30-40%.</li> </ul>

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber, excepto los flavanoles, que están presentes como agliconas, que es la forma más absorbible (D'Archivio et al., 2010). Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren diversas modificaciones. Generalmente, la mayoría de los glucósidos resisten la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino delgado. De forma general, los polifenoles se absorben mediante una de estas dos situaciones:

- 1) Tras la hidrólisis del glucósido por las enzimas secretadas por las células epiteliales del intestino delgado como la  $\beta$  glucosidasa y la lactasa-florizina hidrolasa (D'Archivio et al., 2010).
- 2) Después de sufrir cambios por parte de la microbiota del intestino grueso, dando lugar a metabolitos que son absorbidos por la mucosa del colon (Selma et al., 2009).

Las agliconas formadas sufren, en el intestino delgado (Fase I del metabolismo) y principalmente en el hígado (Fase II del metabolismo), modificaciones mediante un proceso de conjugación. Estos procesos incluyen metilación, sulfatación y/o glucuronidación, formando otros metabolitos gracias a la acción de otras enzimas como las sulfotransferasas (SULTs), uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferasas (UGT), and catecol-O-metiltransferasas (COMTs). (D'Archivio et al., 2010).

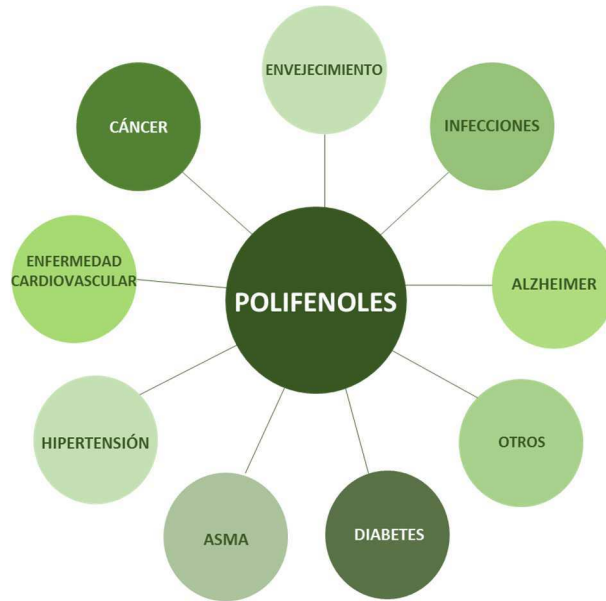
Desde el hígado, los polifenoles intactos y sus metabolitos pasan a la sangre por donde circulan unidos a proteínas, principalmente a albúmina, para ser distribuidos por tejidos y ser finalmente eliminados por la orina. Las concentraciones en plasma de los polifenoles en su forma nativa son normalmente inferiores a la concentración de sus metabolitos, dependiendo del tipo de dieta y de la composición de la microflora de cada individuo (Selma et al., 2009; Barberan et al., 2014). Algunos polifenoles, como las proantocianidinas, llegan al colon intactos y son despolimerizados, metabolizados por la microbiota colónica o excretados por las heces (Monagas et al., 2010). Un aspecto importante a tener en cuenta es que los metabolitos producidos en la fermentación colónica pueden ser más relevantes desde el punto de vista biológico que los polifenoles en forma nativa (Höger et al., 2013).

Según Quiñones et al. (2012), los principales objetivos de los estudios de biodisponibilidad son:

- Determinar cuáles son los polifenoles que mejor se absorben.
- Valorar qué polifenoles dan lugar a metabolitos activos.
- Caracterizar la actividad biológica de estos metabolitos.

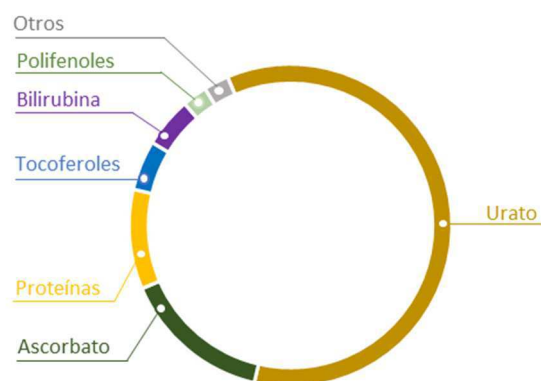
### 1.3. POLIFENOLES Y SALUD

Existe cada vez un mayor nivel de evidencia que demuestra la relación entre el consumo de polifenoles y la prevención de enfermedades crónicas. En la literatura hay excelentes revisiones y metaanálisis que recogen los resultados de de ensayos epidemiológicos, así como de ensayos de intervención con en humanos con alimentos ricos en polifenoles y su posible efecto positivo sobre determinados biomarcadores relacionados con la prvencción de enfermedades tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Scalbert et al., 2005; Chong et al., 2010; Sies, 2010; Andriantsitohaina et al., 2012; Yang & Kortessniemi, 2015). La Figura 2C.5 muestra los principales beneficios de los polifenoles asociados a la salud.



**Figura 2C.5.** Principales beneficios de lo polifenoles sobre la salud.

El mecanismo de acción más estudiado de los polifenoles ha sido su actividad antioxidante (Chiva-Blanch & Visioli, 2012). Aunque en un principio, la mayoría de la evidencia provenía sobre su capacidad antioxidante, actualmente hay controversia en torno a si los polifenoles, una vez ingeridos y metabolizados, pueden formar parte del sistema de defensa antioxidante; ya que son poco absorbibles y rápidamente metabolizados en otros compuestos (Lotito & Frei, 2006; Halliwell, 2011). De hecho, como muestra la Figura 2C.6 (adaptada de Hollman, 2014), la contribución de los polifenoles a la capacidad antioxidante del plasma es menor del 2%, ya que otros antioxidantes, como el ácido úrico o vitamina C, contribuyen en mayor medida.



**Figura 2C.6.** Contribución de antioxidantes plasmáticos a la capacidad antioxidante total FRAP. Adaptado de Hollman (2014).

Las dudas suscitadas en el mundo científico en torno a si los polifenoles pueden formar parte del sistema de defensa antioxidante, han provocado que el número de estudios sobre otros mecanismos de acción alternativos, y más complejos haya aumentado exponencialmente en la última década (Williams et al., 2004; Scalbert et al., 2005; Comalada et al., 2006; Virgili & Marino, 2008). Entre estos mecanismos, una de las más estudiadas es la participación de los polifenoles en la modulación de vías de señalización celular, la cual podría ayudar de forma significativa a explicar los mecanismos de la acción de los alimentos ricos en polifenoles (Williams et al., 2004; Rahman et al., 2006).

### 1.3.1. Polifenoles y estrés oxidativo

Como hemos comentado anteriormente, el mecanismo de acción más descrito en los polifenoles ha sido su actividad antioxidante. Los polifenoles poseen la estructura química ideal para secuestrar radicales libres, y son antioxidantes más efectivos que las vitaminas C y E. (Rice-Evans et al., 1996). Esto es debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado (Pannala et al., 2011; Fernández-Pachón et al., 2006). Existen diversos mecanismos por los cuales las distintas clases de polifenoles actúan como antioxidantes. El mecanismo más conocido es el de secuestrar radicales libres en los procesos de peroxidación lipídica (Sánchez-Moreno et al., 1999). También actúan como quelantes de iones de metales de transición, inhibiendo procesos de degradación oxidativa. La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y localización de los grupos hidroxilo que de su estructura (Cao et al., 1997).

Como se comentó en el capítulo 2B de esta revisión bibliográfica, el daño oxidativo celular causado por los radicales libres es un proceso fisiológico involucrado en diferentes patologías y por tanto la evaluación mediante biomarcadores de los productos formados tras el daño, es una buena forma de evaluar la eficacia de compuestos bioactivos. En este sentido, el panel científico de la EFSA ha considerado en varias opiniones científicas que la protección del ADN, proteínas y lípidos resultantes del daño oxidativo celular puede tener un efecto fisiológico beneficioso para la salud (EFSA, 2011c). Las Tablas 2C.5 y 2C.6 recopilan ensayos clínicos realizados con distintos alimentos ricos en polifenoles y publicados en los últimos 10 años. Los biomarcadores más utilizados son el malonaldehído (MDA) y LDL oxidada para evaluar la peroxidación lipídica, y la 8-OHdG y el ensayo COMET para el daño a ADN.

**Tabla 2C.5.** Ensayos clínicos con saúco, arándanos y frambuesas.

Producto/Intervención	Población	Duración de intervención	Resultados	Referencia
<b>Cápsulas de saúco</b> (100 mg de antocianidinas)	14 (7/7)	3 semanas	↔ LDL oxidada	Murkovic et al., 2004
<b>Arándano azul fresco</b> (250 g por día)	20	3 semanas	↓hidroperóxidos lipídicos ↔ F <sub>2</sub> -isoprostanos	McAnulty et al., 2005
<b>Zumo de arándano rojo</b> (7 ml/kg de peso al día)	21 sanos	2 semanas	↓ LDL oxidada	Ruel et al., 2005
<b>Extracto de arándano</b> Grupo I: 400 mg /día Grupo II: 1200 mg /día	65 (20/22/23)	8 semanas	↓MDA ↑ eritrocitos en grupo II (1200 mg)	Valentová et al., 2007
<b>Extracto de arándano</b> 500 mg/día	30 (15/15) diabetes tipo II	12 semanas	↔ LDL oxidada	Lee et al., 2008
<b>Zumo de arándano concentrado</b> 125/250/500 ml	30 (9/21) síndrome metabólico/sanos	12 semanas	↓ LDL oxidada	Ruel et al., 2008
<b>Zumo de arándano</b> 480 ml/día	31 Síndrome metabólico	8 semanas	↓ LDL oxidada ↓MDA ↓Hidroxinonenal	Basu et al., 2011
<b>Extracto de arándano liofilizado</b> 50 g/día	48 (25/23)	8 semanas	↓ MDA ↓Hidroxinonenal ↓LDL oxidada	Basu et al., 2010
<b>Arándanos frescos</b> 250 g/día + 375 g 1 h después del ejercicio	15	6 semanas	↔ 8-OHdG en orina	McAnulty et al., 2011
<b>Concentrado de zumo de arándano</b> 500 ml/día	35 13 síndrome metabólico/ 22 sanos	4 semanas	↔ LDL oxidada	Ruel et al., 2013
<b>Extractos de mora y arándanos</b> 45 g extracto de mora 45 g extracto arándano	65 45 fumadoras 20 no fumadoras	9 meses	↓MDA	Kaume et al., 2014
<b>Extracto de frambuesa</b> 30 g/día	15 sanos	4 semanas	↔ MDA	Lee et al., 2011

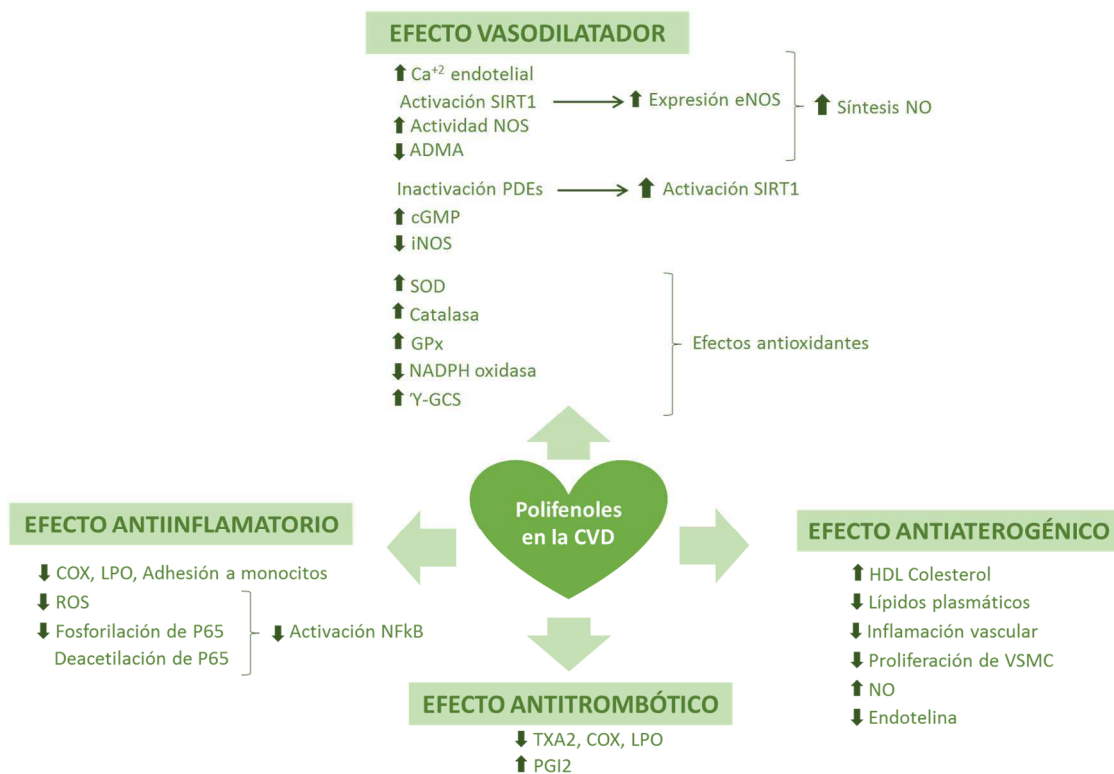


Tabla 2C.6. Ensayos clínicos con cacao, fresas, grosella y aronia.

Producto/Intervención	Población	Duración de intervención	Resultados	Referencia
<b>Cacao en polvo (40 g) +</b> 500 ml leche desnatada	42 riesgo ECV	4 semanas	↓ LDL oxidada	Khan et al., 2012
<b>Bebidas de cacao</b> 30 a 900 mg flavonoles/día <b>Bebidas de cacao +</b> <b>Extracto de té verde</b>	20	5 días	↓ isoprostanos grupo de mayor concentración de flavonoles ↓ PCR	Stote et al., 2012
<b>Extracto de cacao</b> 645.3 mg polifenoles	50 (25/25)	4 semanas	↓ LDL oxidada	Ibero-Baraibar et al., 2014
<b>Fresas</b> 454 g/día	28 hiperlipidémicos	30 días	↓MDA	Jenkins et al., 2008
<b>Extracto de fresa</b> 2 tazas de bebida de fresa al día	16 síndrome metabólico	4 semanas	↓ MDA e ↓Hidroxinonenal ↔ LDL oxidada ↔ PCR	Basu et al., 2009
<b>Bebida de fresa</b> <b>líoilizada + Comida con</b> alto contenido graso	24 hiperlipidémicos	12 semanas	↓ LDL oxidada	Burton- Freeman et al., 2010
<b>Extracto de fresa</b> 10 g equivalentes a 110 g de fresas	44 hiperlipidémicos	6 semanas	↔ LDL oxidada	Burton- Freeman et al., 2010
<b>Fresas</b> 250 g / día	21 sanos	3 semanas	↓ LDL oxidada	Henning et al., 2010
<b>Extracto de fresa</b> 50 g equivalente a 500 g de fresas frescas/día	36 (19/17) diabetes tipo II	6 semanas	↓MDA	Moazen et al., 2013
<b>Fresas frescas</b> 500 g /día	23 sanos	30 días	↓MDA e isoprostanos	Alvarez-Suarez et al., 2014
<b>Extracto de fresa</b> Baja dosis (BD): 25 g equivalente a 250 g de fresas frescas Alta dosis (AD): 50 g equivalente a 500 g de fresas frescas	60 riesgo ECV	3 meses	↓MDA	Basu et al., 2014
<b>Bebida de grosella negra</b> Baja dosis 250 ml/4x/d Bebida de grosella negra alta dosis (250 ml/4x/d	64 (22/21/21)	6 semanas	↓ Isoprostanos grupo de alta dosis	Khan et al., 2014
<b>Zumo de aronia</b> 100 ml/día	25 sanas	3 meses	↓MDA	Kardum et al 2014

### 1.3.2. Polifenoles y salud cardiovascular

Se trata de la patología más estudiada en el área de salud de los polifenoles (Hollman, 2014). Numerosas publicaciones de los últimos años sugieren que los polifenoles pueden modular diversos mecanismos involucrados en la fisiopatología cardiovascular. En este sentido, una reciente revisión elaborada por Quiñones et al. (2013) detalla los posibles efectos protectores de los polifenoles y sus posibles mecanismos de acción. La Figura 2C.7, muestra de forma simplificada los efectos antiinflamatorio, antitrombótico, antiaterogénico y vasodilatador descritos por los autores junto con los posibles mecanismos de acción implicados. Como se observa, la mayor parte de los potenciales efectos beneficiosos van más allá de las propiedades antioxidantes de los polifenoles.

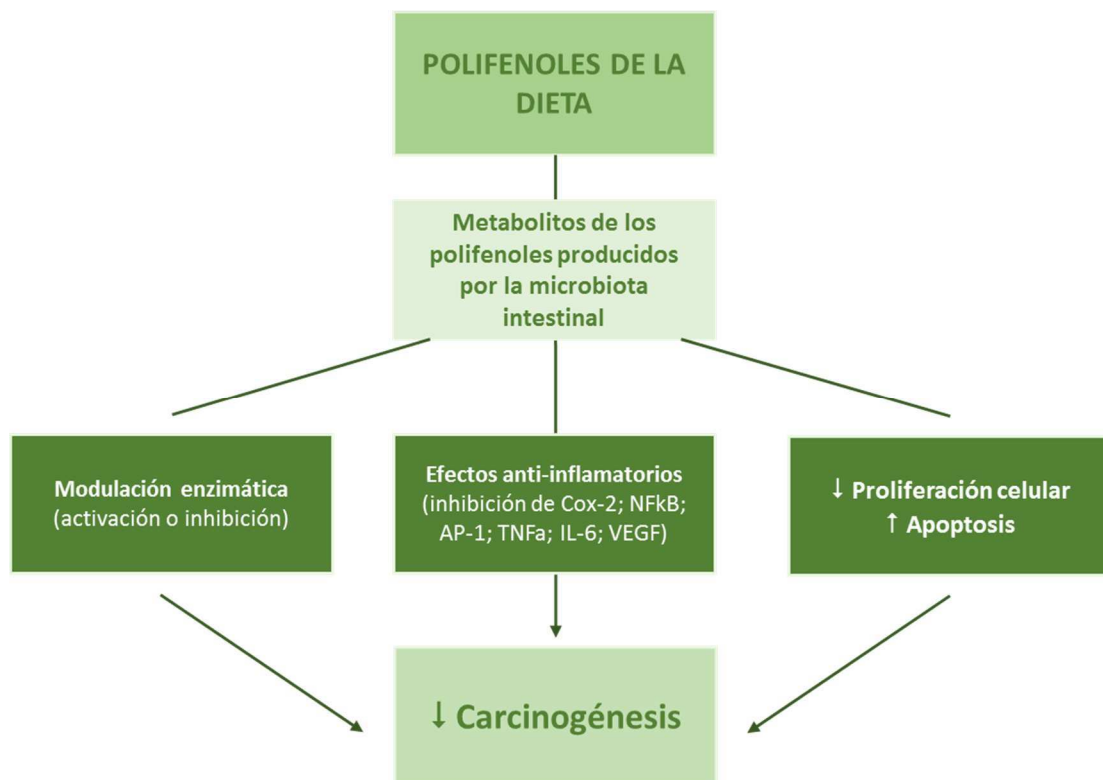


**Figura 2C.7. Efectos beneficiosos de los polifenoles en la enfermedad cardiovascular.** Adaptado de Quiñones et al., 2013

ADMA - Dimetilarginina; COX – Ciclooxygenasa; CVD – Enfermedad cardiovascular; eNOS – Sintasa de óxido nítrico endotelial; γGCS – Gamma glutamylcisteina sintetasa; GPx – Glutathion peroxidasa; HDL – Lipoproteína de alta densidad; cGMP – Guanosina monofosfato cíclica; iNOS – Síntasa de óxido nítrico inducible; LDL – Lipoproteínas de baja densidad; LPO – Lipooxygenasa; NADP - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NO – Óxido nítrico; NFκB - Factor nuclear Kappa B; PDE – Fosfodiesterasa; PGI2 – Prostaglandina I2; ROS – Especies reactivas al oxígeno; SIRT1 – Sirtuina 1 diacetilasa; SOD – Superóxido dismutasa; TXA2 – Tromboxano A2; VSMC – Células del músculo liso vascular.

### 1.3.3. Polifenoles y cáncer

El gran número de estudios realizados en líneas celulares han demostrado que el té verde afecta a las rutas metabólicas y la señalización celular. Esto puede resultar en la inhibición de células cancerígenas, apoptosis e inhibición de la angiogénesis y metástasis (Weng & Yen, 2012). En base a estos resultados y a los últimos estudios realizados en humanos, los polifenoles puede ser una potente herramienta para la prevención y posible futuro tratamiento del cáncer (Chinembiri et al., 2014). En la Figura 2C.8 se presentan algunos de los principales mecanismos en los que los polifenoles pueden actuar en el cáncer (Cardona et al., 2013).



**Figura 2C.8.** Posibles mecanismos propuestos para la prevención del cáncer por los polifenoles de la dieta. Adaptado de Cardona et al., 2013

Cox-2: Ciclooxigenasa-2; NFkB: Factor nuclear Kappa B; AP-1: Factor de Transcripción AP1; TNFa: Factor de necrosis tumoral alfa; IL-6: Interleucina 6; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

### 1.3.4. Efectos y posibles mecanismos de fotoprotección de los polifenoles

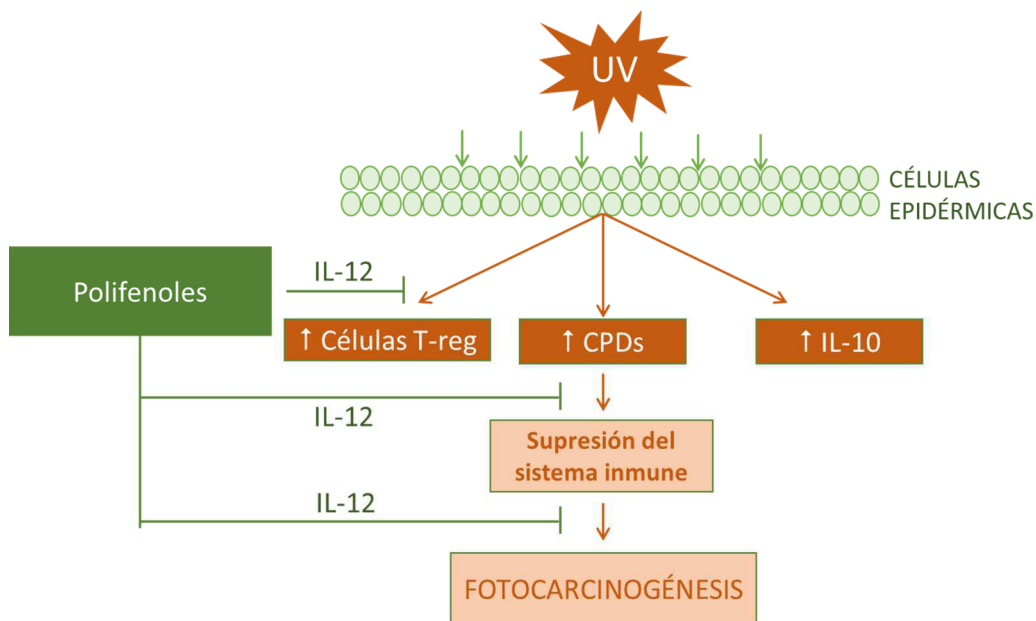
Existe actualmente un gran interés en utilizar compuestos naturales para la prevención del daño producido por la radiación UV y el riesgo de cáncer (Jones & Katiyar., 2013). En el capítulo 2B de esta Tesis, hemos descrito los daños producidos por la luz UV que recordamos eran: estrés oxidativo, inflamación, daño a ADN e inmunosupresión (Ullrich, 2005). Esto provoca que los polifenoles sean unos excelente candidatos debido a sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antioxidantes (Adhami et al., 2008).

Diversos estudios en “in vitro” y en animales han descrito los posibles mecanismos de acción asociados al efecto fotoprotector de los polifenoles A continuación, se describen los efectos y los principales mecanismos implicados.

- **Efecto filtro solar:** A nivel tópico, los polifenoles son capaces de absorber la radiación UV (Nichols & Katiyar, 2010).
- **Efecto antiinflamatorio:** Diversos estudios en animales han mostrado cómo la ingesta de catequinas del té verde reduce el eritema producido por la UV, inhibe la expresión de COX-2 y consecuentemente sus mediadores inflamatorios (prostaglandinas) y la producción de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL1 e IL-6) (Jeon et al., 2009; Meeran et al., 2009). Este efecto antiinflamatorio ha sido demostrado en humanos suplementados con polifenoles de cacao en los que se observó una reducción del eritema producido tras la exposición a UVB (Heinrich et al., 2006; Williams et al., 2009).
- **Efecto antioxidante:** Este efecto ha sido ampliamente demostrado vía tópica tanto en estudios “in vitro” como en animales (Nichols & Katiyar, 2010). En concreto, los polifenoles pueden actuar en la piel:
  1. **Reduciendo la formación de ROS** mediante la inhibición de los sistemas enzimáticos responsables de generar ROS como la COX, lipooxigenasa y xantina oxidasa o también mediante la reducción de iones metálicos.
  2. **Secuestrando directamente los ROS.**
  3. **Induciendo la producción de enzimas antioxidantes.**
- **Efecto reparador de ADN e inmunomodulador:** En una revisión bibliográfica sobre inmunosupresión y fotocarcinogénesis, Katiyar (2007) concluyeron que los polifenoles presentes en extractos de semilla de uva y té verde previenen la inmunosupresión y

fotocarcinogénesis mediante: (i) la inducción de la citoquina inmunoreguladora IL-12 (ii) reparación del ADN dependiente de IL-12; y (iii) la estimulación de Linfocitos T citotóxicos en el microentorno tumoral.

Como hemos comentado en las líneas anteriores, la mayor parte de la evidencia científica de estos mecanismos proviene de ensayos “in vitro”, con células cutáneas, o de ensayos realizados en animales a nivel tópico. Esto dificulta la extrapolación del posible efecto por la suplementación oral en humanos. En este sentido, un estudio realizado con 11 sujetos a los que se les suplementó té verde y se les tomó muestras de piel, puso de manifiesto que varios metabolitos del té verde (O-metil-EC-O-sulfato, ácido gálico-O-glucuronido, O-metil- ácido gálico -O-sulfato, O-metil- ácido gálico-O-glucuronido, quercetina y M6) se encuentran en la piel (Clarke et al., 2015). Esta evidencia sugiere que estos metabolitos pueden ser los responsables tanto de los efectos fotoprotectores encontrados en ensayos clínicos, como de los mecanismos de acción propuestos para las catequinas del té. La Figura 2C.9 resume algunos de los principales mecanismos y efectos fotoprotectores atribuidos a los polifenoles.



**Figura 2C.9. Mecanismos y efectos fotoprotectores de los polifenoles.** Adaptado de Katiyar (2007). Algunos polifenoles como los encontrados en el té verde o en la semilla de uva tienen la capacidad de bloquear los efectos biológicos adversos de la radiación UV a través de la inducción de la citoquina inmunoreguladora, IL-12, evitando de este modo la inmunosupresión inducida por UV. La inhibición de la inmunosupresión inducida por UV contribuye a la prevención de la fotocarcinogénesis. (↑) indican la mejora o la estimulación. Abrev. : Células T-reg – Células T-reguladoras; CPDs – Dímeros de ciclobutano pirimidina; IL-10 – Interleucina 10; IL-12 - Interleucina 12.

## 1. TE VERDE (CAMELIA SINENSIS)

### 2.1. DESCRIPCIÓN

La planta del té (*Camellia sinensis*,) es una planta perteneciente a la Familia *Theaceae*, y sus hojas se utilizan para la preparación de la infusión mundialmente conocida denominada té, siendo después del agua, la bebida popular más consumida en todo el mundo (Yang et al., 2002). Aunque hay más de 300 tipos de té producidos a partir de las hojas de *Camellia sinensis*, mediante diferentes procesos de producción (Sang et al., 2011), generalmente se dividen en 3 tipos: té verde (sin fermentar), té negro (fermentado) y té Oolong o rojo (semifermentado) (Balentine et al., 1997; Lambert & Yang, 2003).

De todo el té producido y consumido en el mundo, el 78 % es negro, 20% verde y tan solo un 2% es Oolong o rojo (Balentine et al., 1997). El té negro es consumido principalmente en países occidentales y algunos lugares asiáticos, el consumo de té verde es predominante en China, Japón e India, mientras que el té rojo es consumido casi en exclusiva en el sureste de China y Taiwan.

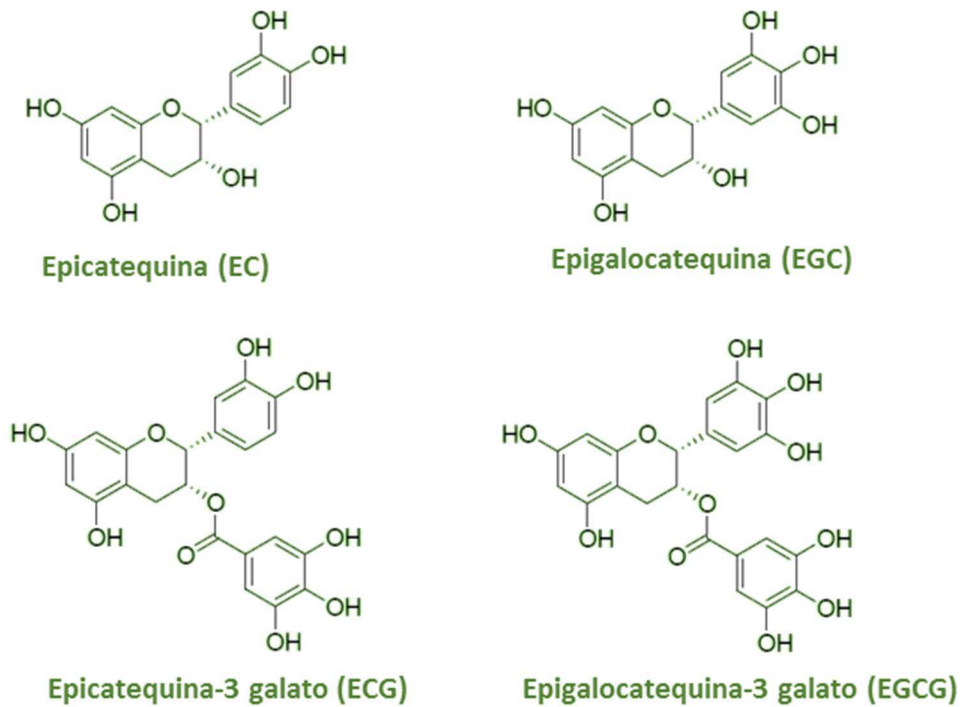
### 2.2. COMPOSICIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS

La hoja de té está compuesta por agua, proteínas, glúcidos, sales minerales, vitaminas del grupo B, vitamina E, vitamina C, minerales como el K, Mn, Cr, Ni and Zn, metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina) y compuestos fenólicos (Graham, 1992; Fernández et al., 2002). A pesar de su origen común, la composición química del té verde y el té negro es completamente diferente, ya que el té verde contiene más de polifenoles (30%) que el negro (5%) y el rojo (4.5%) (Zuo et al., 2002).

De un 6-16% del extracto seco de las hojas de té verde contienen una clase de flavanoles llamados catequinas (Yamamoto et al., 1997; Astill et al., 2001; Wang et al., 2001). Las catequinas, además de ser las responsables de la astringencia y amargor típicos de las infusiones de té verde, son los principales compuestos a los que se les atribuye los potenciales efectos beneficiosos del té sobre la salud (Thorngate & Noble., 1995; Del Rio et al., 2004).

Las principales catequinas encontradas en el té son epigalocatequina-3-galato (EGCG), epigalocatequina (EGC), epicatechin-3-galato (ECG), y epicatequina (EC) (Figura 2C.10). EGCG es la catequina más abundante, más estudiada y puede llegar a tener al 50-75% del contenido total de catequinas del té. Todos los té contienen catequinas, pero el té verde es el que contiene la

concentración más alta (Balentine & Paetau-Robinson., 2000). Además de las catequinas, el té verde, contiene también una pequeña cantidad de otros flavonoides como la quercetina, la miricetina, y el kaempferol (Bhagwat & Haytowitz, 2015).



**Figura 2C.10.** Estructura de las principales catequinas del té verde.

Es importante destacar que la composición de los principales compuestos bioactivos del té (catequinas) varía de forma considerable según diversos factores. La Tabla 2C.7 recopila diversos trabajos científicos que han estudiado los factores que pueden influir en la concentración y composición de compuestos bioactivos, tanto en las hojas de té como en las infusiones.

Tabla 2C.7. Factores que afectan a la composición de compuestos bioactivos en el té verde.

	Controlado por	Factores	Ejemplos	Referencia
Composición de la hoja	Agricultor	<ul style="list-style-type: none"> <li>Variedad y estación del año que se recoge</li> <li>Lugar de cultivo</li> <li>Clima (Condiciones del suelo, clima)</li> <li>Prácticas hortícolas</li> </ul>	A ↑ Exposición al sol, ↑ contenido en catequinas.	Kumamoto & Sonda, 1998
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Edad de la planta</li> </ul>	Cuanto más joven, ↑ contenido en EGCG y cafeína	Lin, Wu, & Lin, 2003
	Fabricante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Método de Procesado</li> <li>Parta de la planta utilizada</li> <li>Tipo de hoja</li> </ul>		Chen et al., 2003
Condiciones de preparación de la Infusión	Fabricante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tamaño de la hoja</li> </ul>		Vuong et al., 2011
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Té en bolsa o suelto</li> <li>Tipo de bolsa</li> </ul>		Rusak et al., 2008
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Contenido de té en la bolsa</li> </ul>	A ↑ contenido en hojas, ↑ contenido de catequinas en la infusión final	Lakenbrink et al., 2000
	Consumidor	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tiempo y temperatura de infusión</li> </ul>	EGC y EC aumentan con el tiempo	Vuong et al., 2011; Labbe et al., 2005 ; Khokhar & Magnusdottir, 2002
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Tipo de Agua</li> </ul>	↑ epimerización en agua del grifo	Wan & Helliwell 2000; Petisca et al., 2009
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Ratio agua: bolsa</li> </ul>	Menor ratio mayor extracción	Perva-Uzunalić, 2004 Astill., 2001 Vuong et al., 2011
↑: Aumento				

Las condiciones de preparación de infusión varían también entre un país y otro debido a los hábitos culturales. Generalmente en Occidente, una infusión de té se suele prepararse con 1.8–2.4 g de té en 200-250 ml de agua caliente dejando el té de 3 a 5 minutos en contacto con el agua (Henning et al., 2003). En Japón y otros países del sureste asiático, se utilizan las mismas hojas de té para hacer tres o cuatro infusiones, y a esta forma de beber té se le llama la ceremonia del té. Las diferentes infusiones obtenidas contienen diferentes concentraciones de catequinas, especialmente la segunda infusión contiene mayor cantidad de EGCG, EGC y xantinas (Sharma et al., 2005).



Además a la hora de la cuantificación de compuestos bioactivos en infusiones de té, los diferentes métodos analíticos y los tipos de solvente utilizados en la extracción (Wang et al., 2000a; Wang et al., 2000b) hacen que sea difícil la comparación de resultados entre los distintos estudios publicados en la literatura científica. Esta variabilidad en la composición de hojas e infusiones, metodología analítica, y hábitos culturales hace además, extremadamente difícil el análisis de su efecto protector a en estudios en humanos, de tal modo que ha sido considerado como uno de los principales factores de confusión en estudios epidemiológicos (Chung et al., 2003).

### 2.3 POSIBLES BENEFICIOS SOBRE LA SALUD

Desde tiempos ancestrales el té verde se ha considerado una bebida medicinal. En la medicina tradicional china (MTC), ha sido prescrito para multitud de patologías (Cabrera et al., 2006). Existen numerosos estudios epidemiológicos y ensayos de intervención que han sugerido que los polifenoles del té verde y especialmente el EGCG pueden tener un efecto preventivo sobre diferentes enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Yang et al., 2002; Chung et al., 2003; Higdon & Frei., 2003; Siddiqui et al., 2004; Grove & Lambert 2010;).

Además de las propiedades antioxidantes, las catequinas del té verde y especialmente el EGCG han mostrado ser anti-mutagénicas (Chen et al., 2011), anti-cancerígenas (Johnson et al., 2010), anti-diabéticas (Zhang et al., 2010), anti-inflamatorias (Danesi et al., 2010), anti-bacterianas (Osterburg et al., 2009), anti-virales (Xiao et al., 2008), anti-obesidad (Moon et al., 2007) y neuro-protectoras (Smith et al., 2010).

#### 2.3.1 Té verde y estrés oxidativo

La potente capacidad antioxidante del té ha sido muy estudiada en estudios *in vitro* y en animales (Nakagawa & Yokozawa, 2002; Frei & Higdon, 2003; Cabrera et al., 2006). De todas las catequinas, el EGCG es la catequina más efectiva con la mayoría de los ROS. Además, las catequinas son quelantes de iones metálicos, por lo que la quelación de estos, previene la formación de ROS (Balentine et al., 1997; Valcic et al., 2000).

Existen numerosos ensayos de intervención realizados con té verde y su posible efecto sobre marcadores de estrés oxidativo, principalmente sobre marcadores de peroxidación lipídica y daño a ADN. Las Tablas 2C.8 y 2C.9 muestran la recopilación de estudios de los últimos 10 años, en los cuales se han evaluado marcadores de oxidación lipídica.

**Tabla 2C.8.** Estudios sobre el estrés oxidativo y marcadores de oxidación lipídica.

Producto/intervención	n/población	Duración de intervención	Resultados	Referencia
<b>Extracto de té verde</b> (4 cápsulas) (1 g catequinas) o 580 mg EGCG	20	1 día	↔ daño ADN (8-OHdG por HPLC en linfocitos)	Henning et al., 2005
<b>Infusiones de té verde</b> 7 tazas (542.5 mg de catequinas)	22	2 semanas	↔ isoprostanos (orina)	Hirano-Ohmori., 2005
<b>Infusiones de té verde</b> 2 tazas (250 mg catequinas)	24 (12/12) sanos	42 días	↓ peróxidos lipídicos ↓ daño ADN (COMET) ↔ MDA	Erba et al., 2005
<b>Extracto de té verde</b> 844 mg flavonoides en extracto de té verde descafeinado	9 sanos	2 semanas	↔ isoprostanos (orina)	Donovan et al., 2005
<b>Cápsulas de té verde</b> 4 cápsulas conteniendo GTP: baja dosis: 500 mg total, alta dosis: 1000 mg, placebo	124 (42 LD/41 HD/41 CTRL)	3 meses	↓ daño ADN (8-OHdG -HPLC orina)	Luo et al., 2006
<b>Bebida en infusión de té verde</b> 1.7 g x 5 veces al día	34 sanos	4 semanas	↓MDA	Coimbra et al., 2006
<b>Cápsulas de té verde</b> 500 mg catequinas en cápsulas	40 (29/11/CTRL)	4 semanas	↓LDL oxidada	Inami, 2007
<b>Infusiones de té verde</b> 6 tazas	60 (15/15/15/15) trabajadores expuestos	6 meses	↔ MDA	Emara and El-Bahrawy, 2008

Tabla 2C.9. Estudios sobre el estrés oxidativo y marcadores de oxidación lipídica (cont.)

Producto/intervención	n/población	Duración de intervención	Resultados	Referencia
<b>Cápsulas de té verde</b> 10 tazas	124 sanos (63/61)	3 semanas	↓MDA	Nantz et al., 2009
<b>Infusiones de té verde</b> 2x150 ml	18	4 semanas	↔ daño AND 8-oxodG (LC-MSMS - orina) ↓ daño ADN (COMET)	Han et al. 2010
<b>Bebida de Té verde (BTV):</b> 4 vasos <b>Extracto té verde (GTE):</b> 2 cápsulas	35 obesidad y síndrome metabólico (BTV/GTE/CTRL)	8 semanas	↓MDA ↓HNE ↔ LDL oxidada	Basu et al., 2010
<b>Cápsulas de té verde y granada</b> 500 mg extracto granada, 300 mg GTE 60 mg vitamina C	114 (56/58) diabetes II	3 meses	↓MDA	Fenercioglu et al., 2010
<b>Cápsulas de té verde</b> 160 mg de catequinas	10 deportistas	3 semanas	↔ LDL oxidada	Eichenberger et al., 2009
<b>Cápsulas de té verde</b> 270 mg EGCG	14	5 semanas	↓ LDL oxidada	Tinahones et al., 2008
<b>Cápsulas de té verde</b> 250 mg/día	40 4 tratamientos (grupos de 10)	4 semanas	↓MDA inducida por ejercicio	Kuo et al., 2015
7 vasos con té verde liofilizado 542 mg/día	22	5 semanas	↓MDA-LDL sérico	Ohmori et al., 2014
<b>Cápsulas de té verde</b> 980 mg polifenoles	16 (8/8) deportistas	2 periodos de 4 semanas	↓MDA tras prueba de velocidad	Jówko et al., 2014

### 2.3.2 Té verde y cáncer

La primera vez que se documentaron efectos preventivos del té verde frente al cáncer fue en un estudio realizado en 1989 por Wang y colaboradores (Wang et al., 1989). A día de hoy, se pueden encontrar más de 1500 artículos en la literatura científica haciendo referencia a las propiedades preventivas del té verde sobre el cáncer.

En los últimos 5 años se han publicado varios metaanálisis y revisiones sistemáticas de estudios epidemiológicos, en los cuales se han observado asociaciones positivas entre el consumo de té verde y la disminución de riesgo de cáncer de pulmón (Wang et al., 2014a), mama (Johnson et al., 2012), hígado (Sing et al., 2011), boca (Wang et al., 2014b), esófago (Sang et al., 2013) y ovarios (Gao et al., 2013). En la mayor parte de los estudios concluyen que aunque se haya observado una asociación positiva, entre el consumo de té y el efecto preventivo frente a estos tipos de cánceres, es recomendable realizar más estudios, especialmente estudios clínicos, que confirmen dicha asociación. En este sentido, en una revisión publicada en el *American Journal of Clinical Nutrition*, Yuan (2013) concluye que los datos actuales no confirman ni niegan el efecto preventivo definitivo del té verde sobre el cáncer, y que se necesitan más ensayos clínicos aleatorizados antes de hacer cualquier recomendación sobre prevención de cáncer y té verde. Igualmente, Lambert (2013) comenta que aunque la evidencia científica disponible es muy prometedora, todavía existen áreas en las que hay que investigar más, como los mecanismos de acción, las dosis efectivas, y las posibles combinaciones con otros compuestos utilizados en las estrategias quimiopreventivas.

En los últimos años, el número de ensayos clínicos de té verde ha aumentado mucho debido a los excelentes resultados obtenidos en los numerosos estudios *in vivo* realizados con animales, así como en los ensayos *in vitro*, sobre el efecto del té verde y la inhibición de carcinogénesis (Moyers & Kumar, 2004; Singh et al., 2011). Actualmente, hay registrados 112 ensayos clínicos con té verde, de los cuales 25 ensayos estudian la eficacia del té verde en diferentes tipos de cáncer (<http://clinicaltrials.gov/>).

No obstante, se pueden encontrar en la bibliografía científica datos de algunos ensayos clínicos, que nos demuestran un claro efecto protector del té sobre el cáncer. Así, Bettuzzi et al. (2006) realizaron un estudio doble ciego con 60 voluntarios (30/30) con alto grado de neoplasia intraepitelial prostática (PIN), en el que los sujetos fueron suplementados con 600 mg de catequinas durante 12 meses. Solo 1 de 30 sujetos del grupo tratamiento desarrollo cáncer

(incidencia 3%) mientras 9 de 30 en el grupo placebo desarrollaron la enfermedad (incidencia 30%).

En un estudio piloto, realizado en Japón, con 136 pacientes a los que se les había extraído un adenoma colorectal (divididos en 2 grupos), se observó que en el grupo que fue suplementado con 1.5 g de extracto de té verde/día (equivalente a 6 tazas) durante 12 meses, tuvo una incidencia de desarrollo de adenoma del 15%, mientras que en el grupo no suplementado esta incidencia fue significativamente mayor, alcanzando el 31% (Shimizu et al., 2008).

Además de los posibles mecanismos de acción descritos en el epígrafe de polifenoles y cáncer, una revisión del 2013 (Henning et al., 2013), planteó el potencial efecto positivo de los polifenoles del té verde para alterar procesos epigenéticos a través de la metilación del ADN, modificación de histonas y regulación del ARN mensajero.

### **2.3.3 Té verde y enfermedades cardiovasculares**

Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales muestran una asociación positiva entre el consumo de té verde y salud cardiovascular (Wolfram, 2007; Zheng et al., 2011; Khan & Mukhtar, 2013). En un reciente metaanálisis de 18 estudios de cohorte prospectivos (Tang et al., 2015) concluyeron que un aumento del consumo de una taza de té verde al día se asocia con un 5% menos de riesgo de muerte cardiovascular, y con un 4% menos de riesgo de morir por cualquier causa. Por otro lado, Onakpoya et al. (2014), tras la realización de una revisión sistemática y meta-análisis en la que incluyeron 20 ensayos clínicos (1536 sujetos), concluyen que el consumo de té verde reduce significativamente la presión sistólica, el colesterol total y el colesterol LDL.

### **2.3.4 Té verde y enfermedades neurodegenerativas**

La neurodegeneración es un proceso multifactorial en el que están involucrados diferentes factores como el estrés oxidativo, la neuroinflamación, la neurotoxicidad, la acumulación de hierro y la reducción de antioxidantes endógenos (Limón et al., 2010). Estudios epidemiológicos recientes han mostrado que el consumo regular de té está asociado a un menor riesgo de padecer Parkinson y problemas cognitivos relacionados a la neurodegeneración (Checkoway et al., 2002; Ng et al., 2008).

Debido a la falta de estudios clínicos bien controlados, el efecto del té en la progresión de desórdenes neurodegenerativos no ha sido estudiado a gran escala. En un reciente ensayo clínico con 15 pacientes enfermos de Parkinson (Chen et al., 2015) han concluido que el consumo de 3 tazas de té durante 3 meses puede mejorar es estado antioxidante y reducir el estrés oxidativo de pacientes con enfermedad de Parkinson.

La mayor parte de la evidencia del papel de los polifenoles del té verde sobre enfermedades neurodegenerativas proviene de ensayos *in vitro* y en animales. Diversos estudios muestran el potencial de las catequinas, y especialmente EGCG, para proteger a las neuronas contra el daño provocado por diversas neurotoxinas (Weinreb et al., 2004). Los principales mecanismos de neuroprotección se deben a su actividad quelante de hierro, a la regulación de enzimas protectoras antioxidantes, a la capacidad de interactuar con la señalización neuronal y a su potencial para inhibir los procesos inflamatorios en el cerebro (Weinreb et al., 2004).

## 2.4. SEGURIDAD

El té verde, al ser consumido durante siglos, y ser la bebida más consumida del mundo, su larga tradición de uso le confiere la consideración de ser un alimento seguro. Según Cabrera et al. (2006), los posibles efectos adversos asociados al consumo de té (verde y negro) se deben principalmente a tres factores principales:

- **Contenido en cafeína**

Como se muestra en la Tabla 2C.10, el té verde contiene menos cafeína que el café, y aunque este contenido sea menor, el consumo excesivo de té puede ocasionar nerviosismo, desordenes del sueño, vómitos, dolor de cabeza y taquicardia (Nawrot et al., 2003).

**Tabla 2C.10. Contenido de cafeína en alimentos y bebidas.** Adaptado de Cabrera et al. (2006) y Nawrot et al. (2003).

Producto	Contenido en cafeína (150 ml)
Café Normal	80–115 mg
Café expreso	108–180 mg
Café Instantáneo	65 mg
Café descafeinado	1–3 mg
Té verde (infusión de 3 min)	15–25 mg
Te Negro (infusión de 3 min)	40–70 mg
Té rojo	18–33 mg
Refresco de Cola	38–46 mg (360 ml)
Ingesta de cafeína diaria por debajo de 400 mg no está asociada a efectos adversos	

- **Presencia de aluminio**

El aluminio (Al), es un elemento neurotóxico que se puede acumular en el organismo y causar enfermedades neurodegenerativas (Cabrera et al., 2006). Algunos estudios han descrito la capacidad de la planta de té para acumular este elemento (Flaten, 2002; Morita et al., 2004). En España, López et al. (2000) evaluaron la presencia de Al en alimentos y bebidas, y encontraron en infusiones de té verde concentraciones de Al que oscilaron entre 13.91 y 27.45 µg/L. En la literatura, el rango de valores encontrados en infusiones de té verde se encuentran entre 1–6 mg/L (Flaten, 2002), por lo que los valores observados para muestras comercializadas en nuestro país fue significativamente inferior. No obstante, no existe evidencia científica que pruebe que el consumo de té tenga relación con toxicidad por Al (Cabrera et al., 2006).

- **Efectos de los polifenoles del té sobre la biodisponibilidad del hierro.**

Varios estudios han demostrado que las catequinas del té verde puede tener una afinidad por el hierro, y las infusiones de té verde puede reducir la biodisponibilidad del hierro de la dieta (Handouai et al., 2003). Este efecto podría ser importante en personas con anemia (Cabrera et al., 2006). En una revisión sistemática de 35 estudios sobre el efecto del consumo de té negro en los niveles de hierro, Nelson & Poulter (2004) concluyeron que, aunque el té limita la absorción de hierro no hemo en los alimentos, no existe evidencia suficiente para concluir que esto tendría un impacto en las concentraciones de hemoglobina y ferritina. Sin embargo, en niños en edad preescolar, se observó una relación estadísticamente significativa entre beber té y niveles bajos de hierro. Cabe señalar que la interacción entre el té y el hierro pueden ser mitigados mediante la adición de limón o recomendando el consumo de té entre las comidas y no durante las mismas (Cabrera et al., 2006). Respecto a otras posibles interacciones con medicamentos y otros alimentos, el té verde contiene Vitamina K, y esta puede antagonizar el efecto de warfarinas (anticoagulantes) (Taylor & Wilt, 1999). También se ha descrito interacciones con el fólico (Alemdaroglu, 2008).

En la literatura hay descritos, algunos casos de hepatotoxicidad asociados al consumo de suplementos de té verde (Bonkovsky, 2005; Mazzanti et al., 2009). Las dosis en la mayoría de los casos van desde los 700 a los 2100 mg/día, y la manifestación clínica es principalmente un incremento de la concentración plasmática de bilirrubina y transaminasas, así como dolor abdominal. Las razones son desconocidas aunque pueden estar relacionadas con las diferencias intra-individuales en el metabolismo y biodisponibilidad de las catequinas (Mazzanti et al., 2015).

Varios estudios de intervención en humanos que han utilizado dosis altas de catequinas no han mostrado reacciones adversas (Chow et al., 2003; Chow et al., 2005; Bettuzzi et al., 2006) ni en adultos ni en niños y adolescentes. Un estudio realizado con niños entre 6 y 16 años de edad que consumieron una bebida de té verde que contenía 576 mg de catequinas (equivalente a de 3 a 6 tazas) durante 24 semanas no presentaron efectos adversos (Matsuyama et al., 2008).



**#3**

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## HIPÓTESIS

La ingesta regular de un producto rico en polifenoles puede afectar al equilibrio redox y proteger las células contra el daño oxidativo.

## OBJETIVO GENERAL

Diseñar, desarrollar y evaluar la eficacia de un producto rico en polifenoles que reduzca el daño oxidativo en individuos sanos.

Para la consecución de este objetivo general, planteamos asimismo los siguientes objetivos específicos:

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

En la fase de **diseño** del producto se realizaron dos estudios:



### ESTUDIO 1. CATEQUINAS EN INFUSIONES DE TÉ VERDE

1. Conocer la cantidad de catequinas en bolsas de hojas de té verde comerciales, evaluar cómo las condiciones de preparación de la infusión influyen en el contenido de catequinas, y estimar el contenido de catequinas en infusiones preparadas en base a las recomendaciones del fabricante.



### ESTUDIO 2. CATEQUINAS EN EXTRACTOS COMERCIALES DE TÉ VERDE

2. Analizar la cantidad de catequinas, fenoles totales y capacidad antioxidante en extractos comerciales de té verde, y su relación entre ellos, para poder utilizar posteriormente un método rápido y económico en el control de calidad de los extractos de té verde.

En la fase de **desarrollo** del producto se realizó un estudio:



### ESTUDIO 3. CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES

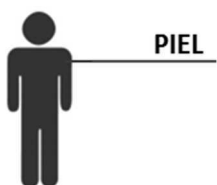
3. Determinar y caracterizar los compuestos bioactivos presentes en el producto, evaluar la estabilidad de los mismos, y la aceptabilidad de éste a lo largo de su vida comercial.

En la fase de **evaluación de la eficacia** se realizó un ensayo clínico que, para una mayor comprensión, lo hemos dividido en dos estudios:



### ESTUDIO 4.1 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA: ESTUDIO SISTÉMICO

4. Evaluar el efecto sobre el estado redox sistémico mediante la determinación de la concentración sanguínea de proteínas carbonilo, MDA, LDL oxidada, F2-isoprostanos, 8-OH-dG, GSH/GSSH y la proteína C reactiva.



### ESTUDIO 4.2 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA: ESTUDIO EN PIEL

5. Evaluar el efecto fotoprotector del producto mediante la evaluación de la dosis mínima de eritema (MED) y valorar el efecto sobre parámetros relacionados con el estado y la calidad de la piel (hidratación, pérdida transepidérmica del agua y elasticidad).
6. Evaluar la protección genómica mediante el recuento de la expresión de p53 y células apoptóticas SBC (*Sunburn cells*), la formación de dímeros de pirimidina (CPDs), así como valorar el efecto inmunoprotector en piel mediante el recuento de células de Langerhans.

**#4A**

**MATERIALES Y  
MÉTODOS**

**DISEÑO DEL  
PRODUCTO Y  
DISEÑO  
EXPERIMENTAL**

...the first of these is the fact that the...

...the second is the fact that the...

...the third is the fact that the...

...the fourth is the fact that the...

...the fifth is the fact that the...

...the sixth is the fact that the...

...the seventh is the fact that the...

...the eighth is the fact that the...

...the ninth is the fact that the...

...the tenth is the fact that the...

...the eleventh is the fact that the...

...the twelfth is the fact that the...

...the thirteenth is the fact that the...

...the fourteenth is the fact that the...

...the fifteenth is the fact that the...

...the sixteenth is the fact that the...

...the seventeenth is the fact that the...

...the eighteenth is the fact that the...

...the nineteenth is the fact that the...

...the twentieth is the fact that the...

...the twenty-first is the fact that the...

...the twenty-second is the fact that the...

# 4 A

## Diseño del producto RP / Diseño experimental

### MATERIALES Y MÉTODOS



#### 1. DISEÑO Y DESARROLLO DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES

*p101*

#### 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

*p137*

##### FASE 1

IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE FRUTAS-EXTRACTOS ANTIOXIDANTES

*p102*

##### FASE 2

SCREENING DE EXTRACTOS COMERCIALES DE TE VERDE

*p103*

##### FASE 3

DISEÑO Y DESARROLLO DEL PRODUCTO

*p104*

##### ESTUDIOS 1

CATEQUINAS EN INFUSIONES DE TE VERDE *p106*

##### ESTUDIO 2

CATEQUINAS, POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE TE VERDE. *p107*

##### ESTUDIO 3

COMPOSICIÓN/CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL PRODUCTO.

*p108*

##### ESTUDIO 4

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL PRODUCTO RP. *p108*

4.1. DISEÑO DEL ENSAYO

4.2. PARTICIPANTES (SELECCIÓN DE LOS SUJETOS)

4.3. INTERVENCIONES

4.4. VARIABLES PRINCIPALES Y SECUNDARIAS

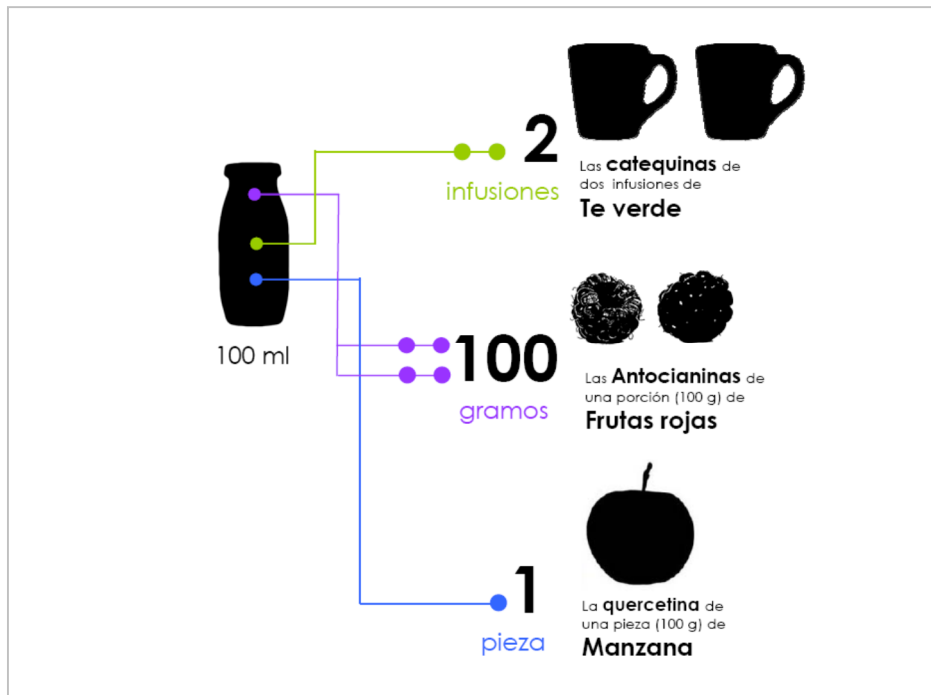
4.5. TAMAÑO MUESTRAL

4.6. ALEATORIZACIÓN Y ASIGNACIÓN DE LOS SUJETOS

4.7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

## 1. DISEÑO Y DESARROLLO DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES

El producto rico en polifenoles (producto RP) fue diseñado con el objeto de aportar la cantidad de compuestos bioactivos equivalentes a la de 2 tazas de té verde (expresadas como catequinas), una manzana de 100 g (expresada como quercetina), y una porción de 100 g de frutas rojas (expresado como antocianinas) (Figura 4A.1).



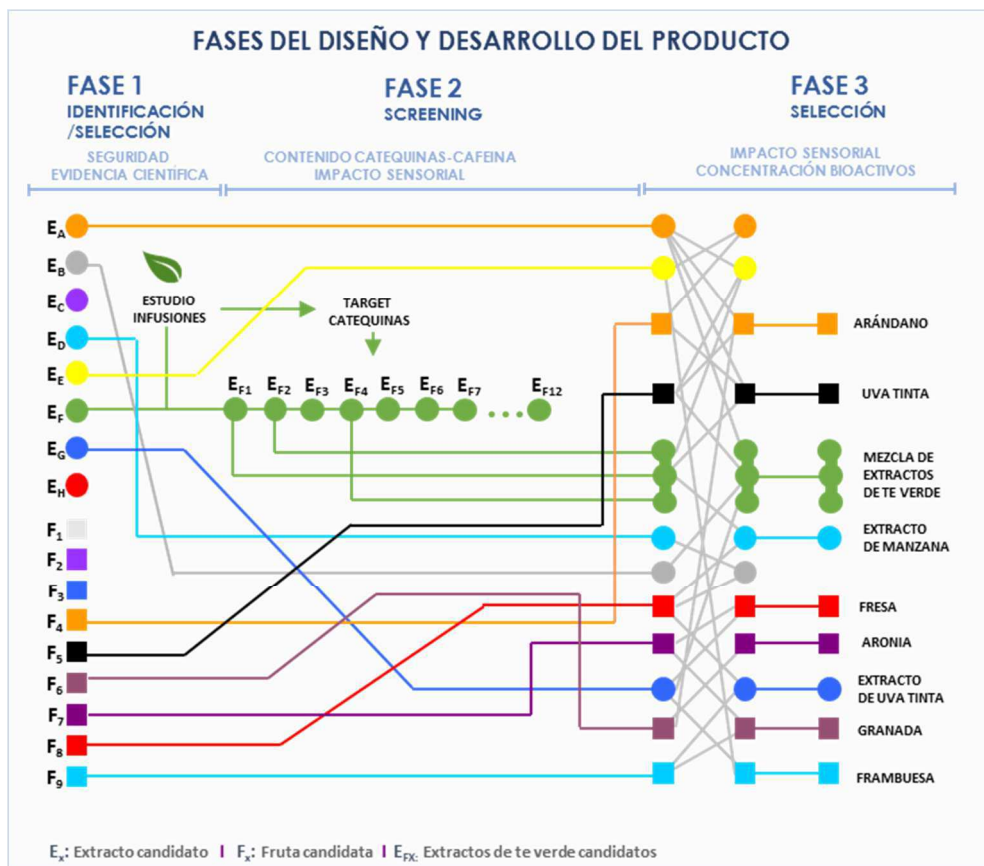
**Figura 4A.1** Objetivo Nutricional del producto

La figura muestra las equivalencias en compuestos bioactivos que se quisieron adicionar por 100 ml durante el diseño y desarrollo del producto.

Los principales factores de decisión a la hora de seleccionar los ingredientes fueron la seguridad, la evidencia científica disponible, el contenido en compuestos bioactivos y el impacto sensorial aportado por cada uno de los ingredientes.



El diseño y desarrollo del producto se realizó en tres fases, reflejadas en la Figura 4A.2, y que pasamos a explicar a continuación.



**Figura 4A.2.** Diseños experimentales durante las fases de diseño y desarrollo del producto.

Durante la primera fase se estudió la evidencia científica y seguridad de diversas frutas y extractos (Ex y Fx). Durante esta fase se realizó un estudio para conocer el contenido en catequinas en infusiones de té verde. En la segunda fase se realizó un estudio donde se analizaron diversos extractos de té verde y en base al contenido en catequinas, cafeína e impacto sensorial se seleccionaron tres extractos. En la tercera fase se realizaron múltiples combinaciones entre todos los ingredientes seleccionados en la fases 1 y 2.

### 1.1. FASE 1 | IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE FRUTAS-EXTRACTOS ANTIOXIDANTES

Para llevar a cabo la primera fase de identificación de frutas y extractos ricos en polifenoles candidatos a ser utilizados en el diseño del producto, tuvimos en cuenta la seguridad y así como la evidencia científica sobre el contenido en compuestos bioactivos y sus efectos beneficiosos para la salud. Se identificaron 8 extractos y 9 frutas, de los cuales dos extractos y 3 frutas no pasaron a la siguiente fase por diferentes motivos, principalmente por el impacto sensorial sobre las características organolépticas del producto final y la evidencia científica (Tabla 4A.1).

Tabla 4A.1. Identificación de extractos y frutas antioxidantes durante la fase 1.

EXTRACTOS		FRUTAS	
<b>Olivo*</b>	Granada	Aronia	Uva tinta
Té verde	Manzana	Frambuesa	Arandano
<b>Melon*</b>	Uva	<b>Acai*</b>	Granada
<b>Pino*</b>	Arándano	Fresa	<b>Noni*</b>
		<b>Higo*</b>	
* Extractos no seleccionados.			

El ingrediente con mayor relevancia fue el té verde, por su larga historia de uso en la alimentación humana y por el número y calidad de las publicaciones revisadas. En esta fase surgió la necesidad de realizar un estudio cuyo principal objetivo fuera conocer la cantidad de catequinas en infusiones de té verde en el mercado español (Estudio 1 de la Tesis). El origen de esta necesidad se debió a la gran variabilidad, en la en la concentración de catequinas en infusiones que aparece recogida en la literatura científica y de forma particular por la falta de datos sobre el contenido de estos compuestos en tés comercializados en nuestro país (Peterson et al., 2005).

## 1.2. FASE 2 | SCREENING DE EXTRACTOS COMERCIALES DE TE VERDE

Una vez conocido el contenido aproximado en catequinas en una taza de té verde (Resultado del estudio 1), y teniendo como objetivo añadir el contenido en catequinas de cómo mínimo 2 tazas de té verde, se procedió a identificar los distintos extractos comerciales disponibles en el mercado y a hacer la selección en base al máximo contenido en catequinas (Estudio 2 de la Tesis), mínimo aporte de cafeína y mínimo impacto sensorial (Figura 4A.3).

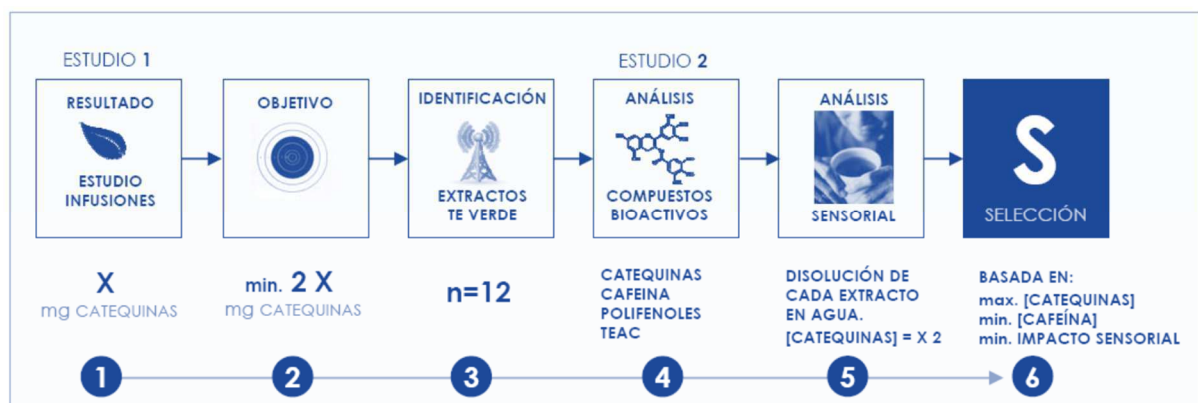


Figura 4A.3. Etapas realizadas durante el proceso de identificación y selección de extractos comerciales de té verde.

### 1.3. FASE 3 | DISEÑO Y DESARROLLO DEL PRODUCTO

Tras la obtención de los resultados de los estudios realizados en infusiones y extractos, y junto con la revisión bibliográfica sobre la evidencia científica disponible de frutas rojas y extractos vegetales (Fase 1), se diseñaron varias fórmulas que fueron prototipadas a escala de laboratorio. En concreto, se mezclaron diferentes tipos de frutas y extractos a diferentes concentraciones, hasta llegar a la fórmula más equilibrada entre concentración de compuestos bioactivos y sabor.

Finalmente, como resultado de estos análisis, los principales ingredientes activos incluidos en el producto fueron: La mezcla de tres extractos de té verde (ingrediente activo principal), extracto de semilla de uva, extracto de manzana y una mezcla de frutas rojas compuesta por zumos concentrados de aronia, uva tinta, frambuesa, arándano, granada y puré de fresa (Tabla 4A.2). Además se le adicionó puré de manzana para aumentar el contenido en quercetina, y puré de plátano y un aroma natural para optimizar el sabor final y mejorar sus características organolépticas.

**Tabla 4A.2. Ingredientes seleccionados para el desarrollo del producto rico en polifenoles.**

Ingredientes	Funcionalidad
Mezcla de Extractos de té verde	↑ Catequinas ↓ Cafeína Optimizar sabor
Extracto de semilla de Uva	↑ OPCs ↑ Antocianidinas
Extracto de manzana	↑ Ácido Clorogénico ↑ Quercetina
Mezcla de frutas rojas (aronia, uva tinta, frambuesa, arándano, granada y fresa)	↑ Antocianinas ↑ Ácido elágico
Puré de Manzana	↑ Quercetina
Puré de Plátano	Optimizar sabor
Aroma natural	Optimizar sabor
Vitamina C	↑ CAT
↑ Incremento, ↓ Reducción OPCs: Procianidinas Oligoméricas, CAT: Capacidad Antioxidante Total	

La Figura 4A.4 muestra el diagrama de flujo del proceso de producción del producto RP a escala industrial en la planta de productos dietéticos de Hero España.

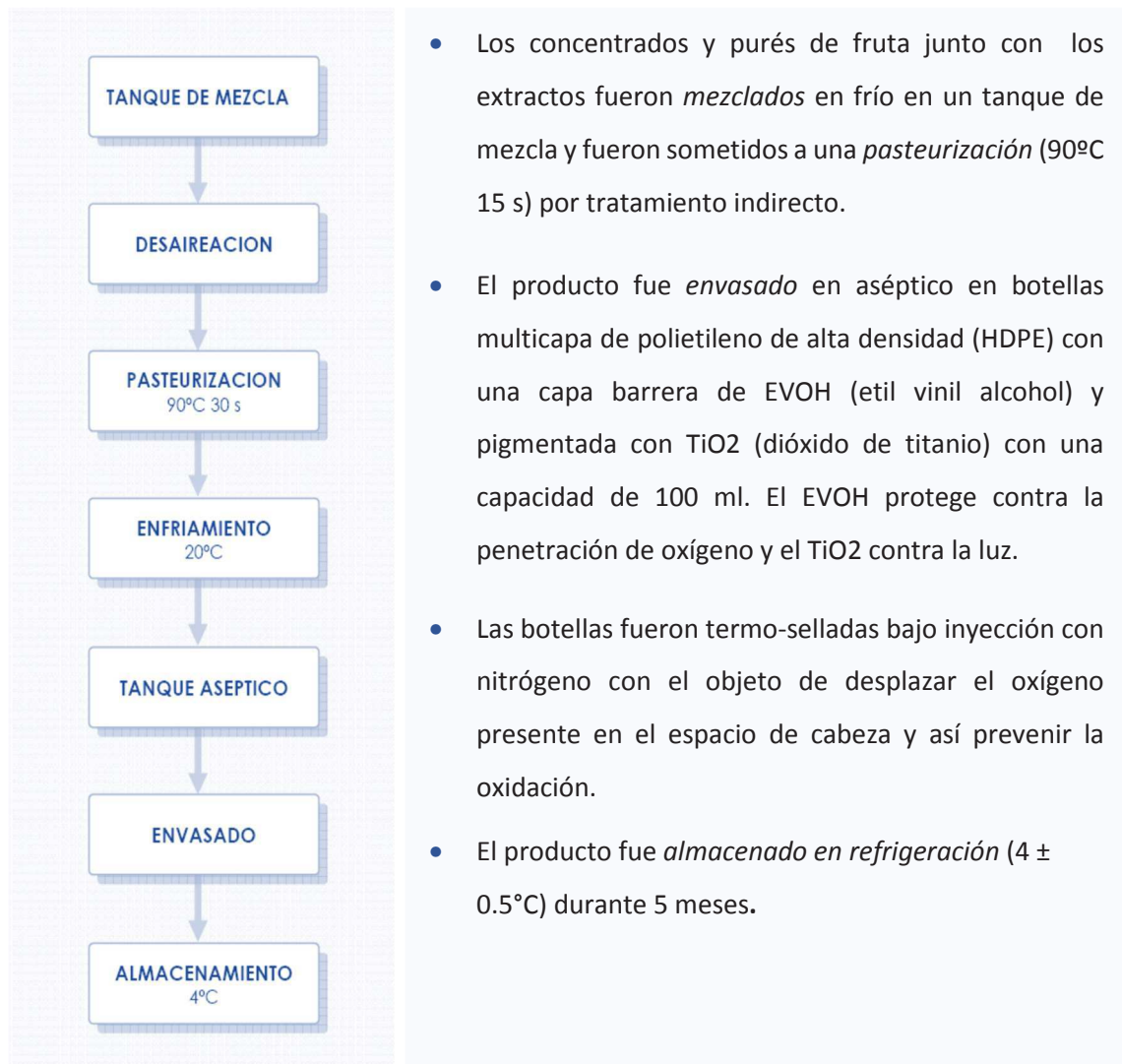


Figura 4A.4. Diagrama de flujo del proceso de fabricación.

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la consecución de los objetivos generales y específicos, se realizaron varios estudios, recogidos esquemáticamente en la Figura 4A.5, y que se describen a continuación.



**Figura 4A.5.** Estudios realizados durante las fases de diseño, desarrollo y evaluación de la eficacia del producto RP.

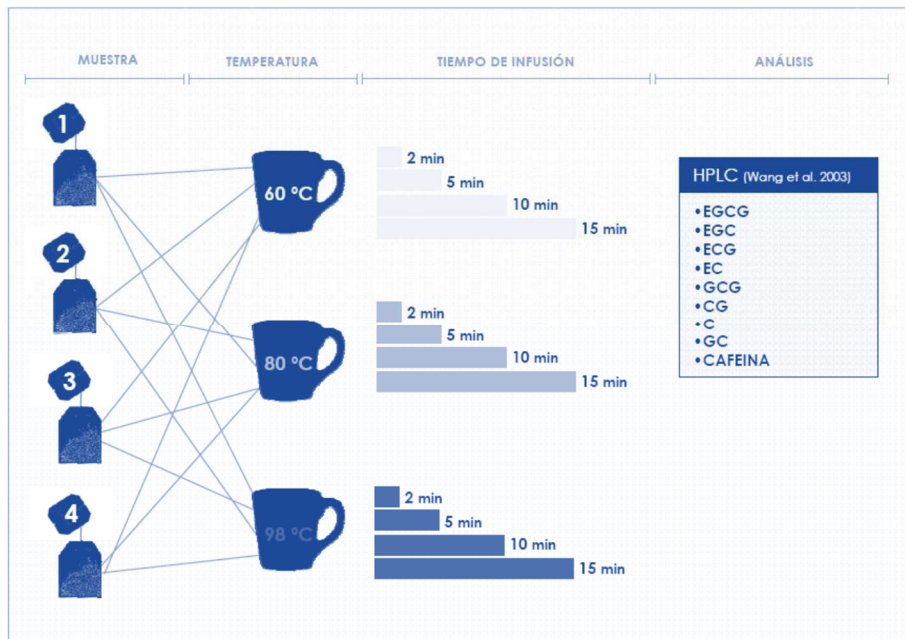
### 2.1. ESTUDIO 1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CATEQUINAS EN INFUSIONES DE TE VERDE

Se estudiaron cuatro muestras comerciales de té verde (Tabla 4A.3) de origen chino, adquirido en supermercados locales de Murcia. El contenido de té de las bolsas variaba entre 1.1 y 2.0 g. Una de la muestras analizada fue de cultivo ecológico.

**Tabla 4A.3.** Muestras de Té verde analizadas

Muestra de Té	Peso de la bolsa	Recomendaciones de preparación del fabricante
1	1.5 g	80° C, 2 min
2	2.0 g	80-95 ° C, 2-5 min
3	2.0 g	Agua hirviendo < 5 min
(Ecológico)	1.1 g	Agua hirviendo, 5 min

Las infusiones fueron preparadas introduciendo las bolsas de té en agua destilada (50 ml de agua por 1 g de té) a 60, 80 y 98°C. Los tiempos de infusión de las muestras a las tres temperaturas seleccionaron fueron de 2, 5, 10 y 15 minutos. Una vez completado el tiempo de infusión, las muestras se llevaron a temperatura ambiente, se diluyeron con agua y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min, para proceder posteriormente al análisis del contenido en catequinas totales e individuales, y cafeína mediante HPLC según el método descrito por Wang et al. (2003).



**Figura 4A.6.** Diseño experimental para determinar el contenido aproximado en catequinas de una taza de té verde.

## 2.2. ESTUDIO 2. CONTENIDO EN CATEQUINAS, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS COMERCIALES DE TE VERDE.


En este segundo estudio, se identificaron 12 extractos comerciales de té verde de diversos proveedores y con distintas procedencias (Japón, China, Alemania, España e Inglaterra). Para el análisis, los extractos se diluyeron con agua destilada hasta conseguir una concentración de 1 mg de extracto/ml. Los contenidos en catequinas totales e individuales, y cafeína se analizaron siguiendo la misma metodología que en el estudio de las infusiones. Adicionalmente, se evaluaron los compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu (Vernon et al., 1999) y la capacidad antioxidante por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Böhm et al., 2002).

Tres extractos de té fueron seleccionados por su alto contenido en catequinas, su bajo contenido en cafeína y las características de astringencia, aportada por la cantidad de catequinas.

### 2.3. ESTUDIO 3. COMPOSICIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL PRODUCTO. ESTABILIDAD Y ACEPTACIÓN SENSORIAL A LO LARGO DEL TIEMPO

Tras el desarrollo del producto, se procedió a validar la composición nutricional y caracterizar el perfil de compuestos bioactivos. Se realizaron diversos análisis físico-químicos, nutricionales y de caracterización de compuestos fenólicos y otros componentes con actividad antioxidante. Además se realizó un estudio de vida comercial analizando la estabilidad de estos compuestos durante el almacenamiento a 4 °C a lo largo de 5 meses (Figura 4A.7). Los muestreos fueron realizados cada mes para la determinación de la capacidad antioxidante, vitamina C, color y compuestos bioactivos. El análisis sensorial se efectuó al inicio y a los 5 meses del estudio. Todos los análisis a tiempo 0 fueron realizados la semana de fabricación del producto RP.

Análisis / Meses	0	1	2	3	4	5
Sensorial	•			•		•
Color	•	•	•	•	•	•
Vitamina C	•	•	•	•	•	•
ORAC	•	•	•	•	•	•
Polifenoles	•	•	•	•	•	•



**Figura 4A.7.** Cronograma y diseño experimental para la evaluación de la estabilidad y la aceptación sensorial del producto.

### 2.4. ESTUDIO 4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES

Para evaluar la eficacia del producto desarrollado, se realizó un ensayo clínico doble ciego, en sujetos sanos con un diseño de medidas intra-sujeto con un grupo control, comparando el efecto del producto RP frente a un placebo. Se analizaron las diferencias a nivel sistémico (Estudio 4.1) y el nivel de protección en piel frente a radiación UV (Estudio 4.2) tras un periodo de intervención de 10 semanas. A continuación se describen las fases del diseño del ensayo.

### **2.4.1. Diseño del ensayo**

El diseño utilizado fue un ensayo clínico doble ciego, con grupo control, controlado y los sujetos fueron asignados de forma aleatoria a uno de los siguientes grupos:

- El grupo de tratamiento (n=25), que recibió un envase de 100 ml al día del producto RP durante 10 semanas.
- El grupo control (n=15), que recibió durante el mismo tiempo un placebo con la misma composición nutricional, excepto en el contenido en polifenoles.

La duración del estudio fue de 10 semanas, ya que de acuerdo a la bibliografía científica este periodo fue el más adecuado (Sies & Stahl, 2004; Williamson & Manach 2005; Thomasset et al., 2007).

Asimismo, conviene señalar que los sujetos pertenecientes al grupo de estudio que interrumpieran o abandonasen la ingesta del producto por alguna circunstancia distinta a los criterios de exclusión, pero que no representaran pérdidas en el seguimiento, se analizarían en el grupo inicialmente asignado (diseño Intención de tratar).

### **2.4.2. Participantes (Selección de los sujetos)**

La población de referencia fueron sujetos sanos del área metropolitana de Murcia, trabajadores en activo en el sector servicios, con estudios de titulación media y superior.

La población elegible fueron trabajadores de la empresa HERO España, S.A y personal universitario de la Facultad de Medicina reclutada mediante sesión informativa conjunta realizada por 3 investigadores del estudio.

Los sujetos que formaron parte del grupo de estudio fueron voluntarios que aceptaron participar libremente sin remuneración y aceptaron las condiciones de la investigación mediante la firma del consentimiento informado. Los criterios de inclusión y exclusión se detallan en la Tabla 4A.4.



Tabla 4A.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación del estudio

CRITERIOS DE INCLUSION	CRITERIOS DE EXCLUSION
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Edad:</b> Entre 25 y 65 años.</li> <li>▪ <b>Sexo:</b> Hombre y mujeres.</li> <li>▪ <b>Estado de salud:</b> sanos.</li> <li>▪ <b>Tipo de piel:</b> I-IV (clasificación Fitzpatrick)</li> <li>▪ <b>Consentimiento informado y hoja de información firmada.</b></li> <li>▪ <b>Aceptación de ingresar en el estudio voluntariamente.</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enfermedad aguda o crónica.</li> <li>▪ Individuos que tomen fármacos, suplementos dietéticos y/o vitamínicos.</li> <li>▪ Mujeres embarazadas o lactantes.</li> <li>▪ Problemas dermatológicos.</li> <li>▪ Individuos que utilicen camas solares o que hayan estado expuestos al sol y/o UV artificial en la zona del fototest y/o en la zona de biopsia al menos 30 días antes de que comience el estudio.</li> </ul>
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Deseo del voluntario de salir del estudio en cualquier momento.</li> <li>▪ Incumplimiento del calendario de visitas para evaluar el tratamiento.</li> </ul>	

### 2.4.3. Intervenciones (Producto rico en polifenoles y placebo)

El grupo de tratamiento tomó el producto RP objeto de esta Tesis doctoral, que ha sido descrito en detalle en la primera parte de materiales y métodos. El producto placebo suministrado al grupo control fue específicamente diseñado para tener unas características sensoriales y nutricionales similares al producto activo, excepto en el contenido en Polifenoles y vitaminas antioxidantes.

Debido a que el color y la astringencia son propiedades características de los polifenoles, se realizaron varias pruebas con colorantes alimenticios hasta llegar al color más próximo. Los colorantes seleccionados fueron Carmosina y Patent Blue V. Para simular la astringencia/amargor característico de las catequinas se utilizó un extracto de quinina. Las frutas fueron seleccionadas para aproximarnos lo máximo posible al perfil de azúcares del producto. Debido a que solo con el colorante no se podía alcanzar el color deseado, se adicionó un 6% de puré de fresa. Para alcanzar la acidez característica de las frutas rojas se añadió ácido cítrico. El mismo aroma natural utilizado en el producto fue incorporado en el placebo. La Tabla 4A.5 muestra los ingredientes de cada uno de los productos, así como su funcionalidad. Los valores nutricionales y la capacidad antioxidante total vienen descritas en la parte de resultados de la

presente Tesis Doctoral. El producto y el placebo se administraron en el mismo envase sin identificar

**Tabla 4A.5. Ingredientes seleccionados para el desarrollo los productos tratamiento y placebo.**

Ingredientes	Funcionalidad
<b>Mezcla de frutas</b> (Plátano, manzana, uva blanca)	Igualar perfil de azúcares y sabor
<b>Sacarosa</b>	Igualar perfil de azúcares
<b>Puré de Fresa</b>	Igualar color
<b>Colorantes</b> (Carmosina , Patent Blue V)	Igualar color
<b>Quinina</b>	Igualar astringencia
<b>Ácido cítrico</b>	Igualar acidez
<b>Aroma</b>	Igualar sabor

A los voluntarios incluidos en el estudio se les suministró una hoja con instrucciones y recomendaciones dietéticas, descritas en la Tabla 4A.6, con el objeto de minimizar posibles hábitos que pudiesen interferir en los resultados. Asimismo, con la finalidad de evitar posibles interacciones con otros alimentos y crear un hábito durante el periodo de estudio, se les recomendó tomar el producto todas las mañanas antes de desayunar.

**Tabla 4A.6. Instrucciones para los participantes.**

<b>1. No exponerse, más que lo estrictamente necesario, a luz solar durante los dos meses y medio de duración del protocolo.</b>
<b>2. Evitarán la ingesta de alcohol y analgésicos, y actividad física vigorosa 2-3 días antes de las visitas.</b>
<b>3. Deberán mantener sus hábitos de ejercicio físico y alimentación durante su participación en el estudio.</b>

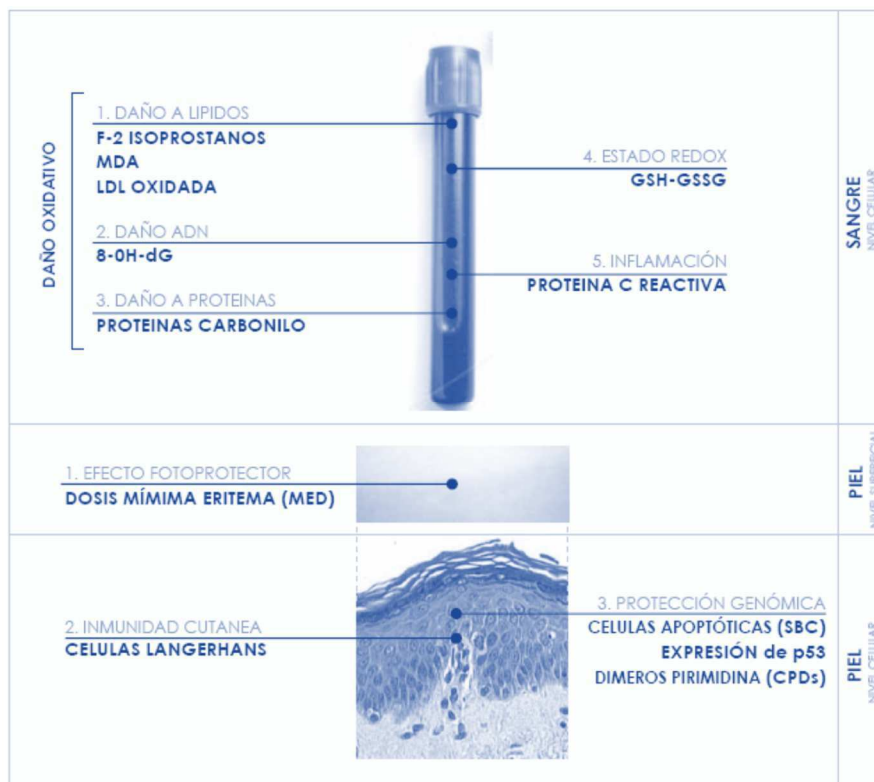
Las recomendaciones dietéticas (Tabla 4A.7) incluían una ingesta máxima de diferentes alimentos con el objeto de limitar el consumo de altas cantidades de polifenoles en la dieta habitual de los participantes.

**Tabla 4A.7.** Recomendaciones dietéticas.

Ingesta máxima de alimentos por día	
Vegetales	3 servicios/día
Frutas o zumos	3 servicios/día
Té verde, té negro o café	1 taza/día
Chocolate	2 onzas/día
Vino	1 copa/día
Cerveza	0,5 l/día

#### 2.4.4. Variables principales y secundarias del estudio

Las 12 variables principales de valoración en este estudio quedan reflejadas en la Figura 4A.8.



**Figura 4A.8.** Variables principales determinadas en sangre y piel (superficial y tras biopsia cutánea).

La Tabla 4A.8 muestra las 69 variables secundarias evaluadas en el estudio. Se incluyeron variables de control (parámetros lipídicos, características demográficas y antropométricas, e ingesta dietética), variables de seguridad (parámetros de función renal y hepática, bioquímica general, parámetros de metabolismo del hierro). Además se incluyeron variables de eficacia relacionadas con la calidad de la piel (TEWL, hidratación y elasticidad).

**Tabla 4A.8. Variables secundarias.**

TIPO DE PARÁMETRO	N	VARIABLE SECUNDARIA
<b>METABOLISMO LIPÍDICO</b> [CONTROL]	4	Colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos
<b>FUNCIÓN RENAL HEPÁTICA</b> [SEGURIDAD]	8	Bilirrubina , albúmina , ácido úrico, urea , creatinina, GOT (ASAT), GPT (ALAT), lactato deshidrogenasa
<b>METABOLISMO HIERRO</b> [SEGURIDAD]	3	Hierro, ferritina, transferrina
<b>BIOQUÍMICOS</b> [SEGURIDAD]	20	Equilibrio hídrico, glucosa, hemograma, coagulación, creatin quinasa
<b>ESTADO Y CALIDAD DE LA PIEL</b> [CONTROL-EFICACIA]	10	Tipo de piel, color (glúteo/brazo), melanina, pérdida transepidermica del agua (TEWL), hidratación, elasticidad
<b>DEMOGRÁFICAS</b> [CONTROL]	4	Edad , sexo, hábito tabáquico, presión arterial
<b>ANTROPOMÉTRICOS</b> [CONTROL]	4	IMC , peso, grasa corporal, circunferencia cintura/cadera
<b>INGESTA DIETÉTICA</b> [CONTROL]	16	Energía , proteína, carbohidratos , grasa (saturada, mono y poliinsaturada), fibra , vitaminas (C, E y fólico), calcio, sodio, colesterol, ingesta de frutas y vegetales

#### 2.4.5. Tamaño muestral

Estimamos el tamaño muestral sobre la estimación *a priori* de los siguientes criterios:

1. La diferencia esperada de cambio en los parámetros de daño oxidativo en el grupo de intervención respecto al grupo control.
2. El cambio de la dosis mínima de eritema (MED).
3. La diferencia de parámetros de protección genómica en la biopsia cutánea.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la Macro ¡NR2IS para SPSS de A Bonillo, JM Doménech y R Granero 2000.

La estimación de cambio favorable en parámetros de daño oxidativo promedio de 75 % en el grupo de intervención y del 40 % en el grupo control supone un riesgo relativo (RR) de 1,88. Para un riesgo de rechazo de hipótesis nula alfa de 0,05 y riesgo beta de 0,2 el tamaño mínimo fue de 30 sujetos (Test bilateral). Asumiendo un 5-10 % de pérdidas durante el estudio en cada grupo (2-3 sujetos) el tamaño mínimo resultante fue de 33 sujetos.

Considerando estos aspectos y sobre la base mínima necesaria para observar estas diferencias estimadas decidimos finalmente estudiar un mínimo 40 sujetos en total.

Respecto a las variables estudiadas en piel consideramos dos relevantes: MED y CPDs. Para un incremento del 40 % en MED en el grupo de tratamiento, el riesgo relativo (efecto protector) respecto al grupo control sería 1,4. Del mismo modo, esperaríamos una diferencia mínima en la media de células /mm<sup>2</sup> en el grupo control del 40 % sobre el grupo de tratamiento (RR = 1,4). Estimamos que el tamaño de muestra de sujetos para observar estas diferencias sería de 19 sujetos con biopsia cutánea.

#### **2.4.6. Aleatorización y asignación de los sujetos a los grupos de tratamiento**

Antes de solicitar el consentimiento, los sujetos fueron informados de que se trataba de un estudio aleatorizado con un grupo control que recibe placebo con doble ciego para el sujeto y los investigadores. De los 40 sujetos reclutados, todos firmaron el consentimiento para realizar el estudio pero no todos aceptaron la biopsia cutánea, por lo que finalmente se estudiaron 40 sujetos, 23 con biopsia cutánea.

La aleatorización de los sujetos en las dos ramas de tratamiento A y B (experimental y placebo) se realizó por el método de Efron (1979), con la Macro !RNDTA para SPSS, versión 2000.03.10 (c) A.Bonillo, JM.Domenech & R.Granero.

Para obtener los grupos de sujetos con y sin biopsia se aleatorizaron los 17 sujetos sin biopsia para grupos equilibrados de tratamiento A y B, y los 23 con biopsia en dos grupos desequilibrados para tratamiento A y B (Ab y Bb). Para la valoración de los parámetros individuales, sistémicos y el efecto fotoprotector se analizaron las ramas A + Ab respecto B + Bb; para parámetros en piel Ab versus Bb.

Puesto que el estudio en piel mediante biopsia era un diseño intra-grupo con medidas pre y post-ingesta, se decidió realizar un grupo mayor de sujetos con tratamiento frente a placebo, manteniendo el grupo placebo pre y post-ingesta para comparar los cambios que observáramos en el grupo de tratamiento respecto a controles y así aumentar la validez de las observaciones, siendo conscientes de que la asimetría en el número de sujetos de cada grupo podría influir negativamente en la significación de las comparaciones.

El investigador independiente, elaboró un listado al azar de los sujetos del estudio después de barajar los sobres numerados que contenían en su interior la verdadera identidad de los sujetos. Según el método de Efron (1979), a cada número de caso se le asocia un número aleatorio entre 0 y 1 generado automáticamente y se asigna una probabilidad de pertenencia al grupo experimental. Si el número aleatorio es superior a la probabilidad de pertenencia el sujeto se asigna al grupo A y si sucede lo contrario al grupo B.

La asignación de voluntarios a los grupos control y experimental se realizó de la siguiente forma:

- **Sujetos sin biopsia:** Se aleatorizaron en dos grupos equilibrados con una probabilidad de pertenencia de 0,5 rango (0.3 a 0.7). Finalmente, los 17 sujetos sin biopsia de piel quedaron distribuidos en los grupos control (8 sujetos) y experimental (9 sujetos).
- **Sujetos con biopsia:** Se realizó una aleatorización para grupos desiguales con probabilidad de pertenencia al grupo de estudio de 0.75 (rango 0.654 a 0.846). Finalmente, los 23 sujetos con biopsia quedaron distribuidos de forma no equilibrada a los grupos control (7 sujetos) y experimental (16 sujetos).

Por lo tanto, 15 sujetos fueron asignados al grupo control y 25 al grupo experimental.

### 2.4.7. Protocolo experimental

Durante la reunión explicativa con los voluntarios potenciales del ensayo, celebrada el 4 de Septiembre de 2009 en la sala de grados de la Facultad de Medicina, se procedió a la entrega de unos cuadernillos que incluían la Hoja de Información para el participante, las instrucciones del estudio, el calendario de visitas y otros aspectos generales y éticos del estudio. Una vez aclaradas todas las preguntas que surgieron, los voluntarios que quisieron participar en el ensayo firmaron el Consentimiento informado (Anexo) y los que, además, quisieron participar en el ensayo con biopsia firmaron el Documento de Consentimiento informado para biopsia cutánea (Anexo) con su aceptación expresa. La Figura 4A.9 muestra las diferentes etapas del protocolo del estudio.

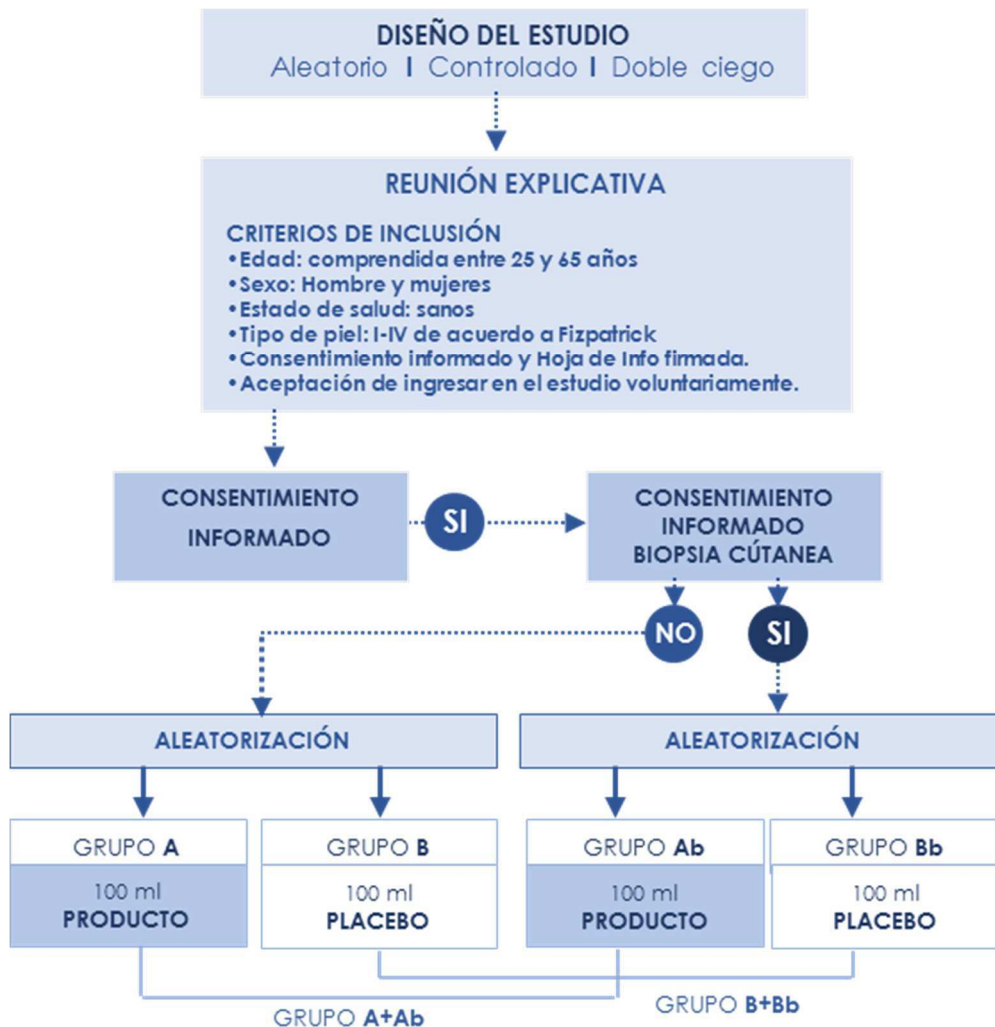


Figura 4A.9. Protocolo del estudio.

El protocolo siguió las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de 1964, revisadas en el año 2000, así como las normas de Buenas Prácticas Clínicas (ICH, 1996). La Figura 4A.10 representa el protocolo de actuación para los sujetos del estudio.

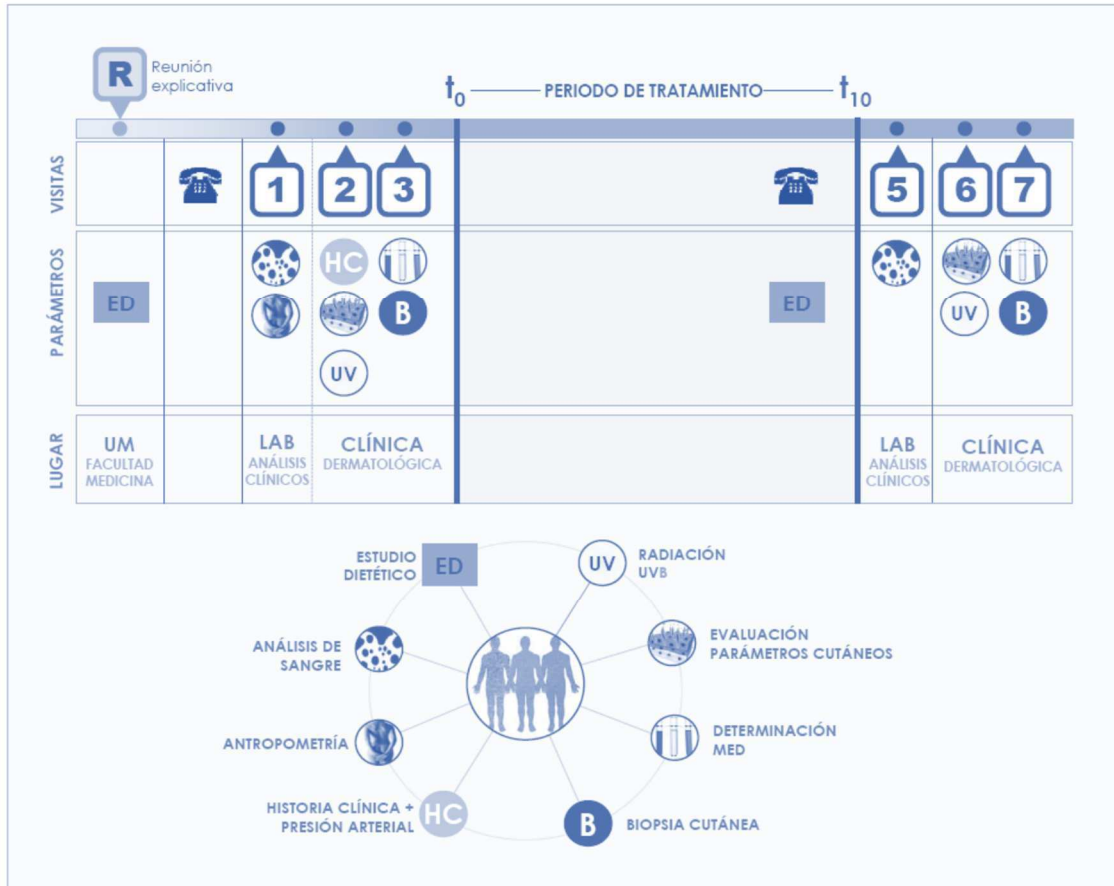


Figura 4A.10. Esquema de visitas

El primer día del estudio, los participantes fueron al laboratorio de análisis clínicos Munuera (Murcia), donde se les extrajo por punción venosa, una muestra sanguínea de 15 ml que se utilizó para realizar el hemograma y pruebas básicas de coagulación, así como el análisis plasmático del perfil bioquímico general y de la actividad de enzimas hepáticas. El plasma, suero y sangre total resultante se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 500 microlitros para la posterior determinación del resto de variables analíticas de interés para este estudio. Además, a todos los participantes se les realizó el estudio antropométrico en la misma clínica.



El segundo día, con los resultados analíticos, los participantes fueron a la clínica Dermatológica OPENDERMA (Murcia) donde se les realizó la historia clínica y un examen físico, se les determinó la presión arterial sistólica y diastólica, y se evaluaron los resultados clínicos de los test analíticos. Con los datos obtenidos se decidió su incorporación o no al estudio. En el caso de la no inclusión, se les dio a los voluntarios una explicación razonada de la decisión tomada.

En la misma visita se valoró en piel, por técnicas no invasivas, el color, el nivel de hidratación, la tasa de pérdida de agua transepidermal y la elasticidad. Además, cada sujeto fue expuesto a una irradiación de rayos ultravioleta tipo B (UVB: 290-320 nm) para la posterior determinación de la Dosis Mínima de Eritema (MED). La zona de irradiación fue la parte media de la nalga.

El tercer día, los voluntarios volvieron a la clínica Dermatológica OPENDERMA para la determinación de la MED. En los sujetos que firmaron el consentimiento informado de biopsia cutánea, se realizó una biopsia de la zona irradiada con aproximadamente 1.4 MED para el análisis histopatológico. El cuarto día, a primera hora de la mañana antes de desayunar cada individuo comenzó a ingerir el producto rico en polifenoles o el placebo.

A las diez semanas del comienzo del tratamiento, los voluntarios se sometieron a las mismas pruebas con la misma cronología y en los mismos lugares que lo hicieron el primer, segundo y tercer día. El cumplimiento de la ingesta del producto oral y placebo se evaluó mediante el recuento de unidades entregadas.

**#4B**

**MATERIALES Y  
MÉTODOS**

**METODOLOGÍA  
ANALÍTICA Y  
ANÁLISIS  
ESTADÍSTICO**



# 4 B

## Metodología analítica/análisis estadístico

### MATERIALES Y MÉTODOS



#### 1. METODOLOGÍA ANALÍTICA: FASE DE DISEÑO Y DESARROLLO

##### 1.1. CATEQUINAS EN INFUSIONES Y EXTRACTOS DE TÉ VERDE (ESTUDIOS 1 Y 2)

- 1.1.1 Contenido en hojas, Infusiones y extractos de té
- 1.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante (TEAC) en extractos de té verde
- 1.1.3 Determinación de compuestos fenólicos totales en extractos de té verde

##### 1.2. CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES (ESTUDIO 3)

- 1.2.1 Análisis Nutricional
- 1.2.2 Determinación de vitamina C
- 1.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>)
- 1.2.4 Evaluación del color
- 1.2.5 Análisis sensorial
- 1.2.6 Determinación de composición de compuestos bioactivos
  - 1.2.6.1 Extracción de compuesto fenólicos
  - 1.2.6.2 Determinación de compuestos fenólicos
  - 1.2.6.3 Determinación de catequinas por Floroglucinólisis

## 2. METODOLOGÍA ANALÍTICA: FASE DE EVALUACIÓN CLÍNICA

### 2.1 DETERMINACIONES EN SANGRE (ESTUDIO 4.1)

- 2.1.1 Obtención de muestras biológicas
- 2.1.2 Determinación de daño oxidativo a ADN
- 2.1.3 Determinación de daño oxidativo a proteínas
- 2.1.4 Determinación de daño oxidativo a lípidos
  - 2.1.5.1 Determinación de LDL oxidada (oxLDL)
  - 2.1.5.2 Determinación de F2-Isoprostanos
  - 2.1.5.3 Determinación de Malondialdehído (MDA)
- 2.1.5 Determinación de Proteína C Reactiva como marcador de inflamación
- 2.1.6 Valoración del estado redox
  - 2.1.6.1 Determinación de los valores de glutatión total.
  - 2.1.6.2 Determinación del glutatión oxidado (GSSG)
- 2.1.7 Determinación de parámetros bioquímicos generales, lipídicos y del metabolismo del hierro.

### 2.2 DETERMINACIONES EN PIEL (ESTUDIO 4.2)

- 2.2.1 Determinación de la dosis mínima de eritema (MED)
  - 2.2.1.1 Fuente de radiación UVB y zona de determinación (Test área)
  - 2.2.1.2 Determinación del tiempo de radiación y dosis de UVB emitida en cada sujeto
  - 2.2.1.3 Protocolo de radiación
  - 2.2.1.4 Determinación del grado de eritema, melanina y efecto fotoprotector
- 2.2.2 Evaluación de la calidad de la piel
  - 2.2.2.1 Pérdida de agua transepidérmica (TEWL)
  - 2.2.2.2 Hidratación del estrato corneo
- 2.2.3 Biopsias y análisis histopatológico
  - 2.2.3.1 Obtención de muestras cutáneas
  - 2.2.3.2 Procesado de las biopsias cutáneas
  - 2.2.3.3 Preparación e inclusión del tejido
    - Histoquímica
      - 2.2.3.4.1 Detección de células apoptóticas (Sunburn Cells -SBC)
      - 2.2.3.4.2 Detección de p53
      - 2.2.3.4.3 Detección de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs)
      - 2.2.3.4.4 Detección de células de Langerhans
      - 2.2.3.4.5 Control
  - 2.2.3.5 Análisis cuantitativo

### 2.3 EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL Y DE SALUD

- 2.3.1 Determinación de medidas Antropométricas
- 2.3.2 Determinación de Presión Arterial
- 2.3.3 Estudio Dietético (Evaluación de la dieta)
- 2.3.4 Historia Clínica

## 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La Figura 4B.1 muestra un esquema general de los métodos analíticos utilizados en la presente Tesis Doctoral y los centros de investigación donde se llevaron a cabo las determinaciones de las distintas variables en las fases de diseño, desarrollo y evaluación clínica del producto rico en polifenoles. Un total de 11 centros participaron en el estudio, pertenecientes a Organismos Públicos y Privados de Investigación nacionales e internacionales.

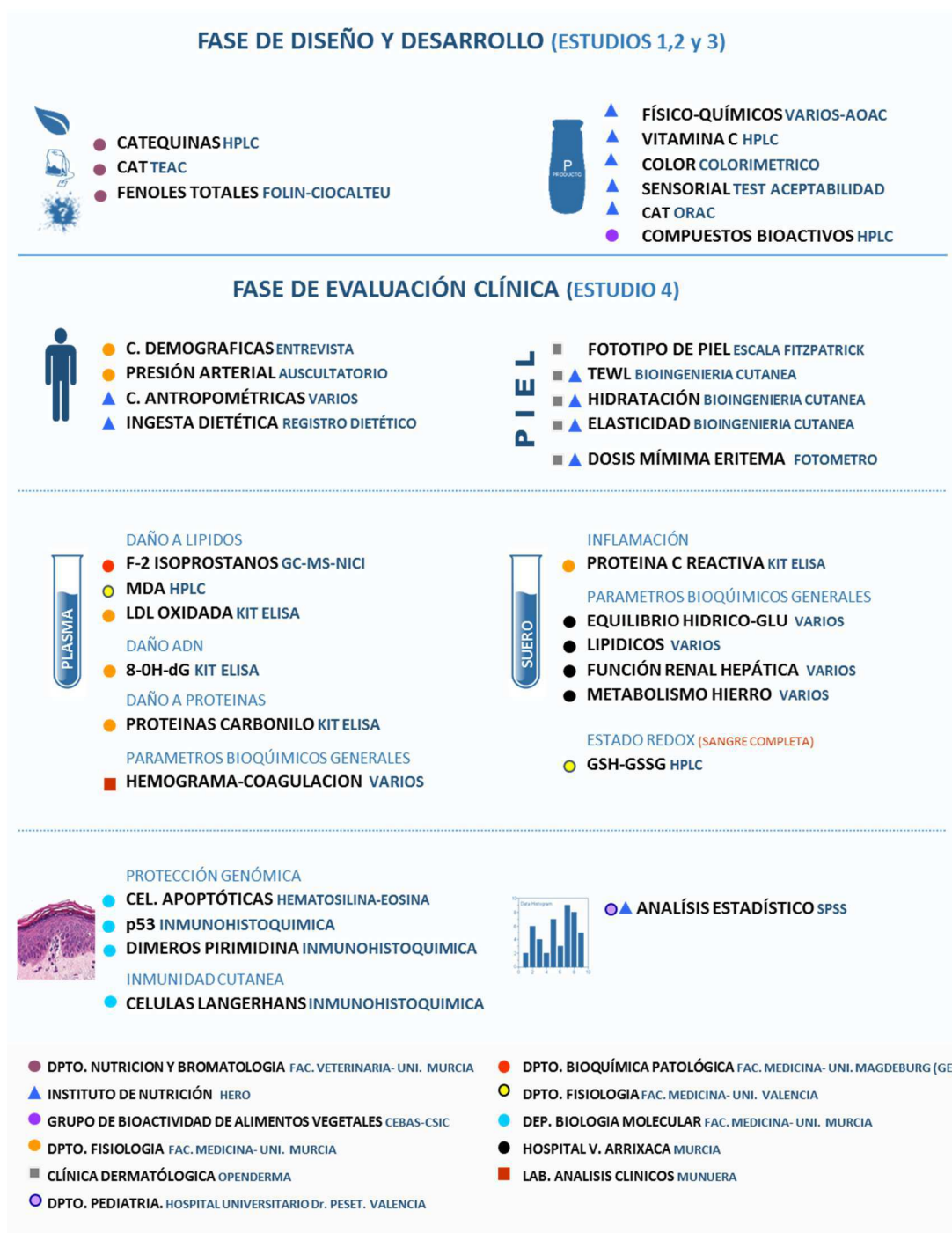


Figura 4B.1. Métodos analíticos, variables y centros de investigación participantes en el estudio.

## 1. METODOLOGIA ANALÍTICA: FASE DE DISEÑO Y DESARROLLO

La Figura 4B.2 muestra las variables analizadas en las distintas muestras y los centros donde se realizaron las determinaciones de los estudios 1, 2 y 3.



**Figura 4B.2.** Lugar de realización de las determinaciones analíticas realizadas en bolsitas, infusiones y extractos de té verde y el producto rico en polifenoles.

### 1.1. DETERMINACIÓN DE CATEQUINAS Y CAFÉINA EN INFUSIONES Y EXTRACTOS DE TÉ VERDE (ESTUDIOS 1 Y 2)

La cuantificación de catequinas y cafeína en hojas de té verde, infusiones y extractos fueron realizadas en el grupo de investigación de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia durante los años 2004 al 2006.

#### 1.1.1 Determinación del contenido de catequinas y cafeína en hojas de té, infusiones y extractos de té verde.

La determinación de la composición de catequinas y cafeína de las hojas de té contenidas en cada una de las bolsitas, se realizó de acuerdo al método propuesto por Lakenbrink et al. (2000). En resumen, 0.2 g (mezcla de 10 bolsitas de té de una misma marca comercial) fueron extraídas por duplicado mediante una solución de metanol-agua (70%) durante 10 minutos en un baño de agua a 70 °C. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para su posterior inyección en el HPLC. En el caso de las infusiones y extractos de té verde se utilizó el protocolo descrito por Wang et al. (2003) con pequeñas modificaciones.

El volumen de inyección fue de 20 ml y se utilizó un HPLC Elite LaChrom-Hitachi provisto de columna de fase reversa RP-C<sub>18</sub> (LiChrospher®, 250x4 mm, 5µm), precedida por una pre-columna RP-C<sub>18</sub> (5µm) y equipado con un detector de diodos con rango de medida de 200-500

nm. El contenido en catequinas y cafeína se expresó en mg/g para las hojas y extractos de té verde y en mg/100 ml para las infusiones.

**Tabla 4B.1 Condiciones cromatográficas para la determinación de catequinas y cafeína**

Fase móvil	0,1% ácido ortofosfórico - agua (eluyente A) 0,1% ácido ortofosfórico- metanol (eluyente B)
Elución	Gradiente (0min 20%B, 25min 45%B, 30 min 20%B)
Velocidad de Flujo	1 ml /min
Volumen inyección	20µl
Longitud de onda	210 y 280 nm
Temperatura	35º C
Cuantificación	Patrón externo

### 1.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante (TEAC) en extractos de té verde

La capacidad antioxidante fue determinada siguiendo el método *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity (TEAC)* descrito por Miller et al. (1996) y modificado por Böhm et al. (2002). Debido a la solubilidad limitada del patrón Trolox (Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromán-2-carboxílico), se realizó una disolución madre en metanol hasta llegar a una concentración de 25mM. La solución fue almacenada a -30ºC, y previo a la realización de las determinaciones la solución madre fue descongelada para preparar las soluciones de trabajo diluyendo con agua destilada hasta llegar a concentraciones de 2.5 y 125 µmol/L.

El método TEAC está basado en la reducción del radical catión ABTS<sup>•+</sup> por los antioxidantes presentes en las muestras. El catión ABTS<sup>•+</sup> es generado, mediante reacción química, a partir de ABTS (2,2-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)) y dióxido de manganeso (MnO<sub>2</sub>). Los antioxidantes presentes en las muestras capturan los radicales generados, este proceso se traduce en una disminución de la absorbancia a 734 nm proporcional a la concentración de antioxidantes de la muestra. Los resultados se expresaron como mmoles equivalentes de Trolox/g.

### 1.1.3 Determinación de compuestos fenólicos totales en extractos de té verde

Los polifenoles totales fueron cuantificados mediante espectrofotometría siguiendo el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), utilizando ácido gálico como solución patrón,



preparando distintas soluciones de trabajo con concentraciones que oscilaron entre 20 y 100 µg/ml. La técnica se basa en la oxidación, en medio básico, de los grupos hidroxilos de los fenoles por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para el desarrollo de la reacción a 200 µl de muestra se le adicionó 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (1:10 en agua) y 0.8 mL de una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Transcurrida 1 hora se midió la absorbancia a 750 nm. El contenido en polifenoles totales se expresó en mg de ácido gálico/g de extracto.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES (ESTUDIO 3)

Las diferentes actividades de caracterización y estabilidad del producto desarrollado fue realizada, durante el año 2008, en los laboratorios del Instituto de Nutrición Infantil Hero (Alcantarilla, Murcia) y en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Centro Superior de Investigaciones Científicas (CEBAS-CSIC) (Espinardo, Murcia).

### 1.2.1 Análisis Nutricional

Tanto en el producto rico en polifenoles como en el producto utilizado como placebo se determinaron los parámetros relacionados con su composición nutricional, cuantificando su contenido en hidratos de carbono, azúcares simples, grasa total, proteína bruta y fibra dietética total, mediante los métodos analíticos recogidos en la Tabla 4B.2.

**Tabla 4B.2.** Análisis nutricionales realizados en el producto tratamiento y el placebo.

Análisis	Unidades	Equipo	Método	Referencia
Hidratos de Carbono	g/100 g	-	Por diferencia	
Azúcares	mg/100 g	HPLC-RI Waters	HPLC	Gotz, 1980
Proteína	g/100 g	Digestor Buchi-324 Unidad destilación Buchi 324	Kjeldahl (N*6.25)	AOAC n. 920.152.1990
Grasas	g/100 g	Equipo de Hidrólisis Buchi B-411 I Extractor Buchi B-811	Hidrólisis- desección	AOAC n. 920.75 y 922.06, 1991
Fibra	g/100 g	Sistema Fibertec E	Enzimático- Gravimétrico	AOAC n. 991.43.1998

### 1.2.2 Determinación de vitamina C

La cuantificación de ácido ascórbico se realizó mediante UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) en fase reversa con un detector de absorbancia diodo array (DAD) (Waters Acquity UPLCTM (Waters Corp., Milford, EE.UU.). La Tabla 4B.3 resume las condiciones

cromatografías utilizadas para el análisis de ácido ascórbico. El contenido en Vitamina C se expresó en mg /100 ml.

**Tabla 4B.3. Condiciones cromatografías para la determinación de Vitamina C**

Fase móvil	Hidrógeno fosfato potásico en 500 ml agua, pH=3.5
Elución	Isocrática
Velocidad de Flujo	0.4 ml /min
Volumen inyección	4 µL
Longitud de onda	245 nm
Temperatura	24° C
Cuantificación	Mediante estándar externo.

### 1.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>)

Se siguió la metodología ORAC (Oxigen-Radical Absorbance Capacity, capacidad de absorción de radicales de oxígeno) empleando fluoresceína (ORAC<sub>FL</sub>) (Dávalos *et al*, 2004). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 200 µl. El extracto antioxidante hidrofílico (50 µl) y la fluoresceína (150 µl; 70 nM, concentración final) se preincubaron durante 30 min a 37 °C. A continuación, se adicionó AAPH (2,2'-Azobis (2-Amidino-Propano) Dihidroclorado) (25 µl; 12mM, concentración final), midiendo la fluorescencia cada 60 s durante 81 min, manteniendo la placa en incubación a 37 °C. Se utilizó un lector de placas Synergy 2 (Biotek GMBH, Offenburg, Germany) con filtros de emisión y excitación de 520 y 485 nm, respectivamente. La medida de fluorescencia del equipo se controla mediante el software GEN 5 (versión 1.08). Las placas utilizadas fueron microplacas negras de 96 pocillos (96F, Costar, USA). Los valores finales de ORAC se expresaron en µmol de Trolox equivalentes (TE)/100 ml.

### 1.2.4 Evaluación del color

La medida objetiva de color se realizó utilizando un colorímetro Minolta CM-508i (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan), determinando las coordenadas de color CIE L\*a\*b\* donde a\* nos indica la variación del rojo al verde, b\* representa la variación de color del amarillo al verde y L\* la luminosidad o las variaciones del blanco al negro. Para la determinación se llenó un placa de petri de cristal con los dos productos, disponiéndola sobre una superficie de papel blanco. El colorímetro es posicionado en el centro de la placa petri y las muestras se realizaron por triplicado.

### 1.2.5 Análisis sensorial

La evaluación sensorial fue llevada a cabo por un panel sensorial no entrenado compuesto por 30 personas de diferentes departamentos de la compañía utilizando pruebas de aceptabilidad para los siguientes atributos sensoriales: color, aroma, amargor/astringencia y aceptabilidad general. Cada atributo fue valorado en una escala hedónica del 1 al 9 (siendo 9 me gusta mucho y 1 me disgusta mucho).

### 1.2.6 Determinación y caracterización de composición de compuestos bioactivos

#### 1.2.6.1 Extracción de compuesto fenólicos

Los compuestos fenólicos del producto rico en polifenoles se extrajeron a partir de 6 g del producto homogenizado con 20 mL de reactivo de extracción (Acetona/agua/ácido acético; 70/29.5/0.5). El homogenizado se centrifugó a 4100 rpm durante 15 min. El sobrenadante se concentró en un rotavapor a vacío y a 35 °C para eliminar la acetona. La fracción acuosa se filtró a través de un cartucho de extracción de fase sólida tipo Sep-Pak (fase reversa cartucho C18; Waters Milipore, United States). Este cartucho previamente se activó con 10 mL de metanol y 10 mL de agua, tras pasar la fracción acuosa, el cartucho se lavó con 10 mL de agua. Los compuestos fenólicos retenidos en el cartucho se eluyeron con 2 mL de metanol. La fracción metanólica se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45 µm Millex-HV13 (Millipore Corp., EEUU) y se conservó a -20°C hasta ser inyectada en el cromatógrafo.

#### 1.2.6.2 Determinación de compuestos fenólicos

La determinación se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto anteriormente para el análisis de polifenoles de la fresa (Buendía et al., 2010) con pequeñas modificaciones. Se utilizó un HPLC modelo Elite LaChrom-Hitachi provisto con una bomba modelo 2130, un inyector automático modelo 2200, y un detector de diodos modelo 2455 (VWR -Hitachi, Barcelona). Para la separación de los compuestos fenólicos, se utilizó una columna de fase reversa\_LiChroCART RP-18 de 250 mm de longitud, 4 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, acoplada a una pre-columna del mismo material y de 4 mm de longitud (Merck, Darmstadt, Alemania). La Tabla 4B.4 resume las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de compuesto fenólicos.

**Tabla 4B.4. Condiciones cromatográficas para la determinación de compuesto fenólicos**

Fase móvil	Agua + 5 % ácido fórmico (eluyente A) Metanol 100% (eluyente B)
Elución	0 min 3% B → 5 min 5% B → 10 min 8% B → 15 min 13% B → 19 min 15% B → 47 min 40% B → 64 min 65% B → 66 min 98% B
Velocidad de Flujo	1 mL/min.
Volumen inyección	20 µL
Longitud de onda	280 nm (catequinas), 320 nm (ácidos hidroxicinámicos) 360 nm (flavonoles y elágico) 520 nm (antocianinas)
Temperatura	24 °C
Cuantificación	<b>Patrones externos</b> Ácido clorogénico → ácidos hidroxicinámicos. Rutina-catequina → flavonoles y flavan-3-oles. Ácido elágico → ácido elágico Cianidina-3-O-glucósido → antocianos

### 1.2.6.3 Determinación de catequinas por Floroglucinólisis

Las catequinas fueron determinados de acuerdo al método descrito por Kennedy y Jones con ligeras modificaciones (Kennedy et al., 2001; 2003). Para la identificación de catequinas se utilizó un HPLC-DAD / MS-MS (Agilent 1100) y para la cuantificación se empleó el equipo de cromatografía líquida descrito en el apartado anterior. Para la separación de las catequinas, se utilizó una columna de fase reversa RP-C<sub>18</sub> Atlantis T3 de 250 mm de longitud, 4 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula (Waters). La Tabla 4B.5 resume las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de compuesto fenólicos por fluoroglucinólisis.

**Tabla 4B.5. Condiciones cromatografías para la determinación de catequinas y cafeína**

Fase móvil	2.5% Ácido acético-agua (eluyente A) Acetonitrilo (eluyente B)
Elución	3% B, at 5 min 5% B, at 15 min 16% B, at 45 min 50% B, at 52 min 3% B
Velocidad de Flujo	1 mL/min
Volumen inyección	10 µL
Longitud de onda	280 nm
Temperatura	24 °C
Cuantificación	Patrón externo de catequina

## 2. METODOLOGÍA ANALÍTICA: FASE DE EVALUACIÓN CLÍNICA

El siguiente esquema (Figura 4B.3) muestra el proceso seguido en la toma de muestras biológicas, y el lugar de realización de las distintas determinaciones que se llevaron a cabo a lo largo de la fase de evaluación de la eficacia del producto RP.

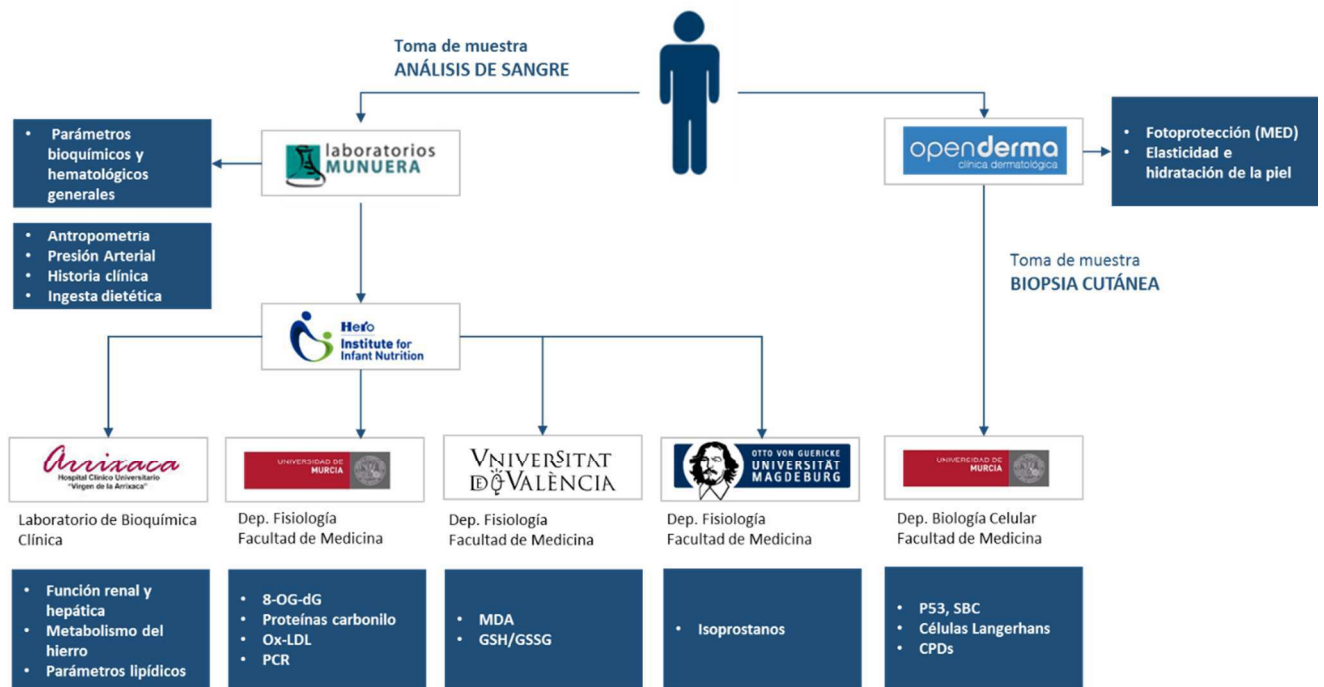


Figura 4B.3 Logística procedimental del ensayo clínico

### 2.1 DETERMINACIONES EN SANGRE

#### 2.1.1 Obtención de muestras biológicas

A los participantes en el ensayo clínico se les extrajo una muestra de sangre (15 ml) de la vena antecubital entre las 8 y 9 de la mañana y después de 12 horas de ayuno. Las muestras se centrifugaron a  $1.500 \times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  para la obtención de plasma. El plasma se utilizó de inmediato para la determinación del hemograma y parámetros de coagulación. Tanto el plasma sobrante como el suero se mantuvieron a  $4^\circ\text{C}$  durante menos de 2 horas antes de ser distribuidos en alícuotas de 250  $\mu\text{l}$  en tubos Eppendorf. Todas las muestras fueron almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia. Las muestras que fueron enviadas a los diferentes centros descritos en la Figura 4B.3 fueron enviadas en cajas especiales rellenas de hielo seco y la entrega de muestras fue inferior a 24 h.

### 2.1.2 Determinación de daño oxidativo a ADN

Los niveles plasmáticos de 8-OH-dG (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina) fueron analizados mediante KIT ELISA ultrasensible para la medición cuantitativa de la oxidación del aducto de ADN 8-hidroxi-2-deoxyguanosina. El Kit utilizado está basado en el anticuerpo monoclonal N45.1. La determinación se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi City, Japan). El resultado se expresó en ng/ml.

### 2.1.3 Determinación de daño oxidativo a proteínas

El método más utilizado para cuantificar el daño oxidativo provocado en proteínas es la determinación de la formación de grupos tras derivatización con DNP (dinitrofenilhidrazina). La concentración de carbonil-proteínas en plasma se realizó mediante la utilización de KIT ELISA de la casa *BIOCELL PC TEST KIT* (Alexis Corporation, Switzerland). Las determinaciones se realizaron por duplicado siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El resultado se expresó en nmol/mg.

### 2.1.4 Determinación de daño oxidativo a lípidos

Como biomarcadores de oxidación lipídica se midieron las concentraciones de malondialdehído (MDA), F2- isoprostanos y la oxLDL en plasma, como indicadores del grado de peroxidación lipídica y oxidación de la molécula de LDL.

#### 2.1.4.1 Determinación de LDL oxidada (oxLDL)

Las concentraciones de LDL oxidada fueron medidas en plasma con un KIT ELISA sandwich (Mercodia, Uppsala, Suecia) que utiliza el anticuerpo monoclonal murino específico mAb-4E6. El mAb-4E6 reacciona en contra de determinados antígenos de la apolipoproteína B-100 que previamente ha sido modificada. Las determinaciones se realizaron por duplicado siguiendo el protocolo descrito por el fabricante y fueron expresados en U/L.

#### 2.1.4.2 Determinación de F2-Isoprostanos

La determinación de las concentraciones de F2-isoprostanos fue realizada por el equipo de la Dra. Ingrid Wiswedel del Departamento de Bioquímica patológica de la Universidad de Magdeburg (Alemania). Los análisis se realizaron mediante GC-MS-NICI siguiendo el método de Wiswedel et al. (2004, 2005 y 2008). Las muestras fueron procesadas (hidrólisis de lípidos esterificados, extracción, limpieza, extracción, limpieza) y a los extractos obtenidos se les

adiciono iso-octano, analizándolas mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas de ionización química de iones negativos (DSQ/Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) utilizando una columna B 5-MS (50 m  $\times$  0.25 mm; 0.25  $\mu$ m; J&W Scientific, Folsom, CA). Se construyó una curva de calibración de cinco puntos para los 9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -PGF2 $\alpha$ -d4, y el 8-iso-PGF2 $\alpha$ . Las muestras se inyectaron en modo splitless sobre la columna, utilizando helio como gas de arrastre y se controlaron los aniones carboxilados [M-181]<sup>-</sup> at m/z 569 y m/z 573 para F2-isoprostanos y 9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -PGF2 $\alpha$ -d4 (AXXORA GmbH, Lörrach, Alemania) en modo de monitorización selectiva de iones (SIM) con el siguiente programa de temperatura: 80 °C (1 min),  $\blacktriangleright$  30°C/min  $\blacktriangleright$  280 °C (19 min) Tiempo total: 27 min. Se realizó la cuantificación utilizando los procedimientos estándar internos. La sensibilidad del espectrofotómetro de masas fue controlada mediante la inyección de la mezcla de estándares de PGF2 $\alpha$ -d4, 8-iso-PGF2 $\alpha$  y 9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -PGF2 $\alpha$  en cada serie de análisis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron en ng/ml.

#### **2.1.4.3 Determinación de Malondialdehído (MDA)**

El MDA se determinó por HPLC según el método de Wong et al. (1987). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA2). Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además de con el malondialdehído, se realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa del aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras.

A 50  $\mu$ L de muestra se le añadieron 75  $\mu$ L de H3PO4 0,44 M y 25  $\mu$ L de la solución de ácido 2-tiobarbitúrico; se agitó y se mantuvo a 60 minutos en un baño a 95 °C. Se adicionó 150  $\mu$ L de la solución neutralizante. Se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos a 4 °C y se inyectan 50  $\mu$ L del sobrenadante obtenido en el HPLC. La Tabla 4B.6 resume las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de de TBA-MDA2.

**Tabla 4B.6. Condiciones cromatográficas para la determinación de TBA-MDA2**

Fase móvil	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM pH=6,8 (eluyente A) Acetonitrilo 70:30 (eluyente B)
Velocidad de Flujo	1 mL/min
Volumen inyección	50 µL
Longitud de onda	532 nm
Cuantificación	El área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA2 se valoró frente a una recta patrón construida con MDA-bis.

### 2.1.5 Determinación de Proteína C Reactiva como marcador de inflamación

La concentración de Proteína C Reactiva (PCR) ultrasensible como marcador de inflamación, fue determinada en suero por técnica ELISA sándwich mediante el kit comercial de la casa Immundiagnostik (Germany). Siendo los valores normales de 0.1 a 3 mg/L (Pearson et al., 2003). Las determinaciones se realizaron por duplicado siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La proteína C reactiva se expresó en mg/L.

### 2.1.6 Valoración del estado redox

#### 2.1.6.1 Determinación de los valores de glutatión total.

El glutatión total se determinó por HPLC siguiendo el método descrito por Reed et al. (1980). Este método se basa en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365 nm. A todas las muestras se les añade como patrón interno una concentración conocida de  $\gamma$ - glutamil glutamato.

Se tomaron 200 µL de sobrenadante ácido y se le añadió 20 µL de  $\gamma$ -glutamyl-glutamato 1 mM en PCA al 0.3% (patrón interno). Seguidamente se añadió 20 µL de ácido iodoacético 1 M disuelto en púrpura de m-cresol 0.2 mM, que es un indicador de pH que vira a color púrpura entre 8.5 y 9. La mezcla se lleva a pH 8.5 – 9 usando un tampón KOH 3M CHES 0.3M y una vez alcanzado el pH adecuado, la muestra se incubó durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 400 µL de 1-fluor dinitrobenzeno al 1% en etanol absoluto y se mantuvo a 4°C y en oscuridad durante 24 horas. Antes de preparar la dilución que será inyectada en el cromatógrafo, las muestras se centrifugan a 15.000 g durante 5 minutos a 4° C. Posteriormente se toman 50 µL de sobrenadante a los que añadimos 270 µL de una mezcla metanol-agua en proporción 800:200.



**Tabla 4B.7. Condiciones cromatográficas para la determinación de glutatión total**

Fase móvil	Eluyente A: solución de metanol al 80% en agua bidestilada. Eluyente B: solución tampón acético/acetato 0.5 M en metanol al 64%.
Elución	5 min 20% B →15 min 99% B Se mantienen estas concentraciones de cada solvente de 5 a 10 minutos. Una vez eluido el último compuesto de interés, se procede al reequilibrado de la columna. Se alcanzan condiciones iniciales (20% de B y 80 % de A) manteniéndose así durante 15 min
Velocidad de Flujo	1 mL/min
Volumen inyección	80 µL
Longitud de onda	365 nm
Cuantificación	Las concentraciones de GSH y GSSG se calculan en el cromatograma basándose en una concentración conocida de $\gamma$ - glutamil-glutamato. El glutatión total se expresó como equivalentes de GSH, utilizando la siguiente fórmula $[GSH]= \text{Glutation total} + (2X \text{ GSSG})$

#### 2.1.6.2 Determinación del glutatión oxidado (GSSG)

El GSSG se determinó de acuerdo al método cromatográfico descrito por Asensi et al. (1994). Se basa en la separación cromatográfica de los dinitrobenzono derivados y posterior detección a 365 nm. Para que el GSH no sufra una autooxidación en el proceso, se bloquea el grupo tiol con N-etilmaleimida (NEM). Los primeros pasos de la DERIVATIZACIÓN son idénticos a los descritos para el glutatión total. Una vez alcanzado el pH de 8.5-9 se centrifuga a 13000 rpm. durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se toman 25 µL de sobrenadante y se mezclan con 50 µL de 1-fluor dinitrobenzono al 1% en etanol absoluto. Después, la muestra se incuba 45 minutos en oscuridad y se deseca la disolución a vacío hasta 70 miliTorr. Justo antes de la inyección en el cromatógrafo, las muestras se resuspenden en 200 µL del eluyente A.

Las condiciones cromatográficas son las mismas que las utilizadas en el apartado anterior (Tabla 4B.7). El cálculo de la concentración de glutatión oxidado (GSSG) se realiza en función de la calibración de soluciones patrón de concentraciones conocidas de GSSG respecto al patrón interno.

### 2.1.7 Determinación de parámetros bioquímicos generales, lipídicos y del metabolismo del hierro.

La Tabla 4B.8 muestra los parámetros hematológicos y parámetros de coagulación analizados en los laboratorios de análisis clínicos Munuera en Murcia antes y después de las intervenciones.

**Tabla 4B.8. Analíticas realizadas en Laboratorios Munuera**

Variable	Unidad
<b>Hemograma</b>	
Eritrocitos	$\times 10^6/\text{mmc}$
Hemoglobina	g/100
Hematocrito	%
Volumen corpuscular medio	fl
Hb corpuscular media, concentración HCM	pg
Leucocitos	$\times 10^3/\text{mmc}$
Linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos	%
Plaquetas	$10^3/\text{mmc}$
Volumen plaquetas medio	mcm <sup>3</sup>
<b>Coagulación</b>	
PTTA, tiempo protombina, actividad protombina	sec

Parte de las determinaciones plasmáticas de bioquímica general se realizaron en el el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Tabla 4B.9). Estos parámetros fueron determinados con un analizador de alto rendimiento Cobas c 711<sup>®</sup> (Roche Diagnostics) (Figura 4B.4).



**Figura 4B.4. Analizador de alto rendimiento (Sistema Cobas c 711).**

**Tabla 4B.9.** Análisis realizados por el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia).

Variable	unidad	Método
<b>Equilibrio hídrico</b>		
Na	mEq/L	ELECTRODO SELECTIVO
K	mEq/L	ELECTRODO SELECTIVO
Cl	mEq/L	ELECTRODO SELECTIVO
Glucosa	mg/dl	GLUCOSA-HEXOKINASA
Creatin-Quinasa	U/L	DGKC modificado
<b>Parámetros Lipídicos</b>		
Colesterol Total	mg/dl	ENZIMATICO COLORIMETRICO
HDL	mg/dl	ENZIMÁTICO COLORIMETRICO HOMOGENEO
LDL	mg/dl	ENZIMÁTICO COLORIMETRICO HOMOGENEO
Triglicéridos	mg/dl	ENZIMÁTICO COLORIMETRICO (WAHLEFELD)
<b>Función Renal y Hepática</b>		
Bilirrubina	mg/dl	JENDRASSIK-GROF
Albumina	g/dl	VERDE DE BROMOCRESOL (BCG)
Ácido úrico	mg/dl	URICASA ENZIMÁTICO COLORIMETRICO
Urea	mg/dl	UREASA CINETICO
Creatinina	mg/dl	JAFFE COMPENSADO
GOT (ASAT)	U/L	IFCC (SIN PIRIDOXAL)
GPT (ALAT)	U/L	IFCC (SIN PIRIDOXAL)
Lactato Deshidrogenasa	U/L	DGKC
<b>Parámetros metabolismo Hierro</b>		
Hierro	(mg/dl	FERROCINA SIN DESPROTEINIZACIÓN
Ferritina	mg/dl	INMUNOTURBIDIMÉRICO
Transferrina	mg/dl	INMUNOTURBIDIMÉRICO

## 2.2 DETERMINACIONES EN PIEL

### 2.2.1 Determinación de la dosis mínima de eritema (MED)

#### 2.2.1.1 Fuente de radiación UVB y zona de determinación (Test área)

La emisión de luz UVB se llevó a cabo mediante la utilización de un simulador solar Dermalight® 80 MED tester PUVB (Dr. K. Honle GmbH, Munich, Germany). El simulador está compuesto por dos tubos fluorescentes que emiten la mayor parte de la emisión en el espectro de radiación UVB (290-320 nm) con pico de emisión media de 306 nm. Como se muestra en la Figura 4B.5, el equipo contiene seis zonas de emisión simultánea con diferentes intensidades (17, 34, 49, 65, 83, 100%) y un controlador electrónico para fijar el tiempo de radiación.



**Figura 4B.5.** Simulador solar Dermalight® 80 MED tester PUVB.

El lugar de la piel donde se realizó el test fue la zona glútea por ser la zona menos expuesta a la radiación diaria de luz solar. La fuente de radiación se puso en contacto directamente con la piel del sujeto participante ya que estas condiciones de trabajo aseguran un flujo de radiación UVB de  $7\text{mW}/\text{cm}^2$  de acuerdo a la ficha técnica fabricante. Con el objeto de reducir variaciones o alteraciones en el simulador, antes de cada medición se calentaron las lámparas durante 4 min.

### 2.2.1.2 Determinación del tiempo de radiación y dosis de UVB emitida en cada sujeto

El tiempo de radiación de cada sujeto fue determinado por el equipo investigador de acuerdo al tipo de piel según la clasificación de Fitzpatrick (2005) y teniendo en cuenta los tiempos recomendados por el fabricante. Para confirmar nuestras estimaciones, se realizó un estudio piloto previo con 5 sujetos, con un tipo de piel II-IV de acuerdo a la clasificación Fitzpatrick (2005).

El tiempo de exposición fue aproximadamente de 30 a 50 s de duración para tipos de piel II-IV. Este tiempo aseguró como mínimo el 1.28 MED en cualquier zona de emisión (17-100%) del simulador solar en 38/40 sujetos.

Para un Flujo de emisión de 7mW/cm<sup>2</sup> (ventana 100%), el tiempo de radiación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo (s)} = \text{Intensidad (mJ/cm}^2\text{)}/\text{Flujo (mW/cm}^2\text{)}$$

**Tabla 4B.10. Tiempo de exposición**

mJ/cm <sup>2</sup>	Tiempo aproximado de Radiación (s)
100	14.28
150	21.42
200	28.57
250	35.71
300	42.85
350	50

El rango de dosis realizadas fue de 0.2 a 2.9 veces el MED dependiendo del tipo de piel y características del sujeto.

### 2.2.1.3 Protocolo de radiación

La obtención de la Dosis Mínima de Eritema (MED) fue basada en la guía de la European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA, 2006), y tuvo lugar en un ambiente estable de temperatura y humedad, siendo la posición de los voluntarios la misma para la exposición ultra violeta y para la medida del MED.

El MED es la dosis mínima de radiación ultravioleta requerida para producir la primera reacción eritematosa perceptible con bordes claramente definidos, observados entre las 16 y 24 horas posteriores a la exposición a la radiación ultravioleta (COLIPA, 2006)

Seis zonas de piel de 1 cm<sup>2</sup> fueron expuestas a dosis crecientes de UVB, usando una progresión de (17, 34, 49, 65, 83 y 100%)

#### 2.2.1.4 Determinación del grado de eritema, melanina y efecto fotoprotector

Para la determinación del grado de eritema y melanina se utilizó el equipo Mexameter MX 18 (Courage-Khazaka GMBH, Koln, Germany), el cual determina los índices de melanina y de hemoglobina, que son los principales cromóforos de la piel (Young, 1997).

El Proceso está basado en el principio de absorción. Un sensor emite luz en tres longitudes de onda predeterminadas 568 nm (verde), 660 nm (rojo) y 880 nm (infrarrojo próximo) y un receptor que capta y mide la luz reflejada sobre la piel. Las medidas se basan en la determinación de la reflexión de la luz no absorbida por la zona de piel muestreada. Mediante un sistema de fotómetro, el aparato calcula:

- **El índice de melanina:** Utiliza dos longitudes de onda (660 nm y 880 nm). Estas longitudes de onda son utilizadas por su escasa absorción por parte de los pigmentos sanguíneos, lo cual da un índice melánico independiente de la vascularización de los tejidos subcutáneos. El filtro a 660 nm es sensible a la cantidad de melanina presente en la piel.
- **El índice de eritema:** Se basa en los principios de Diffey et al. (1984). Las dos longitudes de onda (660 nm y 568 nm) se relacionan con el estrato corneo y las estructuras cutáneas. La longitud de onda 568 nm coincide con el pico de absorción espectral de la hemoglobina.

A las 24 horas de la exposición se realizó un análisis visual bajo luz fluorescente de los seis zonas de piel expuestas y en base a la opinión consensuada del dermatólogo y un miembro del equipo investigador se determinó la zona con MED, siguiendo la definición descrita en la guías COLIPA (2006).

Una vez determinado el MED y tras una la valoración visual, se realizó la determinación cuantitativa a 1 MED y 1.28 MED con el colorímetro Mexameter MX-18 (Courage-Khazaka GMBH, Koln, Germany). La media de tres determinaciones por zona expuesta y por sujeto se usó como valor final a tiempo cero y tras 10 semanas de tratamiento o placebo. Estos valores fueron empleados para calcular el efecto fotoprotector tras el ensayo de intervención para cada sujeto mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad fotoprotectora} = \text{MED } t_{10} / \text{MED a } t_0$$

Para determinar el efecto protector y con el objeto de estandarizar las diferencias de piel entre sujetos, se utilizó la diferencia del valor “índice de eritema” entre la piel irradiada y no irradiada.

Tras la medición de los índices de melanina y eritema, se realizaron fotografías con una cámara Nikon D200. Todas las imágenes fueron realizadas bajo las mismas condiciones.

### 2.2.2 Evaluación de la calidad de la piel

Se utilizaron métodos no invasivos de bioingeniería cutánea para la determinación de las propiedades físicas (elasticidad e hidratación epidérmica) y fisiológicas de la piel (pérdida transepidérmica del agua).

Las sondas científicas utilizadas y el sensor de condiciones ambientales estaban conectados a un equipo multisensor Cutometer MPA 580 (Courage y Khazaka, Electronic GmbH, Alemania). Con el propósito de minimizar la influencia de factores que pudiesen interferir en los resultados, se establecieron protocolos de mediciones comunes para las tres metodologías (Fig 4B.6)



Figura 4B.6. Protocolo de medición de parámetros de calidad de la piel.

Todas las mediciones se realizaron en dos zonas de piel de los voluntarios: el lado ventral del antebrazo y el glúteo, manteniendo las mismas bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura 20-24°C y humedad relativa constantes: 40-60%). Todos los voluntarios permanecieron como mínimo 10 minutos aclimatándose antes de empezar con las determinaciones.

### 2.2.2.1 Pérdida de agua transepidérmica (TEWL)

La estimación de la capacidad de la piel para mantener la humedad fue medida con la sonda Tewameter TM 300 (Courage y Khazaka, Electronic GmbH, Alemania). Esta técnica se basa en la Ley de difusión establecida por Adolf Fick en 1985:

$$dm / dt = -DA * dp/dx$$

Donde  $A$  representa la superficie en  $m^2$ ,  $m$ , el agua transportada (en g),  $t$  el tiempo en horas,  $D$  la constante de difusión ( $=0,877 \text{ g / m}^2 \cdot \text{h}$ ),  $p$  la presión de vapor de la atmósfera en mm Hg y  $x$ , la distancia desde la superficie de la piel hasta el punto de medición (en m). Los valores de medición se expresan en  $(\text{g/h} \cdot \text{m}^2)$ .

**Tabla 4B.11. Valores orientativos de TEWL para la interpretación de resultados.**

Estado	TEWL (g/h/m <sup>2</sup> )
Muy Saludable	0-10
Saludable	10-15
Normal	15-25
Piel maltratada	25-30
Estado crítico	+ 30

### 2.2.2.2 Hidratación del estrato corneo

La medida se llevó acabo con una sonda **Corneometer 825** (Courage-Khazaka Electronics, Germany). El método se basa en las propiedades eléctricas de la piel como un medio dieléctrico, y determina la capacitancia de la piel a una profundidad de 0.1 mm. Se realizaron tres medidas en diferentes zonas del antebrazo y glúteo. Los valores orientativos para pieles sanas (cara interna del brazo) descritos por el fabricante y expresados en Unidades arbitrarias se muestran en la Tabla 4B.12.

**Tabla 4B.12. Valores orientativos de Hidratación para la interpretación de resultados.**

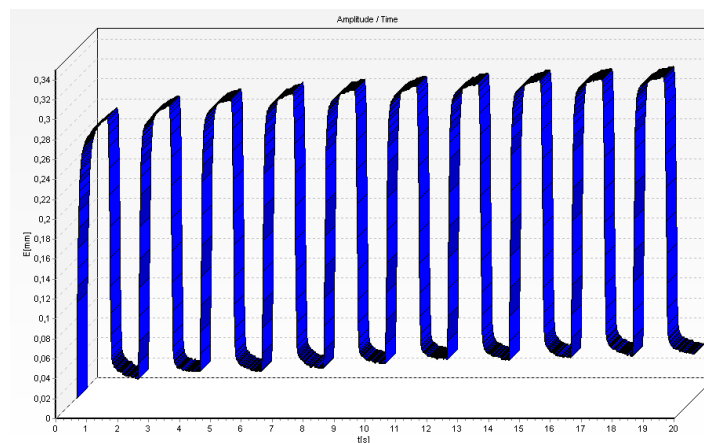
Estado de la piel	Valor
Muy seco	< 30
Seco	30-45
Hidratación suficiente	> 45



### 2.2.2.3 Elasticidad de la piel

La elasticidad cutánea se analizó midiendo el grado de recuperación de la piel una vez que ha sido aplicada una determinada presión de succión (presión negativa constante de 450 mbar), mediante una sonda (2 mm de diámetro) Cutometer MPA 580 (Courage y Khazaka Electronic GmbH, Alemania). Cada medida consistió en 10 ciclos de succión (tiempo succión: 1 s, tiempo de relajación: 1 s) y fue realizada por duplicado. La resistencia de la piel a la succión (firmeza) y su capacidad de volver a la posición original (elasticidad) es mostrada después de cada medición mediante curvas de tiempo-deformación (Figura 4B.7) y a partir de estas se obtuvieron los siguientes parámetros de elasticidad (Tabla 4B.13)

**Figura 4B.7** Curva tiempo-deformación tras 10 ciclos de succión.



**Tabla 4B.13.** Descripción de los parámetros de elasticidad evaluados e interpretación de resultados.

Parámetro elástico	Descripción	Interpretación de los Valores
<b>Elasticidad Bruta</b> Ua/Uf (R2)	Porción entre amplitud máxima y capacidad de re-deformación de la piel	Próximo a 1 más elástica
<b>Viscoelasticidad</b> Uv/Ue (R6)	Porción viscoelástica respecto a la parte elástica de la curva. Atribuidos al contenido en agua de la piel y al desplazamiento de los fluidos intersticiales sobre la red de fibras de la dermis.	Más bajo más elástica
<b>Bio Elasticidad</b> Ur/Uf (R7)	Porción elástica referida a la curva en su totalidad	Próximo a 1 más elástica
<b>Firmeza</b> Uf (R0)	Proporciona información de la tersura de la piel.	Mas alto mejor
<b>Fatiga</b> (R9)		Mas alto menor fatiga

Tanto la elasticidad bruta como la bio-elasticidad dan información sobre la habilidad de la piel a volver a la posición inicial y están relacionadas a la función de las fibras elásticas.

### 2.2.3 Biopsias y análisis histopatológico

#### 2.2.3.1 Obtención de muestras cutáneas

En los sujetos (n=23) que firmaron el consentimiento informado de biopsia cutánea, las biopsias de piel (4 mm de diámetro) se obtuvieron con una aguja de biopsia dermatológica (7 mm de profundidad) en la clínica Dermatológica Openderma, bajo condiciones asépticas y anestesia local con lidocaína. Las pequeñas heridas se cerraron con un punto de sutura. A cada paciente se le realizaron dos biopsias 24 horas después de la radiación (al inicio: t0 y al final del estudio: t10).

Debido a las variaciones de la dosis de UV necesaria para determinar el MED en cada sujeto, las biopsias fueron realizadas en un rango de 1 a 2 MED (media 1.4 y SD 0,26). En total se obtuvieron 56 muestras cutáneas.

#### 2.2.3.2 Procesado de las biopsias cutáneas

Las muestras fueron procesadas por el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Murcia. Cada muestra cutánea de 4 mm se dividió en dos partes de 2 mm mediante un bisturí, en la Clínica Openderma (Murcia). Una de las partes fue fijada durante 12 horas en formol al 10% en tampón fosfato salino a pH 7,4 (PBS) a temperatura ambiente. La otra parte fue congelada en una cubeta con isopentano inmersa en nitrógeno líquido y fue almacenada a -80°C el Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia para futuros análisis.

#### 2.2.3.3 Preparación e inclusión del tejido

Tras su fijación, las muestras de piel fueron lavadas en PBS y procesadas convencionalmente para su posterior inclusión en parafina (Paraplast) utilizando un procesador tisular automático Citadel 1000. Los bloques fueron seccionados con un micrótopo de rotación Microm obteniendo cortes histológicos de un espesor de 3 a 5 micrómetros. Las secciones se depositaron en porta-objetos impregnados con Poly-L-Lisina (Sigma, Madrid) para evitar su desprendimiento y se dejaron secar hasta el momento de la tinción.

#### 2.2.3.4 Histoquímica

Las secciones histológicas fueron desparafinadas por sucesivos pasos en xilol puro (3x 10 min). Posteriormente, las secciones fueron hidratadas usando las siguientes concentraciones decrecientes de etanol (Etanol puro-5min→Etanol al 96%-5min→Etanol al 70%-5min→ Agua destilada-5min → PBS-5min).

Para la cuantificación de células apoptóticas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina, y para la detección de p53, dímeros de pirimidina ciclobutano y células de Langerhans se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas.

#### 2.2.3.4.1 Detección de células apoptóticas (Sunburn Cells -SBC)

Las secciones una vez hidratadas fueron teñidas durante 30 segundos en hematoxilina de Harris y lavadas con agua de grifo. Posteriormente, se tiñen con eosina durante 4 minutos. Tras lavar, las secciones son deshidratadas, aclaradas y montadas con DPX.

#### 2.2.3.4.2 Detección de p53

Antes de la incubación con los anticuerpos, las secciones histológicas fueron sometidas a un tratamiento de revelado antigénico durante 20 minutos utilizando un tampón comercial a pH 9 (Dako S2367). Así, los portaobjetos se introdujeron en el tampón cuando la temperatura alcanzó 65°C y se inició a contar los 20 min, cuando el termómetro marcó 97°C, pasados los 20 min se retiró el recipiente (buffer) que contiene los portas de la placa calefactora, y se bajó la temperatura a 65°C, para más tarde retirar los portaobjetos e introducirlos en PBS.

Tras lavar en PBS, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena. Para ello, los portaobjetos se introdujeron en 200 ml de PBS con 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 30 min. Tras lavar en PBS (3x5min), se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas mediante la incubación con PBS 1%BSA (15 min). Posteriormente, sin lavar, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario que es un anticuerpo monoclonal anti-p53 producido en ratón (Dako M7001) a una dilución de 1:25 diluido en PBS-1%BSA durante 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario que es un anticuerpo anti-Ig G de conejo y de ratón producido en carnero y conjugado con peroxidasa (EnVision FLEX/HRP, Dako K8024) durante 30 minutos. Se lavó con PBS (3X5min) y se procedió al revelado de las preparaciones histológicas. Para ello, se incubaron durante 10 min siguiendo el protocolo del fabricante Dako K8024. Posteriormente, se procedió a contrastar unos 10 segundos con la hematoxilina de Harris.

Tras lavar en PBS, las secciones fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol y aclaradas en xilol. Finalmente se montaron con DPX y se dejaron secar para su posterior observación al microscopio.

#### 2.2.3.4.3 Detección de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD)

Se procedió de un modo similar al descrito previamente para el anticuerpo anti-p53. En este caso, se realizó un revelado antigénico mediante la incubación durante 5 minutos a 97°C con el tampón 0.01 M de TRIS-HCL con 0.001 M de EDTA a pH 9. Como anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-CPD diluido 1:60 en PBS (Kamiya Biomedical Company MC-062). El anticuerpo secundario y revelado fue realizado del modo descrito anteriormente.

#### 2.2.3.4.4 Detección de células de Langerhans

Se procedió de un modo similar al descrito anteriormente para los otros anticuerpos con las siguientes diferencias. Para el revelado antigénico, las secciones histológicas fueron tratadas durante 5 minutos en el tampón 50 mM glicina-HCl con 0.01% (w/v) EDTA a 95°C. El anticuerpo primario utilizado fue un anti-monoclonal anti-CD1A diluido 1:50 (Santa Cruz sc-18885).

#### 2.2.3.4.5 Control

Se realizó el mismo tratamiento descrito anteriormente para los tres anticuerpos pero omitiendo el anticuerpo primario y sustituyéndolo por PBS-1%BSA.

#### **2.2.3.5 Análisis cuantitativo**

El número de células por milímetro cuadrado de epidermis detectadas por las técnicas histológicas anteriormente mencionadas fue realizado utilizando un analizador de imágenes IMCO-10 (Kontron Bildanalyse, Alemania) usando el software de proceso de imágenes de Microm (Microm, Barcelona). El número de células de Langerhans y de células apoptóticas (SBC) fue determinado usando el microscopio, mientras que el conteo del número de núcleos positivos para p53 y CPD se realizó automáticamente tras captación de las imágenes de áreas de epidermis seleccionadas con la paleta gráfica digitalizadora.

## 2.3 EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL Y DE SALUD

La evaluación del estado nutricional y de salud de cada sujeto fue realizado mediante la combinación del resultados de los diferentes parámetros que se muestran en la Tabla 4B.14.

**Tabla 4B.14.** Parámetros utilizados para la evaluación del estado nutricional y del estado de salud.

<b>1</b>	<b>MEDIDAS ANTROPOMETRICAS</b>	Peso, talla, IMC, pliegues cutáneos, circunferencia de cintura y cadera y cálculo de la composición corporal de cada individuo
<b>2</b>	<b>PRESIÓN ARTERIAL</b>	Presión arterial sistólica y diastólica
<b>3</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA DIETA</b>	Diario del consumo de alimentos
<b>5</b>	<b>HISTORIA CLÍNICA Y EXPLORACIÓN FÍSICA</b>	Datos de identidad, antecedentes personales y familiares, tratamiento farmacológico

### 2.3.1 Determinación de medidas Antropométricas

La determinación de cada variable antropométrica (Tabla 4B.15) antes y después de la ingesta del producto, fue realizada por el mismo investigador por duplicado, utilizando la media de las dos mediciones. Todas las determinaciones fueron realizadas por la mañana en ayunas y los voluntarios estaban en ropa interior y sin zapatos.

**Tabla 4B.15.** Medidas antropométricas y equipos técnicos utilizados.

<b>Variable antropométrica</b>	<b>Equipo</b>
<b>PESO CORPORAL</b>	Bascula portátil electrónica (UFESA)
<b>ALTURA</b>	Tallímetro (escala de 1-200 cm ; precisión de 0,5 cm)
<b>PERIMETRO CINTURA-CADERA</b>	Cinta métrica flexible (FUTABA, Japan) ; escala 10 mm (precisión 1 mm)
<b>% GRASA CORPORAL</b>	IMPEDANCIA BIOELÉCTRICA OMRON BF 300® (OMRON Matsukasa Co. LTD, Japón)

A partir de las medidas antropométricas se calcularon las siguientes variables:

- **Índice de Masa Corporal (IMC)** mediante la fórmula: peso (kg)/altura<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). Los criterios de clasificación del IMC utilizados, fueron los preconizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000), que son: bajo peso, menor que 18,5kg/m<sup>2</sup>; peso normal, de 18,5 a 24,9kg/m<sup>2</sup>; pre-obesidad, de 25 a 29,9kg/m<sup>2</sup>; y obesidad, peso mayor o igual a 30kg/m<sup>2</sup> (nivel I-30 a 34,9kg/m<sup>2</sup>; nivel II 35 a 39,9kg/m<sup>2</sup> y nivel III  $\geq$  40kg/m<sup>2</sup>).
- **Índice cintura/cadera (RCC o WHR):** El índice valora la distribución de la grasa, y constituye un indicador de riesgo a padecer determinadas enfermedades además de diferenciar entre obesidad androide y la ginoide. Si este índice da como resultado 1.0 o más para hombres y 0.8 o más para mujeres, indicará obesidad y consecuentemente un mayor riesgo de padecer otras enfermedades relacionadas.

### 2.3.2 Determinación de Presión Arterial

La Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se realizó mediante auscultación con un esfigmomanómetro de mercurio estándar de acuerdo a los criterios de la *American Heart Association* (Pickering et al., 2005). Antes de la determinación los voluntarios descansaron durante 15 min. Se tomó la media de dos determinaciones espaciadas en 3 min.

### 2.3.3 Estudio Dietético (Evaluación de la dieta)

La ingesta de energía, macro y micronutrientes al inicio y al final del estudio se obtuvieron solicitándole al participante rellenar en un diario del consumo de alimentos y bebidas en el cual, se incluían todos los alimentos ingeridos durante un periodo de tres días, incluyendo un día festivo. La información obtenida se analizó en el programa “Alimentación y Salud” 2.0. Software Nutricional: Universidad de Granada. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INYTA).

### 2.3.4 Historia Clínica

La historia clínica fue realizada por el médico Dr. Luis Carbonell mediante una entrevista personal con cada sujeto. Se recogieron los datos de identidad, datos demográficos (edad y sexo) antecedentes patológicos personales y familiares, y tratamiento farmacológico.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### ESTUDIO 1. INFUSIONES DE TE VERDE

Todos los resultados fueron expresaron como el valor medio y la desviación estándar de 3 determinaciones. Para establecer diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras de infusión de té verde para las variables contenido de catequinas y cafeína se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis para variables no paramétricas, al no cumplir los criterios de normalidad.

### ESTUDIO 2. EXTRACTOS DE TE VERDE

Se realizó un análisis de correlación bivariada de Spearman con diversas variables relacionadas con el contenido de catequinas y cafeína en extractos de té verde, para conocer la relación entre variables. Para aquellas variables que mostraron una correlación significativa y de interés, se realizó el correspondiente análisis de regresión lineal para determinar el efecto de una variable sobre la otra. En aquellos casos donde se tuvieron en cuenta más de 2 variables asociadas, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, para determinar la predicción de alguna de las variables a partir de las otras más correlacionadas.

### ESTUDIO 3. COMPOSICION DEL PRODUCTO Y ESTUDIO DE VIDA UTIL

Para conocer la evolución de los compuestos fenólicos, vitamina C, capacidad antioxidante (ORAC) y parámetros de color durante su almacenamiento se aplicó el análisis de varianza, ANOVA de un factor y en aquellos casos donde hubo diferencias significativas ente las medias se aplicó las pruebas post-Hoc y las comparaciones múltiples por parejas lo que nos permitiría conocer que medias se diferencian usando el análisis de Tukey o Games-Howell, dependiendo de si asumimos varianzas iguales o diferentes.

### ESTUDIO 4. ENSAYO CLINICO

Distribución de variables cuantitativas mediante medidas basadas en momentos y ordenaciones: edad, parámetros analíticos basales, hematológicos y coagulación, somatometría, tensión arterial, constantes de la piel, parámetros redox: 8OHdG, MDA, glutation reducido/oxidado, PCR. Estudio de la distribución normal de las variables cuantitativas mediante Test de Kolmogorow-Smirnov y Shapiro-Wilk, y en su caso transformación logarítmica de las variables para ajustar su distribución a los supuestos de normalidad.

Se realizó un análisis comparativo entre el grupo experimental y control al inicio y final del ensayo de los parámetros generales y analíticos en los sujetos de estudio, con el fin de

conocer si hubo una respuesta tras la administración del “Producto”. Para conocer si existían diferencias significativas intra e intergrupos, para las variables cuantitativas se utilizó el test t-Student si cumplían el criterio de normalidad y en caso contrario se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney o la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas (test no paramétricos). En el caso de las variables categóricas se comparan mediante test de Chi-cuadrado de Pearson.

El estudio del efecto del producto sobre los parámetros de estrés oxidativo e inflamación, comparando los cambios en el grupo experimental respecto al control, se realizó mediante análisis comparativo de las diferencias entre las variables del estudio al final del protocolo respecto a los valores iniciales, después de la administración de placebo o control, procedimiento que aumenta la potencia del análisis pre-post, reduciendo la variabilidad entre sujetos y obviando la limitación propia del estudio pre y post al introducir el grupo control, que permite controlar el efecto de variables extrañas a la intervención (administración de placebo o producto) entre la valoración basal y postratamiento, distintas a la propia intervención experimental.

Se comparó la variable diferencia de cada grupo a través de la prueba t-Student para grupos independientes. También, se realizó análisis de regresión múltiple para controlar el efecto de variables de control que han mostrado diferencias significativas en el análisis univariante.

El nivel de significación estadística se estableció en un valor  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS para Windows (SPSS versión 18.0 Inc, Chicago, IL).



**#5A**

**RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN**

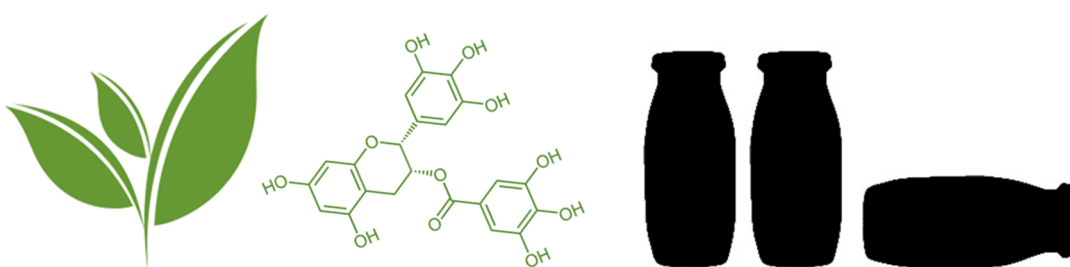
**TÉ VERDE Y  
DISEÑO/DESARROLLO  
DEL PRODUCTO**



# 5 A

## Té verde y diseño/desarrollo del producto

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN



#### 1. CATEQUINAS EN INFUSIONES Y EXTRACTOS DE TÉ VERDE

*P151*

##### 1.1. CONTENIDO EN CATEQUINAS EN INFUSIONES DE TÉ VERDE *p151*

- 1.1.1. Contenido en catequinas en hojas de té verde
- 1.1.2. Efecto del tiempo y temperatura de infusión en el contenido final de catequinas.
- 1.1.3. Estimación del contenido típico de catequinas en infusiones.

##### 1.2. CONTENIDO EN CATEQUINAS EN EXTRACTOS COMERCIALES DE TÉ VERDE *p157*

#### 2. DESARROLLO DEL PRODUCTO

*P162*

##### 2.1. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES *p162*

##### 2.2. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL *p168*

- 2.2.1. Compuestos fenólicos
- 2.2.2. Vitamina C
- 2.2.3. Capacidad antioxidante
- 2.2.4. Color

##### 2.3. ACEPTABILIDAD *p178*

## 1.1. CONTENIDO EN CATEQUINAS EN INFUSIONES DE TE VERDE

### 1.1.1. CONTENIDO EN CATEQUINAS EN HOJAS DE TE VERDE

La Tabla 5A.1, muestra los contenidos de catequinas totales y catequinas individuales determinadas en las diferentes muestras de hoja de té verde. El contenido total de catequinas en las cuatro muestras analizadas varió entre 88.3 y 125.5 mg/g (Tabla 5A.1), observando diferencias significativas entre todas las muestras.

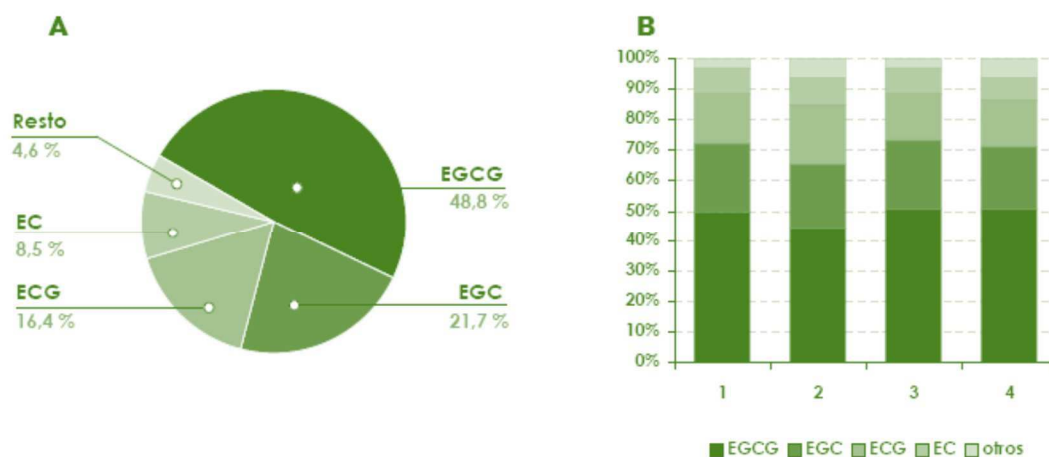
**Tabla 5A.1** Contenido en catequinas total, catequinas individuales y cafeína en hojas de té verde comerciales.

Muestra	Total	EGCG	EGC	ECG	EC	Otras <sup>a</sup>	Cafeína
1	102.4 (2.4) <sup>b</sup>	50.8 (0.9) <sup>b</sup>	23.3 (0.8) <sup>b</sup>	16.2 (0.5) <sup>b</sup>	8.8 (0.3) <sup>b</sup>	3.2 (1.0) <sup>c</sup>	26.7 (1.0) <sup>a</sup>
2	125.5 (1.7) <sup>a</sup>	55.5 (0.8) <sup>a</sup>	26.8 (0.4) <sup>a</sup>	23.8 (0.3) <sup>a</sup>	11.6 (0.1) <sup>a</sup>	7.7 (2.0) <sup>a</sup>	25.1 (0.3) <sup>b</sup>
3	88.3 (1.2) <sup>d</sup>	44.9 (0.3) <sup>c</sup>	19.6 (0.6) <sup>c</sup>	13.6 (0.4) <sup>d</sup>	7.4 (0.0) <sup>c</sup>	2.7 (0.8) <sup>c</sup>	23.1 (0.2) <sup>c</sup>
4 <sup>E<sub>CO</sub></sup>	96.7 (1.8) <sup>c</sup>	48.9 (1.2) <sup>b</sup>	19.7 (0.1) <sup>b</sup>	14.7 (0.4) <sup>c</sup>	7.4 (0.1) <sup>c</sup>	6.0 (2.5) <sup>b</sup>	27.4 (0.5) <sup>a</sup>
<b>media</b>	<b>103.2 (15.9)</b>	<b>50.1 (4.4)</b>	<b>22.4 (3.4)</b>	<b>17.1 (4.6)</b>	<b>8.8 (1.9)</b>	<b>4.9 (2.0)</b>	<b>25.6 (1.9)</b>

Resultados expresados en mg/g como media (DE) de 3 determinaciones.  
<sup>a</sup> GC+CG+GCG+C  
<sup>E<sub>CO</sub></sup> Agricultura Ecológica  
<sup>a-d</sup> Diferentes letras indican diferencias significativas a un p<0.05. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Para las catequinas individuales también se observaron diferencias significativas entre muestras; aunque las muestras 1 y 4 nos mostraron diferencias para el contenido de EGCG ni para el de ECG, ni las muestras 3 y 4 para la EC. Aunque las concentraciones de cafeína fueron similares entre todas las muestras analizadas (23,1-27,4 mg/g), se observaron diferencias significativas entre las muestras 1 y 4 y las muestras 2 y 3 que presentaron un contenido ligeramente menor de esta xantina.

La Figura 5A.1 muestra los contenidos porcentuales de las diferentes catequinas. La catequina presente en mayor proporción fue EGCG (44,9-55,5 %), seguida de EGC, ECG y EC (Figura 5A.1a). Todas las muestras presentaron una tendencia similar en cuanto a la distribución porcentual de las diferentes catequinas (Figura 5A.1b), observando diferencias significativas en el porcentaje de EGCG y ECG de la muestra 2, en comparación con las otras tres muestras analizadas.



**Figura 5A.1.** Distribución porcentual de catequinas en bolsas de té comerciales.

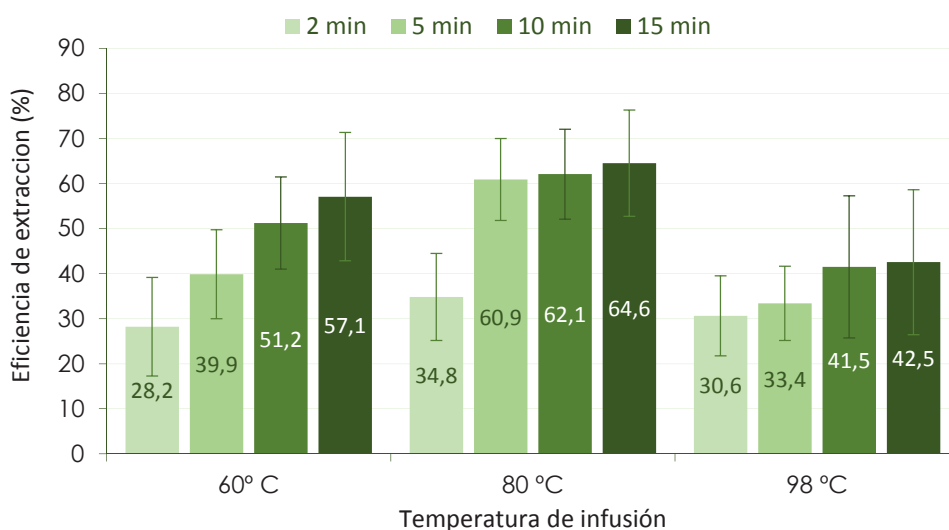
**A.** Distribución porcentual media. **B.** Distribución porcentual individual de las 4 muestras de té analizadas.

Los resultados obtenidos en las cuatro muestras de hoja de té verde analizadas, muestran una similitud con otros datos recogidos en la bibliografía científica, ya que tanto el contenido en catequinas como la distribución de estas se encuentran dentro de los rangos publicados por otros autores. Lin et al., (1998) analizaron 28 muestras de té verde de diferentes orígenes (15 de China y 13 de Japón) obteniendo un amplio rango de variación de los contenidos medios de catequinas totales, EGCG y cafeína (90 a 240, de 131 a 134, 76,8 a 77,3 mg/g respectivamente). Zuo et al. (2002) analizaron 4 muestras de té verde de origen chino y describieron unos contenido medios entre 100 y 123 mg/g de catequinas totales, de 51 a 62,4 mg/g de EGCG y 23 a 29,6 mg/g de cafeína

En este sentido, cabe señalar que las diferencias encontradas en la literatura en la concentración de catequinas en hojas de té son debidas a múltiples factores, tal y como ocurre para otros compuestos fenólicos en materias primas vegetales, como la variedad y calidad del té utilizado, las diferentes condiciones de extracción de las catequinas y los distintos métodos de análisis utilizados (Lin et al., 2003, Yashin et al., 2015).

### 1.1.2. EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE INFUSIÓN EN EL CONTENIDO FINAL DE CATEQUINAS

La Figura 5A.2 muestra el porcentaje de catequinas extraídas de las hojas de té verde en función del tiempo (2, 5, 10 y 15 min) y de la temperatura de infusión (60, 80 y 98 °C). En general, las concentraciones de catequinas aumentaron conforme incrementaba el *tiempo de infusión* tanto en 60, 80 y 98 °C (Figura 5A.2). La eficiencia de extracción de catequinas fue mayor en las muestras sometidas a 85 °C, seguidas de las muestras a 60 °C, mostrando las infusiones obtenidas a la temperatura más elevada los porcentajes más bajos. Nuestros resultados están en línea con los descritos por otros autores. Así, Khokhar & Magnúsdóttir (2002) describieron que la mayor cantidad de catequinas extraídas se consiguen a temperaturas de 77-80 °C. Komes et al. (2010), encontraron que las condiciones de preparación óptimas fueron también a 80 °C, aunque el tiempo óptimo de extracción dependía de la forma de presentación del té (5 min para te en polvo, 15 min para bolsitas y 30 min para hojas secas).



**Figura 5A.2. Eficiencia de extracción de catequinas totales en función del tiempo y temperatura de infusión.** Resultados expresados en % como media (DE) de 3 determinaciones.

Los porcentajes más altos de extracción se obtuvieron a 80 °C, mostrando los tiempos de infusión 5, 10 y 15 minutos valores similares de 60,9, 62,1 y 64,6 %, respectivamente. Hay que destacar que para las muestras tratadas a 98 °C los porcentajes de extracción fueron muy bajos (menores del 43%), posiblemente debido a la epimerización y oxidación de las catequinas a estas temperaturas. Komatsu et al. (1993) observaron que la temperatura de epimerización de las catequinas comenzaba a partir de los 82 °C. La epimerización y degradación de catequinas a altas temperaturas está ampliamente descrita por diversos autores (Wang & Halliwell, 2000; Chen et al., 2001; Wang et al., 2008).

### 1.1.3. CONTENIDO DE CATEQUINAS EN INFUSIONES

El contenido de catequinas totales, catequinas individuales y cafeína en las cuatro muestras de infusiones de té preparadas con agua a 80 y 98 °C durante 2 y 5 min (tiempos y temperaturas típicas de infusión recomendadas por los fabricantes) quedan reflejadas en la Tabla 5A.2. Las concentraciones variaron entre 28,8 y 120,6 mg/100 ml para las catequinas totales, 16.4 y 62,7 mg/100 ml para el EGCG y entre 10,4 y 44,3 mg/100 ml para la cafeína.

**Tabla 5A.2** Contenido en catequinas totales (CT), catequinas individuales y cafeína en infusiones de té verde preparadas en diferentes condiciones de tiempo y temperatura de infusión.

TE <sup>a</sup>	INFUSION <sup>b</sup>	CT	EGCG	EGC	ECG	EC	Resto	Cafeína
<b>1</b>	80 °C 2 m	32.2 (0.0)	16.9 (0.0)	8.4 (0.1)	2.6 (0.0)	2.9 (0.0)	1.2 (0.0)	11.6 (0.0)
	80 °C 5 m	97.5 (0.3)	53.3 (0.0)	24.2 (0.0)	8.6 (0.0)	8.5 (0.2)	2.9 (0.0)	34.6 (0.1)
	98 °C 2 m	66.0 (0.2)	36.2 (0.1)	17.0 (0.1)	5.4 (0.0)	5.5 (0.0)	1.9 (0.0)	22.2 (0.1)
	98 °C 5 m	69.8 (0.2)	38.0 (0.3)	17.5 (0.6)	6.3 (0.1)	5.9 (0.0)	2.1 (0.0)	25.0 (0.3)
	<b>Media (DE)</b>	<b>66.4 (26.7)</b>	<b>36.1(14.9)</b>	<b>16.8 (6.4)</b>	<b>5.7 (2.5)</b>	<b>5.7 (2.3)</b>	<b>2.0 (0.7)</b>	<b>23.4 (9.4)</b>
<b>2</b>	80 °C 2 m	89.2 (0.2)	43.7 (0.1)	22.4 (0.0)	8.7 (0.0)	8.3 (0.0)	6.1 (0.0)	31.8 (0.1)
	80 °C 5 m	120.6 (0.6)	61.9 (0.3)	28.0 (0.2)	12.6 (0.1)	10.5 (0.1)	7.5 (0.1)	43.0 (0.3)
	98 °C 2 m	55.7 (0.5)	28.2 (0.0)	12.8 (0.7)	5.8 (0.1)	5.0 (0.1)	3.8 (0.0)	20.1 (0.3)
	98 °C 5 m	67.9 (0.1)	35.0 (0.0)	15.2 (0.1)	7.1 (0.0)	6.3 (0.0)	4.4 (0.0)	24.9 (0.0)
	<b>Media (DE)</b>	<b>83.3 (28.4)</b>	<b>42.2(14.6)</b>	<b>19.6 (6.9)</b>	<b>8.6 (3.0)</b>	<b>7.5 (2.4)</b>	<b>5.5 (1.7)</b>	<b>29.9 (9.9)</b>
<b>3</b>	80 °C 2 m	71.4 (0.3)	39.4 (0.1)	17.8 (0.3)	6.2 (0.1)	5.7 (0.0)	2.4(0.0)	30.1 (0.1)
	80 °C 5 m	110.5 (1.2)	62.7 (0.2)	25.9 (0.8)	9.9 (0.1)	8.7 (0.0)	3.3 (0.0)	44.3 (0.0)
	98 °C 2 m	53.5 (1.4)	31.1 (1.3)	12.3 (0.5)	4.7 (0.2)	3.8 (0.0)	1.6 (0.0)	22.3 (0.4)
	98 °C 5 m	56.5 (1.2)	32.8 (0.5)	12.7 (0.6)	5.1 (0.1)	4.2 (0.1)	1.6 (0.1)	22.4 (0.4)
	<b>Media (DE)</b>	<b>73.0 (26.2)</b>	<b>41.5(14.6)</b>	<b>17.2 (6.3)</b>	<b>6.5 (2.4)</b>	<b>5.6 (2.2)</b>	<b>2.2 (0.8)</b>	<b>29.8(10.4)</b>
<b>4</b>	80 °C 2 m	45.1 (0.3)	24.1(0.3)	10.5 (0.5)	3.4(0.0)	3.6 (0.0)	3.4 (0.0)	15.6 (0.2)
	80 °C 5 m	74.0 (0.6)	41.8(0.1)	16.5 (0.4)	6.1 (0.1)	5.4 (0.3)	4.1 (0.1)	26.3 (0.0)
	98 °C 2 m	<b>28.8</b> (0.6)	<b>16.4</b> (0.5)	6.4 (0.0)	2.4 (0.0)	2.0 (0.0)	1.5 (0.0)	<b>10.4</b> (0.3)
	98 °C 5 m	31.0 (0.2)	16.9 (0.2)	7.2 (0.0)	2.4 (0.0)	2.1 (0.0)	2.3 (0.0)	11.6 (0.0)
	<b>Media (DE)</b>	<b>44.7 (20.8)</b>	<b>24.8(11.8)</b>	<b>10.2 (4.6)</b>	<b>3.6 (1.7)</b>	<b>3.3 (1.6)</b>	<b>2.8 (1.2)</b>	<b>16.0 (7.2)</b>

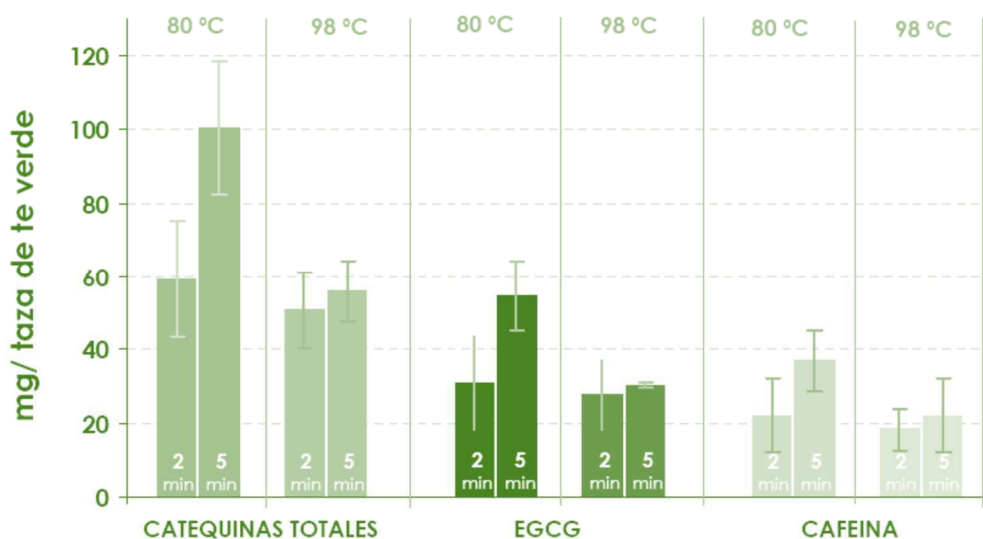
Resultados expresados en mg/taza como media (DE) de 3 determinaciones.

<sup>a</sup> Muestras comercial de bolsas de té verde (Pesos de la bolsa: Te 1: 1.5 g, Te 2 y 3: 2 g, Te 4: 1.1 g)

<sup>b</sup> Condiciones de infusión (Ratio g de hoja/agua: 1:50)

Las diferencias en las cantidades de catequinas y cafeína entre los diversos tipos de té son principalmente debidas a los diferentes gramos de té incluidos en cada bolsa (Tabla 5A.3). Siendo los bolsas de té con mayor gramaje las que mostraron un mayor contenido en catequinas totales, EGCG y cafeína.

La forma de preparación óptima fue la infusión a 80 °C durante 5 min, para todos los té analizados, ya que se obtuvieron las mayores concentraciones de catequinas, observando una mayor extracción conforme incrementa el tiempo de infusión. Por el contrario la infusión a 98°C redujo considerablemente las cantidades de catequinas extraídas, obteniendo unos contenidos ligeramente menores cuando el tiempo de reposo fue de dos min frente al de 5 min (Figura 5A.3). Este hecho estaría realizado con la epimerización y oxidación de las catequinas por acción de la temperatura, tal y como se ha descrito anteriormente (Wang & Halliwell, 2000; Chen et al., 2001; Wang et al., 2008).



**Figura 5A.3.** Contenidos medios en catequinas totales, EGCG y cafeína por taza de té en función al tiempo y temperatura típicos de infusión. (Taza de 100 ml con un Ratio g de hoja: agua, 1:50). Resultados expresados en mg/100 ml como media (DE) de 3 determinaciones.

La estimación de ingesta de catequinas totales, de EGCG y de cafeína calculadas en base a las recomendaciones de los fabricantes de las muestras analizadas vienen reflejadas en la Tabla 5A.3.



**Tabla 5A.3.** Ingesta estimada (mg) de catequinas totales, EGCG y cafeína por taza de acuerdo a las instrucciones de preparación de una infusión de té por el fabricante.

Muestra de Té	Peso de la bolsa	Condiciones de preparación <sup>a</sup>	Catequinas totales	EGCG	Cafeína
1	1.5 g	80° C, 2 min	32	16.9	11.6
2	2.0 g	80-95 ° C, 2-5 min	55.7-120	28.2-61.9	20.1-43
3	2.0 g	Agua hirviendo < 5 min	56.5	32.8	22.4
4 (Ecológico)	1.1 g	Agua hirviendo, 5 min	31	16.9	11.6

<sup>a</sup> Recomendaciones de preparación del fabricante  
Ratio g de hoja/agua: 1:50

El rango de catequinas totales, EGCG y cafeína varió entre 31 y 120, 16,9 y 61,9 y 11,6 y 43 mg/taza, respectivamente, dependiendo de la muestra de té y de las recomendaciones de preparación.

Comparando los resultados con los publicados en la literatura científica, estos fueron similares a los descritos por algunos autores. Así, en un ensayo clínico realizado en USA con 143 sujetos, el contenido por taza de catequinas y EGCG en el grupo de té verde fue de 73.5 y 36 mg/taza, respectivamente (Hakim et al., 2003). Estos resultados son similares a los obtenidos en el té nº3 en condiciones de 80 °C /2min, en el té nº 4 a 80 °C/5 min, y en los té 1 y 2 con una temperatura y tiempo de infusión de 98 °C /5 min. Asimismo, en una opinión científica realizada por la EFSA en el 2011 sobre el té verde (EFSA, 2011b), la estimación de catequinas y EGCG descrita para una taza de 200 ml de té verde es de 100-150 y 50-60 mg, respectivamente. Esta estimación se corresponde con los valores obtenidos en los té 1, 2 y 3 preparados a 80 °C durante 5 minutos.

No obstante, hay que destacar que es difícil realizar una comparación con los numerosos datos encontrados por otros autores, dada la amplia variación en los contenidos de catequinas, principalmente debido a los diferentes tipos de té verde y a la falta de uniformidad en las condiciones de preparación de las infusiones. Peterson et al., (2005), describieron que el contenido de catequinas de una taza de té depende principalmente de dos factores: 1) la composición de la hoja de té, y 2) las condiciones de preparación de la infusión. Estos dos factores que a su vez están fuertemente influenciados por otros (tipo de té utilizado, factores climáticos, agronómicos, condiciones de almacenamiento, hábitos culturales a la hora de preparar la infusión, tipo de agua utilizada, etc.) son los responsables de la gran variabilidad observada en la literatura científica en el contenido de catequinas y cafeína en infusiones de té verde.

## 1.2. CONTENIDO EN CATEQUINAS EN EXTRACTOS COMERCIALES DE TÉ VERDE

Tras los resultados obtenidos en el estudio de las infusiones de té verde comerciales, se procedió al estudio de diferentes extractos de té para validar el contenido de compuesto activos de los extractos, ya que las fichas técnicas de los extractos identificados mostraban amplios rangos de valores de EGCG y catequinas totales. La Tabla 5A.4 muestra los contenidos en catequinas y cafeína de los diferentes extractos comerciales de té verde seleccionados en el estudio. Se observó una gran variabilidad entre las muestras tanto en el contenido total de catequinas, como en el de cafeína. Esta variabilidad, estaría determinada por la utilización de diferentes variedades de té verde a la hora de la obtención de los extractos, pero fundamentalmente por los métodos de extracción, concentración y selección específica de catequinas empleados durante el proceso de producción de los mismos (Vuong et al., 2010).

**Tabla 5A.4** Contenido medio de catequinas individuales y cafeína (mg/g) en extractos de té verde comerciales.

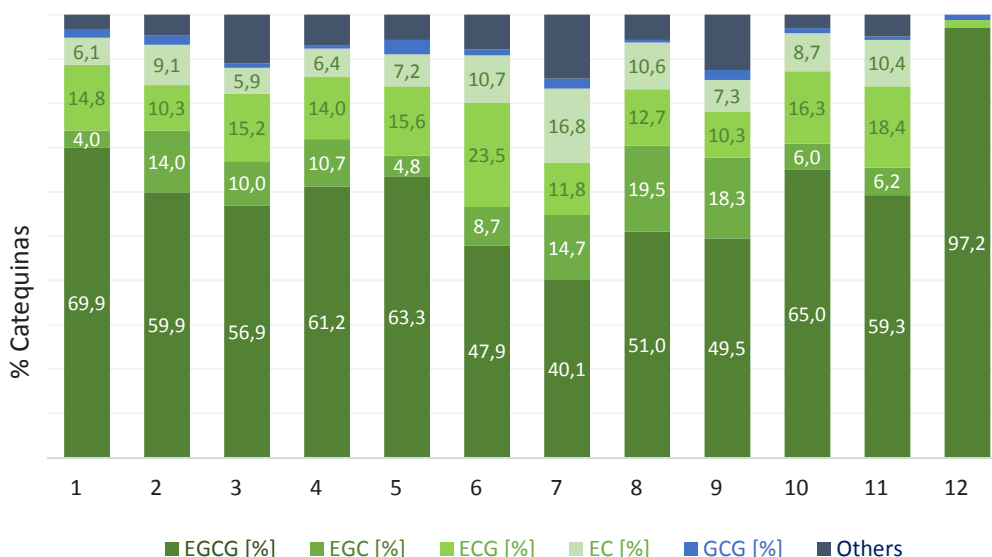
Extracto	EGCG	EGC	ECG	EC	GCG	CG	C	GC	cafeína
1	562.08	31.77	119.18	48.98	16.19	2.84	9.22	13.58	53.51
2	261.56	60.97	44.95	39.74	9.65	1.18	0.00	18.78	81.18
3	166.61	29.24	44.54	17.14	3.04	1.36	2.50	28.17	135.64
4	131.87	23.11	30.14	13.87	1.41	0.80	3.05	11.22	2.90
5	437.11	33.21	107.95	50.02	22.28	4.62	12.52	22.29	50.99
6	126.08	22.76	61.82	28.18	3.60	1.75	8.83	9.95	70.94
7	44.62	16.31	13.15	18.70	2.45	0.58	3.62	11.87	55.01
8	135.62	51.81	33.72	28.06	1.65	0.70	1.10	13.23	78.46
9	30.33	11.19	6.31	4.46	1.36	0.32	0.47	6.85	9.87
10	515.05	47.24	129.03	68.58	9.17	0.00	5.77	17.86	3.01
11	462.50	48.28	143.44	81.22	6.22	1.51	17.14	19.67	0.00
12	948.67	0.00	15.86	0.00	11.86	0.00	0.00	0.00	0.00

Resultados expresados en mg/g como media de 3 determinaciones.

Cabe destacar que en los extractos estudiados el 41.7% de los extractos presentaron un contenido bajo en cafeína (menor al 1%), no mostrando relación con el contenido en catequinas.

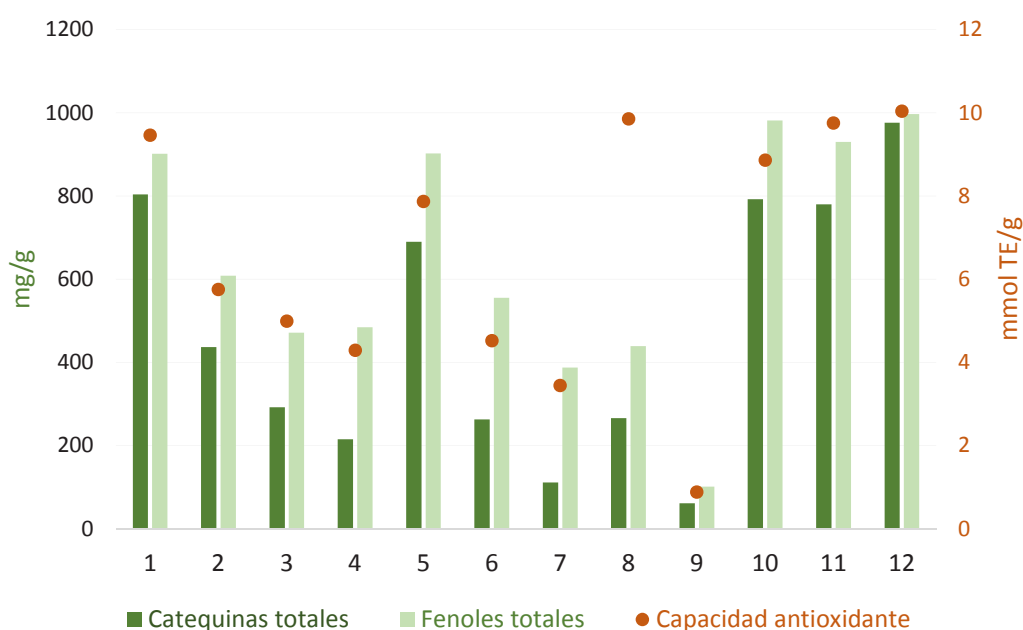
En cuanto al contenido de catequinas observado en los distintos extractos, para la EGCG, la catequina de mayor interés nutricional, el extracto 12 mostró el mayor contenido (948.67 mg/g), mientras que los extractos 1, 5, 10 y 11 presentaron un contenido alto en EGCG (mayor de 400 mg/g). De estos, hay que destacar que el extracto 10 presentó un contenido bajo en cafeína (3 mg/g, 0.03%) y que el extracto 11 no contenía cafeína, lo que nos indica que estos extractos han sido sometidos a un proceso tecnológico de descafeinado.

Con los resultados obtenidos podemos observar que la pureza de los distintos extractos difiere considerablemente. Aunque la EGCG fue en todas las muestras la catequina más abundante, su contenido osciló entre 40.1% y 97.2% de las catequinas totales (Figura 5A.4). Todas la muestras, excepto la 12, presentaron una distribución porcentual de catequinas típica a la del té verde. Sin embargo en el extracto 12, el alto porcentaje observado nos indica que esta muestra se corresponde más con un extracto purificado de EGCG, más que con un extracto típico de té, mostrando que las diferencias en la distribución de estos compuestos pueden depender de los diferentes procesos de producción de los extractos tal y como han descrito otros autores (Bazinet et al., 2007; Vuong et al., 2010)



**Figura 5A.4 | Distribución porcentual de catequinas en extractos comerciales de té verde.** Resultados expresados en % como media de 3 determinaciones.

El contenido en compuestos fenólicos totales en los extractos varió entre 101.15 y 997.10 mg/g, estando constituido mayoritariamente por catequinas, con valores medios que oscilaron entre 61.29 y 976.39 mg/g (Figura 5A.5). Debido a la variabilidad en el contenido de estos compuestos bioactivos, la capacidad a antioxidante de los extractos osciló entre 0.89 y 10.05 mmol TE/g.



**Figura 5A.5.** Contenido en catequinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante en extractos comerciales de té verde. Resultados expresados en mg/g y mmol TE/g como media de 3 determinaciones.

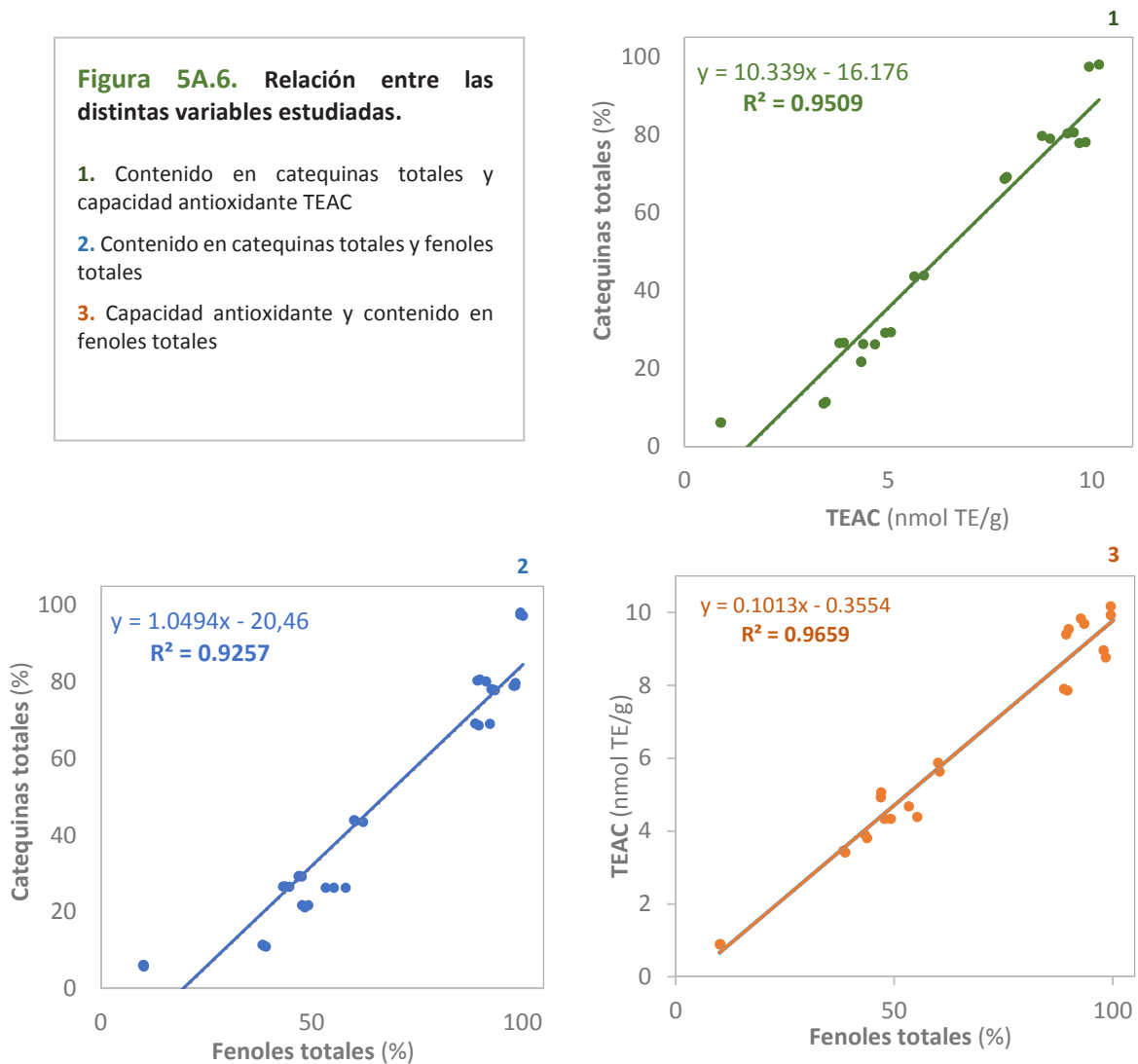
En nuestro estudio, la mayor capacidad antioxidante se detectó en el extracto 12, seguida de los extractos 1, 8 y 11, mientras que en el extracto 9 se observó una menor capacidad antioxidante, estando relacionado con el menor contenido de compuestos bioactivos (Figura 5A.5).

Se realizó un análisis de correlación (rho de Spearman) incluyendo la capacidad antioxidante y el contenido de catequinas totales y de compuestos fenólicos, para estudiar la relación existente entre estos parámetros, realizando posteriormente un análisis de regresión para determinar el efecto de una variable sobre la otra.

En el análisis de correlación observamos que la capacidad antioxidante mostró una correlación positiva y significativa con el contenido en EGCG ( $r= 0.946$ ,  $p<0.001$ ), catequinas

totales ( $r= 0.956$ ,  $p<0.001$ ) y compuestos fenólicos totales ( $r= 0.948$ ,  $p<0.001$ ). En la Figura 5A.6 se muestran las relaciones existentes entre la capacidad antioxidante vs catequinas totales, capacidad antioxidante vs fenoles totales y fenoles totales vs catequinas totales. En todos los casos los coeficientes de determinación fueron elevados  $R^2 > 0.92$ , lo cual indica una elevada relación positiva entre ellos.

Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores como Henning et al. (2003) que hallaron una correlación positiva y significativa ( $r= 0.79$ ,  $p=0.0001$ ) entre la capacidad antioxidante medida con la técnica ORAC y el contenido en catequinas de diferentes té. Asimismo, Seeram et al. (2006) observaron en 19 suplementos de té verde comerciales, que tanto la capacidad antioxidante medida como ORAC y TEAC estaban correlacionados de forma significativa con el contenido total de polifenoles ( $r= 0.95$ ,  $p < 0.0001$ ).



Tras conocer la correlación existente entre estas variables, se realizó un estudio de regresión múltiple para conocer el efecto de una variable sobre cada una de las otras, con el objetivo de poder predecir el contenido de catequinas en extractos de té a partir del contenido en fenoles totales y capacidad antioxidante obteniendo la siguiente ecuación:

$$\text{Catequinas totales} = -17.21 + 8.723 * \text{TEAC} + 0.169 * \text{Fenoles totales}$$
$$R^2 = 0.952; P < 0.001$$

Los resultados del estudio de regresión múltiple nos indican que se pueden estimar la cantidad de catequinas totales a partir de las otras dos variables, con una varianza explicada del 95% ( $R^2 = 0.952$ ;  $P < 0.001$ ). Por tanto, las técnicas espectrofotométricas utilizadas para la determinación del contenido de fenoles totales y de la capacidad antioxidante, permiten de forma rápida y económica evaluar el contenido de compuestos bioactivos en el té verde, debido a que los principales compuestos fenólicos y la mayor parte de la capacidad antioxidante es debida a las catequinas (Seeram et al., 2006).

## 2.1. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICION NUTRICIONAL DEL PRODUCTO

Tras el diseño del producto rico en polifenoles (Producto RP), siguiendo el procedimiento y la formulación descrita en el apartado de materiales y métodos de la presente Tesis Doctoral, se procedió a su análisis nutricional y análisis de la capacidad antioxidante, comparándolo con el producto placebo. La Tabla 5A.5 muestra la composición nutricional de ambos productos utilizados en el ensayo clínico (parte 2 del estudio). En la Tabla 5A.6 se detalla la caracterización y concentración de compuestos bioactivos del producto RP.

**Tabla 5A.5. Composición nutricional y capacidad antioxidante del producto rico en polifenoles y del placebo utilizados en el estudio de intervención.**

Valor Nutricional medio por 100 ml	Unidades	Producto RP	Producto placebo
<b>Energía</b>	kcal	63.5	61.7
<b>Proteína</b>	g	0.51	0.54
<b>Carbohidratos</b>	g	14.87	14.55
<b>de los cuales azúcares</b>	g	14.4	14.07
Glucosa	g	7.1	5.94
Fructosa	g	6.36	6.63
Sacarosa	g	1	1.5
<b>Grasa</b>	g	0.04	0.06
<b>Fibra</b>	g	0.82	0.41
<b>Cafeína</b>	mg	2.24 (0.20)	-
<b>Vitamina C</b>	mg	60.82 (0.55)	10
<b>Capacidad Antioxidante (ORAC)</b>	μmol TE	8230.9 (199.7)	860

Resultados en (paréntesis) = media (DE) de 3 determinaciones.

Como se puede observar en la Tabla 5A.5, el contenido en macronutrientes en ambos productos fue muy similar. En cuanto al aporte energético ambos productos mostraron un bajo contenido en Kcal siendo poco relevante desde el punto de vista del aporte energético ya que la ingesta de 100 ml al día de cualquiera de los dos productos contribuiría tan solo con un 3.2% de la cantidad diaria de energía que un adulto debe ingerir (2000 kcal) (Reglamento 1169/2011).

Como en cualquier producto elaborado a base de frutas, el contenido en proteínas y grasa total fue muy bajo (inferior al 1%), mientras que los hidratos de carbono fueron los principales contribuyentes al valor energético de ambos productos (Producto RP: 93.6 %; Placebo 94.3%). La única fuente de este macronutriente fueron las distintas frutas utilizadas como materias primas,

por lo que el perfil de azúcares estuvo constituido principalmente por glucosa y fructosa, con una pequeña proporción de sacarosa (Tabla 5A.5).

En el producto RP, el contenido en fibra dietética total fue de 0.8 g/100 ml, mientras que para el producto placebo se obtuvo un contenido reducido a la mitad. Estas diferencias estarían determinadas por el contenido de fibra de los distintos purés de frutas utilizados como materias primas. El contenido en vitamina C del producto RP proviene del concentrado de acerola, aportando una ración el 76% de la ingesta de referencia (IR) para esta vitamina, mientras que en el placebo el contenido vitamina C proviene de las frutas utilizadas, aportando al producto final un 12.5% IR.

Respecto al contenido en cafeína del producto RP, los valores obtenidos son muy inferiores a los contenidos en una infusión de té o un café. El contenido de cafeína en infusiones de té verde descritas anteriormente en el presente estudio (Tabla 5A.2) varía entre 11.6 y 43 mg/taza, dependiendo de las recomendaciones de preparación del fabricante y el peso de la bolsa de té. En la literatura se pueden encontrar valores de cafeína entre 20-50 mg/taza para el té verde (Astill et al., 2001; USDA, 2015), 35-75 mg/taza para el té negro (Astill et al., 2001; USDA, 2015) y entre 50 y 322 mg por taza para el café (Crozier et al., 2012; USDA, 2015). Hay que destacar que este bajo contenido en cafeína se debe al tipo de extracto de té utilizado, ya que tras realizar el estudio anterior pudimos seleccionar aquel extracto con un alto contenido en ECGC y baja concentración de esta xantina.

El producto RP mostró una capacidad antioxidante (ORAC) muy alta 8230.9  $\mu\text{mol TE}$ , mostrando un valor casi 10 veces superior al determinado en el placebo. La adición de frutas rojas, zumo de acerola y extracto de té verde contribuyen directamente a la capacidad antioxidante de este producto, mientras que en el caso del placebo el bajo contenido estaría asociado a la adición de plátano, pero principalmente, a la de zumo de uva blanca.

Para contextualizar nuestros hallazgos y tomando como referencia los valores ORAC publicados en 2010 por la USDA; 100 g de plátano tienen un valor ORAC de 730  $\mu\text{mol TE}$ , un melocotón medio 1872  $\mu\text{mol TE}$ , una naranja 2103  $\mu\text{mol TE}$  y 100 g de fresa 4266  $\mu\text{mol TE}$  (Haytowitz & Bhagwat, 2010). Esto pone de manifiesto las diferencias entre la capacidad antioxidante de ambos productos y el poder antioxidante del nuevo producto desarrollado. En este sentido, Wu et al. (2004) estimó que una pieza de fruta y/o vegetales aporta aproximadamente 2200  $\mu\text{mol TE}$ . Asimismo, Prior (2014), tras una análisis de varios estudios epidemiológicos realizados por otros investigadores (Holtan et al., 2012; Rautiainen et al.,



2012a; Rautiainen et al., 2012b; Farvid et al., 2013), concluye que ingestas diarias mayores a 10.000  $\mu\text{mol TE}$  (ORAC) pueden tener un efecto positivo sobre la salud, ya que están relacionadas con una menor incidencia de hipertensión, infarto cerebral, riesgo de muerte y cáncer endometrial. De cualquier forma, si traducimos la estimación de Wu et al. (2004) a las recomendaciones de la Organización Mundial de la salud de tomar al menos 400 g de frutas y/o vegetales al día (equivalentes a 5 piezas) para reducir el riesgo de enfermedades (WHO, 2003), hay que indicar que las 5 piezas de estos alimentos, equivaldrían a 11.000  $\mu\text{mol TE}$  (ORAC) y por tanto están en línea con la recomendación de Prior (2014).

No obstante, la capacidad antioxidante total de un alimento, no es del todo extrapolable a las condiciones fisiológicas celulares y no tiene en cuenta la biodisponibilidad y metabolismo de sus componentes. Además, los mecanismos de acción de los antioxidantes, van más allá de la capacidad antioxidante de captura de radicales libres en la prevención de enfermedades (Liu & Finley, 2005). Se trata de una buena indicación de partida, pero lo realmente importante es el análisis y caracterización de los diferentes compuestos bioactivos que contiene el alimento (EFSA, 2011a). En el caso de los polifenoles, los cuales todos aportan capacidad antioxidante, la estructura química es determinante en la biodisponibilidad, acción biológica y su posible efecto sobre la salud (Tomas-Barberán & Andres-Lacueva, 2012). Está ampliamente aceptado en la literatura que los polifenoles no solo atrapan radicales libres sino que también tienen otras funciones como la de actuar como pro-oxidantes sobre determinadas células y regular rutas de señalización celular y transcripción (Kim et al., 2014)

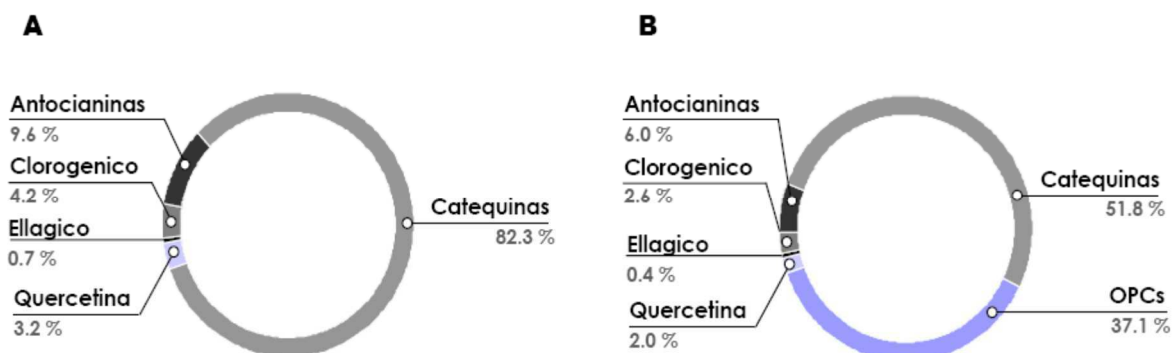
Con el fin de proporcionar la evidencia científica sobre el papel que el alimento funcional desempeña sobre la salud del consumidor, es necesario hacer una caracterización completa de los compuestos bioactivos del alimento (EFSA, 2011a; González-Ferrero et al., 2015), por lo que en este estudio procedimos al análisis del contenido y de los distintos grupos de compuestos polifenólicos en el producto RP, que se recogen en la Tabla 5A.6.

**Tabla 5A.6. Contenido (mg/100 ml) y perfil polifenólicos del nuevo producto desarrollado RP, producto rico en polifenoles utilizado en el estudio de intervención.**

Compuestos Bioactivos en 100 ml	Producto RP
<b>Polifenoles Totales (HPLC+ Florogluculinolisis)</b>	<b>395.25 (14.87)</b>
<b>Polifenoles Totales (HPLC)</b>	<b>255.26 (39.31)</b>
<b>Procianidinas Oligoméricas (valor estimado)</b>	<b>139.99 (24.44)</b>
<b>Procianidinas (Catequinas Totales)</b>	<b>209.45 (32.65)</b>
EGCG	111.09 (21.51)
EGC	44.53 (5.93)
ECG	44.39 (4.81)
C	5.52 (1.04)
EC	3.91 (0.76) <sup>a</sup>
<b>Antocianidinas Totales</b>	<b>24.94 (3.10)<sup>a</sup></b>
<b>Cianidinas Totales</b>	15.88 (2.05) <sup>a</sup>
<i>Cianidina 3 -galactósido</i>	10.27 (1.32) <sup>a</sup>
<i>Cianidina 3 -arabinósido</i>	4.56 (0.56) <sup>a</sup>
<i>Cianidina 3 -glucósido</i>	1.04 (0.17) <sup>a</sup>
Peonidina 3 - glucósido	2.73 (0.30) <sup>a</sup>
Pelargonidina 3 - glucósido	1.67 (0.22) <sup>a</sup>
Delfinidina 3 - glucósido	1.04 (0.18) <sup>a</sup>
Malvidina 3 glucósido	2.02 (0.08) <sup>a</sup>
Malvidina 3-p-coumaroylglucosido	0.70 (0.04) <sup>a</sup>
<b>Acidos hidroxicinámicos</b>	<b>10.66 (2.65)</b>
Ácido Clorogénico	8.14 (1.90)
Ácido Neoclorogénico	2.51 (0.76)
<b>Flavonoles (Quercetina total)</b>	<b>8.44 (0.80)<sup>a</sup></b>
Quercetin-3-O-glucosido	4.50 (0.57) <sup>a</sup>
Quercetin-3-O-rutinosido	1.91 (0.12) <sup>a</sup>
Quercetina	2.03 (0.17) <sup>ab</sup>
<b>Ácido Elágico</b>	<b>1.78 (0.17)<sup>a</sup></b>
Resultados en (paréntesis) = media (DE) de 3 determinaciones.	
<sup>a</sup> Valores calculados	

El contenido total en polifenoles totales analizado por dos métodos-HPLC y florogluculinolisis fue de 255.26 (39.31) y 395.25 (14.87) mg/100 ml, respectivamente (Tabla 5A.6). Las diferencias observadas entre los dos métodos pueden ser debidas a que parte de las procianidinas oligoméricas (OPCs) no son detectadas por HPLC, y sin embargo, tras la hidrólisis que se produce con el segundo método, los monómeros de estas OPCs pueden ser cuantificados y analizados (Kennedy & Jones, 2001).

La distribución de compuestos fenólicos en el producto de acuerdo a los dos métodos utilizados se muestra en la Figura 5A.7. Se observa que la mayor parte de los compuesto fenólicos son flavon-3-oles (catequinas y OPCs), seguidos de antocianidinas, ácidos hidroxicínámicos (ácido clorogénico), flavonoles (quercetina) y ácidos hidroxibenzoicos (ácido elágico).



**Figura 5A.7.** Distribución porcentual de compuestos fenólicos analizados por HPLC (A) y Fluoroglucionolisis (B)

Teniendo en cuenta los requisitos de partida que hemos utilizado para el diseño del producto, RP, basado en obtener con una ración del mismo un contenido de EGCG de dos tazas de té verde, de antocianidinas igual al de 100 g de frutos rojos y de quercetina equivalente al de una manzana, procedimos a analizar las equivalencias entre nuestro producto y datos encontrados en la bibliografía científica:

- El contenido en EGCG del producto RP fue de 111.09 mg/100 ml, valor similar al descrito en la base de datos de flavonoides de la USDA (Bhagwat et al., 2011) (104,2 mg en 2 tazas de 200 ml de té verde), y a los valores obtenidos en el estudio 1 de ésta Tesis (34-124 mg/2 tazas) (Tabla 5A.3).
- Respecto al contenido en antocianidinas totales, los valores obtenidos en el producto (24.94 mg/100 ml) están dentro del rango observado por Buendia et al. (2009) para fresas (20.2–47.4 mg/100 g), mientras que en el caso de la frambuesa el contenido de antocianinas totales variaba de 2.1 (frambuesa amarilla, variedad “Belianka”) a 325.5 mg/100g (frambuesa negra, variedad “Bristol”) (Bobinaite et al., 2012). En otro estudio llevado a cabo por Díaz-García et al. (2013), donde analizaron el contenido de

antocianinas totales en siete zumos de frutas comerciales (fresa, guinda, arándano americano, arándano, uva negra, naranja y manzana), encontraron los siguientes valores: 17.08; 107.2; 55.92; 362.1; 25.08 mg/100 ml respectivamente, en el caso del zumo de naranja y manzana no hubo antocianinas. De acuerdo a estos resultados, nuestros datos están más en línea con los encontrados en el zumo de fresa y uva negra.

- El contenido en quercetina total del producto RP fue de 8.44 mg/100ml, siendo la quercitina-3-O-glucósido la más abundante (4.50 mg/100ml) con un 53% del total. De acuerdo a la literatura científica, nuestros resultados son superiores a los observados You et al. (2011) en cultivos de arándanos tanto orgánicos como convencionales (2.93 y 2.03 mg/100g, respectivamente), mientras que en un estudio con diferentes zumos de frutas ricos en polifenoles analizado por Díaz-García et al. (2013), observaron una amplia variabilidad alcanzándose valores desde 0.329 mg/100ml en el zumo de naranja a 27.8 mg/100ml en el zumo de arándanos americanos. Valores similares en este estudio lo encontramos en el zumo de guinda y de arándanos (8.66 y 10 mg/100ml, respectivamente). El manzanas, la quercetina se encuentra principalmente en la piel (Alonso-Salces et al., 2004). Los glucósidos de quercetina en manzana sin pelar publicados por otros autores se encuentran entre 21–200 mg/100 g (Awad & De Jager, 2002; Lee et al., 2003).

Además, la concentración de otros compuestos fenólicos en el producto RP, fue también similar a los encontrados en el producto RP. La concentración de ácido elágico (1.78 mg/100 ml) analizada está en línea con la encontrada en fresas por otros autores (Aaby et al., 2005; 1.4 mg/100 g) y Buendía et al., (2009; 0.88–2.06 mg/100 g). De cualquier forma, las comparaciones descritas son estimaciones que pueden tener grandes variaciones debido a las diferentes técnicas analíticas utilizadas por otros autores, además de las variaciones en el contenido en polifenoles propias de los alimentos que explicamos en la Revisión bibliográfica de la presente Tesis.

## 2.2. ESTABILIDAD DEL PRODUCTO A LO LARGO DEL TIEMPO

De forma general, la vida útil se define como el tiempo durante el cual, un alimento sigue siendo seguro, cumple con la declaración nutricional de la etiqueta y conserva sus características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales, cuando se almacena de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante (IFST, 1993). En el caso de alimentos funcionales, la estabilidad de los compuestos bioactivos debe ser demostrada durante la vida útil del producto (EFSA, 2011a; González-Ferrero et al., 2015) para asegurar que el producto mantiene sus propiedades de funcionalidad durante el tiempo que va a estar disponible en el mercado para el consumidor.

En este sentido, la Tabla 5A.7 muestra la evolución de los diferentes compuestos polifenólicos, vitamina C y capacidad antioxidante ORAC del producto RP durante el estudio de vida comercial, tras el almacenamiento a 4 °C durante 5 meses. En general, las concentraciones de catequinas, ácidos elágico y clorogénico, vitamina C y la capacidad antioxidante permanecieron estables durante el estudio, mientras que el contenido de antocianidinas y el de quercetina mostraron pérdidas estadísticamente significativas.

A continuación, se discuten en diferentes apartados la estabilidad de los diferentes grupos de compuestos bioactivos, la capacidad antioxidante y la vitamina C. También se describen el análisis sensorial y la evolución del color a lo largo del estudio de vida útil.

**Tabla 5A.7.** Evolución de los compuestos fenólicos, vitamina C y actividad antioxidante ORAC durante el almacenamiento a 4 °C durante 5 meses (mg/100 ml)

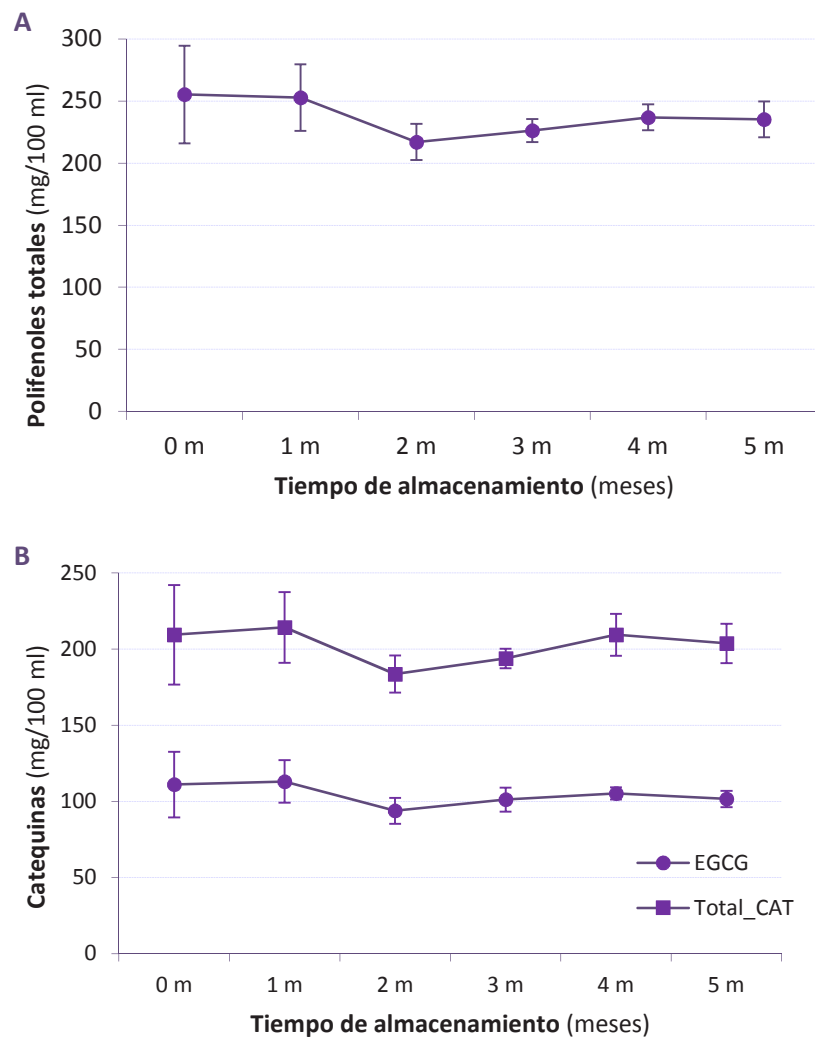
	0 meses	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses
<b>Polifenoles totales</b>	<b>255.26 (39.31)</b>	<b>252.84(26.77)</b>	<b>217.02(14.58)</b>	<b>226.17(9.31)</b>	<b>236.83(10.48)</b>	<b>235.17(14.50)</b>
<b>Procianidinas (Catequinas totales)</b>	<b>209.45 (32.65)</b>	<b>214.23(23.26)</b>	<b>183.60(12.14)</b>	<b>193.83(6.39)</b>	<b>209.39(13.83)</b>	<b>203.79(12.91)</b>
EGCG	111.09 (21.51)	113.15(13.90)	93.91(8.51)	101.21(7.90)	105.26(4.01)	101.65(5.34)
EGC	44.53 (5.93)	44.80(4.88)	38.32(2.32)	37.90(1.91)	49.04(5.46)	44.37(6.94)
ECG	44.39 (4.81)	48.85(3.98)	43.68(2.94)	44.77(0.34)	49.27(6.78)	50.19(2.48)
C	5.52 (1.04)	5.62(0.93)	6.00(0.56)	6.13(1.00)	5.28(0.74)	5.19(0.67)
EC	3.91 (0.76) <sup>a</sup>	1.81(0.31) <sup>b</sup>	1.70(0.18) <sup>b</sup>	3.83(0.00) <sup>a</sup>	2.30(0.31) <sup>b</sup>	2.38(0.06) <sup>b</sup>
<b>Antonicidinas Totales</b>	<b>24.94 (3.10)<sup>a</sup></b>	<b>20.76(2.20)<sup>b</sup></b>	<b>17.14(2.02)<sup>bc</sup></b>	<b>15.64(1.58)<sup>c</sup></b>	<b>14.89(1.19)<sup>c</sup></b>	<b>14.42(0.32)<sup>c</sup></b>
Cianidinas Totales	15.88 (2.05) <sup>a</sup>	12.88(1.39) <sup>ab</sup>	11.31(1.10) <sup>bc</sup>	10.21(1.03) <sup>bc</sup>	9.28(0.99) <sup>c</sup>	8.81(0.20) <sup>c</sup>
Cianidina 3 -galactósido	10.27 (1.32) <sup>a</sup>	8.72(0.96) <sup>ab</sup>	7.40(0.65) <sup>bc</sup>	6.71(0.64) <sup>c</sup>	6.13(0.71) <sup>c</sup>	5.97(0.10) <sup>c</sup>
Cianidina 3 -arabinósido	4.56 (0.56) <sup>a</sup>	3.31(0.33) <sup>b</sup>	3.25(0.30) <sup>b</sup>	2.91(0.27) <sup>bc</sup>	2.57(0.13) <sup>bc</sup>	2.25(0.10) <sup>c</sup>
Cianidina 3 -glucósido	1.04 (0.17) <sup>a</sup>	0.85(0.10) <sup>ab</sup>	0.65(0.16) <sup>b</sup>	0.59(0.12) <sup>b</sup>	0.58(0.15) <sup>b</sup>	0.59(0.01) <sup>b</sup>
Peonidina 3 - glucósido	2.73 (0.30) <sup>a</sup>	2.22(0.23) <sup>b</sup>	1.80(0.18) <sup>bc</sup>	1.60(0.14) <sup>c</sup>	1.52(0.05) <sup>c</sup>	1.47(0.04) <sup>c</sup>
Pelargonidina 3 - glucósido	1.67 (0.22) <sup>a</sup>	1.90(0.21) <sup>ab</sup>	1.13(0.15) <sup>cd</sup>	0.99(0.10) <sup>d</sup>	1.28(0.12) <sup>bcd</sup>	1.44(0.03) <sup>bc</sup>
Delfinidina 3 - glucósido	1.04 (0.18) <sup>a</sup>	0.78(0.11) <sup>ab</sup>	0.46(0.40) <sup>bc</sup>	0.61(0.11) <sup>bc</sup>	0.59(0.02) <sup>bc</sup>	0.48(0.01) <sup>c</sup>
Malvidina 3 glucósido	2.02 (0.08) <sup>a</sup>	1.65(0.05) <sup>ab</sup>	1.38(0.05) <sup>bc</sup>	1.31(0.05) <sup>bc</sup>	1.29(0.00) <sup>c</sup>	1.29(0.02) <sup>c</sup>
Malvidina 3-p-coumaroy glucósido	0.70 (0.04) <sup>a</sup>	0.57(0.04) <sup>b</sup>	0.50(0.02) <sup>bc</sup>	0.49(0.02) <sup>bc</sup>	0.48(0.02) <sup>c</sup>	0.47(0.03) <sup>c</sup>
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>	<b>10.66 (2.65)</b>	<b>10.18(1.78)</b>	<b>10.04(1.31)</b>	<b>11.92(1.33)</b>	<b>7.16(6.69)</b>	<b>11.07(1.38)</b>
Ácido Clorogénico	8.14 (1.90)	7.98(1.04)	7.52(0.89)	8.71(0.86)	5.32(5.02)	8.43(0.79)
Ácido Neoclorogénico	2.51 (0.76)	2.20(0.83)	2.52(0.43)	3.21(0.47)	1.84(1.67)	2.64(0.60)
<b>Flavonoles (Total Quercetina)</b>	<b>8.44 (0.80)<sup>a</sup></b>	<b>5.96(0.86)<sup>b</sup></b>	<b>4.90(0.09)<sup>bc</sup></b>	<b>3.36(0.05)<sup>d</sup></b>	<b>3.64(0.37)<sup>cd</sup></b>	<b>4.11(0.34)<sup>cd</sup></b>
Quercetin-3-O-glucósido	4.50 (0.57) <sup>a</sup>	1.97(0.27) <sup>b</sup>	1.51(0.03) <sup>b</sup>	1.35(0.04) <sup>b</sup>	1.54(0.33) <sup>b</sup>	1.80(0.14) <sup>b</sup>
Quercetin-3-O-rutinósido	1.91 (0.12) <sup>a</sup>	1.97(0.32) <sup>a</sup>	1.67(0.04) <sup>b</sup>	0.35(0.01) <sup>b</sup>		0.00(0.00)
Quercetin	2.03 (0.17) <sup>ab</sup>	2.03(0.28) <sup>ab</sup>	1.71(0.03) <sup>b</sup>	1.66(0.02) <sup>b</sup>	2.10(0.21) <sup>ab</sup>	2.31(0.20) <sup>a</sup>
<b>Ácido elálgico</b>	<b>1.78 (0.17)<sup>a</sup></b>	<b>1.71(0.29)<sup>a</sup></b>	<b>1.35(0.03)<sup>c</sup></b>	<b>1.42(0.01)<sup>b</sup></b>	<b>1.75(0.19)<sup>a</sup></b>	<b>1.79(0.09)<sup>a</sup></b>
<b>Vitamina C</b>	<b>60.82 (0.55)<sup>c</sup></b>	<b>59.11(0.25)<sup>d</sup></b>	<b>63.75(0.50)<sup>b</sup></b>	<b>65.25(0.98)<sup>a</sup></b>	<b>58.45(0.19)<sup>d</sup></b>	<b>58.49(0.18)<sup>d</sup></b>
<b>ORAC <math>\mu</math>mol TE</b>	<b>8230.92 (199.77)</b>	<b>8098.33(294.86)</b>	<b>8128.62 (238.53)</b>	<b>7682.67(278.74)</b>	<b>8112.67(278.74)</b>	<b>7671.92(146.74)</b>

Resultados expresados en mg/g como media (DE) de 3 determinaciones.

<sup>a-d</sup> Diferentes letras indican diferencias significativas a un  $p < 0.05$ . Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

### 2.2.1. Evolución de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento

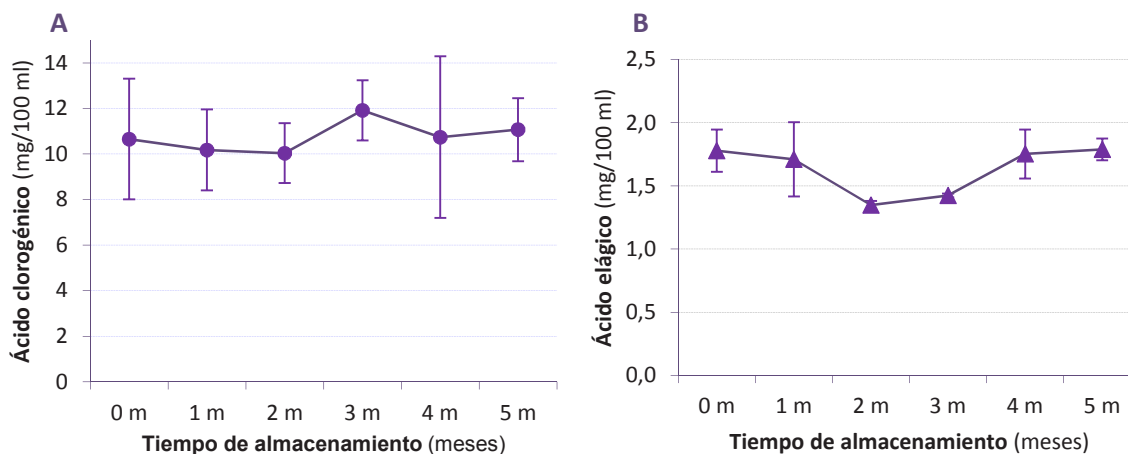
Al final del estudio, el porcentaje de pérdida en el contenido en compuestos fenólicos totales fue de un 8%, aunque no se observaron diferencias significativas a lo largo de los meses de estudio (Figura 5A.8A). Este comportamiento podría estar asociado al hecho de que no se encontraron diferencias significativas en las catequinas, las cuales representan el 82.3% del total de compuestos polifenólicos del producto RP. De forma individual, la pérdida de catequinas totales fue de un 3% y la de EGCG de un 8% (Figura 5A.8B), si bien, al no haber medido el GCG, no podemos determinar si la degradación de EGCG fue debida a un proceso de oxidación o de epimerización (Friedman et al., 2009)



**FIGURA 5A.8** Evolución de compuestos fenólicos totales (A), catequinas y EGCG (B) determinados por HPLC a lo largo del estudio de almacenamiento realizado durante 5 meses a 4°C.

Nuestros resultados coinciden con los descritos por Sang et al. (2005), quién reportó que no se produce una degradación significativa de catequinas en bebidas de té almacenadas a 4 °C durante 6 meses. De acuerdo a Ananingsih et al. (2013), la estabilidad de las catequinas es mayor a pH ácido y a bajas temperaturas de almacenamiento, lo que puede justificar la estabilidad observada en nuestro estudio, donde se dan estas dos condiciones. Sin embargo, la presencia de otros ingredientes también puede influir en la estabilidad de estos compuestos. Así, Chen et al. (2001) observaron que la adición de ácido ascórbico puede aumentar la degradación de catequinas, en largos periodos de almacenamiento, al actuar como prooxidante. Hay que destacar que bajo las condiciones seleccionadas en el presente estudio y con la compleja matriz de diferentes polifenoles del producto, no observamos ningún efecto prooxidante de la vitamina C, la esperada degradación descrita en la literatura.

En relación a otros de los compuestos analizados, no se hallaron diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento para los contenidos de ácido elálgico y de ácidos hidroxicinámicos (clorogénico y neoclorogénico), siendo estos los compuestos más estables a lo largo de los 5 meses (Figura 5A.9)



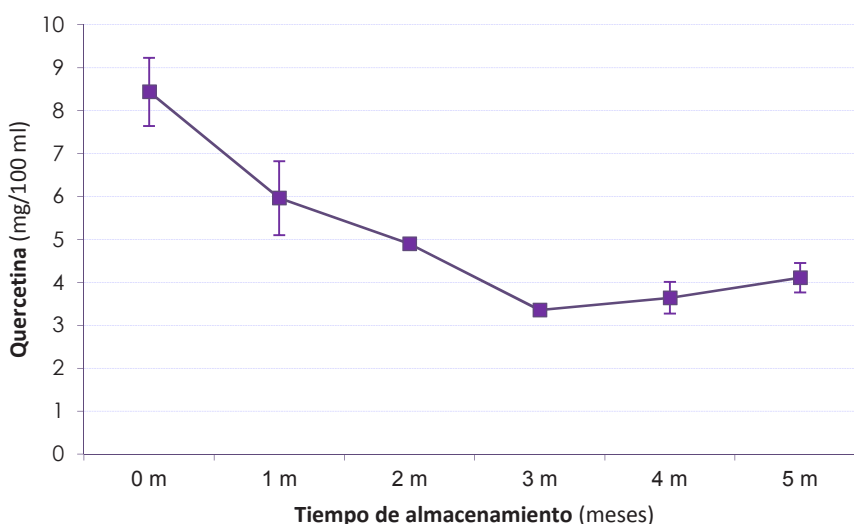
**FIGURA 5A.9** Evolución del contenido de ácido clorogénico (A) y ácido elálgico (B) a lo largo del estudio de almacenamiento durante 5 meses a 4°C.



En el contenido de ácido elálgico se observaron pérdidas del 24% y 20% durante el segundo y tercer mes de almacenamiento, respectivamente; aunque durante el cuarto y quinto mes su contenido volvió a incrementar hasta alcanzar un contenido similar al observado en el tiempo 0. Este incremento podría ser debido a la liberación de ácido elálgico de las elagitaninas durante el almacenamiento. En este sentido, Zafrilla et al. (2001) observaron durante el procesado y almacenamiento de mermeladas de frambuesa un aumento de ácido elálgico 3 veces mayor al producto sin procesar. García-Alonso et al. (2003) observaron un comportamiento similar en un postre de frutos rojos almacenado 12 meses a 8, 21 y 30 °C, aumentando el ácido elálgico en todas las temperaturas.

En relación al contenido de ácidos hidroxicinámicos, la estabilidad descrita en este estudio coincide con los datos publicados por Wojdyło et al. (2014) para el zumo de membrillo, y por Nowicka y Wojdyło (2015) para zumo de cereza almacenado 6 meses a 4 °C.

Por el contrario, los flavonoles (quercetina) y las antocianidinas fueron los compuestos polifenólicos más inestables, al mostrar diferencias significativas a partir del primer y segundo mes de almacenamiento (Figuras 5A.10 y 5A.11)

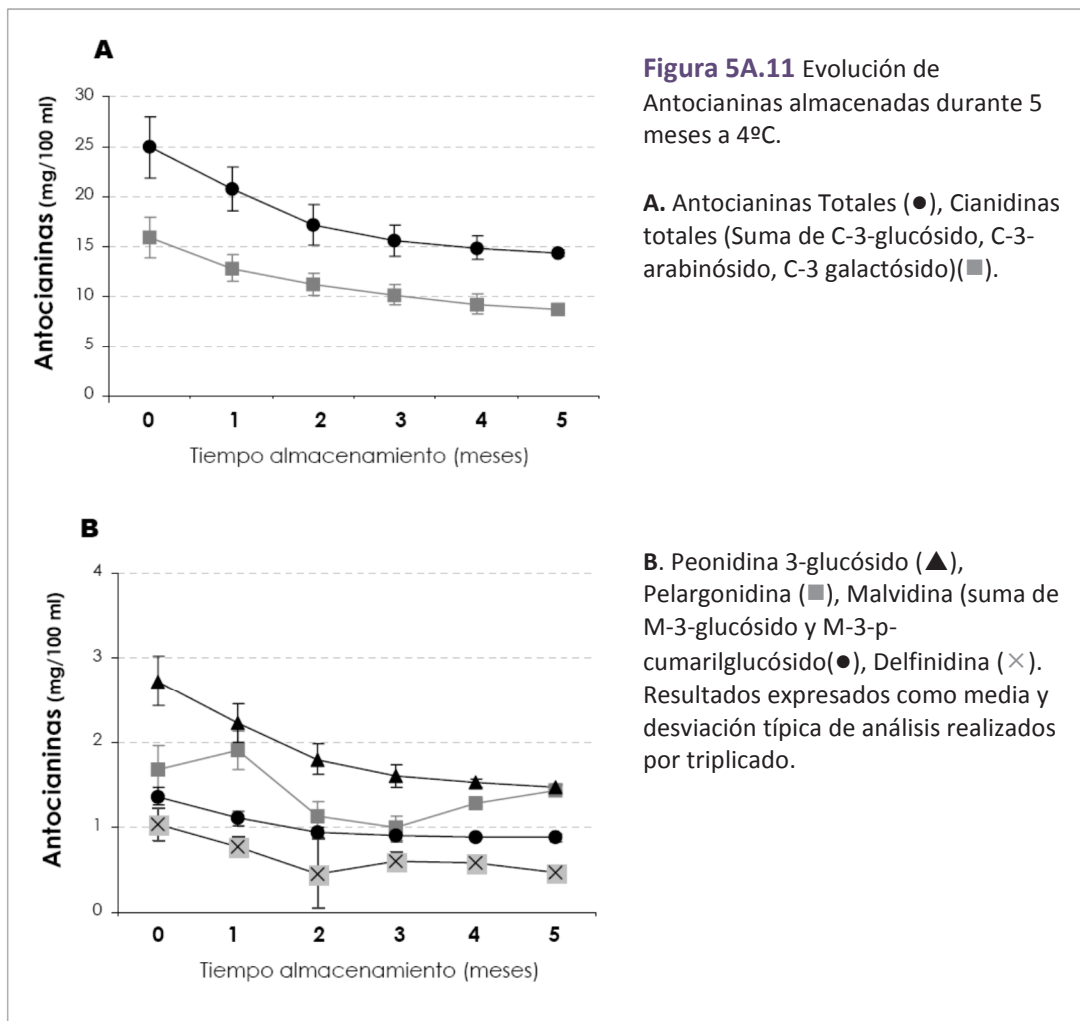


**FIGURA 5A.10.** Evolución de la quercetina almacenada durante 5 meses a 4°C.

Así, la quercetina disminuyó un 51% al final de los 5 meses, aunque en el primer mes de almacenamiento la pérdida fue del 29% con respecto al contenido inicial. Oszmiański et al. (2008) hallaron pérdidas de quercetina inferiores a las nuestras en purés de manzana tratados

con diferentes tratamientos térmicos (microondas a 80°C y calentamiento a 90°C) y almacenados 6 meses a 30 °C. Sin embargo, Will et al. (2005) no mostraron cambios en el contenido de glucósidos de quercetina en zumos de cereza almacenados 180 días a 20°C. Esto confirma el hecho de que la matriz es importante en la estabilidad de los compuesto fenólicos y que en el producto RP desarrollado, la quercetina no fue tan estable como el resto de los compuesto fenólicos.

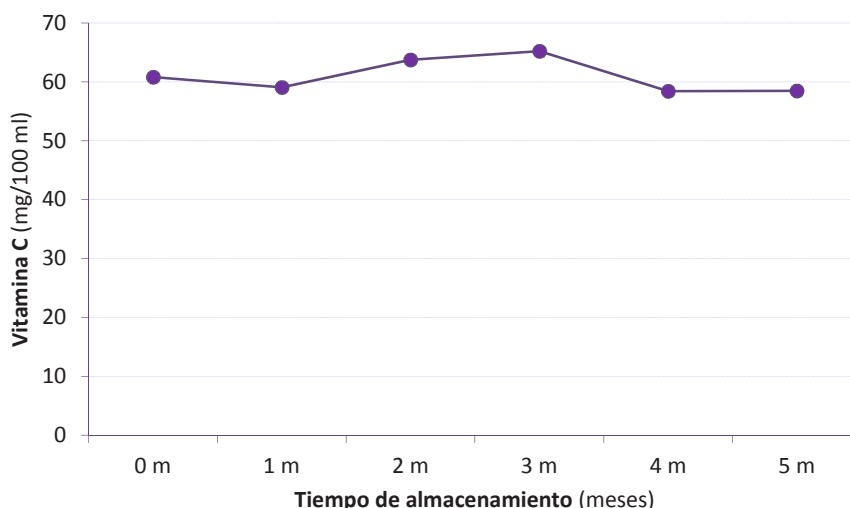
El contenido en antocianidinas disminuyó significativamente a partir del segundo mes, con un valor medio de pérdidas del 31 %, llegando hasta un 42% al finalizar el estudio (Figura 5A.11). Los resultados coinciden con los descritos por otros autores en la bibliografía científica. Por ejemplo, Hartmann et al. (2008) encontraron un 39% de pérdidas de antocianidinas en purés de fresa almacenado a 8 °C durante 11 semanas. García-Alonso et al. (2003) observaron pérdidas del 29.3 y 46.1% en el postre de frutos rojos a los 2 y 6 meses de almacenamiento a 8°C. Por otro lado, Choi et al. (2002) hallaron pérdidas de un 25 % de estos compuestos en zumos de naranja sanguina almacenadas a 4.5°C durante 7 semanas. Tanto el tipo de antocianina como las características de la matriz son factores importantes que determinan la estabilidad de las antocianidinas (Hartmann et al., 2008; Cisse et al., 2009). En este sentido, la presencia de vitamina C acelera el proceso de degradación (Ozkan et al., 2002; De Rosso et al., 2007) e incluso determinados compuesto fenólicos pueden también acelerar el proceso (Ruenroengklin et al., 2009). Por tanto, La pérdida de antocianinas observada en nuestro estudio puede ser debida al alto contenido en Vitamina C del producto o incluso por otros compuestos fenólicos o la interacción entre estos.



La antocianidina más estable fue la pelargonidina, con un 14% de pérdida y la más inestable la delfinidina con un 56% de pérdidas. Todas la cianidinas (antocianidinas mayoritarias) presentaron un porcentaje de pérdida similar al final del estudio (44%). Reque et al. 2014 también observaron que la delfinidina fue la antocianidina que más se degradaba y la pelargonidina la que menos, aunque los porcentajes de pérdida fueron más altos (80% y 9% respectivamente).

### 2.2.2 EVOLUCION DE LA VITAMINA C DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Como se muestra en la Figura 5A.12, la vitamina C permaneció sorprendentemente estable a lo largo del estudio. Se observaron ligeras pérdidas en el contenido de ácido ascórbico (en torno al 2.8%) tras el primer mes, sin observar diferencias significativas en el contenido de esta vitamina a lo largo del estudio. Únicamente se detectó un ligero aumento en el contenido de la vitamina C, en los meses 2º y 3º, posiblemente debido a las tolerancias analíticas.



**FIGURA 5A.12.** Evolución de la Vitamina C almacenados durante 5 meses a 4°C.

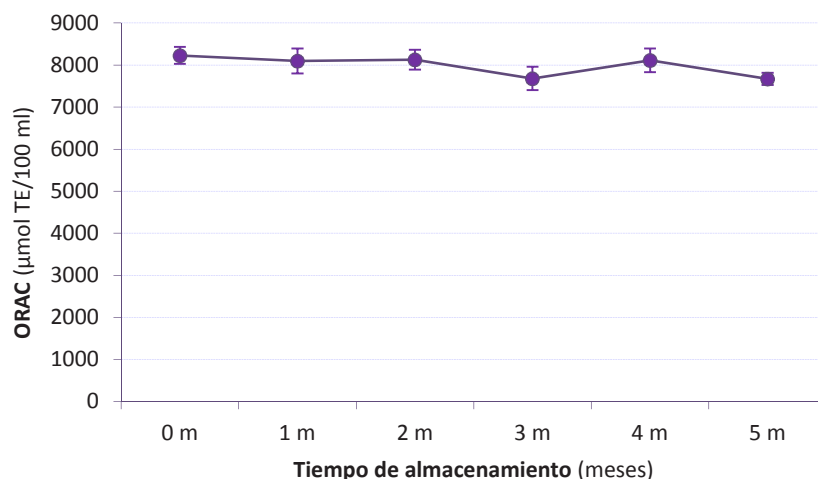
La temperatura es un factor determinante en la estabilidad de la vitamina C (Johnson et al., 1995), observando diferentes efectos en función del tipo de alimento y temperatura de almacenamiento. Choi et al. (2002), en muestras de zumo de naranja sanguina envasadas en botellas de plástico y almacenadas a 4.5°C durante 7 semanas, observaron pérdidas de vitamina C de 10.7% por semana. Gironés-Vilaplana et al. (2012), en una bebida de zumo de limón y maqui (fruto rico en flavonoides y vitamina C), describieron pérdidas de vitamina C en la bebida almacenada a 4°C en torno al 80% al finalizar los 70 días de almacenamiento. De acuerdo a Mena et al., (2013), las pérdidas de vitamina C a 5°C en un zumo de granada fueron superiores al 50% durante un periodo de almacenamiento de 85 días.

El producto RP tiene un alto contenido en Vitamina C y antocianidinas. En la literatura, está ampliamente descrita la degradación mutua de ambos compuestos (García-Viguera et al., 1999; Ozkan, 2002). Una posible explicación a la excelente estabilidad de la vitamina C observada en nuestro estudio, podría estar relacionada con el posible efecto protector de las antocianinas sobre la vitamina C, sugerida por otros autores en diferentes modelos o bebidas. Por ejemplo, Poeschl et al. (1981) y Bordignon-Luiz et al. (2007), han sugerido que el

efecto protector era debido a los flavonoles sobre el ácido ascórbico en un sistema modelo de antocianina-flavonol-ácido ascórbico. Iversen (1999) encontró que la degradación de las antocianinas era de 3-4 veces más elevada que las del ácido ascórbico en un néctar de grosella negra. Kaack et al. (1998) remarcó el efecto protector sobre el ácido ascórbico cuando los flavonoles y antocianinas estaban ambos presentes en la bebida. En este sentido, Gironés-Vilaplana et al. (2012) observaron una reducción de la tasa de degradación de la vitamina C en una bebida de zumo de maqui y limón rico en flavonoides probablemente como consecuencia de la combinación de bioactivos de los zumos de limón y maqui.

### **2.2.3 EVOLUCION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (ORAC) DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

El efecto del almacenamiento sobre la capacidad antioxidante del producto RP fue evaluada por el método  $ORAC_{FL}$ , que mide la capacidad de los componentes presentes en el producto RP para secuestrar los radicales peroxilo (Figura 5A.13). Los valores de la capacidad antioxidante del producto RP permanecieron estables durante los 5 meses de almacenamiento a pesar de las pérdidas de antocianinas totales (Figura 5A.11). Autores como Brownmiller et al. (2008) y Hager et al (2008), tampoco observaron pérdidas en la capacidad antioxidante en zumos de arándanos y frambuesa negra, respectivamente, almacenados durante 6 meses a 25°C. En otro estudio llevado a cabo por Guo et al (2014) en zumo de granada almacenado a 4°C durante 12 semanas, no observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante durante el tiempo de almacenamiento. Los mismos resultados fueron observados por García-Alonso et al (2003) en un postre de frutos rojos almacenados a diferentes temperaturas durante 12 meses, donde la capacidad antioxidante se mantuvo constante a 8°C, mientras que a 21 y 30°C descendieron ligeramente, siendo la temperatura de refrigeración la recomendada para mantener su actividad antioxidante. De acuerdo a estos resultados, se sugieren que otros compuestos fenólicos, tales como los productos de degradación de antocianinas, contribuyen a mantener la actividad antioxidante del producto. Este proceso podría ser similar al que ocurre durante el envejecimiento del vino tinto, en el que se ha sugerido que grandes complejos polifenólicos y productos de condensación que aparecen durante el envejecimiento contribuyen en la actividad antioxidante total del vino (Burns et al., 2001).



**Figura 5A.13.** Evolución de la capacidad antioxidante (ORAC) del producto almacenado durante 5 meses a 4°C.

## 2.2.4 EVOLUCION DEL COLOR DURANTE EL ALMACENAMIENTO

En la Tabla 5A.8 se presentan los valores L\*, a\* y b\* a lo largo de los 5 meses de almacenamiento. Las tres coordenadas de color mostraron diferencias estadísticamente significativas al final del estudio, con respecto a los valores observados en el tiempo cero.

**Tabla 5A.8.** Estabilidad de los valores CIE L\*a\*b\* en el producto durante 5 meses a 4°C.

Coordenada	t0	t1	t2	t3	t4	t5
L*	21.8 (0.1) <sup>c</sup>	22.5 (0.0) <sup>b</sup>	22.4 (0.3) <sup>b</sup>	22.6 (0.1) <sup>b</sup>	23.6 (0.1) <sup>a</sup>	23.8 (0.2) <sup>a</sup>
a*	15.9 (0.0) <sup>a</sup>	15.7 (0.0) <sup>ab</sup>	15.6 (0.0) <sup>abc</sup>	15.6 (0.2) <sup>bc</sup>	15.4 (0.1) <sup>c</sup>	14.8 (0.1) <sup>d</sup>
b*	1.1 (0.0) <sup>d</sup>	2.6 (0.1) <sup>b</sup>	2.4 (0.0) <sup>c</sup>	2.6 (0.0) <sup>b</sup>	2.9 (0.0) <sup>a</sup>	2.9 (0.0) <sup>a</sup>

Resultados expresados como la media (DE) de 3 determinaciones.

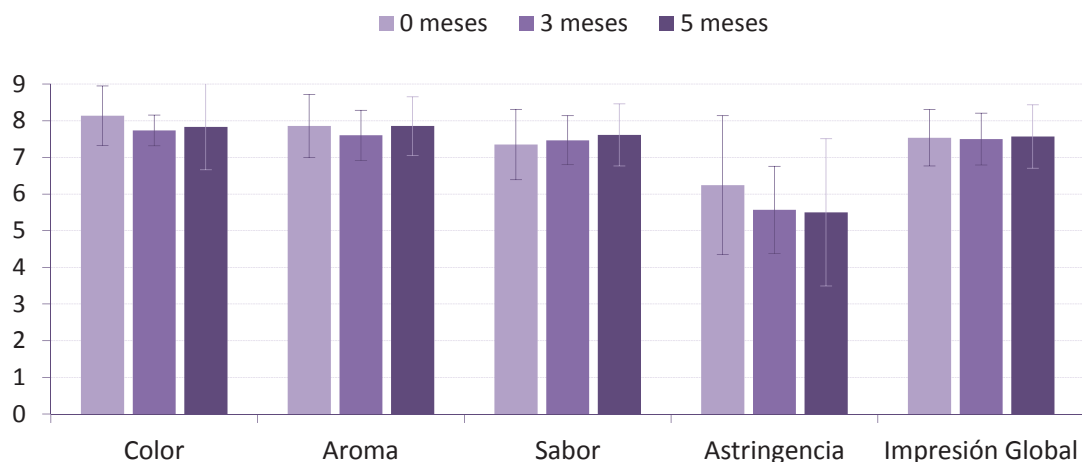
<sup>a-d</sup> Diferentes letras indican diferencias significativas para una  $p < 0.05$ . Test de U Mann-Whitney por parejas.

El valor L\* (luminosidad) aumentó significativamente a lo largo de los meses de almacenamiento, llegando a un 9% de incremento al final del estudio. Este aumento indica un incremento de la luminosidad del producto a lo largo del tiempo. La coordenada a\* (tono rojo) no se vio afectada significativamente durante los 4 primeros meses de almacenamiento, aunque sí en el último mes, observando una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de un 7%. Para la coordenada b\* (tono amarillo), éste aumentó significativamente desde el primer mes, y se mantuvo constante hasta el 5 mes. En general, estos cambios en la medida objetiva del color no

afectaron la calidad del producto, coincidiendo con los resultados del análisis sensorial durante el periodo de almacenamiento.

### 2.3. ACEPTABILIDAD

El análisis sensorial hace posible estudiar las propiedades organolépticas de los productos usando a las consumidores o panelistas como instrumentos de medida (Lawless & Heymann, 2010). Las puntuaciones obtenidas por el panel de degustadores interno de la empresa no mostraron cambios significativos a lo largo del tiempo para los diferentes atributos medidos: color, aroma, sabor, astringencia y aceptabilidad general. Para el análisis sensorial se utilizó un test afectivo, y en concreto el test de aceptación, cuantificando los panelistas los atributos sensoriales mediante una escala hedónica de 9 puntos, donde la puntuación 1 corresponde con “no me gusta nada” y la 9 con “me gusta mucho”. Las puntuaciones medias recibidas en la evaluación sensorial del producto RP se muestran en la Figura 5A.14 para las degustaciones realizadas a tiempo cero, a los tres y a los cinco meses de almacenamiento. La mayoría de los atributos alcanzaron valores medios por encima de 7 a excepción de la astringencia del producto que recibió puntuaciones entre 5 y 6. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para las puntuaciones recibidas de cada característica sensorial en los tres meses de evaluación, lo que nos indica que el producto se mantiene estable a lo largo del almacenamiento y que no se producen cambios importantes en su composición que puedan ser detectados al evaluar la calidad organoléptica del mismo. No obstante, hay que tener en cuenta que el estudio de vida útil se realizó en un tiempo corto y si se quisiera alargar la vida comercial del mismo, sería necesario ampliar el tiempo de estudio en un nuevo ensayo de vida útil.



**Figura 5A.14.** Puntuaciones medias de los atributos sensoriales del producto RP almacenado durante 5 meses a 4°C.

**#5B**

**RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN**

**EVALUACIÓN DE LA  
EFICACIA A NIVEL  
SITÉMICO**



the 1990s. The 1990s have been a decade of change for the world's major powers. The United States has emerged as the sole superpower, and the Soviet Union has disintegrated into 15 independent states. The United Kingdom has lost its status as a superpower, and the European Union has emerged as a major power. The 1990s have also seen the rise of China as a major power, and the emergence of India as a rising power.

The 1990s have also seen the emergence of a new global order. The end of the Cold War has led to a new era of globalisation, and the world has become more interconnected than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global security architecture, and the world has become more peaceful than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global economic order, and the world has become more prosperous than ever before.

The 1990s have also seen the emergence of a new global cultural order, and the world has become more diverse than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global environmental order, and the world has become more concerned about the environment than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global human rights order, and the world has become more concerned about human rights than ever before.

The 1990s have also seen the emergence of a new global health order, and the world has become more concerned about health than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global education order, and the world has become more concerned about education than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global science order, and the world has become more concerned about science than ever before.

The 1990s have also seen the emergence of a new global technology order, and the world has become more concerned about technology than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global space order, and the world has become more concerned about space than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global information order, and the world has become more concerned about information than ever before.

The 1990s have also seen the emergence of a new global energy order, and the world has become more concerned about energy than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global climate order, and the world has become more concerned about climate than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global water order, and the world has become more concerned about water than ever before.

The 1990s have also seen the emergence of a new global food order, and the world has become more concerned about food than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global agriculture order, and the world has become more concerned about agriculture than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global industry order, and the world has become more concerned about industry than ever before.

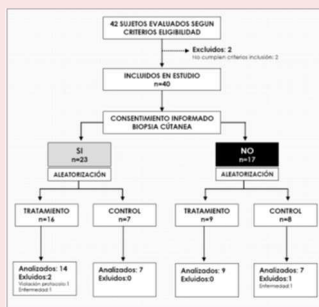
The 1990s have also seen the emergence of a new global services order, and the world has become more concerned about services than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global infrastructure order, and the world has become more concerned about infrastructure than ever before. The 1990s have also seen the emergence of a new global transportation order, and the world has become more concerned about transportation than ever before.

# 5 B

## Evaluación de la eficacia del producto I Nivel sistémico RESULTADOS Y DISCUSIÓN



### 1. FLUJO DE PARTICIPANTES *p181*



### 2. CARACTERÍSTICAS BASALES *p183*

- 2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS
- 2.2 BIOQUÍMICA GENERAL
- 2.3 FUNCIÓN RENAL Y HEPÁTICA
- 2.4 METABOLISMO DEL HIERRO
- 2.5 PARÁMETROS LIPÍDICOS
- 2.6 PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO
- 2.7 INGESTA DIETÉTICA
- 2.8 PARÁMETROS DE PIEL

### 3. CAMBIOS DE LAS VARIABLES A LO LARGO DEL PERIODO DE ESTUDIO *p194* DIFERENCIAS INTRAGRUPO-INTERGRUPO

- 3.1 PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y PRESIÓN ARTERIAL
- 3.2 BIOQUÍMICA GENERAL
- 3.3 FUNCIÓN RENAL Y HEPÁTICA
- 3.4 METABOLISMO DEL HIERRO
- 3.5 PARÁMETROS LIPÍDICOS
- 3.6 INGESTA DIETÉTICA

### 4. EFECTO SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO *p202*

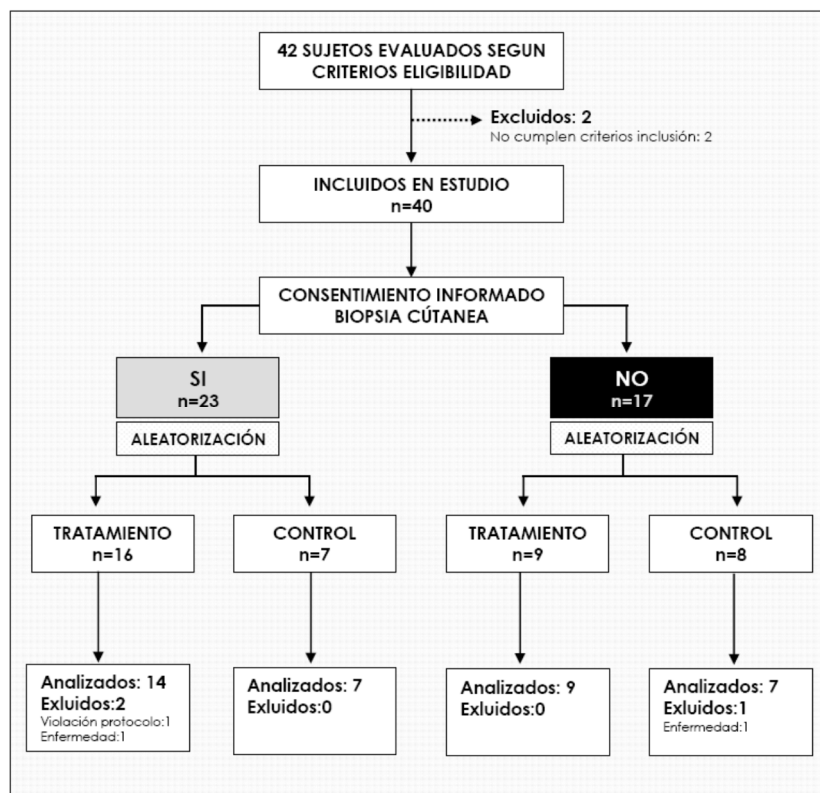
- 4.1. F2-ISOPROSTANOS
- 4.2. MALONDIALDEHIDO
- 4.3. LDL OXIDADA
- 4.4. ESTATUS DE GLUTATION SANGUINEO
- 4.5. PROTEINA C REACTIVA

## 1. FLUJO DE PARTICIPANTES

El periodo de reclutamiento duró aproximadamente 3 meses (Junio 2008 a Septiembre 2008). Se evaluaron a 42 sujetos que aceptaron participar de forma voluntaria en el estudio y firmaron el consentimiento informado. De éstos, se excluyó a 2 sujetos (4,76 %) por no cumplir con los criterios de inclusión. De los 40 sujetos incluidos en el estudio, 23 (57,5%) firmaron el consentimiento informado para biopsia cutánea y 17 rehusaron participar en este grupo. La asignación de pacientes a los grupos control y experimental se realizó de forma aleatoria de la siguiente forma:

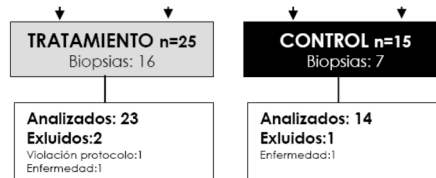
- 17 sujetos sin biopsia de piel se asignaron aleatoriamente de forma equilibrada a los grupos control (8 sujetos) y experimental (9 sujetos).
- 23 sujetos con biopsia se asignaron aleatoriamente de forma no equilibrada a los grupos control (7 sujetos) y experimental (16 sujetos).

En la Figura 5B.1 se muestra el flujo de participantes en el estudio y el proceso de aleatorización.



**Figura 5B.1** Flujo de participantes

Tras la asignación aleatoria, los grupos quedaron finalmente compuestos por 25 (tratamiento) y 15 (control) sujetos (Figura 5B.2).



**Figura 5B.2. Composición final de los grupos.**

De los 40 participantes del estudio, 3 sujetos (2 del grupo experimental y 1 del grupo control) fueron excluidos del análisis de resultados por trasgresión del protocolo o procesos intercurrentes que modificaron los criterios de inclusión; Un sujeto del grupo placebo sin biopsia presentó un proceso infeccioso con un valor de PCR de 15 mg/L (Rango de referencia <10 mg/L); otro sujeto del grupo tratamiento con biopsia violó el protocolo (abandono del hábito tabáquico y aumento de peso (7,2 Kg) y grasa corporal (6.53 Kg); un tercer sujeto fue diagnosticado de disfunción hepática tras la aleatorización, presentando valores de bilirrubina y transaminasa GOT por encima del rango de referencia (0,1-1,2 mg/dl y 5-37 U/L, respectivamente).

De los 37 voluntarios (23 grupo tratamiento y 14 del grupo control) de los cuales se presentan los datos, se perdieron datos de GSSG (n=5), GSH (n=11), presión arterial (n=11) e ingesta dietética (n=8) debido a problemas preanalíticos y falta de cumplimentación o entrega de los cuadernillos de ingesta dietética. Habida cuenta del tamaño de la muestra y con el objeto de no provocar sesgo, no se utilizó ningún método de imputación de datos perdidos.

El grado de cumplimiento durante la intervención se evaluó mediante entrevista personal con los voluntarios y recuento de botellas entregadas al final del estudio. El porcentaje de cumplimiento en los grupos placebo y tratamiento fue de 92,9 y 88,7% respectivamente.

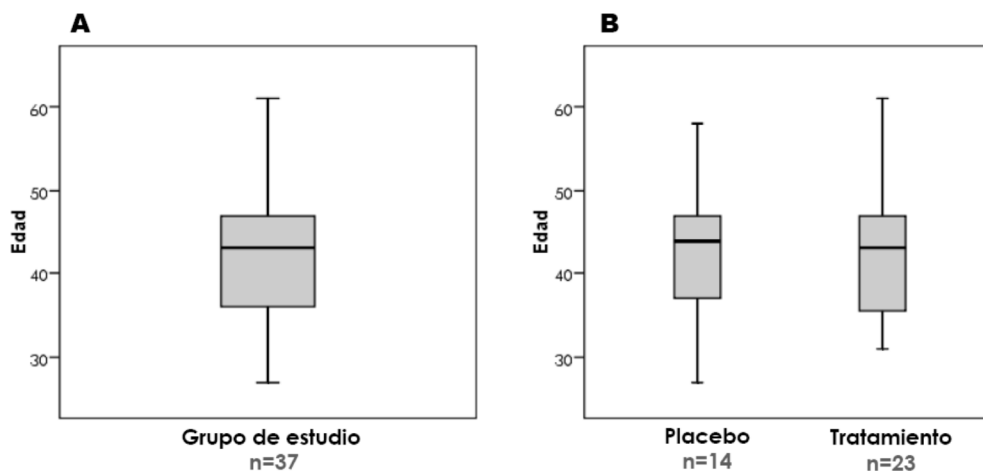
## 2. CARACTERÍSTICAS BASALES

En las Tablas 5B.1-8 se resumen las características basales de los sujetos incluidos en el estudio. El objetivo del análisis es asegurar que los dos grupos son comparables en cuanto a las características individuales, parámetros hematológicos y bioquímicos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre el grupo control y el grupo tratamiento excepto para colesterol total, colesterol LDL y transaminasa GOT (Tablas 5B.3 y 5B.5) donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Así, los niveles de colesterol total y colesterol LDL fueron superiores en el grupo control en comparación con el tratamiento. Las diferencias encontradas para GOT fueron también superiores en el grupo control (20.7 U/L (DE; 3.7) vs. Tratamiento 17.5 U/L (DE; 4.1)) aunque en ambos grupos permanecieron dentro de los límites de referencia (5-37 U/L), considerando estas diferencias biológicamente no relevantes.

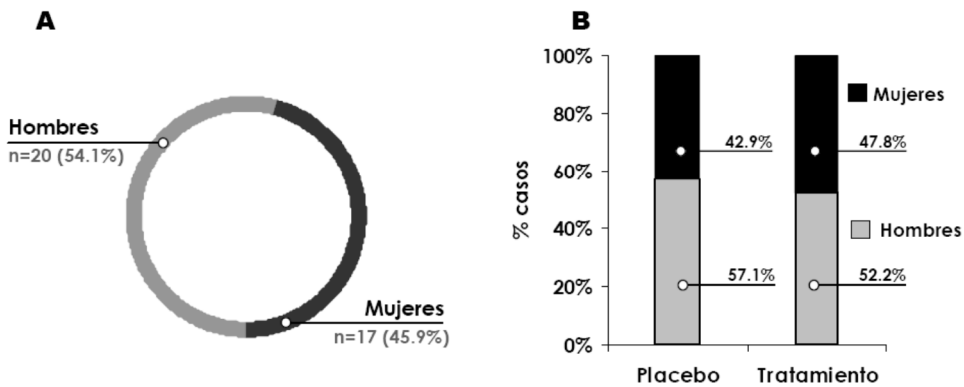
### 2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y ANTROPOMÉTRICAS BASALES

La edad media de los 37 voluntarios incluidos en el análisis fue de 42.5 años (DE, 7.8, rango 27-61 años) (Figura 5B.3). Tras la aleatorización, ambos grupos quedaron homogéneos siendo la edad media en ambos de 42 años ( $p = 0.856$ ).



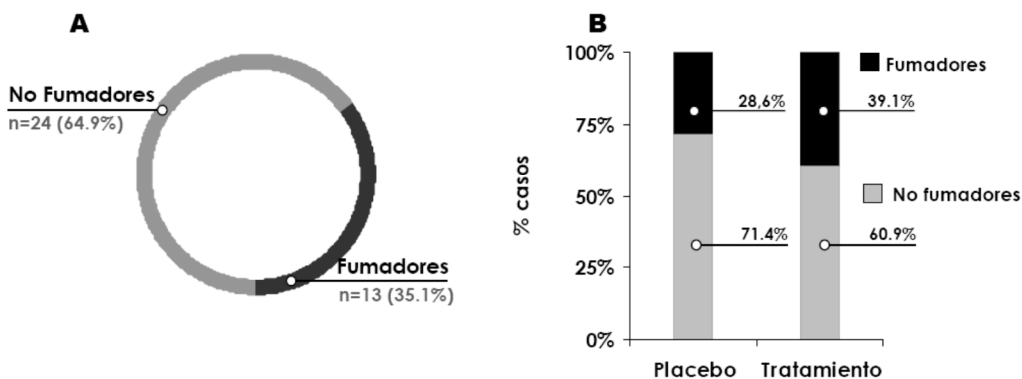
**Figura 5B.3** Edad de la población de estudio (A) y de los grupos tras aleatorización (B)

De los 37 sujetos, 20 (54,1%) eran hombres y 17 mujeres (45,9%). Como se aprecia en la Figura 5B.4, en ambos grupos la distribución por género es similar, no observándose diferencias significativas (Chi-cuadrado 0,087,  $p = 0,519$ ).



**Figura 5B.4** Distribución por género en la población de estudio (A) y en los grupos de intervención tras la aleatorización (B)

Respecto al hábito tabáquico, el 35,1% del total de participantes eran fumadores (Figura 5B.5A), porcentaje muy similar a la media encontrada actualmente en los países de la Unión Europea con un 29% y en concreto España con un 35% (Comisión Europea Eurobarometro 332, 2010). La distribución de la tasa de fumadores según sexo fue del 35% en ambos casos. En el grupo control la tasa de fumadores fue de 28.6% mientras en el grupo tratamiento fue de 39.1% (Figura 5B.5B), diferencias que no alcanzaron significación estadística ( $\chi^2 = 0,426$ ,  $p = 0,724$ ).



**Figura 5B.5** Tasa de tabaquismo en la población de estudio (A) y los grupos de intervención tras la aleatorización (B)

El promedio de la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD) fue de 123.7 (13.9) y 82.8 (77.7) mm Hg, respectivamente en el grupo control, valores dentro de las recomendaciones recientemente publicadas en el 2014 en el último informe del Joint National Committee (JNC) para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial JNC 8 (James et al, 2014). Al comparar la PAS y la PAD entre ambos grupos no hubo diferencias significativas (Tabla 5B.1).

**Tabla 5B.1.** Características demográficas y antropométricas basales de los sujetos asignados al grupo control y al grupo tratamiento.

Variable	VR	Control n=14	Tratamiento n=23	Valor p*
Edad años	-	42.8( 7,6)	42.3(8,1)	0,851
Genero Hombres/Mujeres n	-	8/6	12/11	0,519 <sup>Q</sup>
Fumadores %	-	28.6 %	39.1 %	0,724 <sup>Q</sup>
Presión arterial sistólica mm Hg	óptimo < 120 <sup>a</sup> Normal 120-140	123.7 (13,9)	119.7 (10,2)	0.363
Presión arterial diastólica mm Hg	< 80 <sup>a</sup>	82,8 (12,6)	77,7 (8,4)	0,198
<b>Datos antropométricos</b>				
IMC Kg/m <sup>2</sup>	18.5-24.9 <sup>b</sup>	24.4 (3,7)	24,0 ± 3.1	0.699
Peso Kg	-	70.5(14.6)	71,6 (15.7)	0.824
Grasa corporal %	-	24.2 (6.1)	23,7 (5.9)	0.798
Circunferencia cintura/cadera <sup>c</sup>	≤ 0.80 Mujeres ≤ 0.95 Hombres	0.91 (0.7)	0,92 (0.7)	0.699
Resultados expresados como valores medios (DE)				
* p<0.05, indica diferencias significativas				
<sup>a</sup> Valores óptimos de acuerdo al JNC 7				
<sup>b</sup> Rango Normal de acuerdo a la OMS				
<sup>c</sup> WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of WHO consultation on obesity, June5-7 1997.Geneva: World Health Organization 1998.				
<sup>Q</sup> Test de Chi-cuadrado.				
IMC: Índice de masa corporal; VR: Valores de Referencia				

Como se muestra en la tabla 5B.1, los grupos son comparables en cuanto al IMC, no observándose diferencias significativas. La prevalencia de sobrepeso encontrada en los sujetos del grupo control y tratamiento fue del 30,8% y del 22,7% respectivamente, valores inferiores a la media en España (36,7 %) (MSSSI., 2012).

Respecto al ICC (Índice Cintura Cadera), el porcentaje de sujetos con valores por encima de las recomendaciones de la OMS (1997) fue del 73% y 82 % en los grupos control y tratamiento respectivamente.

## 2.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS GENERALES

En la Tabla 5B.2 se resumen los parámetros bioquímicos y hematológicos de los sujetos a la entrada en el estudio. En general, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los parámetros mostrados y todos los valores se encontraron dentro de los rangos de normalidad.

**Tabla 5B.2** Características bioquímicas basales de los sujetos asignados al grupo control y al grupo tratamiento.

Variable	VR <sup>a</sup>	Grupo control n=14	Grupo Tratamiento n=23	Valor p*
<b>Hemograma</b>				
<i>Serie Roja</i>				
Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> /mmc)	4.5-6	4.6 (0.5)	4.5 (0.4)	0.531
Hemoglobina (g/100)	13.5-17.5	13,75 (1,7)	13,77 (1,4)	0.978
Hematocrito (%)	41-53	41,9(4.6)	41,4(3.4)	0.700
Volumen corpuscular medio (fl)	80-101	91,4 (5.8)	92,2 (4.7)	0.644
<i>Serie Blanca</i>				
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> /mmc)	4-11	5.9 (1.5)	6.3 (1.9)	0.492
Linfocitos (%)	19-48	37.1 (6.3)	35.7 (6.6)	0.531
Monocitos (%)	1-10	6.0 (1.5)	5.7 (1.4)	0.608
Eosinófilos (%)	0.5-5	4.2 (2.0)	3.5 (1.7)	0.278
Basófilos (%)	0-2	0.71 (0.20)	0.68 (0.19)	0.644
Neutrófilos (%)	40-75	51.2 (6.2)	54.3 (6.9)	0.299
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mmc)	125-400	248,5 (55,9)	230,6 (47.3)	0.304
Volumen plaquetas medio (mcm <sup>3</sup> )	6.5-12	8.65 (0.68)	8.26 (0.82)	0.144
<b>Coagulación</b>				
PTTA (sec)	22-38	30.30 (2.37)	29.43 (2.21)	0.268
Tiempo Protombina (sec)	10.5-15.8	13.50 (0.74)	13.29 (0.73)	0.395
Actividad protombina (sec)	> 70 %	91.97 (8.19)	93.43 (6.66)	0.558
<b>Equilibrio hídrico</b>				
Na (mEq/L)	136-145	140.4 (2.1)	141.3 (1.8)	0.207
K (mEq/L)	3.5-5.1	4.26 (0.10)	4.21 (0.18)	0.390
Cl (mEq/L)	98-107	103,64 (1,78)	104,91 (1.44)	0.230
<b>Glucosa</b> (mg/dl)	74-106	96.6 (6.9)	96.1 (6.5)	0.846
<b>Creatin Quinasa</b> (U/L)	38-174	99.2 (62.6)	76.7 (50.4)	0.238
Resultados expresados como valores medios (DE)				
* p<0.05, indica diferencias significativas				
<sup>a</sup> Valores normales de referencia del laboratorio de análisis (Hospital Virgen de la Arrixaca y Laboratorio de Análisis Clínicos Munuera)				



### 2.3 PARÁMETROS DE FUNCIÓN RENAL Y HEPÁTICA

La función renal y hepática basal (Tabla 5B.3) estuvo dentro de los parámetros normales en ambos grupos. No se encontraron diferencias significativas entre grupos al inicio del estudio excepto para GOT que presentó valores medios superiores en el grupo control (media de las diferencias; 3,23 U/L; IC 95%: 0,51-5.95). Dado que los dos grupos presentaron valores dentro del rango de referencia (5-37 U/L), éstas se consideran biológicamente no relevantes.

**Tabla 5B.3.** Parámetros de función renal y hepática de los sujetos asignados al grupo control y al grupo tratamiento.

Variable	VR <sup>a</sup>	Grupo Control n=14	Grupo Tratamiento n=23	Valor p*
Bilirrubina (mg/dl)	0.1-1.2	0.521 (0.172)	0.591 (0.252)	0.367
Albumina (g/dl)	3.4 - 5.4	4.79 (0.17)	4.71 (0.23)	0.275
Ácido urico (mg/dl)	3.4 - 7	5.06 (1.27)	4.86 (1.27)	0.648
Urea (mg/dl)	10-50	33.93 (6.78)	29.78 (7.59)	0.103
Creatinina (mg/dl)	0.7-1.2	0.898 (0.189)	0.899 (0.185)	0.993
GOT (ASAT) (U/L)	5 - 37	20.7 (3.7)	17.5 (4.1)	0.021*
GPT (ALAT) (U/L)	5 - 41	12.7 (5.5)	12.6 (5.9)	0.940
Lactato Deshidrogenasa (LDH)	130-225	135.9 (23.2)	130.5 (18.3)	0.433

Resultados expresados como valores medios (DE)  
\* p<0.05, indica diferencias significativas  
<sup>a</sup> Valores normales de referencia del laboratorio de análisis (Hospital Virgen de la Arrixaca y Laboratorio de Análisis Clínicos Munuera)

### 2.4 PARÁMETROS DEL METABOLISMO DEL HIERRO

No se observaron valores fuera de los rangos de referencia en las cifras basales de hierro, transferrina y ferritina en suero ni diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 5B.4).

**Tabla 5B.4.** Parámetros de metabolismo del hierro de los sujetos asignados al grupo placebo y al grupo tratamiento.

Variable	VR <sup>a</sup>	Grupo Control n=14	Grupo Tratamiento n=23	Valor p*
Hierro (mcg/dl)	59-158	87.21 (43.01)	90.13 (26.33)	0.799
Ferritina (ng/ml)	30-400	121.4 (98.3)	93.3 (85.7)	0.366
Transferrina (mg/dl)	200-360	262.8 (45.9)	259.7 (35.7)	0.816

Resultados expresados como valores medios (DE)  
\* p<0.05, indica diferencias significativas  
<sup>a</sup> Valores normales de referencia del laboratorio de análisis (Hospital Virgen de la Arrixaca y Laboratorio de Análisis Clínicos Munuera)

Estos parámetros están relacionados con el intercambio del hierro y su almacenamiento en el organismo. El hierro sérico es un indicador que mide la cantidad de hierro unido a la transferrina (proteína encargada del transporte del hierro). No obstante, de manera individual este parámetro no es considerado un buen indicador del estado de hierro en el organismo debido a su amplia variabilidad entre horas e incluso entre días (WHO CDC, 2004). La ferritina, por el contrario, sí es un buen indicador del estado del hierro en el organismo ya que se relaciona directamente a las reservas de hierro en el organismo (Cook, 2005).

En general, los valores mostrados por los dos grupos están dentro del rango de referencia, indicando en ambos casos un estatus nutricional de hierro adecuado.

## 2.5 PARÁMETROS LIPÍDICOS

Como se observa en la tabla 5B.5, tanto la concentración de colesterol total como la de LDL fueron significativamente superiores en el grupo control, estando en el nivel superior de los límites máximos recomendados actualmente (Expert Panel on Detection, E. 2001). La diferencias entre grupos para colesterol total y colesterol LDL fueron de 27.92 mg/dl (IC 95%: 10.13 y 45.72) y 27.79 mg/dl (IC 95%: 10.04 y 45.54) respectivamente.

**Tabla 5B.5** Parámetros lipídicos basales de los sujetos asignados al grupo placebo y al grupo tratamiento.

Variable	VR	Grupo control n=14	Grupo tratamiento n=23	p*
<b>Colesterol Total (CT)</b>	< 239 <sup>a</sup>	217.14 (24.08)	189.22 (26.85)	0.003*
<b>HDL (mg/dl)</b>	40-60	52.0 (13.0)	52.7 (13.1)	0.868
<b>LDL (mg/dl)<sup>b</sup></b>	< 159 <sup>a</sup>	149.9 (26.9)	115.1 (25.1)	0.003*
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	< 150 <sup>a</sup>	111.1 (44.1)	106.5 (51.5)	0.783

Resultados expresados como valores medios (DE)

<sup>a</sup> Valores límite de acuerdo Clasificación de la ATP III para el Colesterol LDL, Total y Triglicéridos.

\* p<0.05, indica diferencias significativas.

<sup>b</sup> Calculado a partir de la fórmula de Friedewald: LDL=CT-HDL-TG/5

VR: Valor de referencia

Debido a que el colesterol LDL es calculado y las concentraciones de triglicéridos y HDL son similares en ambos grupos, podemos establecer que las diferencias de colesterol total (CT) son debidas a las diferencias de colesterol LDL.

## 2.6 EVALUACION DE LA INGESTA DIETETICA

En la Tabla 5B.6 se muestran los datos iniciales de ingesta de macronutrientes y micronutrientes, así como el nivel de actividad física en ambos grupos de estudio. No se hallaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre ambos grupos.

**Tabla 5B.6** Ingesta diaria basal de los sujetos asignados al grupo control y al grupo tratamiento.

Variable	Valor Referencia	Grupo control n=10	Grupo tratamiento n=19	Valor p*
Energía (Kcal)	1869-2384	1725 (410)	1905 (481)	0.322
Proteína (% Kcal)	10-20	17.5 (3.4)	16.3 (3.8)	0.410
Carbohidratos (% Kcal)	45-65	45.9 (7.9)	41.63 (8.7)	0.209
Grasa (% Energía)	20-35	36.1 (7.6)	40.8 (7.6)	0.128
Saturada (% Kcal)	-	10.0 (3.5)	10.7 (2.7)	0.549
Monoinsaturada (% Kcal)	-	13.9 (4.7)	17.0 (5.1)	0.128
Poliinsaturada (% Kcal)	-	6.2 (3.1)	6.6 (3.7)	0.927
Fibra (g)	>25	23.4 (12.1)	17.6 (7.9)	0.129
Vitamina C (mg)	95-110	114.9 (53.6)	122.1 (73.7)	0.790
Vitamina E (mg)	11-13	8.4 (3.8)	13.5 (14.3)	0.228
Folato (µg)	330	296.3 (101.17)	224.8 (111.4)	0.102
Calcio (mg)	950-1000	834.3 (309.8)	794.7 (369.3)	0.775
Sodio (mg)	1500	2037.7 (765.1)	2082.2 (995.5)	0.903
Colesterol (mg)	VRND**	245.6 (61.5)	313.8 (118.8)	0.103
Ingesta de Frutas	Min 2	1.46 (0.85)	1.69 (1.26)	0.603
Ingesta de Vegetales	Min 3	1.92 (1.16)	1.74 (0.87)	0.638

Resultados expresados como valores medios (DE)  
 \*\* Valores de Referencia No Dietéticos  
 \* Prueba de Mann-Wittney (datos no paramétricos). Para una  $p < 0.05$  indica diferencias significativas

En general, el patrón de ingesta de macronutrientes y micronutrientes fue muy similar en ambos grupos. El porcentaje de la ingesta de energía que proviene de proteínas y carbohidratos se encontró dentro de los valores de referencia en ambos grupos. (EFSA, 2010a, 2010b, 2012, 2013) mientras que el porcentaje de energía de la grasa en ambos grupos estuvo ligeramente por encima de las recomendaciones (25-30%). En cuanto a la fibra, se observó una ingesta media menor a la recomendada en ambos grupos así como el consumo de folatos y calcio. El aporte diario de vitamina C tanto en el grupo control como en el tratamiento fue del 152.6% y 143.6% con respecto a la ingesta diaria de referencia para un adulto (80 mg) respectivamente. Además, ninguno de los dos grupos alcanzó la cantidad mínima recomendada de frutas y verduras, lo que explica en parte el bajo aporte de fibra y folatos en la dieta.

## 2.7 PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTADO REDOX

En ninguno de los parámetros de estrés oxidativo e inflamación se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de intervención al inicio del estudio (Tabla 5B.7).

Debido al complejo papel de los radicales, los sistemas de defensa antioxidante del organismo y los diferentes tipos de marcadores y metodologías aplicadas a cada uno éstos, a día de hoy no se dispone de valores ampliamente aceptados de marcadores de estrés oxidativo que indiquen niveles óptimos para el correcto funcionamiento del organismo. Sin embargo, sí existen valores elevados de determinados marcadores asociados a diferentes enfermedades o condiciones patológicas. En nuestro estudio, los niveles medios de marcadores de estrés oxidativo observados en ambos grupos estuvieron por debajo de los descritos en diferentes condiciones patológicas, aunque la comparación de resultados en este tipo de marcadores es difícil debido las diferentes técnicas y metodologías actualmente utilizadas.

Cabe mencionar que los análisis realizados con KITS ELISA para determinar el daño al ADN mediante la 8-Ox dhG y daño a proteínas mediante la determinación de grupos carbonilo estuvieron por debajo del límite de detección en la mayor parte de los sujetos. Así, en solo 6 sujetos se pudo detectar 8-Ox dhG, presentando todos ellos niveles normales referenciados para individuos sanos. Respecto a los grupos carbonilo en proteínas, solo 8 sujetos presentaron niveles por encima del límite de detección y todos mostraron cifras de normalidad de acuerdo a los valores de referencia del fabricante. En base a estos resultados y debido al alto coste de los KITS se decidió no continuar analizando estos marcadores.

**Tabla 5B.7** Parámetros de estrés oxidativo de los sujetos asignados al grupo placebo y al grupo tratamiento.

Variable	VR	Grupo control n=14	Grupo tratamiento n=23	Valor p*
LDL oxidada (UL/L)	26–117	97.72 (23.76)	84.24 (22.59)	0.093
MDA (μmol/L)		1.59 (0.37)	1.61 (0.41)	0.868
F2-isoprostanos (ng/ml)		0.961 (0.199)	1.107 (0.363)	0.177
GSSG Glutation oxidado(nm/ml)		9.14 (5.60)	7.81 (5.93)	0.545
GSH Glutation reducido (nm/ml)		4048 (2072)	4534 (2185)	0.478 <sup>a</sup>
(GSSG/GSH) x100		0.225(0.172)	0.195 (0.192)	0.710
Proteína C Reactiva (mg/L)	< 3	1.26 (0,71)	1.57 (2.07)	0.444 <sup>a</sup>
8-Ox dhG		nd	nd	-
Proteínas Carbonilo		nd	nd	-
Resultados expresados como valores medios (DE)				
VR: Valores de referencia				
* p<0.05 indica diferencias significativas				
<sup>a</sup> T de student tras transformación logarítmica				

Asimismo, se determinó la concentración de MDA por HPLC-UV porque es un buen indicador de peroxidación lipídica en plasma (Breusing et al., 2010). La concentración de MDA basal en nuestro estudio es comparable a los rangos publicados por otros autores (1.3-2.2 μmol/L) en sujetos sanos y que han utilizado la misma metodología analítica (de la Asunción et al., 2004; Rust et al., 2001; Leonard et al., 1995; Volkovova et al., 2005). Los valores basales encontrados fueron similares en ambos grupos y menores a los descritos en otras patologías como en cáncer de pecho y de pulmón, donde Gönenç et al. (2001) encontraron valores 6.33 y 5.87 μmol/L respectivamente.

Los Isoprostanos son considerados como uno de los mejores indicadores del estrés oxidativo ya que son muy estables, aumentan con el daño oxidativo y altamente específicos, especialmente si se usa cromatografía de gases/masas (Morrow et al., 2002). Los valores basales observados en nuestro estudio se corresponden con los descritos en otros estudios en los cuales se evaluaron los niveles de isoprostanos en sujetos sanos (Wiswedel et al., 2004; Wiswedel et al., 2008 Handelman et al., 2001). Además, nuestros valores fueron muy inferiores a los reportados por Wiswedel et al. (2008) en pacientes con enfermedad renal crónica, en los cuales se observaron niveles cuatro veces superiores al grupo control de sujetos sanos.

Por otro lado, la relación entre glutatión oxidado y glutatión reducido (GSSG/GSH) en sangre es un buen indicador del estrés oxidativo tanto en condiciones fisiológicas como patológicas como del estado redox celular (Viña, 1990). Los valores de GSH y GSSG obtenidos en nuestro estudio difieren de los publicados por otros autores. La variabilidad puede ser debida a las diferentes metodologías utilizadas, las diferencias en el procesado de las muestras o la selección de sujetos que están bajo la influencia de factores que afectan la concentración de GSH, como indica Pastore et al. (2003) en una revisión de la literatura sobre la metodologías utilizadas para medir esta variable.

La relevancia clínica de la LDL oxidada es importante en el proceso de aterosclerosis (Koenig, 2005). En ambos grupos los valores basales, se encontraron dentro de los rangos de referencia de los fabricantes de los KIT ELISA así como los observados por Kresanov et al. (2013) en un reciente estudio observacional prospectivo con 1395 sujetos en el cual los valores de LDL oxidada en hombres y mujeres fueron de 88.4 (25.3) y 77.8 (21.7) respectivamente.

La Proteína C reactiva es un marcador de infección y/o inflamación de gran utilidad en la práctica clínica y también se considera un marcador independiente de pronóstico y de riesgo (Pearson et al, 2003). En este contexto, dentro de los niveles de referencia (PCR < 10 mg/dl), se han definido puntos de corte para estratificar el riesgo cardiovascular estableciendo las siguientes categorías; riesgo bajo (PCR < 1 mg/dl), riesgo medio (1.0-3.0 mg/dl) y riesgo alto (>3.0 mg/dl). Utilizando estas categorías, los sujetos situados en el tercil alto tendrían 2 veces más de riesgo relativo que aquellos con valores de PCR en el tercil bajo (Pearson et a, 2003). Como se muestra en la tabla 6, todos los sujetos de ambos grupos presentaron valores basales dentro del rango de referencia (<10 mg/dl) y mostraron niveles medios indicativos de riesgo medio (1.0- 3.0 mg/l), no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos.

## 2.8 PARÁMETROS DE PIEL

Como se muestra en la tabla 5B.8, no se observaron diferencias significativas entre grupos para ninguno de los parámetros cutáneos.

**Tabla 5B.8.** Características basales relacionadas con el tipo, calidad y estado de la piel de los sujetos asignados al grupo placebo y al grupo tratamiento.

Variable	Unidades	Grupo control n=14	Grupo tratamiento n=23	Valor p*
Tipo de piel (Fitzpatrick)	-	3.07 (0.47)	3.09 (0.79)	0.948
Color de piel	ua	163.3 (53.2)	175.91 (42.7)	0.442
Melanina basal	ua	109.4 (4.5)	116.74 (34.1)	0.504
Hidratación	ua	40.8 (12.0)	40.0 (6.2)	0.794
TEWL brazo	g/h/m <sup>2</sup>	7.86 (3.24)	7.74 (2.77)	0.907
Elasticidad Bruta Ua/Uf (R2)	ua	0.84 (0.03)	0.84 (0.05)	0.894
Bio Elasticidad Ur/Uf (R7)	ua	0.51 (0.03)	0.52 (0.06)	0.691
Viscoelasticidad (Uv/Ue) R6	ua	0.48 (0.08)	0.48 (0.08)	0.984
Firmeza (Uf) R0	ua	0.27 (0.05)	0.30 (0.04)	0.178
Fatiga (R9)	ua	0.057 (0.009)	0.057 (0.007)	0.897
Resultados expresados como valores medios (DE)				
* p<0.05 indica diferencias significativas				
ua: unidades arbitrarias				

Los niveles de hidratación de la capa cornea de la epidermis en ambos grupos mostraron un estado de piel seco (piel seca= 30-45 au). Sin embargo, los valores medios de pérdida de agua transepidermal fueron muy buenos, quedando dentro de valores “muy saludables “de acuerdo a la escala del fabricante del aparato de medida (Tabla 5B.8).

### 3. CAMBIOS DE LAS VARIABLES A LO LARGO DEL PERIODO DE ESTUDIO.

#### DIFERENCIAS INTRAGRUPRO-INTERGRUPRO

En las tablas que se describen en los siguientes epígrafes se presentan de manera detallada el porcentaje de cambio de las variables en cada uno de los grupos a lo largo del periodo de intervención (análisis intragrupo). Además, se muestra el nivel de significación de las diferencias observadas entre el grupo control y grupo tratamiento (análisis intergrupo).

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y PRESIÓN ARTERIAL

No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de las variables evaluadas excepto en la circunferencia cintura cadera ( $p < 0.001$ ). Así, en el grupo control se incrementó en un 2.8 % ( $p < 0.011$ ) mientras que en el grupo que ingirió el producto rico en polifenoles disminuyó en 1.5 % ( $p < 0.015$ ). No hubo diferencias significativas en el IMC, peso y % de grasa corporal. Aunque existen diversos estudios con polifenoles (especialmente con Té verde) que han mostrado tener efectos positivos sobre la pérdida de peso y grasa corporal (Nagao et al., 2007; Hursel et al., 2009), nuestros resultados son similares a los descritos en un meta-análisis de 5 estudios (Baladia et al., 2014) donde no se hallaron diferencias significativas en el peso e IMC en adultos con sobrepeso u obesidad.

**Tabla 5B.9** Cambios en la presión arterial y en las variables antropométricas de ambos grupos durante la fase de intervención. Análisis intragrupo e intergrupo.

Variables antropométricas	Control n=14		Tratamiento n=23		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	Valor p <sup>b</sup>	% Cambio <sup>a</sup>	Valor p <sup>b</sup>	
Presión arterial sistólica mm Hg	1.67 (7.14)	0.523	-1,99 (8.84)	0.291	0.256
Presión arterial diastólica mm Hg	3.71 (7.44)	0.117	-0.67 (13.5)	0.574	0.241
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,06 (2.32)	0.910	-0,34 (2.18)	0.406	0.543
Peso (Kg)	-0.11(2.17)	0.824	-0,34 (2.18)	0.346	0.626
% Grasa corporal	2.24 (8.10)	0,327	2.39 (6.13)	0.094	0.993
Circunferencia cintura/cadera	2.81 (3.56)	0.011*	-1,53 (2.73)	0.015*	<0.001*

<sup>a</sup> respecto a los datos basales; media (desviación estándar).  
<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado).  
<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.  
\* p<0.05 indica diferencias significativas.



### 3.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS GENERALES.

En general, al finalizar las 10 semanas de intervención, no se hallaron diferencias significativas intragrupo en los parámetros bioquímicos generales excepto en el grupo de tratamiento donde se observó una ligera reducción en los valores de leucocitos, cloro y glucosa (Tabla 5B.10). No obstante, independientemente de la significación estadística, todos los valores se mantuvieron dentro de los rangos de referencia y, por tanto, los cambios observados no se consideran relevantes desde el punto de vista clínico, pudiendo ser reflejo simplemente de la variación biológica intraindividual (Fraser, 2001).

**Tabla 5B.10** Cambios en las características bioquímicas durante la fase de intervención en ambos grupos.

Variables bioquímicas	Grupo control n=14		Grupo tratamiento n=23		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	
<b>Hemograma</b>					
<i>Serie Roja</i>					
Eritrocitos	0.66 (3.87)	0.520	1,99 (5,60)	0.124	0.491
Hemoglobina	2.55 (4.85)	0.079	2,11 (6,23)	0.133	0.783
Hematocrito	-1,75 (4.72)	0.173	0.26 (3.93)	0.720	0.158
<i>Serie Blanca</i>					
Leucocitos	-5,55 (11.7)	0.053	-5,08 (13,66)	0.022*	0.989
Linfocitos (%)	-,058(14.95)	0.787	1,27 (19.43)	0.917	0.914
Monocitos (%)	0.92 (25.94)	0.897	-3,71 (28.47)	0.184	0.468
Eosinófilos (%)	-6,84(28.61)	0.365	-0.11 (24.78)	0.567	0.576
Basófilos (%)	-10,95 (39.79)	0.182	0.84 (42.80)	0.515	0.338
Neutrófilos (%)	2,66 (12.84)	0.589	2.25 (15.11)	0.646	0.930
Plaquetas (103/mmc)	-0.59(10.12)	0.566	0.03 (12.30)	0.658	0.870
Volumen plaquetas medio (mcm3)	-0.54(3.27)	0.485	2.39 (10.46)	0.290	0.278
<b>Coagulación</b>					
PTTA	1.88 (10.97)	0.566	-0.41 (11.69)	0.695	0.490
Tiempo Protombina	0.18(5.31)	0.971	1,72 (6.61)	0.263	0.477
Actividad protombina	0.61 (9.75)	0.905	-1.28 (8.49)	0.376	0.526
<b>Equilibrio hídrico</b>					
Na	-0.34(1.27)	0,314	-0.39 (1.39)	0.183	0.920
K	-0.45(5.6)	0,743	2.49 (7.97)	0.159	0.237
Cl	-0.25(1.93)	0,598	-0.65 (1.22)	0.017*	0.450
<b>Glucosa</b>	2.37 (10.89)	0.446	-2,89 (6.56)	0.038*	0.007*
<b>Creatin Quinasa</b>	11,33 (43.0)	0.947	23.50 (42.90)	0.153	0.498

<sup>a</sup> respecto a los datos basales; media (desviación estándar)

<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado)

<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.

\* p<0.05 indica diferencias significativas

No obstante, respecto a la glucosa, cabe resaltar el sentido opuesto de los cambios observados según el tipo de intervención, observándose una reducción del -2.9 % en el grupo tratamiento y un aumento de 2.4 % en el grupo control. En este sentido, varios estudios epidemiológicos han mostrado que la ingesta de polifenoles está inversamente relacionada con el riesgo de diabetes tipo 2 (Song et al., 2005; Iso et al., 2006) y, tanto estudios en animales como en humanos, han señalado los beneficios de diferentes clases de polifenoles (diversas antocianidinas, catequinas, quercetina, ácidos clorogénico etc.) sobre el metabolismo de los carbohidratos, la regulación de la glucemia y la posible reducción de la resistencia a la insulina (Dragan et al., 2014).

En este sentido, nuestros resultados son consistentes con trabajos previos (Suliburska et al. 2012) donde se observó en pacientes obesos una reducción media del 3% en los niveles basales de glucosa tras la administración de un extracto de té verde durante 3 meses. No obstante, las principales diferencias con nuestro estudio fue la mayor cantidad de EGCG suministrada (208 mg vs 111 mg en nuestro producto RP) y la ausencia de otras clases de polifenoles con posibles efectos sobre el metabolismo de la glucosa como el ácido clorogénico (Ong et al., 2012), la quercetina (Bardy et al., 2013) y antocianinas de la aronia (Valcheva-Kuzmanova & Belcheva, 2006) incluidas en el producto desarrollado.

### **3.3 PARÁMETROS DE FUNCIÓN RENAL Y HEPÁTICA**

No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en ninguno de los parámetros de función renal-hepática tras el periodo de intervención (Tabla 5B.11). Sin embargo, dentro de los parámetros de función renal-hepática estudiados, hubo diferencias estadísticamente significativa intragrupo en los valores de albúmina y creatinina para el grupo control, y de transaminasas (GOT y GPT) en el grupo tratamiento (Tabla 5B.11) aunque, de nuevo, esta significación estadística no se considera de relevancia biológica al estar todos los valores dentro los rangos de referencia.

**Tabla 5B.11.** Cambios en los parámetros de función renal y hepática durante la fase de intervención en ambos grupos.

Variables	Grupo control n=14		Grupo tratamiento n=23		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	
Bilirrubina	-8,04 (31.89)	0.119	-3.76 (24.24)	0.247	0.559
Albumina	-2,34 (2.88)	0.009*	-0.95 (4.64)	0.275	0.358
Ácido urico	3.73 (22.63)	0.634	-2.6 (12.5)	0.199	0.285
Urea	-2,11 (18.58)	0.451	8.5 (22.80)	0.209	0.170
Creatinina	-5,81 (9.06)	0.025*	-3.1 (10.3)	0.100	0.410
GOT (ASAT)	1.55 (23.49)	1.0	11.1 (21.4)	0.032*	0.230
GPT(ALAT)	46.09 (61.17)	0.056	49.84 (46.35)	<0.001*	0.537
Lactato Deshidrogenasa (LDH)	-1,04 (9.48)	0.663	1.0 (9.7)	0.852	0.633

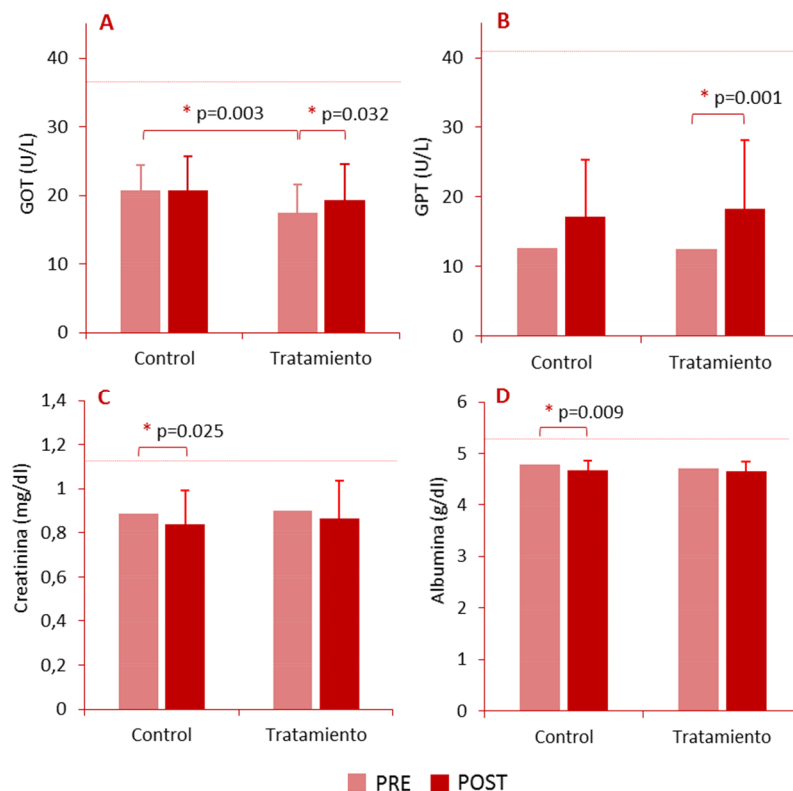
<sup>a</sup> respecto a los datos basales; media (desviación estándar)

<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado)

<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.

\* p<0.05 indica diferencias significativas

Por otro lado, la ausencia de cambios significativos en estos marcadores y su permanencia en rangos de referencia confirman la ausencia de efectos adversos asociados a la intervención y, por tanto, avalan la seguridad del producto. Para clarificar los cambios observados intragrupo de forma gráfica, en la figura 5B.6 muestra los valores de los parámetros con cambio significativo y los valores de referencia.

**Figura 5B.6** Valores de variables de función renal-hepática antes y después del tratamiento en ambos grupos.

Valores expresados como media (DE), n=37.

\*diferencia significativa p< 0.05

(t Student para datos pareados)

\* diferencia significativa p< 0.05

(t Student para muestras

independientes)

PRE: antes de la intervención;

POST: tras 10 semanas de

intervención.

— Límite superior de los valores

normales de referencia.

### 3.4 PARÁMETROS DEL METABOLISMO DEL HIERRO

La variación entre los valores basales y los obtenidos al final del estudio para cada grupo no fueron significativos y, del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de intervención (Tabla 5B.12).

**Tabla 5B.12** Cambios en los parámetros del metabolismo del hierro durante la fase de intervención en ambos grupos.

Variables	Grupo control n=14		Grupo tratamiento n=23		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	
Hierro (mcg/dl)	-0.27 (34.13)	0.390	4.9 (31.8)	0.495	0.231
Ferritina (ng/ml)	-3.37 (25.79)	0.545	-17.56 (29.4)	0.555	0.417
Transferrina (mg/dl)	-0.34 (3.92)	0.591	3.2 (8.6)	0.104	0.095

<sup>a</sup> respecto a los datos basales; media (desviación estándar)  
<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado)  
<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.  
\* p<0.05 indican diferencias significativas

De forma global, los cambios relativos observados tras la intervención no fueron significativos en ninguno de los grupos. Más aún, la magnitud del cambio es pequeña (<5%, excepto para ferritina) y por tanto podría ser explicada tanto por la variabilidad biológica como por la incertidumbre analítica asociada a la medida. En el caso de la ferritina, hubo una disminución con respecto a sus valores basales pero sin diferencias significativas. En este sentido, diversos estudios epidemiológicos (Mennen et al., 2007; Hogenkamp et al., 2008; Schlesier y col; 2009) describen la ausencia de efecto asociado al consumo de té verde sobre los parámetros del estatus del hierro aunque la ferritina se vio afectada de manera negativa por la ingesta prolongada de té verde, especialmente en mujeres con valores de ferritina basal <25 ng/ml. Por tanto, en nuestro caso, no se puede descartar que la mayor bajada de ferritina en el grupo de tratamiento pueda relacionarse, al menos en parte, con el tratamiento en mujeres con estatus nutricional de hierro inadecuado en algunas participantes.

### 3.5 PARÁMETROS LIPÍDICOS

Dentro de los parámetros lipídicos estudiados, no hubo diferencias significativas intergrupo en ninguno de los valores analizados (Tabla 5B.13 y Figura 5B.7) aunque se observaron diferencias estadísticamente significativa intragrupo en los valores de colesterol total ( $p < 0.043$ ) y colesterol LDL ( $p < 0.031$ ) en el grupo tratamiento. Hay que destacar que en el grupo tratamiento los valores de colesterol total y LDL al inicio del estudio fueron más bajos y estadísticamente significativos (CT: 189.22 (26.85), LDL: 115.1 (25.1)) en comparación con el grupo control (CT: 217.14 (24.08), LDL: 149.9 (26.9)). El hecho de que aún con valores de colesterol total y LDL bajos se observe una reducción significativa de éstos hace particularmente interesante esta observación.

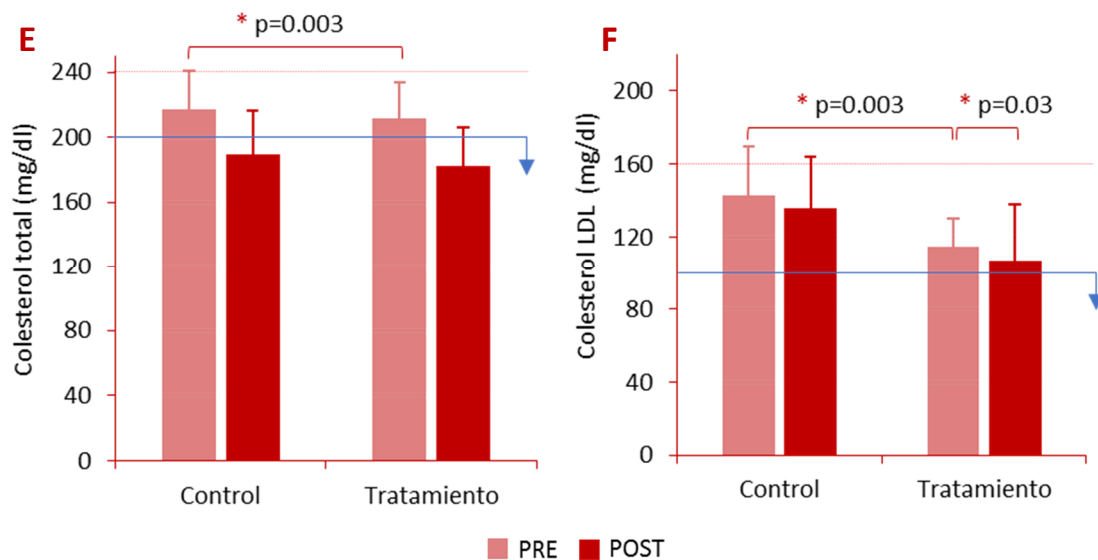
**Tabla 5B.13** Cambios en los parámetros lipídicos durante la fase de intervención en ambos grupos.

Variables	Grupo control n=14		Grupo tratamiento n=23		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	
<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>	-2,63 (7,28)	0.203	-3.84 (8,82)	0.043*	0.795
<b>HDL (mg/dl)</b>	7,76 (13.05)	0.074	4.91 (13.18)	0.132	0.721
<b>LDL (mg/dl)</b>	-4,49 (9.07)	0.082	-7.59 (16.08)	0.031*	0.786
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	-8,17 (35.02)	0.291	1.49 (37.72)	0.512	0.774

<sup>a</sup> respecto a los datos basales; media (desviación estándar)  
<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado)  
<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.  
\*  $p < 0.05$ , indican diferencias significativas

En este sentido, Onakpoya et al. (2014) realizaron una revisión sistemática con objeto de evaluar la evidencia en humanos de los polifenoles del té sobre parámetros lipídicos. Evaluando 19 ensayos clínicos y casi 1500 sujetos, encontraron reducciones significativas del colesterol total (-5.03 mg/dl) y LDL (-7.34 mg/dl) asociadas al consumo de té verde. Este efecto es superior al observado por nosotros aunque se puede explicar por la utilización de dosis de compuestos activos muy superiores a las utilizadas en el presente estudio (Catequinas Totales: 336-1500 mg/día; EGCG: 336-1500 mg/día versus Catequinas totales: 209 mg; EGCG 111 mg). No obstante, no observaron cambios significativos en los niveles de TG y HDL lo que es consistente con la ausencia de variaciones observadas en éstos marcadores en nuestro estudio.

La disminución de LDL colesterol observada en nuestro estudio (7.6 %) es inferior a la encontrada por Suliburska et al. (2012), quienes en un ensayo clínico con 46 sujetos obesos observaron una reducción media del 13% tras la administración en el desayuno de una cápsula de extracto de té verde con 208 mg de EGCG durante 3 meses. En nuestro estudio, no obstante, la dosis utilizada fue inferior (111 mg EGCG) y nuestros resultados podrían en parte explicarse por la disminución de la absorción de colesterol de la dieta en presencia de los polifenoles (Frejngel & Wroblewska 2010). Esto es debido a que los polifenoles pueden modular la absorción de lípidos mediante la formación de complejos con lípidos y enzimas, y reduciendo de esta manera su solubilidad y absorción (Shishikura et al., 2006; Koo & Noh., 2007), pero en nuestro estudio el producto RP fue ingerido en ayunas por lo que otros mecanismos pueden haber estado implicados.



**Figura 5B.7** Valores de colesterol total y LDL antes y después del tratamiento en ambos grupos.

Valores expresados como media (DE), n=37.

\*diferencia significativa  $p < 0.05$  (t Student)

**PRE:** antes de la intervención; **POST:** tras 10 semanas de intervención.

— Límite superior de los valores normales de referencia.

— Valores óptimos recomendados para colesterol total y colesterol LDL.

### 3.6 EVALUACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA

No se observaron diferencias significativas en el patrón de ingesta de ninguno de los nutrientes evaluados (tabla 5B.14), a excepción de los carbohidratos en el grupo de intervención observándose un aumento significativo (+13.8%,  $p < 0.05$ ) frente a los valores basales y al grupo control.

**Tabla 5B.14** Ingesta dietética basal y nivel de actividad física de los sujetos asignados al grupo placebo y al grupo tratamiento.

Variable	Control n=10		Tratamiento n=19		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	
Energía (Kcal)	2,1(16,7)	0.976	-7.9 (24.5)	0.188	0.359
Proteína (g)	9.0 (19,6)	0.296	11.5(30.1)	0.191	0.843
Carbohidratos (g)	-4.3 (18,6)	0.402	13.8 (22.8)	0.028*	0.044*
Grasa (G)	12.0 (42,2)	0.545	-6.4 (19.2)	0.102	0.144
Saturada	44.7 (94,4)	0.377	17.7 (70.9)	0.339	0.700
Monoinsaturada	27.4 (79,5)	0.507	-1.7 (20.3)	0.462	0.288
Poliinsaturada	49.6 (123,2)	0.783	1.6 (47.84)	0.633	0.602
Fibra	8.8 (22,4)	0.155	28.8 (65.7)	0.411	0.768
Vitamina C	8.5 (49,7)	0.775	11.7 (67.6)	0.292	0.387
Vitamina E	35.6 (143,3)	0.721 <sup>d</sup>	-12.2 (50.9)	0.212 <sup>d</sup>	0.484 <sup>e</sup>
Folato	-0.75 (25,09)	0.680	38.1 (82.6)	0.284	0.601
Calcio	-6.2 (21,2)	0.230	12.9 (65.6)	0.484	0.713
Sodio	24.9 (98,7)	0.343	35.8 (117.2)	0.679	0.616
Colesterol	-7.7 (36,1)	0.314	10.8 (93.3)	0.837	0.648
Ingesta de Frutas/día	-13.1 (72,9)	0.595	-0.3 (75.2)	0.180	0.864
Ingesta de Vegetales/ día	42.1 (89,3)	0.408	43.7 (97.9)	0.065	0.741

<sup>a</sup> respecto a los datos basales (media; desviación estándar)  
<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado)  
<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.  
<sup>d</sup> Wilcoxon  
<sup>e</sup>Mann-Whitney  
\*  $p < 0.05$ , indican diferencias significativas

Aunque sin diferencias significativas, merece la pena destacar el aumento en la ingesta de grasa (+12%) en el grupo control y la disminución del consumo de frutas en ambos grupos, aunque más acusada en el grupo control (-13.1% versus -0.3%). Por otro lado, se observó un aumento de aproximadamente el 50% en el consumo de verduras en los dos grupos aunque estos cambios en la ingesta de frutas y verduras no fueron significativos ( $p > 0.05$ ) frente a sus valores basales y entre los dos grupos de estudio.

#### 4. EFECTO SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

En la tabla 5B.15 se expone el porcentaje de cambio de los marcadores de estrés oxidativo a lo largo del estudio. Al finalizar el tratamiento, los niveles de F2 isoprostanos y MDA fueron significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) en el grupo que ingirió el producto rico en polifenoles comparado con el control, aunque no hubo diferencias significativas en el resto de marcadores de estado redox (Glutation reducido, glutatión oxidado, ratio GSSG/GSH, LDL oxidada y Proteína C reactiva).

**Tabla 5B.15.** Cambios en los parámetros de estrés oxidativo en ambos grupos tras el periodo de intervención.

Variable	Control n=14		Tratamiento n=23		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	
LDL oxidada (UL/l)	8.0 (25.0)	0.380	5.1 (28.8)	0.483	0.908
MDA (μmol/L )	20.0 (39.2)	0,132	-2,4 (20.1)	0.265	0.033*
F2 isoprostanos (ng/ml)	-5.5 (12.9)	0.164	-18.7 (19.6)	0.001*	0.010*
GSSG (nm/ml)	8.5 (3.0)	0.772	-7.3 (53)	0.655	0.602
GSH (nm/ml)	-13.8 (28.0)	0.594 <sup>d</sup>	-18.1 (32.1)	0.510 <sup>d</sup>	0.818
GSSG/GSH x100	32.8 (27.2)	0.453	-7.9 (52.9)	0.761	0.367
Proteína C Reactiva (mg/L)	26.7 (164.7)	0.570 <sup>e</sup>	52.6 (151,4)	0.207 <sup>e</sup>	0.149 <sup>v</sup>

<sup>a</sup> respecto a los datos basales (media; desviación estándar)  
<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado)  
<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.  
<sup>d</sup> Test de Wilcoxon  
<sup>e</sup> t de student tras una transformación logaritmica  
\*  $p < 0.05$ , indican diferencias significativas

Con objeto de verificar que los cambios significativos observados tanto en isoprostanos como en MDA no se relacionaban con diferencias basales de colesterol LDL entre grupos, se realizaron análisis de regresión múltiple utilizando como variables dependientes las diferencias en F2 isoprostanos y MDA y como independientes el tratamiento y los valores de LDL basal. Los resultados estadísticos mostraron que en ninguno de los casos la variable LDL basal tenía un efecto significativo sobre las diferencias en Isoprostanos y MDA ( $\beta = -0.76$ ,  $p = 0.677$ ;  $\beta = 0.282$ ,  $p = 0.117$ , respectivamente)



#### 4.1. EFECTO SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE F2-ISOPROSTANOS

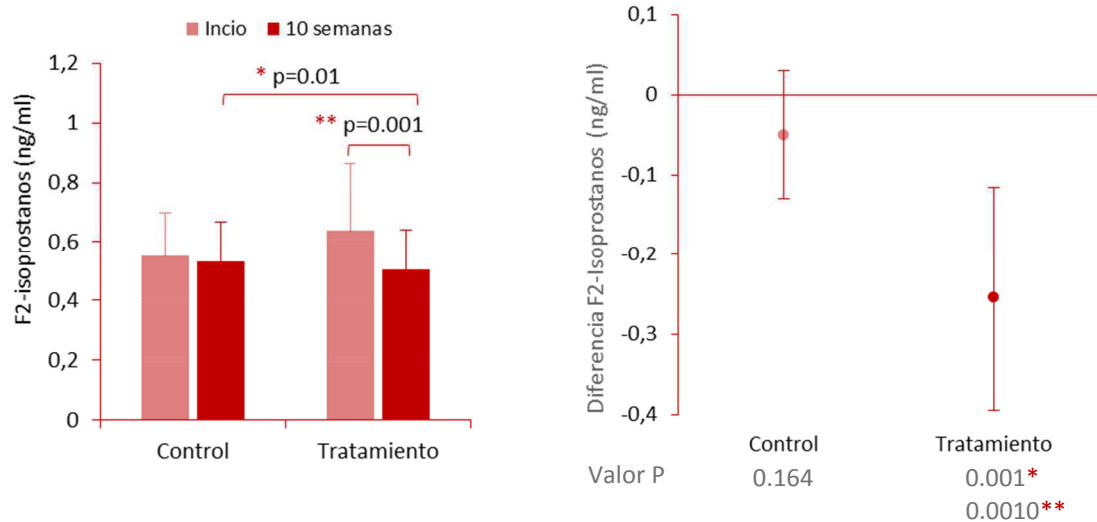
Los F2-isoprostanos son compuestos similares a las prostaglandinas que se producen mediante un mecanismo no enzimático de peroxidación del ácido araquidónico inducido por radicales libres (Roberts & Morrow, 1997). La determinación de F2-isoprostanos está considerado como el marcador *gold standard* para medir la peroxidación lipídica (Stephens et al., 2009; EFSA, 2011c; Frijhoff et al., 2015). Los niveles plasmáticos de F2-Isoprostanos al inicio y al final del estudio se muestran en la Tabla 5B.16.

**Tabla 5B.16.** Evolución de F2 isoprostanos a lo largo del estudio.

F2-isoprostanos	Unidades	Control n=14	Tratamiento n=23
PRE_Valores basales	ng/ml <sup>a</sup>	0.96 (0,20)	1,11 (0,36)
POST_Valores Finales	ng/ml <sup>a</sup>	0.91 (0.22)	0.85 (0.17)
Diferencia Pre-Post	ng/ml <sup>b</sup>	-0.05 (0.02,-0,13)	-0.26 (-0.12, -0.39)
Valor p <sup>c</sup>		0.164	0.001*
Diferencia Placebo-Tratamiento	ng/ml <sup>b</sup>		-0.20 (-0.05, -0.36)
Valor p <sup>d</sup>			0.010*
<sup>a</sup> Resultados expresados como media; desviación estándar <sup>b</sup> Resultados expresados como media; Intervalo de confianza 95% <sup>c</sup> test t student intragrupo (pareado) <sup>d</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal. * p<0.05 indican diferencias significativas			

En el grupo que ingirió el producto RP, los valores disminuyeron significativamente en 0.26 ng/ml (p=0.001) mientras que el grupo control se observó un ligero descenso de 0.05 ng/ml (p=0.164) (Figura 5B.8). El descenso medio en los niveles de isoprostanos en suero fue de 0.20 ng/ml (17,7 %) mayor entre de los voluntarios del grupo tratamiento vs. Control (p=0.010; 95% IC, -0,05 y -0,36).

Nuestros resultados confirman la hipótesis de que el producto RP reduce de forma significativa el marcador más fiable de peroxidación lipídica.



**Figura 5B.8** | Niveles plasmáticos de F2-isoprostanos antes y después de las intervenciones.

**A.** Medias y desviaciones estándar. **B.** Las barras de error representan el IC al 95% de las diferencias de medias intragrupo. \*  $p < 0.05$  indica diferencias significativas intragrupo \*\*  $p < 0.05$  indica diferencias significativas intergrupo.

En la literatura hay pocos estudios en los que se haya evaluado el efecto de los polifenoles sobre los niveles de F2-isoprostanos con la metodología más fiable (GC-MS o LC-MS/MS) en población sana.

En plasma, un estudio previo en el que se utilizó la misma metodología analítica, Wiswedel et al. (2004) observaron una reducción en los niveles de F2-isoprostanos tras la suplementación de una bebida de cacao rico en flavanoles (187 mg de flavanoles/100 ml). Hallazgos similares han sido descritos tras la administración de un suplemento de Pycnogenol (Ryan et al., 2008) e higos chumbos (Tesoriere et al., 2004). Sin embargo otros estudios realizados en plasma no se observan efectos significativos. Entre estos estudios, encontramos los realizados con arándanos (McAnulty et al., 2005), cebolla y té negro (O'Reilly et al., 2001), chocolate (Murphy et al., 2003; Mursu et al., 2004) y un suplemento de extracto de semilla de uva (Ward et al., 2005).

En orina, los resultados son similares a los encontrados en plasma. En un reciente estudio doble ciego con sujetos sanos a los que se les suministró un extracto de maqui berry (*Aristotelia chilensis*) rico en antocianidinas (162 mg), Davinelli et al. (2015) mostraron una disminución de los niveles de F2-isoprostanos en orina. Otros estudios con diferentes alimentos ricos en polifenoles no han mostrado efectos significativos (cerezas amargas: Traustadottir et al., 2009; té verde: Hodgson et al., 2002; té verde descafeinado: Donovan et al., 2005; extracto de semilla de uva: Ward et al., 2005).

Las diferencias entre los resultados publicados en la literatura puede ser debida a la heterogeneidad de las poblaciones, alimentos y dosis estudiadas, y en algunos casos a los tamaños muestrales insuficientes (Petrosino & Serafini., 2014). Otro aspecto importante a tener en cuenta es el nivel de salud de los individuos, ya que es difícil encontrar efectos positivos en individuos con bajos niveles de estrés oxidativo. Aun así, el producto desarrollado con un perfil específico de polifenoles reduce de forma significativa el marcador más fiable de peroxidación lipídica.

#### 4.2. EFECTO SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE MALONDIALDEHIDO

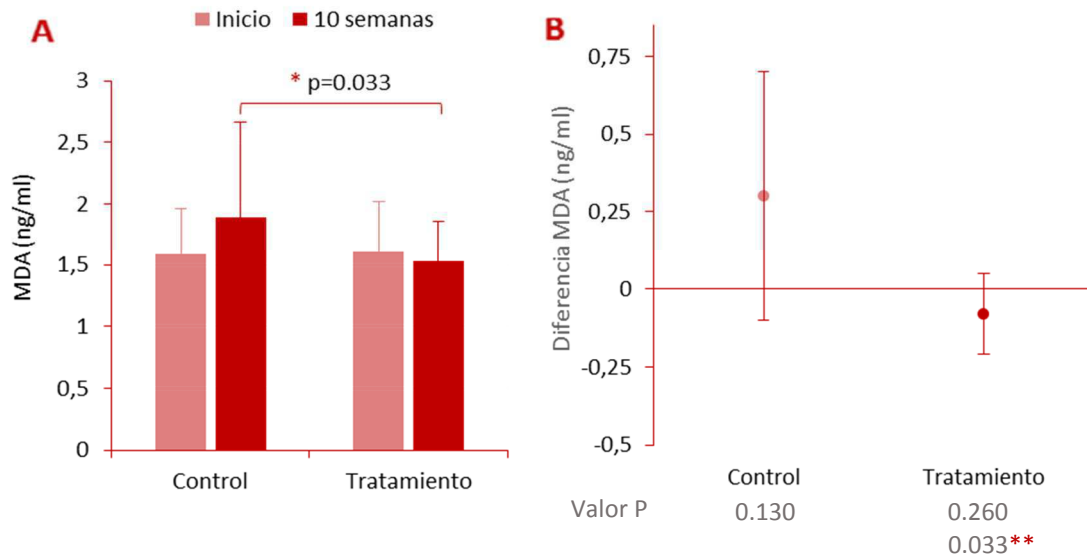
El MDA es uno de los productos formados por la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados y es altamente tóxico y reactivo (Del Rio et al., 2005; Niki, 2014). Como marcador, la EFSA no lo considera un marcador fiable aunque, si es determinado mediante HPLC junto a F2-isoprostanos y/o LDL oxidada, lo considera adecuado para corroborar la evidencia (EFSA, 2011c). En nuestro estudio, tras la suplementación con el producto RP, observamos una ligera reducción no significativa de 0.08  $\mu\text{mol/L}$  en los niveles medios de MDA en plasma, mientras que en el grupo control aumentaron en 0.30  $\mu\text{mol/L}$  al final del estudio (Tabla 5B.17).

**Tabla 5B.17.** Evolución del MDA a lo largo del estudio.

MDA		Placebo n=14	Tratamiento n=23
PRE_Valores basales	$\mu\text{mol/L}^a$	1.59 (0.37)	1.61 (0.41)
POST_Valores Finales	$\mu\text{mol/L}^a$	1.89 (0.78)	1.53 (0.33)
Diferencia Pre-Post	$\mu\text{mol/L}^b$	0.30 (0.71, -0.10)	-0.08 (0.07,-0.23)
Valor $p^c$		0.13	0.26
Diferencia Placebo-Tratamiento	$\mu\text{mol/L}^b$	-0.38 (-0.033,- 0.73)	
Valor $p^d$		0.033*	
<sup>a</sup> Resultados expresados como media; desviación estándar			
<sup>b</sup> Resultados expresados como media; Intervalo de confianza 95%			
<sup>c</sup> test t student intragrupo (pareado)			
<sup>d</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.			
* $p < 0.05$ indica diferencias significativas			

Aunque no se observaron diferencias significativas intragrupo, el aumento medio en los niveles de MDA del grupo control (20.0 %) y el ligero descenso en el grupo tratamiento (-2.4 %) mostraron diferencias significativas intergrupo ( $p=0.033$ ). Esto pone de manifiesto que el

producto rico en polifenoles produjo una reducción significativa (-17.6 %) sobre la peroxidación lipídica en comparación con el control (Figura 5B.9).



**Figura 5B.9 | Niveles plasmáticos de MDA antes y después de las intervenciones.**

**A.** Medias y desviaciones estándar. **B.** Las barras de error representan el IC al 95% de las diferencias de medias intragrupo. \*  $p < 0.05$  indican diferencias significativas. \*\*Diferencias significativas intergrupo.

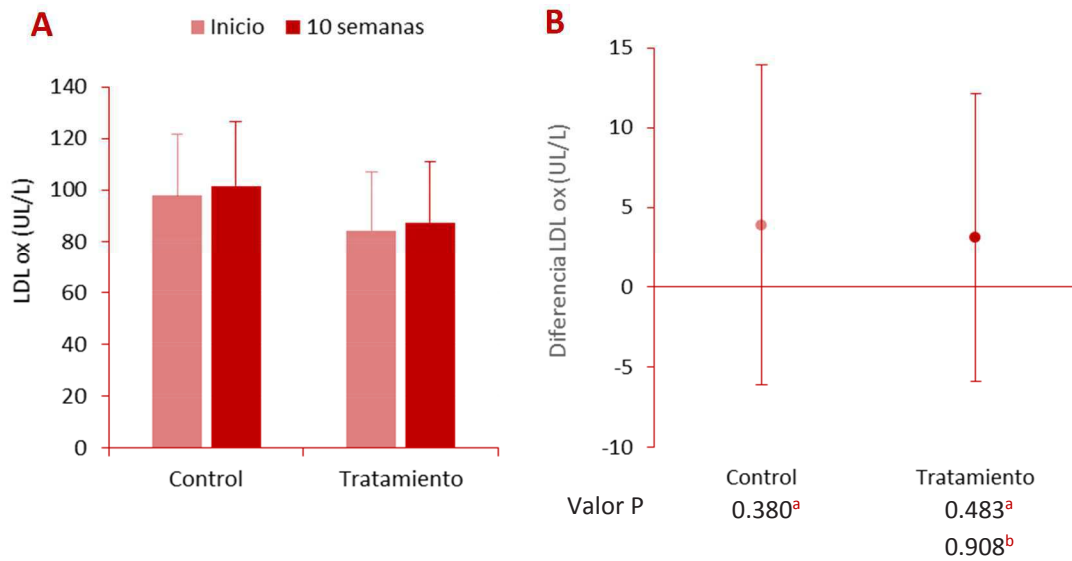
En este sentido, nuestros resultados son similares a los descritos por Nantz et al. (2009) quienes en un ensayo con 111 sujetos sanos a los que se le administraron capsulas de té verde (Catequinas: 320 mg/día de las cuales EGCG: 180 mg/día) durante 3 semanas observaron una diferencia en los valores de MDA de 11.9%. Esta diferencia también fue debida al aumento de MDA en el grupo placebo (+6.7%) y una reducción en los niveles de MDA en el grupo que ingirió los capsulas de té verde (-5.2%). En una línea similar Fraga et al. (2005), también en sujetos sanos que ingirieron de una dosis de polifenoles del cacao (168 mg de flavanoles) similar a la nuestra, observaron una reducción de MDA del 12% mientras que en el grupo placebo aumentó un 10%.

Otros estudios realizados con mayores dosis de polifenoles confirman el posible efecto de la suplementación con polifenoles sobre la reducción de la peroxidación lipídica medida mediante los niveles de MDA (Freese et al., 1999; Coimbra et al., 2006; Alvarez-Suarez et al., 2014; Basu et al., 2009), lo que es consistente con nuestros hallazgos.

### 4.3. EFECTO SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE LDL OXIDADA

Cada vez existe más evidencia que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeña un papel fundamental en desarrollo de la aterosclerosis (Steinberg, 1997; Witzum, 2001). En este contexto, se ha descrito que niveles elevados de LDL oxidada muestran una correlación positiva con la severidad de los eventos coronarios agudos (Ehara et al., 2001) y se ha considerado como un marcador bioquímico de la enfermedad coronaria (Toshima et al., 2000).

En el presente estudio, no se observaron efectos significativos en ninguno de los dos grupos ni entre grupos en cuanto a la oxidación de la LDL. Así, tanto el grupo control como el experimental sufrieron un ligero aumento en los niveles séricos medios de LDL oxidada del 4% y 3.7%, respectivamente, si bien no alcanzaron significación estadística. Aunque estos resultados son consistentes con la ausencia de reducción de niveles en LDL oxidada descrita en algunos estudios (Eichemberg et al., 2008), otros autores han señalado una disminución de las concentraciones de LDL oxidada tras suplementación con cacao (Osakabe et al, 2001; Baba et al, 2007; Khan et a. 2012) y té verde (Inami et al, 2007). No obstante, los efectos observados no son uniformes incluso utilizando igual suplemento (té verde). Así, mientras que la administración de catequinas (té verde) redujo los niveles de LDL oxidada sin provocar cambios de las concentraciones de LDL colesterol (Inami et al, 2007), otros estudios no observaron cambios significativos con intervenciones más cortas (Eichemberg et al, 2008). De esta forma, es posible que tanto la composición y dosis de los suplementos como la duración de la intervención, así como la metodología utilizada, el tamaño muestral y la heterogeneidad de la respuesta de los individuos determinen el efecto observado y contribuyan a explicar la inconsistencia de resultados entre estudios.



**Figura 5B.10** | Niveles plasmáticos de LDL oxidada antes y después de las intervenciones.

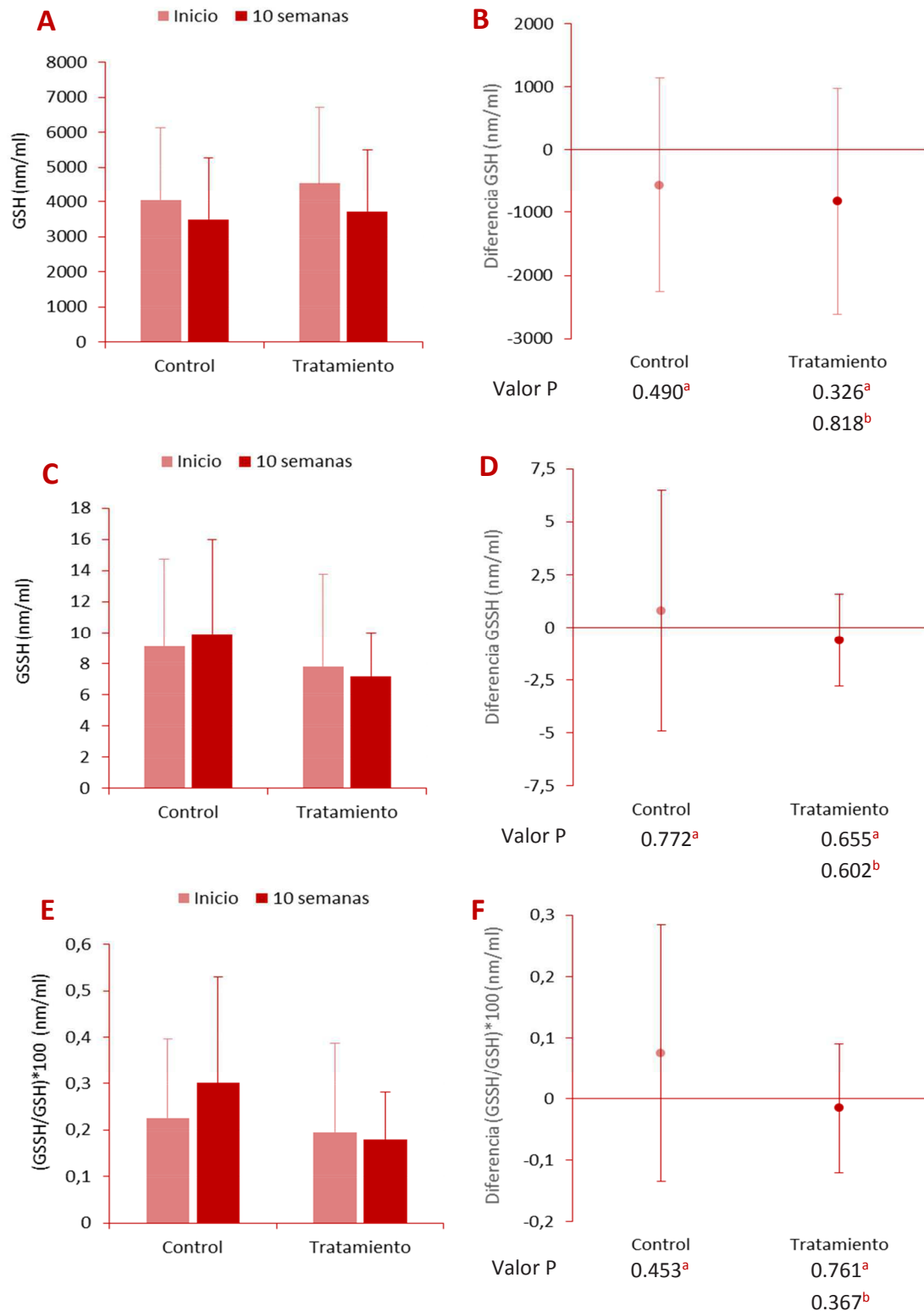
**A.** Medias y desviaciones estándar. **B.** Las barras de error representan el IC al 95% de las diferencias de medias intragrupo. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  indica diferencias significativas intragrupo. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  indica diferencias significativas intergrupo.

#### 4.4. EFECTO SOBRE EL ESTATUS DE GLUTATION SANGUINEO

Los resultados del glutatión en sangre muestran que el producto no provocó ningún efecto significativo sobre los niveles de GSH, GSSG y su cociente  $[(GSSG/GSH) \cdot 100]$  (Figura 5B.11). Tras 10 semanas de intervención, los valores de Glutatión reducido (GSH) mostraron un descenso medio del 13.8 % y 18.1 % en el grupo control y experimental, respectivamente.

Respecto al glutatión oxidado, los valores medios aumentaron un 8.5% en el grupo control mientras que en el grupo experimental disminuyeron un 7.3%, si bien las diferencias no alcanzaron significación estadística. Consecuentemente, se observó una tendencia similar en los cocientes GSSG/GSH.

Las grandes desviaciones observadas podrían deberse al insuficiente tamaño muestral. En cualquier caso, volveremos a estudiar y analizar los datos para una interpretación y discusión más profunda de los resultados obtenidos.



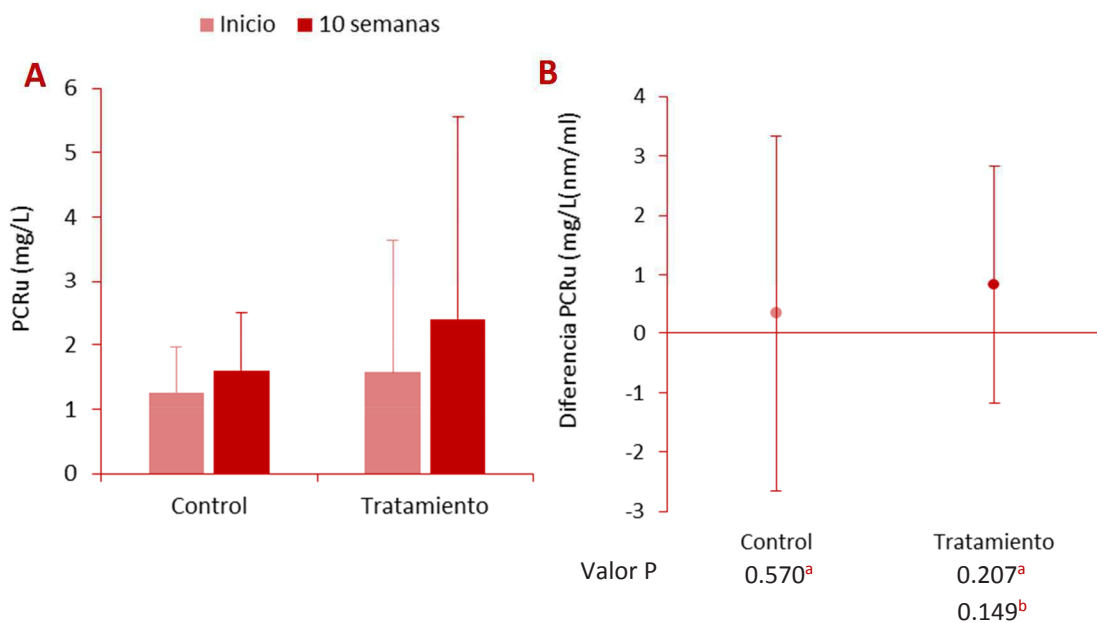
**Figura 5B.12** | Niveles sanguíneos de GSH, GSSG y cociente GSSG/GSH\*100 antes y después de las intervenciones.

**A, C, E.** Medias y desviaciones estándar. **B,D,F.** Las barras de error representan el IC al 95% de las diferencias de medias intragrupo. <sup>a</sup> valor p intragrupo. <sup>b</sup> valor p intergrupo. \* p<0.05 indica diferencias significativas

#### 4.5. EFECTO SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE PROTEINA C REACTIVA

El estrés oxidativo está relacionado con la inflamación. En este contexto, la PCR es un marcador de inflamación asociado a enfermedad cardiovascular (Pearson et al, 2003; Abraham et al., 2007).

En nuestro estudio, el nivel total medio de PCR en plasma aumentó tanto en los voluntarios tratados con el producto como en los voluntarios del grupo control, aunque estos cambios no fueron significativos ni intragrupo ni intergrupo (Figura 5B.11).



**Figura 5B.11 | Niveles plasmáticos de PCR antes y después de las intervenciones.**

**A.** Medias y desviaciones estándar. **B.** Las barras de error representan el IC al 95% de las diferencias de medias intragrupo. <sup>a</sup> valor p intragrupo. <sup>b</sup> valor p intergrupo. \*  $p < 0.05$  indica diferencias significativas

Diferentes ensayos clínicos con alimentos ricos en polifenoles muestran resultados contradictorios respecto a la reducción de la PCR (Khan et al., 2014; Serban et al., 2015). Así, algunos estudios describen el papel antiinflamatorio de los polifenoles aunque la mayoría incorporan otros marcadores de inflamación como citoquinas, quimoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1) y moléculas de adhesión (E-selectina, P-selectina, sVCAM-1, sICAM-1) (Tangney, 2013).

La falta de efecto observada en el presente estudio es consistente con observaciones previas utilizando té verde (Eichemberg et al, 2008) y con los resultados de un reciente meta-análisis realizado con 11 estudios clínicos con té verde y donde no encontró efecto significativo sobre las concentraciones plasmáticas de PCR (Serban et al, 2015). Sin embargo, estudios



realizados con otros polifenoles (cacao) muestran resultados contradictorios observándose una reducción en los niveles séricos de PCR (Tzounis et al., 2011; Stote et al., 2012). Cabe señalar que los niveles de PCR constituyen un marcador de inflamación pero también de respuesta de fase aguda (infección) presentando variaciones incluso en ausencia de síntomas clínicos. Asimismo, los niveles de PCR se consideran un marcador de riesgo cardiovascular en intervalos de concentración dentro del rango de referencia (Pearson et al, 2003). De esta forma, en sujetos asintomáticos, pequeñas variaciones de los niveles séricos, con o sin significación estadística, pueden ser interpretados de forma simultánea como clínica y biológicamente aceptables pero epidemiológicamente relevantes. En conjunto, aunque la PCR es un marcador de inflamación ampliamente aceptado, otros factores de confusión pueden contribuir y modular la magnitud de los cambios en suero, lo que explicaría, al menos en parte, la variabilidad de resultados descritos en la bibliografía.

**#5C**

**RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN**

**EVALUACIÓN DE LA  
EFICACIA EN  
PARÁMETROS  
CUTÁNEOS**

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This includes not only sales and purchases but also any other financial activities that may occur. It is essential to ensure that all entries are properly documented and supported by appropriate evidence.

In addition, the document emphasizes the need for regular reconciliation of accounts. This process involves comparing the company's internal records with the bank statements to identify any discrepancies. By doing so, the company can ensure that its financial statements are accurate and reliable.

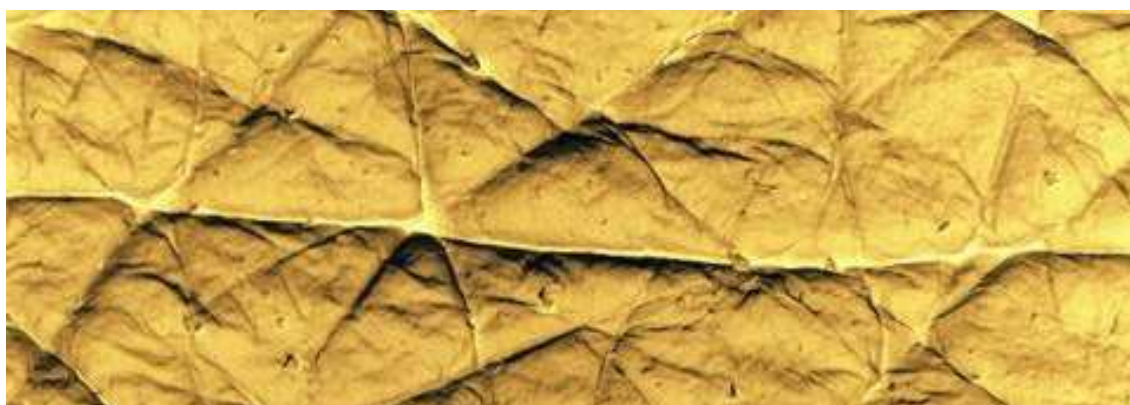
Furthermore, the document highlights the significance of maintaining up-to-date financial statements. These statements provide a clear and concise overview of the company's financial performance over a specific period. They are essential for making informed decisions and for communicating the company's financial health to stakeholders.

Finally, the document stresses the importance of seeking professional advice when needed. This may include consulting with an accountant or a financial advisor to ensure that the company is following best practices and complying with all relevant regulations.

# 5C

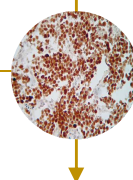
## Evaluación de la eficacia del producto I Parámetros cutáneos

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN



#### 1. EFECTO SOBRE PARAMETROS RELACIONADOS CON LA CALIDAD Y ESTADO DE LA PIEL *p214*

#### 2. EFECTO FOTOPROTECTOR Y ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO *p218*



#### 2.1. EFECTO FOTOPROTECTOR *p219*

- 1 MED
- 1.4 MED

#### 2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOLÓGICO

2.2.1. Efecto sobre el daño ADN/ Recuento de CPDs *p224*

2.2.2. Efecto sobre la protección genómica *p226*

2.2.2.1. Expresión de p53

2.2.2.2. Recuento de SBC (Células apoptóticas)

2.2.3. Efecto inmunoprotector/ Recuento de células de Langerhans *p229*

## 1. EFECTO SOBRE PARAMETROS RELACIONADOS CON LA CALIDAD Y ESTADO DE LA PIEL

La Tabla 5C.1 muestra el porcentaje de cambio de las variables relacionadas con la calidad y el estado de la piel. No se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos, lo cual demuestra que la toma del producto RP durante 10 semanas no tuvo un efecto significativo sobre ningún parámetro de calidad cutáneo. No obstante, en ambos grupos (control y tratamiento) se observó una reducción significativa al final del estudio en los siguientes parámetros: hidratación, firmeza y fatiga de la piel.

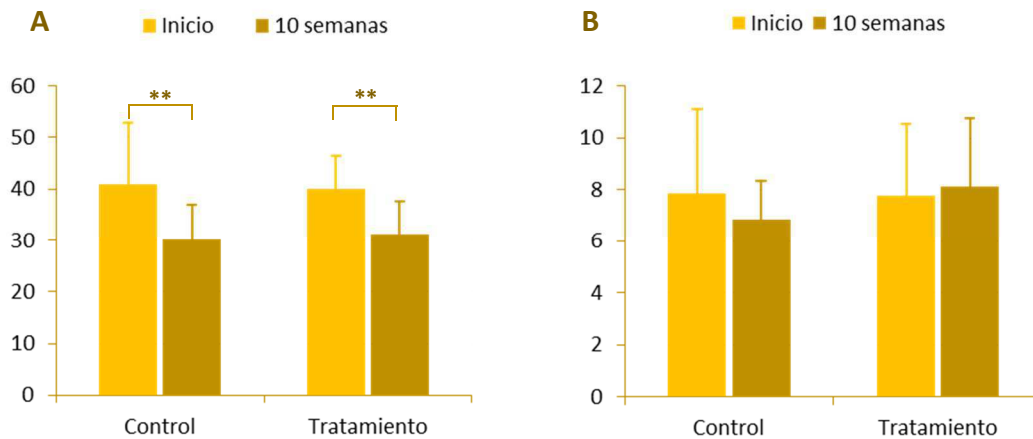
**Tabla 5C.1. Comportamiento de las variables relacionadas con el tipo, calidad y estado de la piel de los sujetos asignados al grupo placebo y al grupo tratamiento.**

Variable	Control n=14		Tratamiento n=23		Valor p <sup>c</sup>
	% Cambio <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	% Cambio	p <sup>b</sup>	
Hidratación (UA)	-23.4 (16.9)	0.000**	-21.0 (19.2)	0.000**	0.486
TEWL brazo (g/h/cm <sup>2</sup> )	-1.0 (44.4)	0.304	14.8 (46.8)	0.547	0.208
Elasticidad total Ua/Uf (R2)	2.4 (5.3)	0.144	2.5 (5.9)	0.057	0.997
Bio Elasticity Ur/Uf (R7)	5.8 (14.8)	0.237	7.9 (10,5)	0.001*	0.666
Viscoelasticidad (Uv/Ue) R6	15.2 (13.5)	0.002*	10.4 (23,7)	0.110	0.355
Firmeza (Uf) R0	-12.2 (11.8)	0.003*	-15.2 (13,4)	0.000**	0.355
Fatiga (R9)	-14.8 (21.9)	0.019*	-8.0 (14,8)	0.017*	0.271

<sup>a</sup> respecto a los datos basales (media; desviación estándar)  
<sup>b</sup> test t student intragrupo (pareado)  
<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.  
\* p<0.05 \*\*p<0.001  
% cambio: media del cálculo individual en cada sujeto

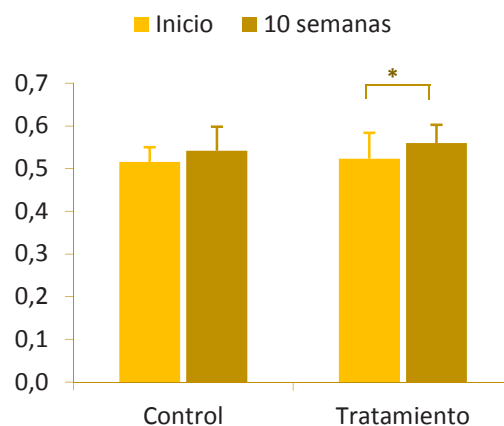
Los resultados observados pueden ser debidos al cambio estacional ya que nuestro estudio comenzó en septiembre y terminó en diciembre. Otros autores (Rogers et al., 1996; Kikuchi et al., 2003; Denda et al., 1998) han mostrado que los cambios estacionales de invierno pueden tener efectos negativos sobre los componentes estructurales de la piel (ej. lípidos del estrato córneo), así como en parámetros biomecánicos, incluyendo la hidratación y la pérdida de agua transepidérmica (TEWL). Según Fanian et al. (2013), estos cambios pueden ser debidos a la irritación causada en la piel por el ambiente seco y frío en invierno.

La evolución de los niveles de hidratación de la capa córnea de la epidermis fue muy similar en ambos grupos. Tras 10 semanas ambos grupos sufrieron un descenso significativo en relación con los valores basales (Figura 5C.1A). Esta disminución refleja un peor estado de hidratación posiblemente debido a la estacionalidad como hemos comentado anteriormente. En cuanto a la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), como se muestra en la Figura 5C.1B, no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los grupos.



**Figura 5C.1.** Evolución de la hidratación (A) y la pérdida de agua transepidérmica (B) a lo largo del estudio. Valores expresados como media y desviación estándar \*\* p<0.001

Respecto a los resultados obtenidos en los parámetros biomecánicos, no se observaron resultados estadísticamente significativos entre los dos grupos. Sin embargo, en la elasticidad biológica ( $U_r/U_f$ ), un parámetro que según Ryu et al (2008) representa muy bien la elasticidad de la piel, se observó una mejora significativa ( $p<0.01$ ) al final del estudio en el grupo que ingirió el producto RP (Figura 5C.2).



**Figura 5C.2.** Evolución de la elasticidad biológica a lo largo del estudio. Valores expresados como media y desviación estándar \* p<0.05

En general, en la literatura publicada hay algunos resultados contradictorios, aunque diversos autores han demostrado efectos positivos sobre parámetros de calidad de la piel tras la suplementación de polifenoles (Pezdiric et al., 2015).

La administración diaria de una bebida de cacao rica en polifenoles (326 mg/d) durante 12 semanas mejoró la hidratación y la TEWL, aunque no se observaron diferencias en la elasticidad de la piel (Heinrich et al. 2006). Sin embargo, Yoon et al. (2015), quienes realizaron un estudio similar con cacao en mujeres coreanas durante 24 semanas, observaron una mejora en la elasticidad de la piel mientras que no hubo diferencias en estado de hidratación entre los el grupo placebo y tratamiento.

En otro estudio doble ciego con 62 mujeres donde se evaluó la eficacia de un complemento con vitaminas, minerales y extractos de arándano y pino, Segger y Schonlau, (2004) mostraron, en el grupo que tomó el complemento, una mejora del 9% en la elasticidad de la piel tras 6 semanas de tratamiento.

Por su parte, Skovgaard et al. (2006) testaron durante 6 meses en mujeres postmenopáusicas un suplemento con varios extractos ricos en polifenoles (té blanco y semilla de uva), carotenoides vitaminas y minerales con resultados positivos en algunos parámetros de calidad de la piel, como por ejemplo: densidad de la dermis, firmeza, e hidratación de la piel, mientras que no observaron diferencias en la elasticidad.

Heinrich et al. 2012 observaron una mejora en la hidratación de la piel, TEWL y elasticidad en mujeres tras la suplementación diaria durante 12 semanas de una bebida con 1402 mg de catequinas. Los autores sugieren que el posible mecanismo de acción observado podría ser debido a la capacidad de los polifenoles de aumentar la microcirculación de la piel.

Aunque la evidencia es cada vez mayor en cuanto al posible rol positivo de los polifenoles en la mejora de parámetros relacionados con la calidad de la piel, creemos que se necesitan un mayor número de estudios clínicos con una mayor duración para evitar los posibles cambios asociados a la estacionalidad.

## 2. EFECTO FOTOPROTECTOR Y ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Numerosos estudios han demostrado que la radiación UV solar induce la formación de ROS en piel (Afaq et al., 2002; Ahmed et al., 1999). Como defensa a la agresión la piel se pigmenta y además se protege mediante su sistema de defensa antioxidante.

El hecho de que la piel sea la primera barrera de protección, el que estemos expuestos diariamente a la luz solar (fuente de radicales libres), que la nutrición pueda afectar a las defensas antioxidantes de la piel, y que podamos estandarizar el nivel de radiación UVB en cada individuo, hacen en nuestra opinión, que la piel sea un buen modelo para demostrar la eficacia de productos antioxidantes.

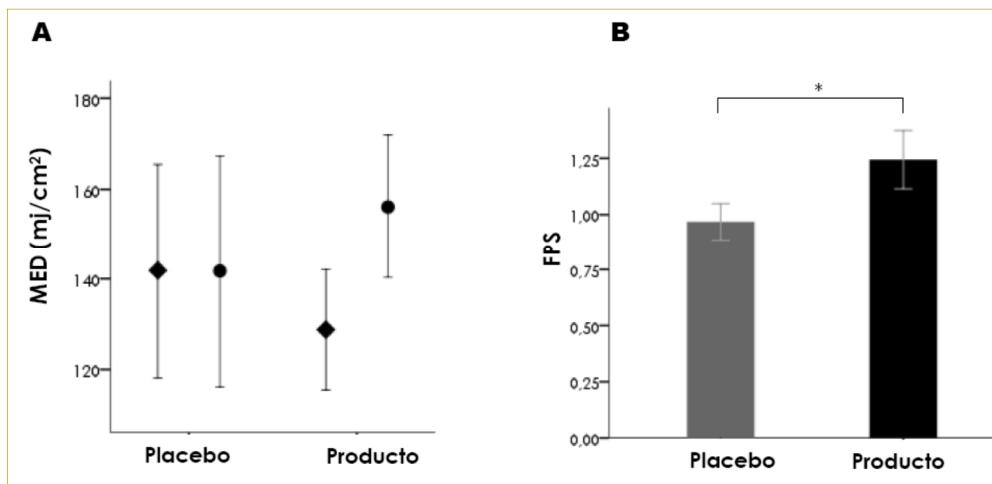
Para comprobar la eficacia del producto, primero indujimos el estrés oxidativo mediante la radiación controlada de luz UVB en la piel de los sujetos, para más tarde, mediante el uso de técnicas de investigación en dermatología cosmética y biología celular, comprobar la eficacia del producto RP.

- En la primera parte del estudio, evaluamos el efecto fotoprotector del producto mediante la evolución colorimétrica de la zona no irradiada e irradiada, antes y después de la intervención en ambos grupos.
- En la segunda parte, a los sujetos que firmaron el consentimiento informado de la biopsia, se les extrajo una muestra de piel para evaluar la eficacia del producto sobre la inmunidad cutánea y protección genómica de la piel mediante técnicas inmunohistoquímicas.



## 2.1 EFECTO FOTOPROTECTOR

Para calcular el Factor de Protección Solar (FPS), en primer lugar se determinó visualmente la mínima cantidad de UVB para producir eritema (MED) en el glúteo antes y después del periodo de intervención (Figura 5C.3A). Una vez estimados los MED en cada sujeto, el FPS se calculó a través de la fórmula (MED t10/MED t0) siguiendo el procedimiento de COLIPA (2006). El valor de FPS en el grupo que ingirió el producto rico en polifenoles 1.24 (0.29) fue significativamente mayor ( $p=0.001$ ; IC 95% 0.39 a 0.11) que en el grupo placebo 0.99 (0.92).



**Figura 5C.3. Efecto fotoprotector**

**A. Dosis mínima de eritema antes y después del tratamiento.**

Inicio (♦), 10 semanas (●). Valores expresados como media; Intervalo de confianza al 95%. **B. Factor de Protección Solar.** Valores expresados como media; Desviación estándar. \*  $p<0.05$

Además, se valoró el color de las zonas irradiadas mediante un equipo colorimétrico para confirmar de forma objetiva los resultados obtenidos en la valoración visual. Para evaluar el efecto fotoprotector se utilizaron los valores de las diferencias de color entre zona no irradiada e irradiada antes y después de la intervención a 1MED y 1.4MED. Se observó una correlación significativa entre la valoración visual del FPS y el efecto fotoprotector evaluado por colorimetría ( $r = 0.70$ ;  $p < 0.01$ ).

La Figura 5C.4. muestra ejemplos de imágenes obtenidas de las zonas irradiadas a diferentes dosis, antes y después de la intervención en voluntarios de ambos grupos.

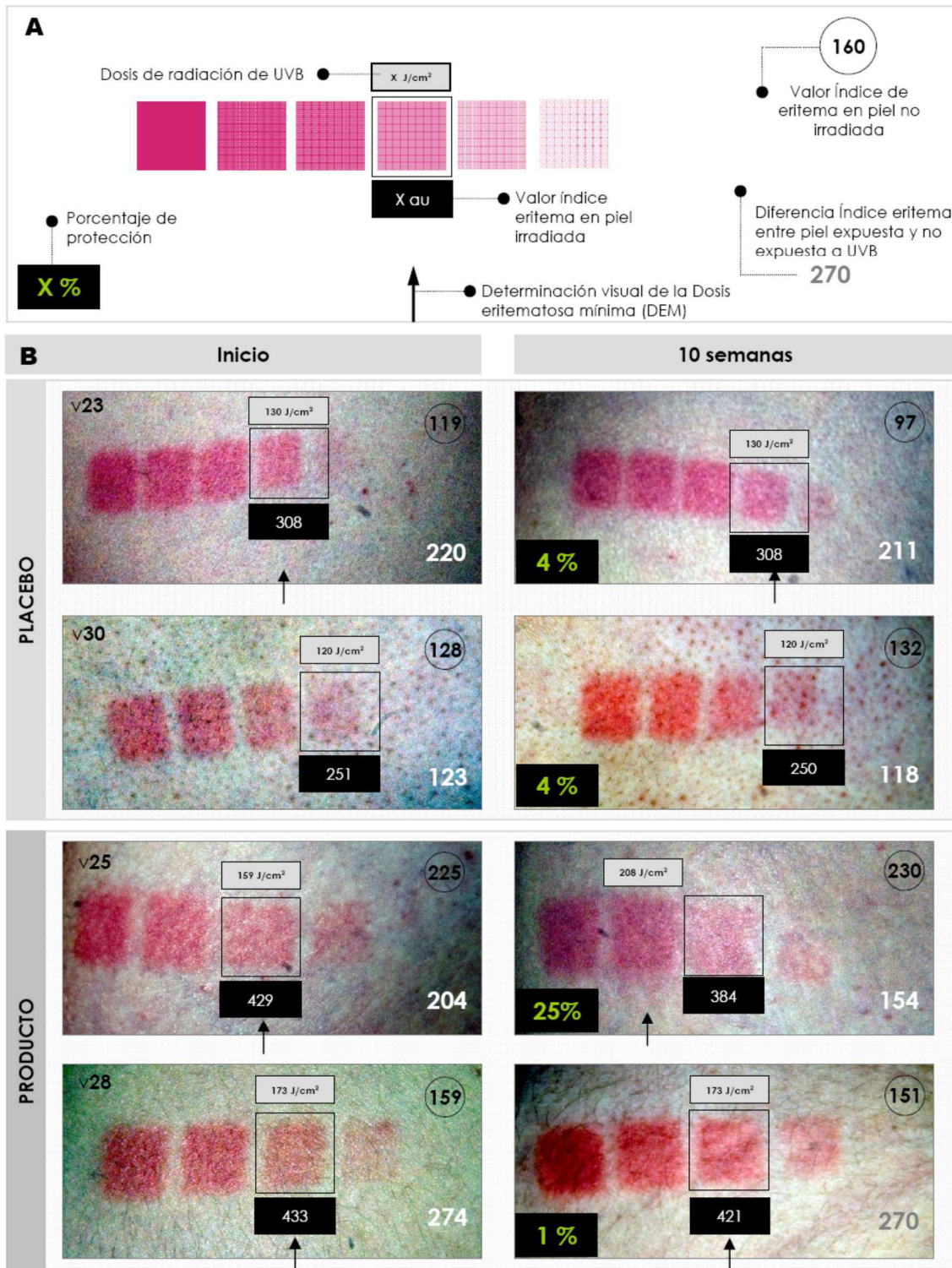


Figura 5C.4. Ejemplos de imágenes obtenidas tras la radiación UVB.

**A. Esquema explicativo para la interpretación de las imágenes clínicas.**

**B. Ejemplos de resultados de la MED antes y después de las 10 semanas en ambos grupos.** Grupo control: Voluntarios 23 y 30 mostraron un 4 % de protección. El voluntario 25 (grupo tratamiento) mostró un 25% de protección valorada coloriméricamente, mientras que en la valoración visual de la MED aumentó en un 38% (de  $159 \text{ mJ/cm}^2$  a  $208 \text{ mJ/cm}^2$ ).

Las tablas 5C.2 y 5C.3 presentan los resultados del efecto fotoprotector obtenidos en los grados de eritema evaluados (1 MED y 1.4 MED) en ambos grupos, al inicio (Pre) y al final (Post) del estudio.

**Tabla 5C.2.** Efecto fotoprotector a 1MED antes y después de la intervención.

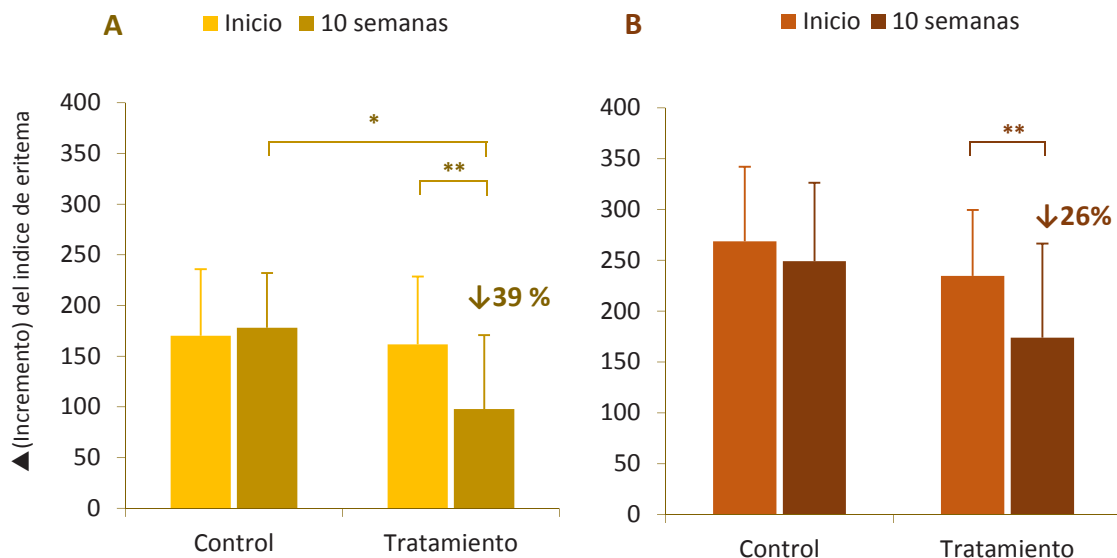
Índice de Eritema a 1MED	Unidades	Placebo n=12	Tratamiento n=22
PRE_sin irradiar	au	180.5 (60.6)	189.0 (46.0)
PRE_Irrradiado	au	350.6 (93.0)	350.6 (75.4)
<b>▲ Índice Eritema_PRE</b>	au	<b>170.1</b> (65.79)	<b>161.5</b> (67.0)
POST_sin irradiar	au	177.2 (68.7)	187.9 (39.1)
POST_irradiado	au	355.3 (87.0)	285.9 (84.8)
<b>▲ Índice Eritema_POST</b>	au	<b>178.0</b> (54.0)	<b>98.0</b> (72.8)
<b>Efecto fotoprotector</b>	au <sup>b</sup>	7.9 (50.0 a -34.06)	-63.5 (-39.6 a -87.6)
<b>p<sup>c</sup></b>		0.684	0.000**
<b>Diferencia del efecto fotoprotector</b>	au <sup>b</sup>	-71.5 (-28.7 a -114.3)	
<b>p<sup>d</sup></b>		0.002*	
<sup>a</sup> (media; desviación estándar) <sup>b</sup> media; Intervalo de confianza 95% <sup>c</sup> test t student intragrupo <sup>d</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal. * p<0.05 ** p<0.001			

**Tabla 5C.3.** Efecto fotoprotector a 1.4 MED antes y después de la intervención

Índice de Eritema a 1MED	Unidades	Placebo n=11	Tratamiento n=22
PRE_sin irradiar	au	180.5 (60.6)	189.0 (46.0)
PRE_Irrradiado	au	453.0 (105.2)	423.7 (60.1)
<b>▲ Índice Eritema_PRE</b>	au	<b>268.7</b> (73.5)	<b>234.7</b> (64.9)
POST_sin irradiar	au	177.2 (68.7)	187.9 (39.1)
POST_irradiado	au	429.5 (85.6)	361.8 (103.9)
<b>▲ Índice Eritema_POST</b>	au	<b>249.3</b> (77.1)	<b>173.9</b> (92.5)
<b>Efecto fotoprotector</b>	au <sup>b</sup>	-19.4 (19.2 a -58.0)	-60.8 (-23.1 a -98.6)
<b>p<sup>c</sup></b>		0.290	0.003*
<b>Diferencia Efecto fotoprotector</b>	au <sup>b</sup>	-41.4 (+16.7 a -99.7)	
<b>p<sup>d</sup></b>		0.157	
<sup>a</sup> (media; desviación estándar) <sup>b</sup> media; Intervalo de confianza 95% <sup>c</sup> test t student intragrupo <sup>d</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal. * p<0.05			

A 1 MED (Figura 5C.5a; Tabla 5C.2), y tras 10 semanas de intervención, en el grupo que ingirió el producto rico en polifenoles, los valores medios del incremento de índice de eritema se redujeron significativamente en un 39 % indicando un aumento fotoprotector del producto ( $p=0.000$ ). Sin embargo, los valores medios del incremento de índice de eritema en el grupo placebo no cambiaron significativamente ( $p=0.684$ ). Al comparar ambos grupos, el grupo tratamiento mostró un mayor efecto fotoprotector en comparación con el grupo control ( $p=0.002$ ).

A 1.4 MED (Figura 5C.5b; Tabla 5C.3), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ( $p=0.157$ ), en el grupo que ingirió el producto RP, el  $\blacktriangle$  de índice de eritema disminuyó significativamente tras la intervención ( $p=0.003$ ), observándose una protección media del 26%. En el grupo control aunque mostró una protección media del 7.2%, no se hallaron diferencias significativas.



**Figura 5C.5. Efecto fotoprotector a 1 MED (A) y 1.4 MED (B) antes y después de la intervención.** Inicio (■), 10 semanas (■). Valores expresados como media y desviación estándar. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.001$

En conjunto, nuestros resultados muestran un efecto positivo del producto rico en polifenoles sobre la fotoprotección cutánea. El efecto encontrado es comparable con los descritos por otros investigadores en diversos alimentos. Por ejemplo, Heinrich et al. (2006), en un estudio con 24 mujeres a las que se les suplementó una bebida de cacao (Flavonoles 326 mg/día), observaron que el grado de intensidad del eritema a 1.25 MED a las 12 semanas fue un 25% inferior con respecto a los valores basales al inicio del estudio. Los mismos autores, en un estudio posterior (Heinrich et al., 2011), mostraron también una reducción del 25 % en mujeres irradiadas a 1.25 MED, y tras la ingesta diaria durante 12 semanas de una bebida de té verde (Catequinas: 1402 mg, EGCG: 980 mg). Hallazgos similares a los observados en nuestro estudio han sido descritos en productos de tomate ricos en licopeno (Stahl et al., 2001; Aust et al., 2005; Rizwan et al., 2011), mezclas de carotenoides (Heinrich et al., 2003), té verde (Rhodes et al., 2013) y mezcla de extracto de cítricos y romero (Pérez-Sánchez et al., 2014).

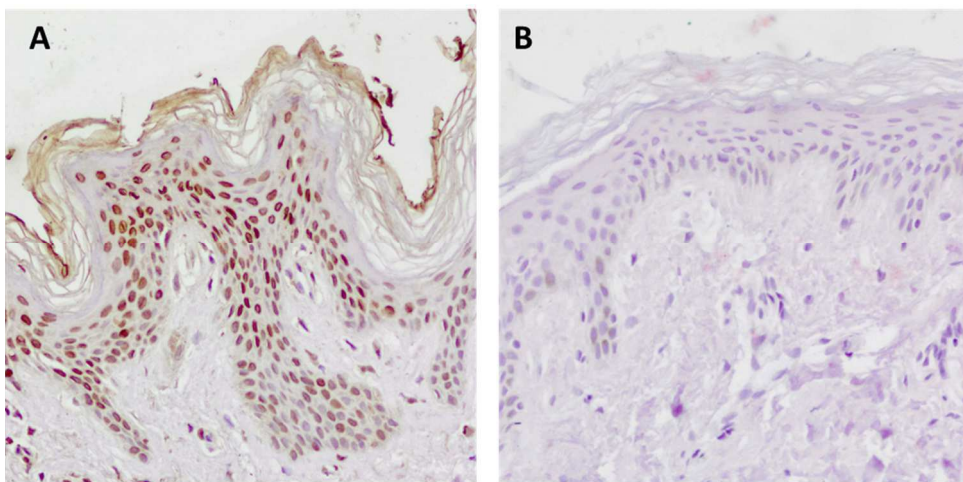
El eritema producido por la luz UV es una respuesta inflamatoria de la piel asociada a unos procesos bioquímicos complejos (Farr et al., 1988). A nivel celular, hay varios mecanismos por los cuales los polifenoles podrían reducir el grado de eritema y actuar como fotoprotectores. La mayoría de los polifenoles son capaces de absorber la luz UV (Nichols & Katiyar, 2010). Además, pueden proteger al ADN de la oxidación mediante la captación de radicales libres. Por otro lado, los polifenoles pueden actuar como señalizadores celulares. Según Afaq y Katiyar (2001), los polifenoles pueden disminuir la expresión de ciclooxigenasa y / o lipoxigenasa, reducir la producción de citoquinas proinflamatorias (e.j. IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ ) e incrementar las concentraciones de enzimas antioxidantes.

El efecto protector obtenido en estos estudios no es comparable al efecto protector de las cremas solares. Sin embargo, nuestros resultados junto con la evidencia discutida anteriormente, sugieren que una buena alimentación podría contribuir a mejorar la protección basal aumentando las defensas frente al daño diario recibido por la luz solar.

## 2.2 ESTUDIO INMUNOHISTOLÓGICO

### 2.2.1 Efecto sobre el daño ADN y producción de dímeros de pirimidina (CPDs)

El ADN es el cromóforo más importante de la piel y puede absorber UVB (290-320 nm), produciendo daño en las bases pirimidínicas de ADN. Los productos resultantes a la exposición a UVB son los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) (Chadwick et al., 1995). En la Figura 5C.6a se muestra la imagen de la inmunohistoquímica realizada para determinar los dímeros de pirimidina (CPDs) en los cortes de piel de voluntarios irradiados a 1.4 MED. La Figura 5C.6b muestra que la unión del anticuerpo es específica al no observarse inmunomarcaje cuando se incuban las secciones solamente con el anticuerpo secundario.



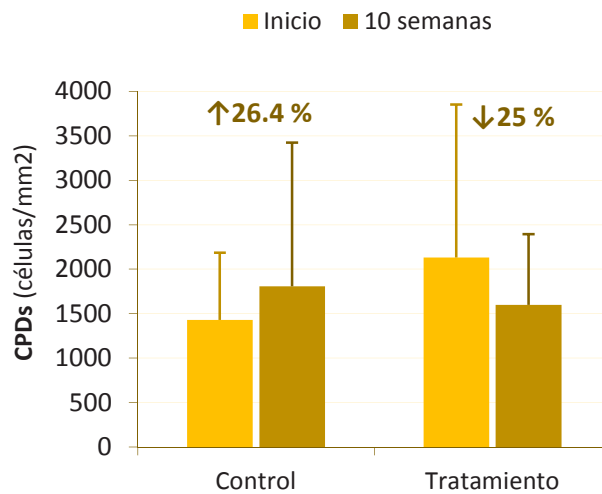
**Figura 5C.6. Piel de voluntario irradiado a 1.4 MED incubada con el anticuerpo de dímeros de pirimidina. A.** Se observa una intensa inmunoreactividad **B.** Sección sometida al mismo tratamiento pero el anticuerpo primario ha sido omitido.

Como se muestra en la Tabla 5C.4; Figura 5C.7, obtenida tras el análisis cuantitativo de los núcleos marcados usando las tinciones inmunohistoquímicas (Figura 5C.6a) de la piel irradiada, se observó una ligera protección no significativa ( $p=0.166$ ) en el grupo tratamiento frente al control en la producción de CPDs. El número medio de dímeros de pirimidina aumentó en un 26.4% en el grupo control, mientras que en el grupo que ingirió el producto se observó un descenso del 25% (Figura 5C.7).

**Tabla 5C.4.** CPDs en piel antes y después del tratamiento.

CPDs		Control (n=4)	Tratamiento (n=14)
PRE (cel/mm <sup>2</sup> piel)	χ (DE)	1429 (756)	2132 (1720)
POST (cel/mm <sup>2</sup> piel)	χ (DE)	1808 (1617)	1599 (795)
Diferencia intragrupo (cel/mm <sup>2</sup> piel)	IC 95%	378 (1916 a -1160)	-533 (145 a -1210)
p <sup>b</sup>		0.491	0.113
Diferencia intergrupo	IC 95%	-911 (421 a -2242)	

<sup>a</sup> Abreviaciones: IC: Intervalo de Confianza; χ: Media; DE: desviación estándar  
<sup>b</sup> test t student intragrupo  
\* p<0.05



**Figura 5C.7.** Número de dímeros de pirimidina antes y después de la intervención. Inicio (■), 10 semanas (■). Valores expresados como media y desviación estándar.

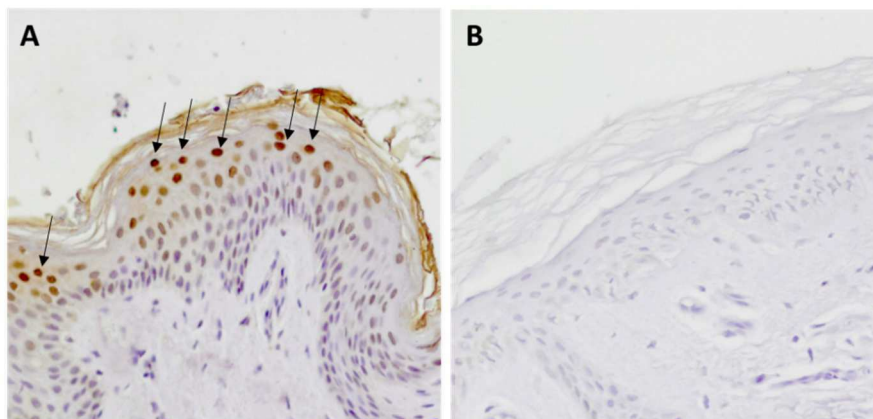
El número de CPDs descrito en la literatura es muy inferior al encontrado en nuestro estudio (Middelkamp-Hup et al., 2004; Placzek et al., 2005; Oresajo et al., 2008; Yamaguchi et al., 2008; Cole et al., 2014). Los valores reportados por estos autores se encuentran entre 40 y 300 células/mm<sup>2</sup> de epidermis. A priori, y con la información disponible de estos estudios, no podemos aclarar la causa de estas diferencias, aunque sí que se abre una interesante línea de investigación futura que profundice sobre los resultados obtenidos.

### 2.2.2. Efecto sobre la protección genómica

Cuando las células están dañadas debido a la exposición UV, tienen que ser reparadas antes de la división celular para evitar mutaciones y carcinogenicidad (Cesarini et al., 2003). Estas lesiones pueden ser directas como la formación de CPDs, o indirectas, principalmente causa del estrés oxidativo produciendo fotoproductos. Tras la exposición a UVB, la célula expresa p53 para proteger a la célula dañada y como hemos comentado en la revisión bibliográfica, se pueden dar dos escenarios: 1) Que se pare el ciclo celular para que los mecanismos de reparación celulares eliminen las lesiones (ejemplo: CPDs); 2) Que induzca apoptosis y se formen *sunburn cells*. Estos dos marcadores están considerados como marcadores de protección genómica. (Ziegler et al., 1994; Cesarini et al., 2000).

#### 2.2.2.1 Expresión de p53

En la Figura 5C.8a se expone la imagen de la inmunohistoquímica realizada para determinar la expresión de p53 en los cortes de piel de voluntarios irradiados a 1.4 MED. La Figura 5C.8b muestra que la unión del anticuerpo es específica al no observarse inmunomarcaje cuando se incuban las secciones solamente con el anticuerpo secundario.



**Figura 5C.8.** Piel de voluntario irradiado a 1.4 MED incubada con el anticuerpo de p53. **A.** Se observa una intensa inmunoreactividad **B.** Sección sometida al mismo tratamiento pero el anticuerpo primario ha sido omitido.

Como se pone de manifiesto en la Tabla 5C.5, se advierte una gran variabilidad en la expresión de p53, tal y como confirman las desviaciones standard. En teoría, y de acuerdo a la literatura, el efecto protector del producto observado a nivel superficial de piel debería haber reducido la expresión de p53 (Cesarini et al., 2000; Oresajo et al., 2008; Mnich et al., 2009). Sin embargo, en ambos grupos (placebo y producto RP) se observó un aumento no significativo de



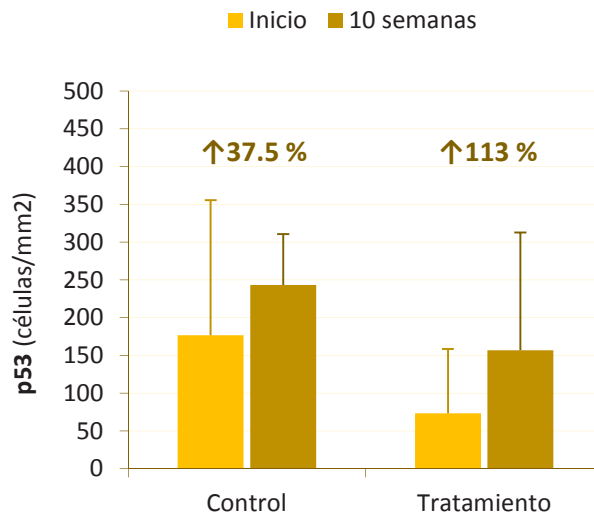
p53. Además, los valores de p53 al inicio (t0) fueron muy diferentes entre el grupo control (176.9) y el grupo tratamiento (73.6). Esto puede ser debido a que en el grupo tratamiento el MED (mj/cm<sup>2</sup>) fue ligeramente inferior (Figura 5C.3A), y quizás las células epidérmicas estaban menos dañadas, expresando de esta forma menos p53.

**Tabla 5C.5.** Expresión de p53 tras radiación UVB en piel antes y después del tratamiento.

p53		Placebo (n=4)	Tratamiento (n=14)
PRE (cel/mm <sup>2</sup> piel)	χ (DE)	176.9 (178.5)	73.6 (84.8)
POST (cel/mm <sup>2</sup> piel)	χ (DE)	243.4 (67.5)	156.7(156.1)
Diferencia intragrupo (cel/mm <sup>2</sup> piel)	IC 95%	66.4 (417.4 a -284.6)	83.1 (184.8 a -18.6)
p <sup>b</sup>		0.589	0.101
Diferencia intergrupo	IC 95%	16.7 (239.4 a -206.1)	

<sup>a</sup> Abreviaciones: IC: Intervalo de Confianza; χ: Media; DE: desviación estándar  
<sup>b</sup> test t student intragrupo  
 \* p<0.05

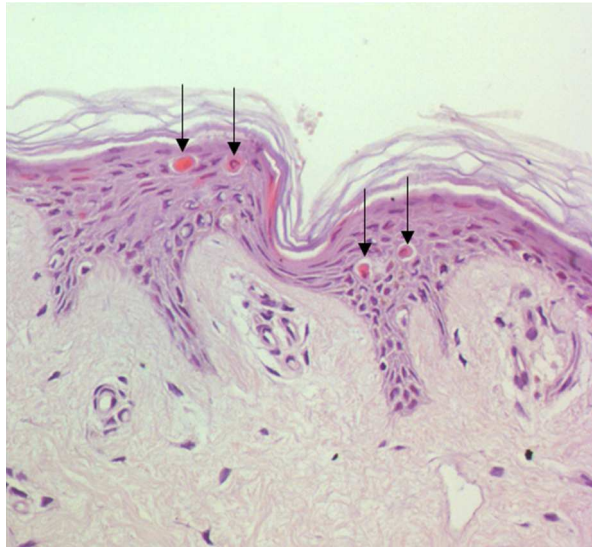
En nuestra investigación, el número de células con inmunotinción positiva para p53 encontradas en piel irradiada está en línea con las encontradas en piel irradiada de 1 a 5 MED por otros autores (Burren et al., 1998; Liardet et al., 2001; Oresajo et al., 2008).



**Figura 5C.9.** Expresión de p53 en piel tras irradiación a 1.4 MED. Inicio (■), 10 semanas (■). Valores expresados como media y desviación estándar.

### 2.2.2.2 Recuento de SBC (células apoptóticas)

La tinción de las secciones de piel de los diferentes voluntarios mostraron la presencia de células epidérmicas con una intensa tinción eosinófila (Figura 5C.10) y cuyo número fue cuantificado por mm<sup>2</sup> de piel (Tabla 5C.6.).



**Figura 5C.10.** Epidermis de voluntario irradiado a 1.4 MED. Se aprecian varias células eosinófilas (flechas) en el epitelio estratificado plano queratinizado de la epidermis que se corresponden con las Sunburn Cells

En ambos grupos se redujo de forma no significativa el número de células apoptóticas al final del estudio (Tabla 5C.6; Figura 5C.11). A raíz de estos resultados nos surgen los siguientes interrogantes que pueden dar lugar a interesantes líneas de investigación futura:

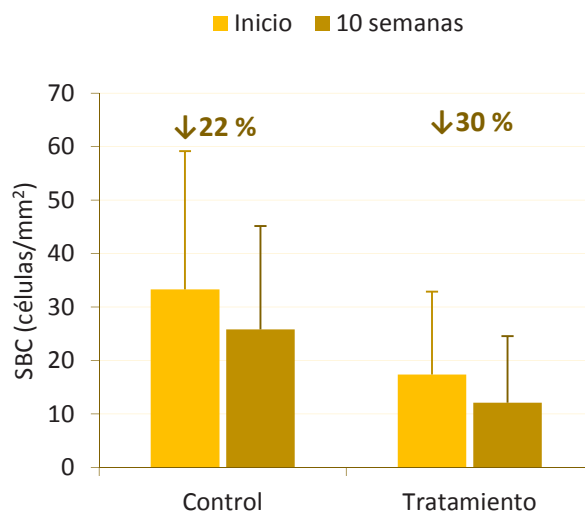
- ¿Hasta qué punto estos resultados han podido ser causados por la influencia del p53 en la parada del ciclo celular, dejando por lo tanto al mecanismo de escisión de nucleótidos reparar la célula y la consecuente reducción de SBC?
- ¿Hasta qué punto el menor número de SBC observado podría ser debido al menor daño observado mediante la evaluación del eritema en el grupo que ingirió el producto RP?

**Tabla 5C.6. Células apoptóticas positivas en piel antes y después del tratamiento.**

		Placebo (n=4)	Tratamiento (n=14)
PRE (cel/mm <sup>2</sup> piel)	χ (DE)	33.3 (25.9)	17.37 (15.51)
POST (cel/mm <sup>2</sup> piel)	χ (DE)	25.8 (19.3)	12.1 (12.4)
Diferencia intragrupo (cel/mm <sup>2</sup> piel)	IC 95%	-7.4 (24.8 a -39.8)	-5.3 (3.2 a -13.8)
p <sup>b</sup>		0.515	0.203
Diferencia intergrupo	IC 95%	2.18 (21.32 a -16.9)	

<sup>a</sup> Abreviaciones: IC: Intervalo de Confianza; χ: Media; DE: desviación estándar  
<sup>b</sup> test t student intragrupo  
 \* p<0.05

El número de SBC en nuestro estudio es consistente con los resultados descritos por otros autores tras la irradiación de 1 a 3 MED (Lin et al., 2003; Middelkamp-Hup et al., 2004; Cole et al., 2014).



**Figura 5C.11. Número de células apoptóticas antes y después de la intervención.** Inicio (■), 10 semanas (■). Valores expresados como media y desviación estándar.

### 2.2.3 Efecto inmunoprotector (Recuento de células de Langerhans)

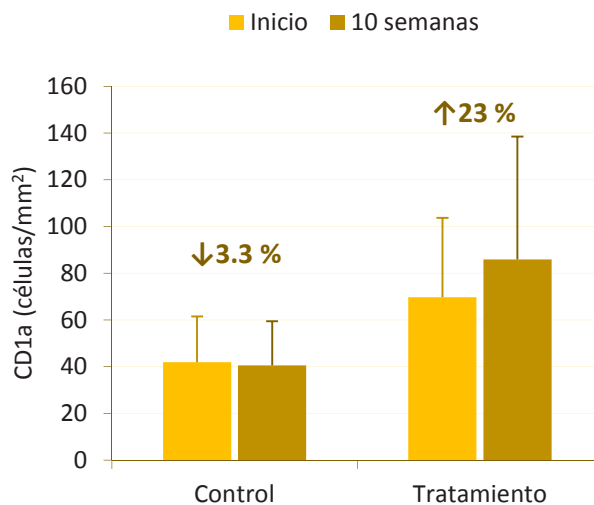
La luz UVB deprime el sistema inmunitario de la piel y estimula los queranocitos para producir mediadores inmunosupresores (e.j. IL-10) (Nishigori et al., 1996; Katiyar et al., 2007). Las células de Langerhans (CL) son las células responsables de la inmunidad cutánea. La radiación UV tiene como resultado la disminución del número de células de Langerhans y su dendricidad (Novakovic et al., 2001). Esta reducción de las CL juega un papel importante en el cáncer de piel (Saladi et al., 2005).

La Tabla 5C.7 muestra los resultados obtenidos en los dos grupos. En el grupo suplementado con el producto rico en polifenoles observamos un aumento medio no significativo ( $p=0.056$ ) del 23% (Figura 5C.12), indicando una posible tendencia inmunoprotectora al final de la intervención. Sin embargo en el grupo placebo, básicamente se encontraron el mismo número de CL al inicio y al final del estudio.

**Tabla 5C.7.** Células de Langerhans (CD1a) positivas en piel antes y después del tratamiento.

		Placebo (n=4)	Tratamiento (n=14)
PRE (cel/mm piel)	$\chi$ (DE)	41.9 (19.7)	69.8 (33.9)
POST (cel/mm piel)	$\chi$ (DE)	40.5 (18.9)	85.9 (52.6)
Diferencia intragrupo (cel/mm piel)	IC 95%	-1.4 (10.1 a -12.9)	16.1 (32.6 a -0.5)
$p^b$		0.724	0.056
Diferencia intergrupo	IC 95%	17.5 (48.8 a -13.8)	

<sup>a</sup> Abreviaciones: IC: Intervalo de Confianza;  $\chi$ : Media; DE: desviación estándar  
<sup>b</sup> test t student intragrupo  
<sup>c</sup> test t student intergrupo para diferencias de la variables respecto al valor basal.  
\*  $p<0.05$

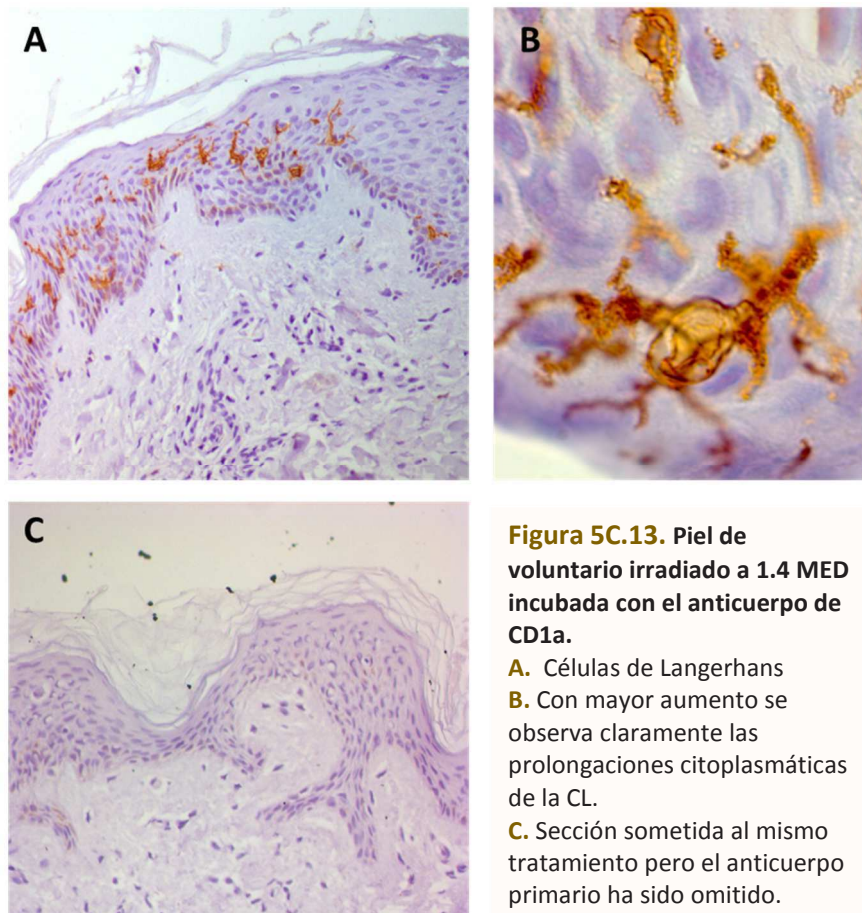


**Figura 5C.12.** Efecto Inmunoprotector antes y después de la intervención.

Inicio (■), 10 semanas (■). Valores expresados como media y desviación estándar.

En la literatura no hay muchos estudios que hayan cuantificado el número de células de CL tras suplementación oral con antioxidantes. En este sentido, Middelkamp-Hup et al. (2004) hallaron una efecto positivo en la preservación de CL en sujetos irradiados a 2MED-3MED a los que se les administró un extracto de Polypodium leucotomos. En este estudio el número medio de CL (18.56 (5.76)) fue inferior al que hemos obtenido en nuestra investigación (grupo control:

41.9 (19.7); grupo tratamiento 69.8 (33.9)). Estas diferencias pueden haberse originado porque la dosis de radiación en nuestro estudio fue menor (1.4 MED vs. 2MED-3MED). En cualquier caso, consideramos que la estimación del número total de células de Langerhans puede no ser tan precisa debido al aspecto dendrítico característico que poseen estas células lo que hace difícil su cuantificación (Figura 5C.13a,b). Futuras investigaciones podrían plantear un análisis de la longitud de las prolongaciones celulares de este tipo celular. En las secciones control no se observa inmunoreactividad, lo que demuestra la especificidad de la técnica utilizada (Figura 5C.13c).



En resumen, la falta de significación en los parámetros histológicos analizados en nuestro estudio puede ser debida a que la suplementación oral no es capaz de reducir los efectos provocados por la radiación UVB a nivel experimental. Esto no significa que en la realidad los polifenoles no sean efectivos en la disminución de CPDs, SBCs, expresión de p53 y preservación de CL, ya que la radiación UVB en laboratorio es muy superior a la que estamos expuestos diariamente.

## LIMITACIONES

**Faltaríamos al rigor que todo trabajo de investigación exige si no mencionáramos sus limitaciones:**

- Desequilibrio en la aleatorización entre los grupos control y tratamiento.
- La no utilización de un marcador plasmático de ingesta.
- El tamaño muestral insuficiente para algunas variables (GSH/GSSG, LDL oxidada...)
- El uso de una población sana en el estudio, lo que dificulta encontrar cambios en los niveles fisiológicos de biomarcadores de estrés oxidativo.

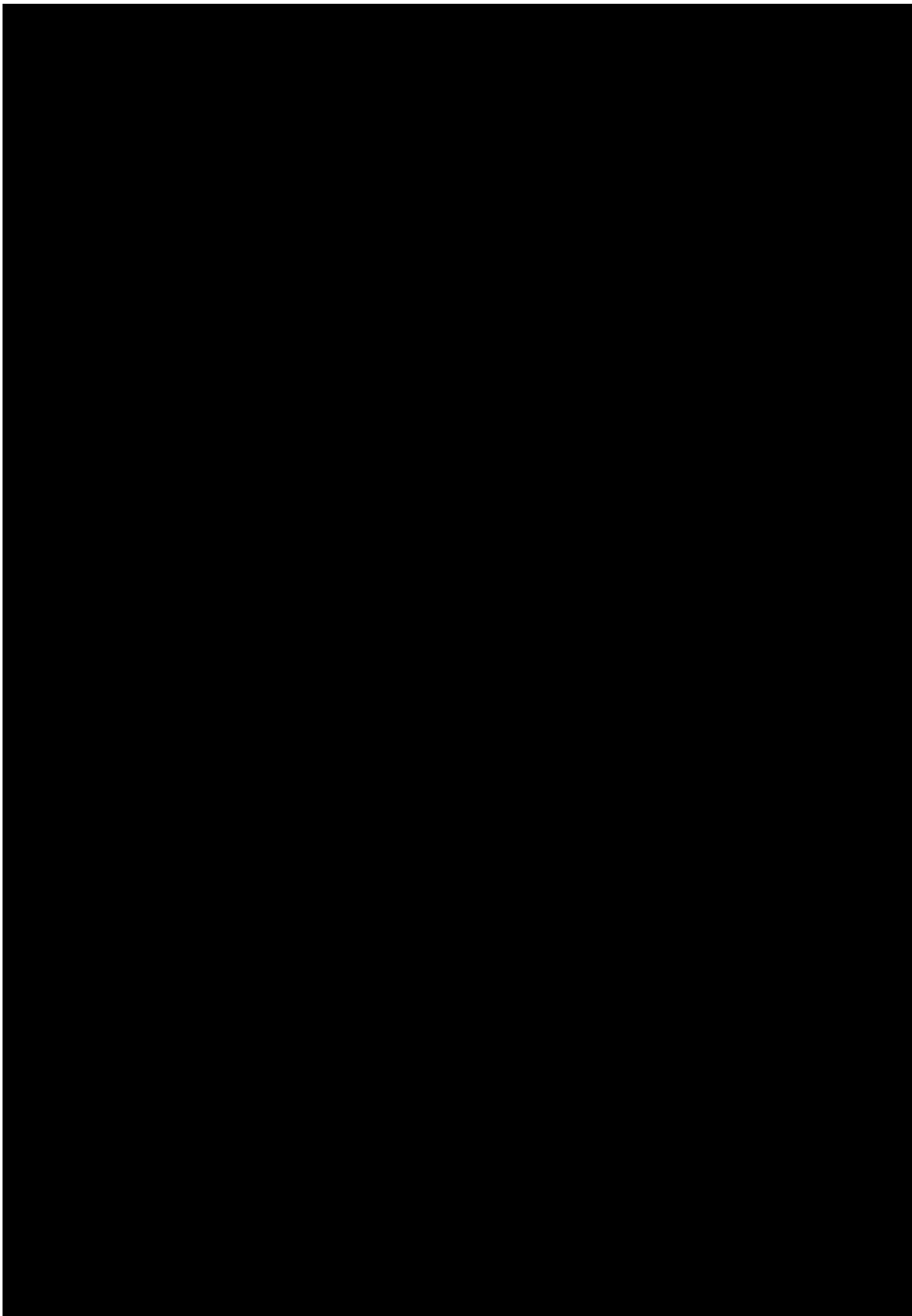
## PERSPECTIVA-FUTURO

**La realización de esta Tesis Doctoral abre numerosas oportunidades para seguir investigando, algunas de las cuales proceden de las limitaciones ya apuntadas:**

- Utilizar una población menos sana, con niveles basales más altos de marcadores de estrés oxidativo.
- Evaluar la presencia en plasma y piel de metabolitos procedentes de los compuestos activos del producto.
- Aumentar el tiempo de intervención para evaluar el efecto sobre el estado de calidad de la piel.
- Incluir otros marcadores para confirmar los hallazgos encontrados y esclarecer los resultados no esperados. Por ejemplo, se podrían incluir otros marcadores de inflamación como la mieloperoxidasa, IL-6; determinar los F2-isoprostanos en orina para confirmar el efecto encontrado a nivel plasmático; utilización de marcadores de la actividad de las enzimas antioxidantes como la Superóxido dismutasa SOD.
- Aumentar el número de sujetos para esclarecer las tendencias observadas a nivel inmunohistoquímico y quizás reducir la variabilidad inter-sujeto observada en algunas variables como el GSH/GSSG.

**#6**

# CONCLUSIONES





# 6

## CONCLUSIONES



Las principales conclusiones que se derivan de la realización de esta investigación son:

### ESTUDIO 1: INFUSIONES DE TÉ VERDE

1. Las condiciones de infusión óptimas para preparar una taza de té verde con el mayor contenido en compuestos bioactivos es de 80º y 5 minutos para temperatura y tiempo de infusión respectivamente.
2. La estimación del contenido en catequinas realizada en cada uno de los téis analizados (siguiendo las instrucciones de preparación aportadas por el fabricante), indican que existe variabilidad en el consumo de catequinas, ocasionado principalmente por las diferencias en la cantidad de té incluidas en la bolsa, y las diferentes recomendaciones en las temperaturas y tiempos de infusión.

### ESTUDIO 2: EXTRACTOS DE TÉ VERDE COMERCIALES

3. La utilización de métodos espectrofotométricos para la determinación de polifenoles totales o capacidad antioxidante, es válida para estimar la cantidad de catequinas durante el control de calidad de extractos de té verde.

### **ESTUDIO 3: CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DEL PRODUCTO**

4. El producto desarrollado mostró un perfil de compuestos fenólicos similar al encontrado en dos tazas de té verde (equivalencia en EGCG), una ración de frutas rojas (equivalencia en antocianidinas), y una manzana (equivalencia en quercetina).
5. El EGCG y resto de catequinas fueron estables en condiciones de refrigeración durante los 5 meses de almacenamiento.
6. Las antocianidinas y la quercetina fueron los compuestos activos más inestables, aunque los valores al final del estudio se encontraron dentro de los rangos publicados en la literatura para frutas rojas y manzana respectivamente.
7. El producto rico en polifenoles mostró una alta aceptabilidad durante el estudio de vida útil.

### **ESTUDIO 4.1: PARAMETROS SISTÉMICOS**

#### **La administración diaria del producto rico en polifenoles durante 10 semanas:**

8. No alteró los parámetros de bioquímica general, metabolismo del hierro, y función renal y hepática determinados, demostrando la inocuidad de su consumo.
9. Disminuyó la peroxidación lipídica plasmática (F2-isoprostanos y MDA), sugiriendo un efecto antioxidante sobre el estado redox basal.
10. Redujo los valores basales de glucosa, colesterol total y LDL.
11. No fue efectivo en los marcadores de LDL oxidada, Proteína C reactiva y ratio GSSG/GSH.

## ESTUDIO 4.2: PARAMETROS EN PIEL

**En consumo diario del producto rico en polifenoles durante 10 semanas:**

- 12.** No produjo cambios en parámetros relacionados con la calidad de la piel (hidratación, pérdida transepidérmica del agua y elasticidad).

**En consumo diario del producto rico en polifenoles durante 10 semanas, y tras la inducción de estrés oxidativo mediante radiación UVB en la piel de los sujetos:**

- 13.** Indujo un aumento de la dosis mínima de eritema (MED), demostrando un efecto fotoprotector.
- 14.** Mostró una tendencia inmunoprotectora, mediante la preservación del número de células de Langerhans.
- 15.** No redujo el daño a ADN producido por la radiación UVB, aunque se observó una tendencia protectora.
- 16.** No influyó en los parámetros de protección genómica analizados (expresión de p53 y recuento de células apoptóticas).

### CONCLUSION GENERAL

**La ingestión diaria del producto rico en polifenoles evaluado:**

- **Disminuyó la peroxidación lipídica plasmática sugiriendo un efecto antioxidante sobre el estado redox basal.**
- **Proporcionó en la piel un efecto fotoprotector que se acompañó con una tendencia inmunoprotectora y disminución del daño oxidativo del ADN.**
- **Disminuyó las concentraciones plasmáticas de colesterol y glucosa.**

**Su consumo diario podría ser útil como antioxidante natural, contribuyendo a mejorar la fotoprotección y la prevención del envejecimiento cutáneo, así como en la prevención de hiperlipemia y diabetes tipo 2.**

**#7**

**RESUMEN /  
SUMMARY**

...the first of these is the fact that the ...

...the second of these is the fact that the ...

...the third of these is the fact that the ...

...the fourth of these is the fact that the ...

...the fifth of these is the fact that the ...

...the sixth of these is the fact that the ...

...the seventh of these is the fact that the ...

...the eighth of these is the fact that the ...

...the ninth of these is the fact that the ...

...the tenth of these is the fact that the ...

...the eleventh of these is the fact that the ...

...the twelfth of these is the fact that the ...

...the thirteenth of these is the fact that the ...

...the fourteenth of these is the fact that the ...

...the fifteenth of these is the fact that the ...

...the sixteenth of these is the fact that the ...

...the seventeenth of these is the fact that the ...

...the eighteenth of these is the fact that the ...

# 7

## RESUMEN /SUMMARY

Los avances científicos, en el campo de la nutrición y la salud de las últimas décadas, muestran que cada vez hay una mayor evidencia entre el consumo de polifenoles y sus efectos beneficiosos sobre la salud, justificando conocimientos ancestrales utilizados en la medicina tradicional, como es el caso del té verde con alto contenido en polifenoles siendo las catequinas el grupo principal. Los polifenoles, son reconocidos como antioxidantes dietéticos, y poseen efectos beneficiosos diversos como son las propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y neuroprotectoras, entre otras. Aunque los mecanismos de acción que desarrollan estos compuestos y sus metabolitos no se conocen en su totalidad, la regulación del estrés oxidativo es una de sus actividades biológicas que a su vez están relacionadas con varias enfermedades como el cáncer, diabetes, enfermedades degenerativas y envejecimiento.

En la actualidad, el desarrollo de alimentos funcionales viene justificado por los notables cambios en nuestra sociedad y sobre todo por los hábitos alimentarios de la población en los países desarrollados, como por ejemplo, el aumento en la esperanza de vida de la población, los mayores niveles de estrés y la creciente preocupación por conservarnos saludables a lo largo de los años. En este contexto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido diseñar, desarrollar y evaluar la eficacia de un producto rico en polifenoles que reduzca el daño oxidativo en individuos sanos.

Para la consecución de este objetivo se llevaron a cabo cuatro estudios, agrupados en tres fases que resumimos a continuación. En la primera fase (diseño de producto), se planteó la necesidad de hacer un estudio ([estudio 1](#)) para conocer qué cantidad de catequinas tienen las infusiones de té verde comercializadas en España. A continuación se identificaron y seleccionaron extractos de té verde comerciales ([estudio 2](#)), para ser incorporados en el alimento funcional, en base al contenido en catequinas, cafeína y al impacto sensorial sobre el producto final. En la siguiente fase se desarrolló el producto teniendo en cuenta los objetivos nutricionales que se perseguían (equivalencia de catequinas y EGCG, antocianidinas y quercetina de 2 tazas de té verde, una ración de frutas rojas y una manzana respectivamente) y los

resultados obtenidos en los estudios anteriores. Seguidamente, se caracterizaron los compuestos bioactivos del producto desarrollado y se evaluó la estabilidad y aceptabilidad durante la vida comercial (estudio 3). Por último, en la tercera fase se realizó un ensayo clínico aleatorizado doble ciego con 40 sujetos sanos, durante el cual los participantes ingirieron una dosis diaria del producto rico en polifenoles o un placebo durante 10 semanas (estudio 4). En el estudio se evaluó la eficacia tanto a nivel sistémico, mediante la determinación de marcadores de estrés oxidativo (estudio 4.1), como a nivel cutáneo utilizando radiación UVB y determinado el efecto fotoprotector.

Los resultados de dichos estudios revelaron que el producto desarrollado es seguro, reduciendo significativamente los niveles de F2-isoprostanos y MDA (marcadores de peroxidación lipídica). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de LDL oxidada, proteína C reactiva y ratio GSSG/GSH. Asimismo, tras la inducción de estrés oxidativo mediante radiación ultravioleta en el grupo que tomó el producto rico en polifenoles se observó un efecto fotoprotector, al mejorar la dosis mínima para producir eritema (MED). En los sujetos a los que se les hizo una biopsia cutánea para evaluar el daño producido a nivel celular no se encontraron resultados significativos para el daño al ADN (medido como dímeros de pirimidina) y para los parámetros de protección genómica (expresión de p53 y células apoptóticas). Sin embargo, se observó una posible tendencia inmunoprotectora mediante la preservación del número de células de Langerhans. El producto no tuvo efectos significativos sobre parámetros de calidad de la piel (hidratación, pérdida transepidérmica del agua y elasticidad).

## SUMMARY

Over the past decades, scientific advances in the field of nutrition and health have showed the increased evidence between the consumption of polyphenols and their beneficial effects on health, justifying ancestral knowledge used in traditional medicine, as is the case of green tea polyphenols, being the catechins the main group. Polyphenols are recognized as dietary antioxidants, and have several beneficial effects such as anti-inflammatory, anti-cancer and neuroprotective properties, among others. Although the mechanisms of actions of these compounds and their metabolites are not fully known, the regulation of oxidative stress is one of the biological activities related to several diseases such as cancer, diabetes, degenerative diseases and aging.

Nowadays, the development of functional foods is justified by the significant changes in our society, namely, the increase in life expectancy, the higher social stress levels and the growing concern about keeping us healthy over the years, which have had dramatical consequences on individuals' eating habits in developed countries. In this context, the general objective of this thesis has been to design, develop and evaluate the efficacy of a product rich in polyphenols that reduces oxidative damage in healthy individuals.

To achieve this goal, four empirical studies, grouped in three phases, were carried. In the first phase (product design), we did a study ([Study 1](#)) to assess the amount of catechins in green tea infusions sold in Spain. Then, we identified and selected commercial green tea extracts ([Study 2](#)) to be added in the functional food based on the catechin and caffeine content, as well as sensory impact in the final product. In the next phase, we developed the product taking into account the target nutritional objectives (equivalence of catechins and EGCG in 2 cups of green tea, quercetin content in an apple, and anthocyanins content of one serving of red berries), and the results obtained in prior research. Next, the bioactive compounds of the developed product were characterized, and stability and acceptability were evaluated during shelf life ([Study 3](#)). Finally, in the third phase, a randomized double-blind clinical trial with 40 healthy subjects was performed, in which the participants were allocated to consume a daily dose of the product rich in polyphenols or a placebo for 10 weeks ([Study 4](#)). We evaluated the efficacy in blood measuring biomarkers of oxidative stress, and in the skin by the exposure of UVB radiation and the measurement of photoprotection.



The results of these studies showed that the product is safe and significantly reduced the levels of F2-isoprostane and MDA (markers of lipid peroxidation). On the other hand, no significant differences in plasma concentrations of oxidized LDL, CRP and GSSG / GSH ratio were found. Moreover, after the induction of oxidative stress by ultraviolet radiation in the treatment group, a photoprotective effect was observed by the increase of the minimum erythematous dose (MED). In the subjects where we took skin biopsies to assess the damage at cellular level, no significant differences were found for DNA damage (measured as pyrimidine dimers) and genomics protection parameters (p53 expression and number of sunburn cells). However, an immunoprotective trend was observed by preserving the number of Langerhans cells. The product did not show any significant improvements on skin quality parameters (hydration, transepidermal water loss and elasticity).

**#8**

# **BIBLIOGRAFÍA**



# 8

## BIBLIOGRAFÍA



### REFERENCIAS

#### A

Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4032-4040. •

Ablij, H. C., & Meinders, A. E. (2002). C-reactive protein: history and revival. *European Journal of Internal Medicine*, 13(7), 412-422. •

Abraham, J., Campbell, C. Y., Cheema, A., Gluckman, T. J., Blumenthal, R. S., & Danyi, P. (2007). C-Reactive Protein in Cardiovascular Risk Assessment: A Review of the Evidence. *Journal of the Cardiometabolic Syndrome*, 2(2), 119-123. ••

#### LEYENDA

Los colores de los puntos (•) incluidos al final de cada referencia se corresponden con el capítulo en el cual se han referenciado.

• Introducción • Alimentos funcionales (2A) • Estrés oxidativo (2B) • Polifenoles y té verde (2C) y Resultados Te verde y producto (5A) • Materiales y métodos • Resultados ensayo clínico a nivel sistémico (5B) • Resultados ensayo clínico piel (5C)

Abramson, J. L., Hooper, W. C., Jones, D. P., Ashfaq, S., Rhodes, S. D., Weintraub, W. S., ... & Vaccarino, V. (2005). Association between novel oxidative stress markers and C-reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 178(1), 115-121. •

ADA. American Dietetic Association. (2002). Tracking trends. *Dietetics in Practice*. 2 (1), 1-4. •

Adhami, V. M., Syed, D. N., Khan, N., & Afaq, F. (2008). Phytochemicals for Prevention of Solar Ultraviolet Radiation-induced Damages†. *Photochemistry and photobiology*, 84(2), 489-500. •

- Afaq, F. (2011). Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(2), 144-151. •
- Afaq, F., Adhami, V. M., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2002). Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 7, d784-92. •
- Aggett, P. J. (2010). Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. *The American journal of clinical nutrition*, 91(5), 1433S-1437S. •
- Aggett, P. J., Antoine, J. M., Asp, N. G., Bellisle, F., Contor, L., Cummings, J. H., et al. (2005). Process for the assessment of scientific support for claims on foods. *European Journal of Nutrition*, 44, 1. • •
- Ahmed, N. U., Ueda, M., Nikaido, O., Osawa, T., & Ichihashi, M. (1999). High levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation. *British Journal of Dermatology*, 140(2), 226-231. •
- Akbulut, H., Akbulut, K. G., Icli, F., & Büyükcelik, A. (2003). Daily variations of plasma malondialdehyde levels in patients with early breast cancer. *Cancer Detection and Prevention*, 27(2), 122-126. •
- Alendaroglu, N. C., Dietz, U., Wolfram, S., Spahn-Langguth, H., & Langguth, P. (2008). Influence of green and black tea on folic acid pharmacokinetics in healthy volunteers: potential risk of diminished folic acid bioavailability. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 29(6), 335-348. •
- Alonso-Salces, R. M., Barranco, A., Abad, B., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2004). Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(10), 2938-2952. •
- Altman, D. G., Schulz, K. F., Moher, D., Egger, M., Davidoff, F., Elbourne, D., et al. (2001). The revised CONSORT statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration. *Ann Intern Med*, 134(8), 663-94. •
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paramás, A. M., ... & Battino, M. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(3), 289-294. • •
- American Dietetic Association (ADA). (2002). Tracking trends. *Dietetics in Practice*. 2 (1), 1-4. •
- Ames, B. N., & Shigenaga, M. K. (1992). Oxidants Are a Major Contributor to Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663(1), 85-96. •
- Amecua-Guerra, L. M., Springall del Villar, R., & Bojalil Parra, R. (2007). Proteína C reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. *Archivos de Cardiología de México*, 77(1), 58-66. •
- Ananingsih, V. K., Sharma, A., & Zhou, W. (2013). Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection. *Food Research International*, 50(2), 469-479. •
- Andriantsitohaina, C., Auger, T., Chataigneau, N., Etienne-Selloum, H., Li, M.C., Martinez, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols *Br J Nutr*, 108 (2012), pp. 1532-1549 •
- Andriantsitohaina, C., Auger, T., Chataigneau, N., Etienne-Selloum, H., Li, M.C., Martinez, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols *Br J Nutr*, 108 (2012), pp. 1532-1549. •
- AOAC. Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. •
- Arai, S. (1996). Studies on functional foods in Japan—State of the art. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(1), 9-15. •

Arai, S., Osawa, T., Ohigashi, H., YOSHIKAWA, M., KAMINOGAWA, S., WATANABE, M., ... & HIRAHARA, T. (2001). A mainstay of functional food science in Japan—history, present status, and future outlook. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(1), 1-13. •

Ares, G., & Gámbaro, A. (2007). Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite*, 49(1), 148-158. •

Asami, D.K., Hong, Y., Barrett, D.M. and Mitchell, A.E. Processing-induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches. *J Sci Food Agric.*2003, 83:56–63. •

Asensi, M., Sastre, J., Pallardo, F. V., Delaasuncion, J. G., Estrela, J. M., & Vina, J. (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical biochemistry*, 217(2), 323-328. •

Asp, E. H. (1999). Factors affecting food decisions made by individual consumers. *Food Policy*, 24(2), 287-294. •

Astill, C., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G., & Martin, P. T. (2001). Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5340-5347. • •

Aust, O., Stahl, W., Sies, H., Tronnier, H., & Heinrich, U. (2005). Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in human serum and protects against UV-light-induced erythema. *International journal for vitamin and nutrition research*, 75(1), 54-60. • •

Awad, M. A., & de Jager, A. (2002). Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. *Scientia Horticulturae*, 92(3), 265-276. •

Awad, M., Jager, A., van der Plas, L., van der Krol, A. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of Elstar and Jonagold apples during development and ripening. *Scientia Hort* 2001, 90:69-83. •

## B

Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., ... & Kondo, K. (2007). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 85(3), 709-717. •

Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5), 1464-1476. •

Bakowska, A., Kucharska, A. Z., & Oszmiański, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81(3), 349-355. •

Baladia, E., Basulto, J., Manera, M., Martínez, R., & Calbet, D. (2014). Efecto del consumo de té verde o extractos de té verde en el peso y en la composición corporal: revisión sistemática y metaanálisis. *Nutrición Hospitalaria*, 29(3), 479-490. •

Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(8), 693-704. •

Barberá, R., Farre, R. (1992). Biodisponibilidad de los elementos traza. *Revista española de ciencia y tecnología de alimentos*. 1992, 32 (4): 381-399. •

Bardy, G., Virsolvy, A., Quignard, J. F., Ravier, M. A., Bertrand, G., Dalle, S., et al. (2013). Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. *British journal of pharmacology*, 169(5), 1102-1113. •

- Barr, R. M., Walker, S. L., Tsang, W., Harrison, G. I., Ettehadi, P., Greaves, M. W., & Young, A. R. (1999). Suppressed alloantigen presentation, increased TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1Ra, IL-10, and modulation of TNF-R in UV-irradiated human skin. *Journal of investigative dermatology*, 112(5), 692-698. •
- Bartosz, G. (2003). Total antioxidant capacity. *Advances in Clinical Chemistry*, 37, 219-292. •
- Basu, A., Betts, N. M., Nguyen, A., Newman, E. D., Fu, D., & Lyons, T. J. (2014). Freeze-dried strawberries lower serum cholesterol and lipid peroxidation in adults with abdominal adiposity and elevated serum lipids. *The Journal of nutrition*, 144(6), 830-837. •
- Basu, A., Betts, N. M., Ortiz, J., Simmons, B., Wu, M., & Lyons, T. J. (2011). Low-energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with metabolic syndrome. *Nutrition Research*, 31(3), 190-196. •
- Basu, A., Du, M., Leyva, M. J., Sanchez, K., Betts, N. M., Wu, M., ... & Lyons, T. J. (2010). Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. *The Journal of nutrition*, 140(9), 1582-1587. •
- Basu, A., Sanchez, K., Leyva, M. J., Wu, M., Betts, N. M., Aston, C. E., & Lyons, T. J. (2010). Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(1), 31-40. ••
- Basu, A., Wilkinson, M., Penugonda, K., Simmons, B., Betts, N. M., & Lyons, T. J. (2009). Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr J*, 8(1), 1-7. ••
- Bazinet, L., Labbé, D., & Tremblay, A. (2007). Production of green tea EGC-and EGCG-enriched fractions by a two-step extraction procedure. *Separation and Purification Technology*, 56(1), 53-56. •
- Beal, M. F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 797-803. •
- Bech-Larsen, T., & Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 18(4), 231-234.
- Beckeman, M., & Skjöldebrand, C. (2007). Clusters/networks promote food innovations. *Journal of food engineering*, 79(4), 1418-1425. •
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19633-19636. •
- Benzie IF, Szeto YT, Strain JJ, Tomlinson B. Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nutr Cancer* 1999; 34: 83-7. •
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. •
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316. •
- Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, et al. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Res*. 2006;66:1234-1240. ••

Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2011). USDA database for the flavonoid content of selected foods, Release 3.1. Beltsville: US Department of Agriculture, 03-1. •

Bhagwat, S., Haytowitz, D.B. 2015. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.2. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page:<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>. •

Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129. •

Biström, M., & Nordström, K. (2002). Identification of key success factors of functional dairy foods product development. *Trends in Food Science & Technology*, 13(11), 372-379. •

Bleiel, J. (2010). Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success?. *International Dairy Journal*, 20(4), 303-306. •

Bloom, D. E. (2011). 7 billion and counting. *Science*, 333(6042), 562-569. •

Bobinaitė, R., Viškelis, P., & Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(3), 1495-1501. •

Boelsma, E., Van de Vijver, L. P., Goldbohm, R. A., Klöpping-Ketelaars, I. A., Hendriks, H. F., & Roza, L. (2003). Human skin condition and its associations with nutrient concentrations in serum and diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 348-355. •

Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., & Schwartz, S. J. (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 221-226. •

Bondia-Pons, I., Ryan, L., & Martinez, J. A. (2012). Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68(4), 701-711. •

Bonkovsky, H. L. (2006). Hepatotoxicity associated with supplements containing Chinese green tea (*Camellia sinensis*). *Annals of internal medicine*, 144(1), 68. •

Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F., & Falcao, L. D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 594-599. •

Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. j*, 134, 707-716. •

Brassington, F., & Pettitt, S. (2003). *Principles of Marketing*. FT Prentice-Hall International Editions, Englewood Cliffs, NJ. •

Brauer, M., Amann, M., Burnett, R. T., Cohen, A., Dentener, F., Ezzati, M., ... & Thurston, G. D. (2012). Exposure assessment for estimation of the global burden of disease attributable to outdoor air pollution. *Environmental science & technology*, 46(2), 652-660. •

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998; 56 (11): 317-333. •

Breusing, N., Grune, T., Andrisic, L., Atalay, M., Bartosz, G., Biasi, F., et al. (2010). An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free radical research*, 44(10), 1203-1215. •



Brink, N., Szamel, M., Young, A. R., Wittern, K. P., & Bergemann, J. (2000). Comparative quantification of IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-10r, TNF $\alpha$  and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflammation Research*, 49(6), 290-296. •

Brownmiller, C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of food science*, 73(5), H72-H79. •

Buendía, B., Gil, M. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., y col. (2009). HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3916-3926. • •

Burns, J., Gardner, P. T., Matthews, D., Duthie, G. G., Lean, J., & Crozier, A. (2001). Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5797-5808. •

Burren, R., Scaletta, C., Frenk, E., Panizzon, R. G., & Applegate, L. A. (1998). Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I+ II and solar simulating radiations. *International journal of cancer*, 76(2), 201-206. •

Burton-Freeman, B., Linares, A., Hyson, D., & Kappagoda, T. (2010). Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(1), 46-54. •

Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., & Winterbourn, C. C. (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 361-366. •

Bykov, V. J., Sheehan, J. M., Hemminki, K., & Young, A. R. (1999). In situ repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6–4 photoproducts in human skin exposed to solar simulating radiation. *Journal of investigative dermatology*, 112(3), 326-331. •

## C

Cabrera C., Giménez R. and López M.C., Determination of tea components with antioxidant activity, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51 (15) (2003), pp. 4427–4435. •

Cabrera, C., Artacho, R. and Gimenez, R. (2006) Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25, 79-99. •

Cadet, J., Sage, E., & Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1), 3-17. •

Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual-Teresa, S., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4606-4612. •

Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol Med.* 1997; 22: 749-760. •

Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology and medicine*, 14(3), 303-311. •

Cardona, F., Andres-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., Queipo-Ortuno, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* 24: 1415–1422. •

Casciola-Rosen, L., Wigley, F., & Rosen, A. (1997). Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 185(1), 71-80. •

Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009b). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871. •

Castañeda-Ovando, A., Galán-Vidal, C. A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Rodríguez, J. A., & Páez-Hernández, M. E. (2009a). Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas Metal content evaluation and its effect on the stability of anthocyanins. *CyTA-Journal of Food*, 7(3), 225-232. •

Cesarini, J. P., Michel, L., Maurette, J. M., Adhoute, H., & Bejot, M. (2003). Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 19(4), 182-189. •

Chadwick, C. A., Potten, C. S., Nikaido, O., Matsunaga, T., Proby, C., & Young, A. R. (1995). The detection of cyclobutane thymine dimers, (6-4) photolesions and the Dewar photoisomers in sections of UV-irradiated human skin using specific antibodies, and the demonstration of depth penetration effects. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 28(2), 163-170. • •

Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic, 764-775. •

Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. L. B. E. R. T. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3), 527-605. •

Checkoway, H., Powers, K., Smith-Weller, T., Franklin, G. M., Longstreth, W. T., & Swanson, P. D. (2002). Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *American Journal of Epidemiology*, 155(8), 732-738. •

Cheeseman, K. H. (1993). Lipid peroxidation and cancer. *DNA and free radicals*, 109-144. •

Cheftel, J. C. (2005). Food and nutrition labelling in the European Union. *Food Chemistry*, 93(3), 531-550. •

Chen, C. N., Liang, C. M., Lai, J. R., Tsai, Y. J., Tsay, J. S., & Lin, J. K. (2003). Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7495-7503. •

Chen, D., Wan, S. B., Yang, H., Yuan, J., Chan, T. H., & Dou, Q. P. (2011). EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Advances in clinical chemistry*, 53, 155. •

Chen, D., Zhou, Y., Lyons, K. E., Pahwa, R., & Reddy, M. B. (2015). Green Tea Consumption Reduces Oxidative Stress in Parkinson's disease Patients. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 5(06), 194. *American Journal of Epidemiology*, 155(8), 732-738. •

Chen, Z. Y., Zhu, Q. Y., Tsang, D., & Huang, Y. (2001). Degradation of green tea catechins in tea drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 477-482. •

Chinembiri, T. N., du Plessis, L. H., Gerber, M., Hamman, J. H., & du Plessis, J. (2014). Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules*, 19(8), 11679-11721. •

Chiva-Blanch, G., & Visioli, F. (2012). Polyphenols and health: moving beyond antioxidants. *J. Berry Res*, 2(2), 63-71. •

Chiva-Blanch, G., & Visioli, F. (2012). Polyphenols and health: moving beyond antioxidants. *J. Berry Res*, 2(2), 63-71. •

Chobanian, A. V. (2003). Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee: Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 42, 1206-1252. •

Choi, M. H., Kim, G. H., & Lee, H. S. (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35(8), 753-759. •

Chong, R. Macdonald, J.A. Lovegrove Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr*, 104 (Suppl. 3) (2010), pp. S28–S39•

Chong, R. Macdonald, J.A. Lovegrove Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr*, 104 (Suppl. 3) (2010), pp. S28–S39. •

Chow HH, Cai Y, Hakim IA, et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 2003;9:3312–9. •

Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet*. 2009 Oct 3; 374(9696):1196–208. •

Chung, F. L., Schwartz, J., Herzog, C. R., & Yang, Y. M. (2003). Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3268S-3274S. •

Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuique-Mayer, C., & Dornier, M. (2009). Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the Arrhenius, Eyring, and Ball models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6285-6291. •

Clarke, K. A., Dew, T. P., Watson, R. E., Farrar, M. D., Osman, J. E., Nicolaou, A., ... & Williamson, G. (2015). Green tea catechins and their metabolites in human skin before and after exposure to ultraviolet radiation. *The Journal of nutritional biochemistry*. •

Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., & Muller, H. K. (2001). Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology*, 79(6), 547-568. •

Coimbra S, Santos-Silva A, Rocha-Pereira P, Rocha S, Castro E: Green tea consumption improves plasma lipid profiles in adults. *Nutr Res* 26 :604 –607, 2006. •

Coimbra, S., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Rebelo, I., Rocha, S., & Santos-Silva, A. (2006). The effect of green tea in oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25(5), 790-796. •

Cole, C., Appa, Y., & Ou-Yang, H. (2014). A broad spectrum high-SPF photostable sunscreen with a high UVA-PF can protect against cellular damage at high UV exposure doses. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 30(4), 212-219. •

Colipa. INTERNATIONAL SUN PROTECTION FACTOR TEST METHOD, 2006, European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), Brussels. •

Collins, T., & Cybulsky, M. I. (2001). NF- $\kappa$ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?. *Journal of Clinical Investigation*, 107(3), 255. •

Comalada, M., Ballester, I., Bailon, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., ... & Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure–activity relationship. *Biochemical pharmacology*, 72(8), 1010-1021. •

Comision Europea Eurobarometro 332•

Connors, M., Bisogni, C. A., Sobal, J., & Devine, C. M. (2001). Managing values in personal food systems. *Appetite*, 36(3), 189-200. •

Cook, J. D. (2005). Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18(2), 319-332. •

Cooper, 2003. R.G. Cooper (Ed.), *Profitable product innovation: The critical success factors*, Elsevier Science Ltd, Canada (2003). •

Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in dermatology*, 27(2), 175-194. •

Costa and Jongen, 2006. A.I.A. Costa, W.M.F. Jongen. *New insights into consumer-led food product development*. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (8) (2006). •

Cox, T., & Rial-Gonzalez, E. (2002). Work-related stress: the European picture. *Magazine of the European Agency for Safety and Health at work*, 5, 4-6. •

Craig, W. J. (1997). Phytochemicals: guardians of our health. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(10), S199-S204. •

Cristalli, D. O., Arnal, N., Marra, F. A., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2012). Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Journal of the neurological sciences*, 314(1), 48-56. •

Crozier, T. W., Stalmach, A., Lean, M. E., & Crozier, A. (2012). Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. *Food & function*, 3(1), 30-33. •

## D

D O'Reilly, J., Mallet, A. I., McAnlis, G. T., Young, I. S., Halliwell, B., Sanders, T. A., & Wiseman, H. (2001). Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *The American journal of clinical nutrition*, 73(6), 1040-1044. •

D'Archivio, M., Filesì, C., Vari, R., Scaccocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342. • •

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), 601-623. •

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, 329(1), 23-38. •

Danesi, F., Philpott, M., Huebner, C., Bordonì, A., & Ferguson, L. R. (2010). Food-derived bioactives as potential regulators of the IL-12/IL-23 pathway implicated in inflammatory bowel diseases. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690(1), 139-144. •

Datamonitor. (2008). *Functional Foods, drinks and ingredients: Consumer attitudes and trends*, 1-97. Reference Code: DMCM4602. •

Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 48-54. •

Davi, G., Guagnano, M. T., Ciabattoni, G., Basili, S., Falco, A., Marinopicolì, M., ... & Patrono, C. (2002). Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *Jama*, 288(16), 2008-2014. •

Davinelli, S., Bertoglio, J. C., Zarrelli, A., Pina, R., & Scapagnini, G. (2015). A Randomized Clinical Trial Evaluating the Efficacy of an Anthocyanin–Maqui Berry Extract (Delphinol®) on Oxidative Stress Biomarkers. *Journal of the American College of Nutrition*, 34(sup1), 28-33. •

de la Asunción, J. G., del Olmo, M. L., Gómez-Cambronero, L. G., Sastre, J., Pallardó, F. V., & Viña, J. (2004). AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: protective effect of vitamins C and E. *Life sciences*, 76(1), 47-56. •

de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Boucher, P., & Mamelle, N. (1998). Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Archives of Internal Medicine*, 158(11), 1181-1187. •

De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chemistry*, 103(3), 935-943. •

de Vega, J. M. A., Díaz, J., Serrano, E., & Carbonell, L. F. (2002). Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine*, 30(8), 1782-1786. •

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 52ª asamblea general. Edimburgo, Escocia, Oct 2000 •

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892. •

Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316-328. ••

Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E., Brighenti, F., & Crozier, A. (2004). HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2807-2815. •

Denda, M., Sato, J., Tsuchiya, T., Elias, P. M., & Feingold, K. R. (1998). Low humidity stimulates epidermal DNA synthesis and amplifies the hyperproliferative response to barrier disruption: implication for seasonal exacerbations of inflammatory dermatoses. *Journal of investigative dermatology*, 111(5), 873-878. •

Des Jarlais, D. C., Lyles, C., & Crepaz, N. (2004). Improving the reporting quality of nonrandomized evaluations of behavioral and public health interventions: the TREND statement. *American journal of public health*, 94(3), 361-366. •

Díaz-García, M. C., Obón, J. M., Castellar, M. R., Collado, J., & Alacid, M. (2013). Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food chemistry*, 138(2), 938-949. •

Diffey BL. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002; 18:68-74. •

Diffey, B. L., Oliver, R. J., & Farr, P. M. (1984). A portable instrument for quantifying erythema induced by ultraviolet radiation. *British Journal of Dermatology*, 111(6), 663-672. •

Diplock, A. T. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *The American journal of clinical nutrition*, 53(1 Suppl), 189S-193S. •

Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. (1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81(Suppl 1), 1-27. •

do Val Carneiro, J. L., Nixdorf, S. L., Mantovani, M. S., Do Amaral, A. C. D. S., Aoki, M. N., Amarante, M. K., ... & Watanabe, M. A. E. (2009). Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 135(8), 997-1004. •

do Val Carneiro, J. L., Nunes, D. N., & Dias-Neto, E. (2014). Evaluation of the role of miRNA-4728-3p, a miRNA located in an intron of HER2 gene, in breast cancer stem cells. *Cancer Research*, 74(19 Supplement), 532-532. •

Donovan JL, DeVane CL, Chavin KD, Oates JC, Njoku C, Patrick KS, Fiorini RN, Markowitz JS. Oral Administration of a Decaffeinated Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract Did Not Alter Urinary 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ , a Biomarker for In Vivo Lipid Peroxidation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2005) 57: 1365-1369. •

Donovan, J. L., Vane, L., Chavin, K. D., Fiorini, R. N., Oates, J. C., Njoku, C., ... & Markowitz, J. S. (2005). Oral administration of a decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) extract did not alter urinary 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ , a biomarker for in-vivo lipid peroxidation. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 57(10), 1365-1369. •

Dragan, S., Andrica, F., Serban, M. C., & Timar, R. (2015). Polyphenols-rich natural products for treatment of diabetes. *Current medicinal chemistry*, 22(1), 14-22. •

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95. •

Du, J., Leten, B., & Vanhaverbeke, W. (2014). Managing open innovation projects with science-based and market-based partners. *Research Policy*, 43(5), 828-840. •

Dusting, G. J., & Triggle, C. (2005). Are we over oxidized? Oxidative stress, cardiovascular disease, and the future of intervention studies with antioxidants. *Vascular health and risk management*, 1(2), 93. •

## E

Earle, M.D., R.L. Earle, & A. Anderson. (2001). *Food Product Development*. Cambridge, England: Woodhead. •

Efron, B. (1979). Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The annals of Statistics*, 1-26. •

EFSA 2011a. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of an application for authorisation of a health claim (revision 1). *EFSA Journal* 2011; 9(5):2170. •

EFSA 2011b. EFSA Panel on Dietetic Products and Allergies (NDA), 2011: 9(4):2055. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (tea), including catechins in green tea, and improvement of endothelium-dependent vasodilation (ID 1106, 1310), maintenance of normal blood pressure (ID 1310, 2657), maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 1108), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 2640), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID 1110, 1119), protection of DNA from oxidative damage (ID 1120, 1121), protection of lipids from oxidative damage (ID 1275), contribution to normal cognitive function (ID 1117, 2812), “cardiovascular system” (ID 2814), “invigoration of the body” (ID 1274, 3280), decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 1118), “immune health” (ID 1273) and “mouth” (ID 2813) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. •

EFSA 2011c. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. *EFSA Journal* 2011; 9(12):2474.[13pp.]. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal). •

EFSA. The EFSA Comprehensive European Food Consumption Database [http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datex\\_fooddbhtm.2011](http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datex_fooddbhtm.2011). •

EFSA, N (2010b). Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 2010; 8(3):1462. •

EFSA, N. (2010a). Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal* 2010; 8(3):1461. •

EFSA, N. (2012). Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2012. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal*, 10(2), 2557. •

EFSA, N. (2013). Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2013. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for energy. *EFSA Journal*, 11(1), 3005. •

Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otsuka, M., ... & Becker, A. E. (2001). Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*, 103(15), 1955-1960. ••

Eichenberger, P., Colombani, P. C., & Mettler, S. (2009). Effects of 3-week consumption of green tea extracts on whole-body metabolism during cycling exercise in endurance-trained men. *International journal for vitamin and nutrition research*, 79(1), 24-33. ••

Emara, A. M., & El-Bahrawy, H. (2008). Green tea attenuates benzene-induced oxidative stress in pump workers. *Journal of immunotoxicology*, 5(1), 69-80. •

Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi PL, Testolin G. Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem*. 2005;16:144–9. •

Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schüz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E. W., & Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk?. *International Journal of Cancer*, 132(2), 385-400. •

Ernst, H. (2002). Success factors of new product development: a review of the empirical literature. *International Journal of Management Reviews*, 4(1), 1-40. •

Eskiocak, S., Gozen, A. S., Yapar, S. B., Tavas, F., Kilic, A. S., & Eskiocak, M. (2005). Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. *Human Reproduction*, 20(9), 2595-2600. •

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 341-390. •

Euromonitor. (2010). Navigating wellbeing: today and tomorrow in functional food and drinks-world 2011, from [www.euromonitor.com](http://www.euromonitor.com). •

European Commission. Tobacco. Special Eurobarometer 332/Wave 72.3. Book Tobacco. Special Eurobarometer 332/Wave 72.3. 2010 [http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/ebs332\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/tobacco/docs/ebs332_en.pdf). •

Everson, C. A., Laatsch, C. D., & Hogg, N. (2005). Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(2), R374-R383. •

Expert Panel on Detection, E. (2001). Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*, 285(19), 2486. •

Expert Working Group. (1996). of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guideline for Industry, Structure and Content of Clinical Study Reports. •

## F

Fairweather-Tait, S., & Hurrell, R. F. (1996). Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutrition Research Reviews*, 9(01), 295-324. •

Falk, L. W., Bisogni, C. A., & Sobal, J. (1996). Food choice processes of older adults: a qualitative investigation. *Journal of Nutrition Education*, 28(5), 257-265. •

Faniani, F., Mac-Mary, S., Jeudy, A., Lihoreau, T., Messikh, R., Ortonne, J. P., ... & Humbert, P. (2013). Efficacy of micronutrient supplementation on skin aging and seasonal variation: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Clinical interventions in aging*, 8, 1527. •

Farr, P. M., Besag, J. E., & Diffey, B. L. (1988). The time course of UVB and UVC erythema. *Journal of investigative dermatology*, 91(5), 454-457. •

Farvid, M. S., Homayouni, F., Kashkalani, F., Shirzadeh, L., Valipour, G., & Farahnak, Z. (2013). The associations between oxygen radical absorbance capacity of dietary intake and hypertension in type 2 diabetic patients. *Journal of human hypertension*, 27(3), 164-168. •

Fenercioglu, A. K., Saler, T., Genc, E., Sabuncu, H., & Altuntas, Y. (2010). The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of endocrinological investigation*, 33(2), 118-124. •

Fernandez, P. L., Pablos, F., Martín, M. J., & Gonzalez, A. G. (2002). Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 76(4), 483-489. •

Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *ALAN*, 56(2), 110-122. •

Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. • •

Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S., & Voorhees, J. J. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. •

Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., & Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of dermatology*, 138(11), 1462-1470. •

Fitzpatrick (2005). *Dermatología en Medicina General*. 7ª Edición. •

Fitzpatrick, TB. (1975). Soleil et peau (Sun and skin). *Journal de Médecine Esthétique*, 2, 33-34.

Flaten, T. P. (2002). Aluminium in tea—concentrations, speciation and bioavailability. *Coordination Chemistry Reviews*, 228(2), 385-395. •

Fonollá, J., López-Huertas, E., Machado, F. J., Molina, D., Álvarez, I., Mármol, E., ... & Marti, J. L. (2009). Milk enriched with “healthy fatty acids” improves cardiovascular risk markers and nutritional status in human volunteers. *Nutrition*, 25(4), 408-414. •

Fraga, C. G., Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., Carrasquedo, F., Lotito, S. B., Lazarus, S., et al. (2005). Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Journal of Immunology Research*, 12(1), 11-17. •



Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., & Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1), 3-22. •

Fraser, C. G. (2001). *Biological variation: from principles to practice*. Amer. Assoc. for Clinical Chemistry.

Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), 412. •

Freese, R., Basu, S., Hietanen, E., Nair, J., Nakachi, K., Bartsch, H. & Mutanen, M. (1999) Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *Eur. J. Nutr.* 38:149-157. • •

Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, 97(3), S5-S13. •

Frei, B., & Higdon, J. V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3275S-3284S. •

Frejngel, S., & Wroblewska, M. (2010). Comparative effect of green tea, chokeberry and honeysuckle polyphenols on nutrients and mineral absorption and digestibility in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 56(3), 163-169. •

French, S. (2006). Functional foods: the next phase. *Food and Beverage International*, 5, 19-20. •

Frías-Navarro, D. (2010). CONSORT 2010: Adapted Spanish translation. Spain: University of Valencia. <https://www.uv.es/friasnav/CONSORTSpanish.pdf>. •

Friedman, M., Levin, C. E., Choi, S. H., Lee, S. U., & Kozukue, N. (2009). Changes in the Composition of Raw Tea Leaves from the Korean Yabukida Plant during High-Temperature Processing to Pan-Fried Kamairi-Cha Green Tea. *Journal of food science*, 74(5), C406-C412. •

Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S., Stocker, R., Cheng, D., y col. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 43(14), 1144-1170. • •

Fritz, H., Seely, D., Kennedy, D. A., Fernandes, R., Cooley, K., & Fergusson, D. (2012). Green tea and lung cancer: a systematic review. *Integrative cancer therapies*, 1534735412442378. •

Fuller, C. J., & Jialal, I. (1994). Effects of antioxidants and fatty acids on low-density-lipoprotein oxidation. *The American journal of clinical nutrition*, 60(6), 1010S-1013S. •

Furst, T., Connors, M., Bisogni, C. A., Sobal, J., & Falk, L. W. (1996). Food choice: a conceptual model of the process. *Appetite*, 26(3), 247-266. •

## G

Gaboriau, F., Morliere, P., Marquis, I., Moysan, A., Goetze, M., & Dubertret, L. (1993). Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochemistry and photobiology*, 58(4), 515-520. •

Gao, M., Ma, W., Chen, X. B., Chang, Z. W., Zhang, X. D., & Zhang, M. Z. (2013). Meta-analysis of green tea drinking and the prevalence of gynecological tumors in women. *Asia-Pacific Journal of Public Health*, 25(4 suppl), 43S-48S. •

García-Alonso, F. J., Periago, M. J., Vidal-Guevara, M. L., Cantos, E., Ros, G., Ferreres, R., & Abellán, P. (2003). Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry, and berries. *Journal of food science*, 68(4), 1525-1530. • •

- García-Viguera, C., & Bridle, P. (1999). Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 64(1), 21-26. •
- Gerber, A., Evers, T., Haverkamp, H., & Lauterbach, K. W. (2006). Cost-benefit analysis of a plant sterol containing low-fat margarine for cholesterol reduction. *The European Journal of Health Economics*, 7(4), 247-254. •
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 29-36. •
- Gil, L., Siems, W., Mazurek, B., Gross, J., Schroeder, P., Voss, P., & Grune, T. (2006). Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free radical research*, 40(5), 495-505. •
- Gilchrest, B. A., Soter, N. A., Hawk, J. L., Barr, R. M., Black, A. K., Hensby, C. N., ... & Parrish, J. A. (1983). Histologic changes associated with ultraviolet A-induced erythema in normal human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 9(2), 213-219. •
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT-Food Science and Technology*, 47(2), 279-286. • •
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research*, 39(8), 1529-1542. •
- Global Age Watch Index. (2015). Population age 60 and over in 2015, 2030 and 2050. UNDESA Population Division, World Population Prospects: the 2015 Revision, DVD edition, 2015. •
- Gollnick, H. P. M., Hopfenmüller, W., Hemmes, C., Chun, S. C., Schmid, C., Sundermeier, K., & Biesalski, H. K. (1996). Systemic beta carotene plus topical UV-sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: results of the Berlin-Eilath study. *EJD. European journal of dermatology*, 6(3), 200-205. •
- Gönenç, A., Özkan, Y., Torun, M., & Şimşek, B. (2001). Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 26(2), 141-144. • •
- González-Ferrero, C., & Sáiz-Abajo, M. J. (2015). Characterization and stability studies of bioactive compounds and food matrices as evidence in support of health claims. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(sup1), S4-S12. • •
- Gotz, H. (1980). Analysis of carbohydrates in food by HPLC. *Hewlett Packard Appl. Note AN232-14*. •
- GRADE Working Group. (2004). Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ: British Medical Journal*, 328(7454), 1490. •
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive medicine*, 21(3), 334-350. •
- Greilberger, J., Koidl, C., Greilberger, M., Lamprecht, M., Schroecksadel, K., Leblhuber, F., ... & Oettl, K. (2008). Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free radical research*, 42(7), 633-638. •
- Griffin, I. J., Davila, P. M., & Abrams, S. A. (2002). Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S187-S191. •
- Griffiths, C. E. M., Dearman, R. J., Cumberbatch, M., & Kimber, I. (2005). Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man. *Cytokine*, 32(2), 67-70. •

Grove, K. A., & Lambert, J. D. (2010). Laboratory, epidemiological, and human intervention studies show that tea (*Camellia sinensis*) may be useful in the prevention of obesity. *The Journal of nutrition*, 140(3), 446-453. •

Guo, M., Jin, T. Z., Geveke, D. J., Fan, X., Sites, J. E., & Wang, L. (2014). Evaluation of microbial stability, bioactive compounds, physicochemical properties, and consumer acceptance of pomegranate juice processed in a commercial scale pulsed electric field system. *Food and Bioprocess Technology*, 7(7), 2112-2120. •

Guthold, R., Ono, T., Strong, K. L., Chatterji, S., & Morabia, A. (2008). Worldwide variability in physical inactivity: a 51-country survey. *American journal of preventive medicine*, 34(6), 486-494. •

Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in biochemical sciences*, 15(4), 129-135. •

Hager, A., Howard, L. R., Prior, R. L., & Brownmiller, C. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *Journal of Food Science*, 73(6), H134-H140. •

## H

Hakim IA, Harris RB, Brown S, Chow HH, Wiseman S, Agarwal S, Talbot W. Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *J Nutr* 2003; 133: 3303S-3309S. ••

Halliwell, B. (2005). Free radicals and other reactive species in disease. eLS. •

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5), 531-542. •

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1990). Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: an overview. •

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (Vol. 3, pp. 1-543). Oxford: Oxford university press. •

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. *Free radicals in biology and medicine*, 86. •

Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255. •

Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617. •

Halliwell, Free radicals and antioxidants-quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32(3) (2011), 125–130. •

Han KC, Wong WC, Benzie IF. Genoprotective effects of green tea (*Camellia sinensis*) in human subjects: results of a controlled supplementation trial. *Br J Nutr*. Sep2010;1-8. •

Handelman, G. J., Walter, M. F., Adhikarla, R., Gross, J., Dallal, G. E., Levin, N. W., & Blumberg, J. B. (2001). Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney international*, 59(5), 1960-1966. •

Harbour, R., & Miller, J. (2001). A new system for grading recommendations in evidence based guidelines. *BMJ: British Medical Journal*, 323(7308), 334. •

Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104-109. •

Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. GerontoL*, 11, 298-300. •

- Harrison, G. I., & Young, A. R. (2002). Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin. *Methods*, 28(1), 14-19. •
- Hartmann, A., Patz, C. D., Andlauer, W., Dietrich, H., & Ludwig, M. (2008). Influence of processing on quality parameters of strawberries. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 56(20), 9484-9489. •
- Hasler, C. M. (2000). The changing face of functional foods. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup5), 499S-506S. •
- Hasler, C. M. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of nutrition*, 132(12), 3772-3781. •
- Hasler, C. M., & Brown, A. C. (2009). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 735-746. •
- Hawk, J. L. M., Murphy, G. M., & Holden, C. A. (1988). The presence of neutrophils in human cutaneous ultraviolet-B inflammation. *British Journal of Dermatology*, 118(1), 27-30. •
- Haytowitz, D. B., & Bhagwat, S. (2010). USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, Release 2. US Department of Agriculture. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>. • •
- Haytowitz, D.B., Bhagwat, S.A., Prior, R.L., Wu, X., Gebhardt, S.E., Holden, J.M. 2007. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Food. Release 1. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>. •
- Heinrich, U., Gärtner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H., & Stahl, W. (2003). Supplementation with  $\beta$ -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *The Journal of nutrition*, 133(1), 98-101. •
- Heinrich, U., Gärtner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H., & Stahl, W. (2003). Supplementation with  $\beta$ -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *The Journal of nutrition*, 133(1), 98-101. •
- Heinrich, U., Moore, C. E., De Spirt, S., Tronnier, H., & Stahl, W. (2011). Green tea polyphenols provide photoprotection, increase microcirculation, and modulate skin properties of women. *The Journal of nutrition*, 141(6), 1202-1208. •
- Heinrich, U., Neukam, K., Tronnier, H., Sies, H., & Stahl, W. (2006). Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. *The Journal of nutrition*, 136(6), 1565-1569. • •
- Henning SM, Niu Y, Liu Y, Lee NH, Hara Y, Thames GD, Minutti RR, Carpenter CL, Wang H, Heber D. Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 610-6. •
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L., & Heber, D. (2003). Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and cancer*, 45(2), 226-235. • •
- Henning, S. M., Seeram, N. P., Zhang, Y., Li, L., Gao, K., Lee, R. P., ... & Heber, D. (2010). Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum. *Journal of medicinal food*, 13(1), 116-122. •
- Henning, S. M., Wang, P., Carpenter, C. L., & Heber, D. (2013). Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenomics*, 5(6), 729-741. •

Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., & Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1456-1462. •

Hirano-Ohmori R., Takahashi R., Momiyama Y., Taniguchi H., Yonemura A., Tamai S., Umegaki K., Nakamura H., Kondo K., Ohsuzu F.: Green tea consumption and serum malondialdehyde-modified LDL concentrations in healthy subjects. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2005; 24: 342-346. •

Hodgson, J. M., Croft, K. D., Mori, T. A., Burke, V., Beilin, L. J., & Puddey, I. B. (2002). Regular ingestion of tea does not inhibit in vivo lipid peroxidation in humans. *The Journal of nutrition*, 132(1), 55-58. ••

Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Croft, K. D., Burke, V., Mori, T. A., Caccetta, R. A. & Beilin, L. J. (2000) Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1103-1107. •

Hogenkamp, P. S., Jerling, J. C., Hoekstra, T., Melse-Boonstra, A., & MacIntyre, U. E. (2008). Association between consumption of black tea and iron status in adult Africans in the North West Province: the THUSA study. *British journal of nutrition*, 100(02), 430-437. •

Höger, P. (2013). Nutrition-derived bioactive metabolites produced by gut microbiota and their potential impact on human health. *Nutrition and Medicine*, 1(1). •

Holliday, R. (1999). Ageing in the 21st century. *Lancet*, 354, siv4. •

Hollman, P. C. (2014). Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics*, 559, 100-105. •

Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology*, 19(2), 73-82. •

Holtan, S. G., O'Connor, H. M., Fredericksen, Z. S., Liebow, M., y col. (2012). Food-frequency questionnaire-based estimates of total antioxidant capacity and risk of non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, 131(5), 1158-1168. •

Holub, B. J. (2002). Potential benefits of functional foods and nutraceuticals to reduce the risk and costs of diseases in Canada. *Agriculture and Agri-Food Canada*. •

Hosoya, N. (1998). Health claims in Japan. *Japanese Journal of Nutritional Food*, 1(3/4), 1-11. •

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856. •

Hulthe, J., & Fagerberg, B. (2002). Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(7), 1162-1167. •

Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American journal of clinical nutrition*, 91(5), 1461S-1467S. •

Hursel, R., Viechtbauer, W., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2009). The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *International journal of obesity*, 33(9), 956-961. •

## I

Ibero-Baraibar, I., Abete, I., Navas-Carretero, S., Massis-Zaid, A., Martinez, J. A., & Zulet, M. A. (2014). Oxidised LDL levels decreases after the consumption of ready-to-eat meals supplemented with cocoa extract within a hypocaloric diet. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(4), 416-422. •

IFST (1993) Shelf Life of Foods – Guidelines for Its Determination and Prediction. Institute of Food Science and Technology, London, UK. •

Inami S, Takano M, Yamamoto M, Murakami D, Tajika K, Yodogawa K, Yokoyama S, Ohno N, Ohba T, et al. Tea catechin consumption reduces circulating oxidized low-density lipoprotein. *Int Heart J.* 2007; 48:725–32. •

Inami, S., Takano, M., Yamamoto, M., Murakami, D., Tajika, K., Yodogawa, K., ... & Mizuno, K. (2007). Tea catechin consumption reduces circulating oxidized low-density lipoprotein. *International heart journal*, 48(6), 725-732. •

Institute of Food Science and Technology (IFST). (1993). Shelf life of Foods-Guideline for its Determination and Prediction. IFST, London. •

Institute of Food Technologists Expert Report. IFT (2005): Functional Foods: Opportunities and Challenges. Chicago: Institute of Food Technologists. •

International Food Information Council (IFIC) Foundation. (2009). FOOD & HEALTH SURVEY. Consumer Attitudes toward Food, Nutrition & Health. A Trended Survey. •

International Food Information Council (IFIC). (2002). The consumer view on functional foods: yesterday and today. *Food Insight*, 2002 (May/June), 5, 8. •

International Food Information Council (IFIC). (2008). FOOD & HEALTH SURVEY. Consumer Attitudes toward Food, Nutrition & Health. A Trended Survey. •

Iso, H., Date, C., Wakai, K., Fukui, M., & Tamakoshi, A. (2006). The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Annals of Internal Medicine*, 144(8), 554-562. •

Iversen, C. K. (1999). Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *Journal of Food Science*, 64(1), 37-41. •

## J

James, P. A., Oparil, S., Carter, B. L., Cushman, W. C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., ... & Ortiz, E. (2014). 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *Jama*, 311(5), 507-520. •

Jenkins, D. J., Nguyen, T. H., Kendall, C. W., Faulkner, D. A., Bashyam, B., Kim, I. J., ... & Singer, W. (2008). The effect of strawberries in a cholesterol-lowering dietary portfolio. *Metabolism*, 57(12), 1636-1644. •

Jeon HY, Kim JK, Kim WG, et al. Effects of oral epigallocatechin gallate supplementation on the minimal erythema dose and UV-induced skin damage. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22:137–141. •

Jesus, A., Qingkun, L., Ariela, H., Misty J, E., & Karam, S. (2014). Protection Against Methamphetamine-induced Striatal Neurodegeneration by Epigallocatechin Gallate (EGCG) in the Mouse Brain. *Journal of Drug and Alcohol Research*, 2014. •

Johnson, J. J., Bailey, H. H., & Mukhtar, H. (2010). Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective. *Phytomedicine*, 17(1), 3-13. •

Johnson, J. R., Braddock, R. J., & Chen, C. S. (1995). Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. *Journal of Food Science*, 60(3), 502-505. •

Johnson, R., Bryant, S., & Huntley, A. L. (2012). Green tea and green tea catechin extracts: an overview of the clinical evidence. *Maturitas*, 73(4), 280-287. •

Jones, V., & Katiyar, S. K. (2013). Emerging phytochemicals for prevention of melanoma invasion. *Cancer letters*, 335(2), 251-258. •

Jówko, E., Długołęcka, B., Makaruk, B., & Cieśliński, I. (2014). The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *European journal of nutrition*, 1-9. •

Jurkiewicz, B. A., & Buettnerf, G. R. (1996). EPR Detection of Free Radicals in UV-Irradiated Skin: Mouse Versus Human. *Photochemistry and photobiology*, 64(6), 918-922. •

## K

Kaack, K., & Austed, T. (1998). Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52(3), 187-198. •

Kardum, N., Takić, M., Šavikin, K., Zec, M., Zdunić, G., Spasić, S., & Konić-Ristić, A. (2014). Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *Journal of Functional Foods*, 9, 89-97. •

Kathleen, L., Escott-stump, S., Raymond, J. L. (2012). *Krauser's Food and the Nutrition Care Process*. Elsevier Health Sciences. Ed. 13. •

Katiyar, S. K. (2007). UV-induced immune suppression and photocarcinogenesis: chemoprevention by dietary botanical agents. *Cancer letters*, 255(1), 1-11. •

Katiyar, S., Elmets, C. A., & Katiyar, S. K. (2007). Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(5), 287-296. •

Kaume, L., Gbur, E. E., DiBrezza, R., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2014). Antioxidant-rich berries exert modest bone protective effects in postmenopausal smokers without improving biomarkers of bone metabolism. *Journal of Functional Foods*, 9, 202-210. •

Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1740-1746. • •

Kennedy, J. A., & Taylor, A. W. (2003). Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 995(1), 99-107. •

Khan, F., Ray, S., Craigie, A. M., Kennedy, G., Hill, A., Barton, K. L., ... & Belch, J. J. (2014). Lowering of oxidative stress improves endothelial function in healthy subjects with habitually low intake of fruit and vegetables: A randomized controlled trial of antioxidant-and polyphenol-rich blackcurrant juice. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 232-237. •

Khan, N., & Mukhtar, H. (2013). Tea and health: studies in humans. *Current pharmaceutical design*, 19(34), 6141. •

Khan, N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxidants & redox signaling*, 10(3), 475-510. •

Khan, N., Khymenets, O., Urpí-Sardà, M., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Monagas, M., et al. (2014). Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, 6(2), 844-880. •

Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2012). Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(12), 1046-1053. •

- Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2012). Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(12), 1046-1053. •
- Khan, R. S., Grigor, J., Winger, R., & Win, A. (2013). Functional food product development—Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 27-37. •
- Khokhar, S., & Magnúsdóttir, S. G. M. (2002). Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 565-570. ••
- Kikuchi, K., Kobayashi, H., Hirao, T., Ito, A., Takahashi, H., & Tagami, H. (2003). Improvement of mild inflammatory changes of the facial skin induced by winter environment with daily applications of a moisturizing cream. *Dermatology*, 207(3), 269-275. •
- Kim, H. S., Quon, M. J., & Kim, J. A. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox biology*, 2, 187-195. •
- Kimura, M., Umegaki, K., Kasuya, Y., Sugisawa, A. and Higuchi, M., 2002. The relation between single/double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, pp. 1186–1193. •
- Klaunig JE, Xu Y, Han C, Kamendulis LM, Chen J, Heiser C, Gordon MS, Mohler ER. The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 220: 249-54. •
- Koenig, W. (2005). Predicting risk and treatment benefit in atherosclerosis: the role of C-reactive protein. *International journal of cardiology*, 98(2), 199-206. •
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650. •
- Komatsu, Y., Suematsu, S., Hisanobu, Y., Saigo, H., Matsuda, R., & Hara, K. (1993). Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(6), 907-910. •
- Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Ganić, K. K., & Vulić, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food research international*, 43(1), 167-176. •
- Kong, S. Y. J., Bostick, R. M., Flanders, W. D., McClellan, W. M., Thyagarajan, B., Gross, M. D., y col. (2014). Oxidative balance score, colorectal adenoma, and markers of oxidative stress and inflammation. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(3), 545-554. •
- Koo, S. I., & Noh, S. K. (2007). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(3), 179-183. •
- Korver O, Kuhn MC, Richardson DP (2004) Functional Foods Dossier: Building Solid Health Claims. How to Prepare the Scientific Dossier for Health Claims of European Functional Foods. Practical Industrial Guide: 1–185, The Netherlands, Wageningen: FoodLink Forum. •
- Kotler, P. (2003), *Marketing Management*, 11th ed., FT Prentice-Hall International Editions, Englewood Cliffs, NJ. •
- Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. E. (2000). Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2), 171-184. •
- Kraus, A. (2015). Development of functional food with the participation of the consumer. Motivators for consumption of functional products. *International Journal of Consumer Studies*, 39(1), 2-11. •



Kresanov, P., Ahotupa, M., Vasankari, T., Kaikkonen, J., Kähönen, M., Lehtimäki, T., ... & Raitakari, O. T. (2013). The associations of oxidized high-density lipoprotein lipids with risk factors for atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 1284-1290. •

Krishnaswamy, K. (2008). Traditional Indian spices and their health significance. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 17(S1), 265-268. •

Kruger, C. L., & Mann, S. W. (2003). Safety evaluation of functional ingredients. *Food and chemical toxicology*, 41(6), 793-805. •

Kumamoto, M., & Sonda, T. (1998). Evaluation of the antioxidative activity of tea by an oxygen electrode method. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(1), 175-177. •

Kuo, Y. C., Lin, J. C., Bernard, J. R., & Liao, Y. H. Green tea extract supplementation does not hamper endurance training adaptation but improves antioxidant capacity in sedentary men. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40(10); 990-996. •

## L

Labbé, D., Araya-Farias, M., Tremblay, A., & Bazinet, L. (2005). Electromigration feasibility of green tea catechins. *Journal of membrane science*, 254(1), 101-109. •

Lahmann, C., Young, A. R., Wittern, K. P., & Bergemann, J. (2001). Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation. *Photochemistry and photobiology*, 73(6), 657-663. •

Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., & Engelhardt, U. H. (2000). Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2848-2852. ••

Lambert, J. D. (2013). Does tea prevent cancer? Evidence from laboratory and human intervention studies. *The American journal of clinical nutrition*, 98(6), 1667S-1675S. •

Lambert, J. D., & Yang, C. S. (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3262S-3267S. •

Lambert, J. D., Hong, J., Kim, D. H., Mishin, V. M., & Yang, C. S. (2004). Piperine enhances the bioavailability of the tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *The Journal of nutrition*, 134(8), 1948-1952. •

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16. •

Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: principles and practices* (Vol. 5999). Springer Science & Business Media. ••

Leccia, M. T., Yaar, M., Allen, N., Gleason, M., & Gilchrest, B. A. (2001). Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. *Experimental dermatology*, 10(4), 272-279. •

Lee, I. T., Chan, Y. C., Lin, C. W., Lee, W. J., & Sheu, W. (2008). Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine*, 25(12), 1473-1477. •

Lee, J. E., Park, E., Auh, J. H., Choi, H. K., Lee, J., Cho, S., & Kim, J. H. (2011). Effects of a *Rubus coreanus* Miquel supplement on plasma antioxidant capacity in healthy Korean men. *Nutrition research and practice*, 5(5), 429-434. •

Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6516-6520. •

Leenen, R., Roodenburg, A. J., Tijburg, L. B., & Wiseman, S. A. (2000). A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(1), 87-92. •

Leffell, D. J. (2000). The other side of the sun. *The Lancet*, 356(9231), 699. •

Leonard, M. B., Lawton, K., Watson, I. D., Patrick, A., Walker, A., & MacFarlane, I. (1995). Cigarette Smoking and Free Radical Activity in Young Adults with Insulin-dependent Diabetes. *Diabetic Medicine*, 12(1), 46-50. •

Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 330S-335S. •

Li, G., Ho, V. C., Mitchell, D. L., Trotter, M. J., & Tron, V. A. (1997). Differentiation-dependent p53 regulation of nucleotide excision repair in keratinocytes. *The American journal of pathology*, 150(4), 1457. •

Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143. •

Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). LOS FLAVONOIDES: MECANISMO DE ACCIÓN, NEUROPROTECCIÓN Y EFECTOS FARMACOLÓGICOS. *MENSAJE BIOQUÍMICO*, 34. •

Lin, J. K., Lin, C. L., Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., & Juan, I. M. (1998). Survey of catechins, gallic acid, and methylxanthines in green, oolong, pu-erh, and black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3635-3642. •

Lin, Y. S., Tsai, Y. J., Tsay, J. S., & Lin, J. K. (2003). Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1864-1873. •

Lin, Y. S., Wu, S. S., & Lin, J. K. (2003). Determination of tea polyphenols and caffeine in tea flowers (*Camellia sinensis*) and their hydroxyl radical scavenging and nitric oxide suppressing effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 975-980. •

López, F. F., Cabrera, C., Lorenzo, M. L., & López, M. C. (2000). Aluminum content in foods and beverages consumed in the Spanish diet. *Journal of food science*, 65(2), 206-210. •

Lord, J.B. 2000. "New Product Failure and Success." In *Developing New Food Products for a Changing Marketplace*, ed. A.L. Brody & J.B. Lord, pp. 55–86. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. •

Lotito and B. Frei, Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* 41 (2006), 1727–1746. •

Lucas, R. (2010). Solar ultraviolet radiation: assessing the environmental burden of disease at national and local levels. *World Health Organization*. •

Luo H, Tang L, Tang M, Billam M, Huang T, Yu J, Wei Z, Liang Y, Wang K, Zhang ZQ, Zhang L, Wang JS: Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high-risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Carcinogenesis*, 27 :262–268,2006. •

Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica chimica acta*, 380(1), 50-58. •

## M

Mark, R. J., Lovell, M. A., Markesbery, W. R., Uchida, K., & Mattson, M. P. (1997). A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid  $\beta$ -peptide. *Journal of neurochemistry*, 68(1), 255-264. •

- Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*, 58(2), 85-90. ●
- Masaki, H., Okano, Y., & Sakurai, H. (1999). Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1428(1), 45-56. ●
- Mateos, R., & Bravo, L. (2007). Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *Journal of separation science*, 30(2), 175-191. ●
- Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H. N. (2002). Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 7, d765-83. ●
- Mayer, D. (2004). *Essential evidence-based medicine* (Vol. 1). Cambridge University Press. ●
- Mazzanti, G., Di Sotto, A., & Vitalone, A. (2015). Hepatotoxicity of green tea: an update. *Archives of toxicology*, 1-17. ●
- Mazzanti, G., Menniti-Ippolito, F., Moro, P. A., Cassetti, F., Raschetti, R., Santuccio, C., & Mastrangelo, S. (2009). Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *European journal of clinical pharmacology*, 65(4), 331-341. ●
- McAnulty, L. S., Nieman, D. C., Dumke, C. L., Shooter, L. A., Henson, D. A., Utter, A. C., ... & McAnulty, S. R. (2011). Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 h of running. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(6), 976-984. ●
- McAnulty, S. R., McAnulty, L. S., Morrow, J. D., Khardouni, D., Shooter, L., Monk, J., ... & Brown, V. (2005). Effect of daily fruit ingestion on angiotensin converting enzyme activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers. *Free radical research*, 39(11), 1241-1248. ● ●
- McMeekin, T. A. (2007). Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat science*, 77(1), 17-27. ●
- Meeran SM, Akhtar S, Katiyar SK. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *J Invest Dermatol*. 2009; 129:1258–1270. ●
- Mena, P., Martí, N., Saura, D., Valero, M., & García-Viguera, C. (2013). Combinatory effect of thermal treatment and blending on the quality of pomegranate juices. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3186-3199. ●
- Mennen, L., Hirvonen, T., Arnault, N., Bertrais, S., Galan, P., & Hercberg, S. (2007). Consumption of black, green and herbal tea and iron status in French adults. *European journal of clinical nutrition*, 61(10), 1174-1179; ●
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of food engineering*, 56(2), 181-188. ●
- Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP and Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem*. 2003 Nov 5; 51(23):6887-92. ●
- Middelkamp-Hup, M. A., Pathak, M. A., Parrado, C., Goukassian, D., Rius-Díaz, F., Mihm, M. C., ... & González, S. (2004). Oral Polypodium leucotomos extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(6), 910-918. ●
- Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 95-108. ●

Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3), 240-242. •

MITCHELL, D. L., & NAIRN, R. S. (1989). The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochemistry and Photobiology*, 49(6), 805-819. •

Miura, Y., Chiba, T., Miura, S., Tomita, I. I., Umegaki, K., Ikeda, M. & Tomita, T. (2000) Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. *J. Nutr. Biochem.* 11:216-222. •

Mnich, C. D., Hoek, K. S., Virkki, L. V., Farkas, A., Dudli, C., Laine, E., ... & Dummer, R. (2009). Green tea extract reduces induction of p53 and apoptosis in UVB-irradiated human skin independent of transcriptional controls. *Experimental dermatology*, 18(1), 69-77. •

Moazen, S., Amani, R., Homayouni Rad, A., Shahbazian, H., Ahmadi, K., & Taha Jalali, M. (2013). Effects of freeze-dried strawberry supplementation on metabolic biomarkers of atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind controlled trial. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63(3), 256-264. •

Moehrle, M., Dietrich, H., Patz, C. D., & Häfner, H. M. (2009). Sun protection by red wine?. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 7(1), 29-32. •

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., & PRISMA Group. (2009). Reprint—preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Physical therapy*, 89(9), 873-880. •

Monagas M, Urpi-Sarda M, Sanchez-Patan F, Llorach R, Garrido I, Gomez-Cordoves C, et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*. 2010 2010; 1(3):233-53. •

Moncada, S. R. M. J., Palmer, R. M. L., & Higgs, E. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*, 43(2), 109-142. •

Montine, K. S., Quinn, J. F., Zhang, J., Fessel, J. P., Roberts, L. J., Morrow, J. D., & Montine, T. J. (2004). Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 128(1), 117-124. •

Moon, H. S., Lee, H. G., Choi, Y. J., Kim, T. G., & Cho, C. S. (2007). Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. *Chemico-biological interactions*, 167(2), 85-98. •

Morillas-Ruiz, J., Zafrilla, P., Almar, M., Cuevas, M. J., Lopez, F. J., Abellan, P., ... & Gonzalez-Gallego, J. (2005). The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists. *European journal of applied physiology*, 95(5-6), 543-549. •

Morita, A., Horie, H., Fujii, Y., Takatsu, S., Watanabe, N., Yagi, A., & Yokota, H. (2004). Chemical forms of aluminum in xylem sap of tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Phytochemistry*, 65(20), 2775-2780. •

Morrow, J. D. (2005). Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(2), 279-286. •

Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (1999). Mass spectrometric quantification of F 2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods in enzymology*, 300, 3-12. •

Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (2002). The isoprostanes: their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(supplement\_1), S25-S30. •

Moskowitz, H. R., Beckley, J. H., & Resurreccion, A. V. (2012). Sensory and consumer research in food product design and development. John Wiley & Sons. •

Motilva, M. J., Serra, A., & Rubió, L. (2015). Nutrikinetic studies of food bioactive compounds: from in vitro to in vivo approaches. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(sup1), S41-S52. •

Moyers, S. B., & Kumar, N. B. (2004). Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. *Nutrition reviews*, 62(5), 204-211. •

MSSSI. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (2012). Informe anual del Sistema Nacional de Salud. Disponible en [www.msssi.gob.es](http://www.msssi.gob.es). •

Murkovic, M., Abuja, P. M., Bergmann, A. R., Zirngast, A., Adam, U., Winklhofer-Roob, B. M., & Toplak, H. (2004). Effects of elderberry juice on fasting and postprandial serum lipids and low-density lipoprotein oxidation in healthy volunteers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *European journal of clinical nutrition*, 58(2), 244-249. •

Murphy, K. J., Chronopoulos, A. K., Singh, I., Francis, M. A., Moriarty, H., Pike, M. J., ... & Sinclair, A. J. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1466-1473. •

Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Rissanen, T. H., Virtanen, J. K., Kaikkonen, J., ... & Salonen, J. T. (2004). Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1351-1359. •

## N

Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y, Tokimitsu I. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified ldl in men. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:122-9. •

Nagao, T., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2007). A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity*, 15(6), 1473-1483. •

Nakagawa, K., Ninomiya, M., Okubo, T., Aoi, N., Juneja, L. R., Kim, M., Yamanaka, K. & Miyazawa, T. (1999) Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *J. Agric. Food Chem.* 47:3967-3973. •

Nakagawa, T., & Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1745-1750. •

Nanri, A., Moore, M. A., & Kono, S. (2007). Impact of C-reactive protein on disease risk and its relation to dietary factors: literature review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 8(2), 167. •

Nantz, M. P., Rowe, C. A., Bukowski, J. F., & Percival, S. S. (2009). Standardized capsule of *Camellia sinensis* lowers cardiovascular risk factors in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition*, 25(2), 147-154. • •

Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Avino, J., Perez, P., & Estrela, J. M. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3), 410-418. •

Navas-Carretero, S., & Martinez, J. A. (2015). Cause-effect relationships in nutritional intervention studies for health claims substantiation: guidance for trial design. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(sup1), S53-S61. •

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 1-30. •

Negishi, H., Xu, J. W., Ikeda, K., Njelekela, M., Nara, Y., & Yamori, Y. (2004). Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *The Journal of nutrition*, 134(1), 38-42. •

Nelson, M., & Poulter, J. (2004). Impact of tea drinking on iron status in the UK: a review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17(1), 43-54. •

Netzel, M., Strass, G., Kaul, C., Bitsch, I., Dietrich, H., & Bitsch, R. (2002). In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food research international*, 35(2), 213-216. •

Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, doi: 10.1093/database/bap024. Full text (free access). •

Ng, T.P., Feng, L., Niti, M., Kua, E.H. and Yap, K.B. (2008) Tea Consumption and Cognitive Impairment and Decline in Older Chinese Adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 224-231. •

Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*. 2010; 302:71–83. •

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503-515. •

Niki, E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 809-817. • •

Nishigori, C., Yarosh, D. B., Ullrich, S. E., Vink, A. A., Bucana, C. D., Roza, L., & Kripke, M. L. (1996). Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10354-10359. • •

Nishimori, H., Shiratsuchi, T., Urano, T., Kimura, Y., Kiyono, K., Tatsumi, K., ... & Tokino, T. (1997). A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene*, 15(18), 2145-2150. •

Noonan, F. P., Bucana, C., Sauder, D. N., & De Fabo, E. C. (1984). Mechanism of systemic immune suppression by UV irradiation in vivo. II. The UV effects on number and morphology of epidermal Langerhans cells and the UV-induced suppression of contact hypersensitivity have different wavelength dependencies. *The Journal of Immunology*, 132(5), 2408-2416. •

Nordström, K., & Biström, M. (2002). Emergence of a dominant design in probiotic functional food development. *British Food Journal*, 104(9), 713-723. •

Novakovic, L., Lee, S., Orchard, G. E., Sheehan, J. M., Young, A. R., & Walker, S. L. (2001). Effects of solar-simulated radiation dose fractionation on CD1a+ Langerhans cells and CD11b+ macrophages in human skin. *British Journal of Dermatology*, 145(2), 237-244. •

Nowicka, P., & Wojdyło, A. (2015). Stability of phenolic compounds, antioxidant activity and colour through natural sweeteners addition during storage of sour cherry puree. *Food Chemistry*. •

Nucci C, Di PD, Varesi C et al. (2013). Increased malondialdehyde concentration and reduced total antioxidant capacity in aqueous humor and blood samples from patients with glaucoma. *Mol Vis*, 19:1841-1846. •

## O

Obtułowicz, T., Swoboda, M., Speina, E., Gackowski, D., Rozalski, R., Siomek, A., & Tudek, B. (2010). Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis*, *geq028*. •

OCEBM Levels of Evidence Working Group\*. "The Oxford 2011 Levels of Evidence". Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. <http://www.cebm.net/ocebmllevels-of-evidence/> (Acceso 16 de Noviembre 2015). •

Ohmori, R., Kondo, K., & Momiyama, Y. (2014). Antioxidant Beverages: Green Tea Intake and Coronary Artery Disease. *Clinical Medicine Insights. Cardiology*, *8(Suppl 3)*, 7. •

Okada, K., Takahashi, Y., Ohnishi, K., Ishikawa, O., & Miyachi, Y. (1994). Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *Journal of dermatological science*, *8(3)*, 183-186. •

OMS 2015. Informe Mundial sobre el envejecimiento y la Salud. <http://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/es/> (Accedido 4 Noviembre 2015) •

OMS World Health Organization (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO; (WHO technical report series, 894). •

Onakpoya, I., Spencer, E., Heneghan, C., & Thompson, M. (2014). The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *24(8)*, 823-836. • •

Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. (2012). Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: a contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. *PLoS one*, *7(3)*, e32718. •

Oresajo, C., Stephens, T., Hino, P. D., Law, R. M., Yatskayer, M., Foltis, P., ... & Pinnell, S. R. (2008). Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. *Journal of cosmetic dermatology*, *7(4)*, 290-297. •

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002). The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization. •

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2004). Food and health in Europe: a new basis for action. National Research Institute for Food and Nutrition, WHO Collaborating Centre for Nutrition, Rome, Italy. WHO Regional Publications. European Series [2004(96):i-xvi, 1-385. •

Osakabe, N., Baba, S., Yasuda, A., Iwamoto, T., Kamiyama, M., Takizawa, T., ... & Kondo, K. (2001). Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free radical research*, *34(1)*, 93-99. •

Osterburg, J., Gardner, S.H., Hyon, A., Neely and G. Babcock, Highly antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates are killed by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), *Clinical Microbiology and Infection* *15 (4)* (2009), pp. 341–346. •

Oszmiański, J., Wolniak, M., Wojdyło, A., & Wawer, I. (2008). Influence of apple purée preparation and storage on polyphenol contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, *107(4)*, 1473-1484. •

Özkan, M. (2002). Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry*, *78(4)*, 499-504. •

## P

Pannala AS, Chan TS, O'Brien P, Rice-Evans C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Com.* 2001; 282: 1161-1168. •

Panza V.S., Wazlawik E., Ricardo Schütz G., Comin L., Hecht K.C. and da Silva E.L., Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men, *Nutrition* **24** (5) (2008), pp. 433–442. •

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta*, 333(1), 19-39. ••

Pathak, M. A. (2004). In memory of Thomas Bernhard Fitzpatrick. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(2), xx-xxi. •

Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3-11. •

Patwardhan, B., Warude, D., Pushpangadan, P., & Bhatt, N. (2005). Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(4), 465-473. •

Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., Criqui, M., ... & Vinicor, F. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107(3), 499-511. •••

Pence, B. C., & Naylor, M. F. (1990). Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice. *Journal of investigative dermatology*, 95(2), 213-216. •

Pérez Gastell, P. L., & Pérez de Alejo, J. L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192-198. •

Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A (2010) Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem* 58:4959–4969. •

Perez-Jimenez, L. Fezeu, M. Touvier, N. Arnault, C. Manach, S. Hercberg, et al., Dietary intake of 337 polyphenols in French adults, *Am J Clin Nutr* 93 (2011), 1220–1228. •

Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., Caturla, N., Castillo, J., Benavente-García, O., Alcaraz, M., & Micol, V. (2014). Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 136, 12-18. ••

Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., & Knez, Ž. (2004, August). Isolation of active ingredients from green tea (Fanning Bellas, China). In *Proceedings of the 16th International Congress of Chemical and Process Engineering-CHISA, Prague, Czech Republic* (pp. 22-26). •

Peterson, J., Dwyer, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A. L., Beecher, G., & Aladesanmi, J. (2005). Major flavonoids in dry tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 487-501. ••

Petisca, C., Melo, A., Ferreira, I. M., & Pinho, O. (2009). Brewing practices to maximise levels of catechins and other compounds with functional properties in Azorean green tea infusions: comparison with composition of canned green tea drinks. *Journal of Foodservice*, 20(5), 241-249. •

Petrosino, T., & Serafini, M. (2014). Antioxidant Modulation of F2-Isoprostanes in Humans: A Systematic Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(9), 1202-1221. •



Pezdiric, K., Hutchesson, M., Whitehead, R., Ozakinci, G., Perrett, D., & Collins, C. E. (2015). Can dietary intake influence perception of and measured appearance? A Systematic Review. *Nutrition Research*, 35(3), 175-197. •

Phillips, C., Belsey, J., & Shindler, J. (2000). Flora pro. activ: a clinical and financial impact analysis. *Journal of Drug Assessment*, 3(3), 179-194. •

Pickering, T. G., Hall, J. E., Appel, L. J., Falkner, B. E., Graves, J., Hill, M. N., ... & Roccella, E. J. (2005). Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Hypertension*, 45(1), 142-161. •

Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P and Bombardelli E, 1998. Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *Biofactors*, 8, 111-118. •

Pinnell, S. R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(1), 1-22. •

Placzek, M., Gaube, S., Kerkmann, U., Gilbertz, K. P., Herzinger, T., Haen, E., & Przybilla, B. (2005). Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and D- $\alpha$ -tocopherol. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(2), 304-307. •

Plana, N., Nicolle, C., Ferre, R., Camps, J., Cos, R., Villoria, J., & Masana, L. (2008). Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects. *European journal of nutrition*, 47(1), 32-39. •

Podrez, E. A., Abu-Soud, H. M., & Hazen, S. L. (2000). Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(12), 1717-1725. •

Poei-Langston, M. S., & Wrolstad, R. E. (1981). Color Degradation in an Ascorbic Acid-Anthocyanin-Flavanol Model System. *Journal of Food Science*, 46(4), 1218-1236. •

Porter, M. E. (1990). The competitive advantage of nations. *Harvard business review*, 68(2), 73-93. •

Princen HM, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, Blonk C, Tijburg LB, Langius JA, Meinders AE, Pijl H. No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on ldl oxidation in smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:833-41. •

Prior, R. L. (2014). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18(B), 797-810. •

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302. •

Pryor, W. A., & Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitritea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 686(1), 12-27. •

## Q

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. •

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, 68(1), 125-131. •

**R**

Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology*, 72(11), 1439-1452. ●●

Rautiainen, S., Larsson, S., Virtamo, J., & Wolk, A. (2012a). Total antioxidant capacity of diet and risk of stroke a population-based prospective cohort of women. *Stroke*, 43(2), 335-340. ●

Rautiainen, S., Levitan, E. B., Orsini, N., Åkesson, A., Morgenstern, R., Mittleman, M. A., & Wolk, A. (2012b). Total antioxidant capacity from diet and risk of myocardial infarction: a prospective cohort of women. *The American journal of medicine*, 125(10), 974-980. ●

Reardon, W., Pembrey, M. E., Trembath, R. C., Ross, R. J. M., Sweeney, M. G., Harding, A. E., & Luxon, L. M. (1992). Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *The Lancet*, 340(8832), 1376-1379. ●

Reaven, P. D., Grasse, B. J., & Tribble, D. L. (1994). Effects of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with alpha-tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(4), 557-566. ●

Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., Brodie, A. E., Ellis, W. W., & Potter, D. W. (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical biochemistry*, 106(1), 55-62. ●

Reglamento (Ce) No 107/2008 Del Parlamento Europeo Y Del Consejo de 15 de enero de 2008 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión. ●

Reglamento (Ce) No 109/2008 Del Parlamento Europeo Y Del Consejo de 15 de enero de 2008 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. ●

Reglamento (Ce) No 1169/2009 De La Comisión De 30 De Noviembre De 2009 que modifica el Reglamento (CE) no 353/2008, por el que se establecen normas de desarrollo para las solicitudes de autorización de declaraciones de propiedades saludables con arreglo al artículo 15 del Reglamento (CE) n o 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo. ●

Reglamento (CE) no 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. ●

Reglamento (Ce) No 353/2008 De La Comisión De 18 De Abril De 2008 por el que se establecen normas de desarrollo para las solicitudes de autorización de declaraciones de propiedades saludables con arreglo al artículo 15 del Reglamento (CE) no 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo. ●

Reglamento (UE) No 116/2010 DE LA COMISIÓN de 9 de febrero de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n o 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. ●

Repine, J. E., Bast, A. A. L. T., & Lankhorst, I. D. A. (1997). Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(2), 341-357. ●

Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. D. O., & de Jong, E. V. (2014). Cold storage of blueberry (*Vaccinium spp.*) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 111-116. ●

Rhodes, L. E., Darby, G., Massey, K. A., Clarke, K. A., Dew, T. P., Farrar, M. D., ... & Nicolaou, A. (2013). Oral green tea catechin metabolites are incorporated into human skin and protect against UV radiation-induced cutaneous inflammation in association with reduced production of pro-inflammatory eicosanoid 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *British Journal of Nutrition*, 110(05), 891-900. • •

Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*. 1996; 20: 933-956. •

Rice-Evans, C. A. (2000). Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radical Research*, 33, S59-66. •

Richardson, D. P. (2005). The scientific substantiation of health claims with particular reference to the grading of evidence. *European journal of nutrition*, 44(5), 319-324. •

Richardson, D. P. (2006). The scientific substantiation of health claims with particular reference to the grading of evidence and consumer understanding. *Food Science and Technology Bulletin: Fu*, 2(4), 39-48. •

Richardson, D. P., Affertsholt, T., Asp, N. G., Bruce, Å., Grossklaus, R., Howlett, J., ... & Viechtbauer, V. (2003). PASSCLAIM—Synthesis and review of existing processes. *European Journal of Nutrition*, 42(1), i96-i111.

Rittié, L., & Fisher, G. J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing research reviews*, 1(4), 705-720. •

Rizwan, M., Rodriguez-Blanco, I., Harbottle, A., Birch-Machin, M. A., Watson, R. E. B., & Rhodes, L. E. (2011). Tomato paste rich in lycopene protects against cutaneous photodamage in humans in vivo: a randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology*, 164(1), 154-162. • •

Roberts II, L. J., & Morrow, J. D. (1997). The generation and actions of isoprostanes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1345(2), 121-135. • •

Roberts, L. J., & Morrow, J. D. (2000). Measurement of F 2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(4), 505-513. •

Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Knai, C., Jensen, J., Ferro-Luzzi, A., & James, W. (2004). *Food and Health in Europe: A New Basis for Action (European Series No 96)*. •

Roest, M., Voorbij, H. A., Van der Schouw, Y. T., Peeters, P. H., Teerlink, T., & Scheffer, P. G. (2008). High levels of urinary F2-isoprostanes predict cardiovascular mortality in postmenopausal women. *Journal of clinical lipidology*, 2(4), 298-303. •

Rogers, J., Harding, C., Mayo, A., Banks, J., & Rawlings, A. (1996). Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Archives of dermatological research*, 288(12), 765-770. •

Rosenblat, M., Volkova, N., Attias, J., Mahamid, R., & Aviram, M. (2010). Consumption of polyphenolic-rich beverages (mostly pomegranate and black currant juices) by healthy subjects for a short term increased serum antioxidant status, and the serum's ability to attenuate macrophage cholesterol accumulation. *Food & function*, 1(1), 99-109. •

Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of Nutrition*, 22(1), 19-34. •

Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Lusini, L., Colombo, R., & Di Simplicio, P. (2002). Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact?. *Clinical chemistry*, 48(5), 742-753. •

Rothwell JA, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Medina-Ramon A, M'Hiri N, Garcia Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart D, Scalbert A. (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate

data on the effects of food processing on polyphenol content. Database, 10.1093/database/bat070. Full text (free access). •

Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordoñez M, Knox C, Llorach R, Eisner R, Cruz J, Neveu V, Wishart D, Manach C, Andres-Lacueva C, Scalbert A. (2012) Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. Database, doi: 10.1093/database/bas031. Full text (free access). •

Ruel, G., Lapointe, A., Pomerleau, S., Couture, P., Lemieux, S., Lamarche, B., & Couillard, C. (2013). Evidence that cranberry juice may improve augmentation index in overweight men. *Nutrition Research*, 33(1), 41-49. •

Ruel, G., Pomerleau, S., Couture, P., Lamarche, B., & Couillard, C. (2005). Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabolism*, 54(7), 856-861. •

Ruel, G., Pomerleau, S., Couture, P., Lemieux, S., Lamarche, B., & Couillard, C. (2008). Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men. *British Journal of Nutrition*, 99(02), 352-359. •

Ruenroengklin, N., Sun, J., Shi, J., Xue, S. J., & Jiang, Y. (2009). Role of endogenous and exogenous phenolics in litchi anthocyanin degradation caused by polyphenol oxidase. *Food Chemistry*, 115(4), 1253-1256. •

Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., & Kovač, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 852-858. •

Rust, P., Lehner, P., & Elmadfa, I. (2001). Relationship between dietary intake, antioxidant status and smoking habits in female Austrian smokers. *European journal of nutrition*, 40(2), 78-83. •

Ryan, J., Croft, K., Mori, T., Wesnes, K., Spong, J., Downey, L., ... & Stough, C. (2008). An examination of the effects of the antioxidant Pycnogenol® on cognitive performance, serum lipid profile, endocrinological and oxidative stress biomarkers in an elderly population. *Journal of Psychopharmacology*, 22(5), 553-562. •

Ryu, A., Arakane, K., Koide, C., Arai, H., & Nagano, T. (2009). Squalene as a target molecule in skin hyperpigmentation caused by singlet oxygen. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(9), 1504-1509. •

Ryu, H. S., Joo, Y. H., Kim, S. O., Park, K. C., & Youn, S. W. (2008). Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer®. *Skin Research and Technology*, 14(3), 354-358. •

## S

Sackett, D. L., Rosenberg, W. M., Gray, J. M., Haynes, R. B., & Richardson, W. S. (1996). Evidence based medicine. *BMJ: British Medical Journal*, 313(7050), 170. •

Sahari, M.A., Boostani F., M., Hamidi E.,Z. Effect of low temperature on the ascorbic acid content and quality characteristics of frozen strawberry. *Food Chemistry* 86 (2004) 357–363. •

Saladi, R. N., & Persaud, A. N. (2005). The causes of skin cancer: a comprehensive review. *Drugs of Today*, 41(1), 37-54. •

Samiec, P. S., Drews-Botsch, C., y Flagg, E. W. (1998). Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 24, 699-704. •

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 39-85. •

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32(6), 407-412.

•

Sander, C. S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C. S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2002). Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(4), 618-625.

Sang, L. X., Chang, B., Li, X. H., & Jiang, M. (2013). Green tea consumption and risk of esophageal cancer: a meta-analysis of published epidemiological studies. *Nutrition and cancer*, 65(6), 802-812.

Sang, S., Lambert, J. D., Ho, C. T., & Yang, C. S. (2011). The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological research*, 64(2), 87-99.

Sang, S., Lee, M. J., Hou, Z., Ho, C. T., & Yang, C. S. (2005). Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24), 9478-9484.

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215S-217S.

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191-1212.

Schlesier, K., Kühn, B., Kiehntopf, M., Winnefeld, K., Roskos, M., Bitsch, R., & Böhm, V. (2012). Comparative evaluation of green and black tea consumption on the iron status of omnivorous and vegetarian people. *Food research international*, 46(2), 522-527; Cheng, T. O. (2009). Green tea does not inhibit iron absorption. *International journal of cardiology*, 133(1), 112.

Scholz. (2007). Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *International journal for vitamin and nutrition research*, 77(3), 224-235.

Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755-1766.

Schulz, E., Jansen, T., Wenzel, P., Daiber, A., & Münzel, T. (2008). Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxidants & redox signaling*, 10(6), 1115-1126.

Seeram, N. P., Henning, S. M., Niu, Y., Lee, R., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1599-1603.

Segger, D., & Schönlau, F. (2004). Supplementation with Evelle® improves skin smoothness and elasticity in a double-blind, placebo-controlled study with 62 women. *Journal of dermatological treatment*, 15(4), 222-226.

Selma, M. V., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6485-6501.

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

Serafini, M., Laranjinha, J.A., Almeida, L.M. and Maiani, G., 2000. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry* 11, pp. 585-590.

- Serban, C., Sahebkar, A., Antal, D., Ursoniu, S., & Banach, M. (2015). Effects of supplementation with green tea catechins on plasma C-reactive protein concentrations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition*, 31(9), 1061-1071. •
- Sharma, V., Gulati, A., & Ravindranath, S. D. (2005). Extractability of tea catechins as a function of manufacture procedure and temperature of infusion. *Food Chemistry*, 93(1), 141-148. •
- Sheehan, J. M., & Young, A. R. (2002). The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(6), 365-377. •
- Shimizu, M., Fukutomi, Y., Ninomiya, M., Nagura, K., Kato, T., Araki, H., ... & Moriwaki, H. (2008). Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: a pilot study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(11), 3020-3025. •
- Shimizu, T. (2003). Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. *Nutrition research reviews*, 16(02), 241-252. •
- Shishikura, Y., Khokhar, S., & Murray, B. S. (2006). Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1906-1913. •
- Siddiqui, I. A., Afaq, F., Adhami, V. M., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2004). Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(3), 571-582. •
- Side, C. (2002). *Food Product Development Based on Experience (Vol. 17)*. Blackwell Publishing Ltd. •
- Siedlok, F., Smart, P., & Gupta, A. (2010). Convergence and reorientation via open innovation: the emergence of nutraceuticals. *Technology Analysis & Strategic Management*, 22(5), 571-592. •
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058-1071. •
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91(3), S31-S38. •
- Sies, H. (2007). Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *The Journal of nutrition*, 137(6), 1493-1495. •
- Sies, H., & Stahl, W. (2004). Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 173-200. •
- Sies, H., Stahl, W., & Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of nutrition*, 135(5), 969-972. •
- Sies. Polyphenols and health: update and perspectives *Arch Biochem Biophys*, 501 (2010), pp. 2–5. ••
- Sing, M. F., Yang, W. S., Gao, S., Gao, J., & Xiang, Y. B. (2011). Epidemiological studies of the association between tea drinking and primary liver cancer: a meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, 20(3), 157-165. •
- Singh, B. N., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology*, 82(12), 1807-1821. •
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. •
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467. •

- Siwik, D. A., Pagano, P. J., & Colucci, W. S. (2001). Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(1), C53-C60. •
- Skovgaard, G. L., Jensen, A. S., & Sigler, M. L. (2006). Effect of a novel dietary supplement on skin aging in postmenopausal women. *European journal of clinical nutrition*, 60(10), 1201-1206. •
- Slater, S. F., & Narver, J. C. (2000). The positive effect of a market orientation on business profitability: a balanced replication. *Journal of business research*, 48(1), 69-73. •
- Smith, A., Giunta, B., Bickford, P. C., Fountain, M., Tan, J., & Shytle, R. D. (2010). Nanolipidic particles improve the bioavailability and  $\alpha$ -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *International journal of pharmaceutics*, 389(1), 207-212. •
- Song, Y., Manson, J. E., Buring, J. E., Sesso, H. D., & Liu, S. (2005). Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(5), 376-384. •
- Sontag, Y., Guikers, C. L., Vink, A. A., de Gruijl, F. R., van Loveren, H., Garssen, J., ... & van Vloten, W. A. (1995). Cells with UV-specific DNA damage are present in murine lymph nodes after in vivo UV irradiation. *Journal of investigative dermatology*, 104(5), 734-738. •
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224. •
- Stadtman, E. R. (2001). Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928(1), 22-38. •
- Stahl, W., Heinrich, U., Wiseman, S., Eichler, O., Sies, H., & Tronnier, H. (2001). Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. *The Journal of nutrition*, 131(5), 1449-1451. •
- Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 20963-20966. •
- Steinberg, S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo and J.L. Witztum. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New England Journal of Medicine*, 320, 915-924. •
- Stephens, J. W., Khanolkar, M. P., & Bain, S. C. (2009). The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202(2), 321-329. ••
- Stone, H., Sidel, J. (2004). *Sensory evaluation practices* Academic Press, New York. •
- Stote, K. S., Clevidence, B. A., Novotny, J. A., Henderson, T., Radecki, S. V., & Baer, D. J. (2012). Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *European journal of clinical nutrition*, 66(10), 1153-1159. ••
- Stroup, D. F., Berlin, J. A., Morton, S. C., Olkin, I., Williamson, G. D., Rennie, D., et al. (2000). Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. *Jama*, 283(15), 2008-2012. •
- Suhrcke, M., & McKee, M. (2005). *The contribution of health to the economy in the European Union*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. •
- Suliburska, J., Bogdanski, P., Szulinska, M., Stepien, M., Pupek-Musialik, D., & Jablecka, A. (2012). Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biological trace element research*, 149(3), 315-322. •

Sung H, Nah J, Chun S, Park H, Yang SE, Min WK. In vivo antioxidant effect of green tea. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 527-9. •

## T

Takashima, A., & Bergstresser, P. R. (1996). Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochemistry and photobiology*, 63(4), 397-400. •

Tang, J., Zheng, J. S., Fang, L., Jin, Y., Cai, W., & Li, D. (2015). Tea consumption and mortality of all cancers, CVD and all causes: a meta-analysis of eighteen prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition*, 114(05), 673-683. •

Tangney, C. C., & Rasmussen, H. E. (2013). Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*, 15(5), 1-10. •

Taylor, J. R., & Wilt, V. M. (1999). Probable antagonism of warfarin by green tea. *Annals of Pharmacotherapy*, 33(4), 426-428. •

Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2004). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 391-395. •

Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (1995). Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor  $\beta$ 1. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30334-30338. •

Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028. •

The Netherlands Ministry of Health (2004) Netherlands Proposal for a Systematic Approach for a Generic List of Health Claims, VWA (Dutch Food Authority) Nutrition Centre. •

Thomasset, S. C., Berry, D. P., Garcea, G., Marczylo, T., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2007). Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *International Journal of Cancer*, 120(3), 451-458. •

Thorngate, J. H., & Noble, A. C. (1995). Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R (–)-epicatechin and 3S (+)-catechin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(4), 531-535. •

Tillett, W. S., & Francis, T. (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of experimental medicine*, 52(4), 561-571. •

Timothy, M., Dall, T. M., Fulgoni III, V. L., Zhang, Y., Reimers, K. J., Packard, P. T., & Astwood, J. D. (2009). Potential health benefits and medical cost savings from calorie, sodium, and saturated fat reductions in the American diet. *American Journal of Health Promotion*, 23(6), 412-422. •

Tinahones, F. J., Rubio, M. A., Garrido-Sanchez, L., Ruiz, C., Gordillo, E., Cabrerizo, L., & Cardona, F. (2008). Green tea reduces LDL oxidability and improves vascular function. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), 209-213. •

Tomas-Barberan, F. A., & Andres-Lacueva, C. (2012). Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 8773-8775. •

Tomas-Barberan, F., García-Villalba, R., Quartieri, A., Raimondi, S., Amaretti, A., Leonardi, A., & Rossi, M. (2014). In vitro transformation of chlorogenic acid by human gut microbiota. *Molecular nutrition & food research*, 58(5), 1122-1131. •



Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B. and Kader, A.A. HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4748-4760. •

Toshima, S. I., Hasegawa, A., Kurabayashi, M., Itabe, H., Takano, T., Sugano, J., ... & Nagai, R. (2000). Circulating oxidized low density lipoprotein levels a biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(10), 2243-2247. ••

Traustadóttir, T., Davies, S. S., Stock, A. A., Su, Y., Heward, C. B., Roberts, L. J., & Harman, S. M. (2009). Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women. *The Journal of nutrition*, 139(10), 1896-1900. •

Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., ... & Lamuela-Raventós, R. M. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(10), 953-959. •

Trott, P. (2008). *Innovation management and new product development*. Prentice Hall. •

Tuorila, H., & Cardello, A. V. (2002). Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Quality and Preference*, 13(7), 561-569. •

Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C., & Spencer, J. P. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American journal of clinical nutrition*, 93(1), 62-72. •

## U

Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*, 42(4), 318-343. •

Uhlig, S., & Wendel, A. (1992). The physiological consequences of glutathione variations. *Life sciences*, 51(14), 1083-1094. •

Ullrich, S. E. (2005). Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1), 185-205. •

Urakawa, H., Katsuki, A., Sumida, Y., Gabazza, E. C., Murashima, S., Morioka, K., ... & Adachi, Y. (2003). Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(10), 4673-4676. •

US Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Special Nutritionals (1999) *Guidance for Industry. Significant Scientific Agreement in the Review of Health Claims for Conventional Foods and Dietary Supplements*. Washington D. C.: USFDA. •

USDA 2015. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Version Current: September 2015. Internet: <http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/ndl>. •

## V

Vaidya, A. D., & Devasagayam, T. P. (2007). Current status of herbal drugs in India: An overview. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 41(1), 1. •

Valcheva-Kuzmanova, S., Ivanova, D., & Belcheva, A. (2006). Total phenolic content and in vitro antioxidant activity of fruit juices from *Aronia melanocarpa*, *Punica granatum* and *Rubus caesius*. *Bulletin of the Medical Institute after Mehrabyan*, 2, 5-9. •

Valcic, S., Burr, J. A., Timmermann, B. N., & Liebler, D. C. (2000). Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals. *Chemical research in toxicology*, 13(9), 801-810. •

Valencia, A., & Kochevar, I. E. (2008). Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(1), 214-222. •

Valentová, K., Stejskal, D., Bednár, P., Vostálová, J., Cíhalík, C., Večerová, R., ... & Šimánek, V. (2007). Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: a pilot double-blind placebo-controlled trial. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), 3217-3224. •

Valero, A., Carrasco, E., & García-Gimeno, R. M. (2012). Principles and Methodologies for the Determination of Shelf-Life in Foods. *Trends in Vital Food and Control Engineering*, 1. •

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84. •

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40. •

van Amelsvoort JM, Van Hof KH, Mathot JN, Mulder TP, Wiersma A and Tijburg LB, 2001. Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica*, 31, 891-901. •

Van Baal, P. H., Polder, J. J., De Wit, G. A., Hoogenveen, R. T., Feenstra, T. L., Boshuizen, H. C., ... & Brouwer, W. B. (2008). Lifetime medical costs of obesity: prevention no cure for increasing health expenditure. *PLoS Med*, 5(2), e29. •

Van Boekel, M. A. (2008). Kinetic modeling of food quality: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 144-158. •

van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H., & Bast, A. A. L. T. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511-517. •

Van der Vaart, H., Postma, D. S., Timens, W., & Ten Hacken, N. H. T. (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, 59(8), 713-721. •

van der Veen, B. S., de Winther, M. P., & Heeringa, P. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2899-2937. •

Van Gaal, L. F., Vertommen, J., & De Leeuw, I. H. (1998). The in vitro oxidizability of lipoprotein particles in obese and non-obese subjects. *Atherosclerosis*, 137, S39-S44. •

van het Hof, K.H., Wiseman, S.A., Yang, C.S. & Tijburg, L.B.M. (1999) Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 203-209. •

Van Kleef, E., Van Trijp, H. C., Luning, P., & Jongen, W. M. (2002). Consumer-oriented functional food development: how well do functional disciplines reflect the 'voice of the consumer'?. *Trends in Food Science & Technology*, 13(3), 93-101. •

Vandenbroucke, J. P., Von Elm, E., Altman, D. G., Gøtzsche, P. C., Mulrow, C. D., Pocock, S. J., et al. (2007). Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Annals of internal medicine*, 147(8), W-163. •

- Vaupel, J. W. (2010). Biodemography of human ageing. *Nature*, 464(7288), 536-542. •
- Verbeke, W. (2006). Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health?. *Food Quality and Preference*, 17(1), 126-131. •
- Verhagen, H. (2008). The current status of nutrition and health claims in Europe. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 43 (Suppl. 1) (2008) 1–5. •
- Viiigimaa, M., Abina, J., Zemtsovskaya, G., Tikhaze, A., Konovalova, G., Kumskova, E., & Lankin, V. (2010). Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood pressure*, 19(3), 164-168. •
- Vink, A. A., & Roza, L. (2001). Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 65(2), 101-104. •
- Viña, J. (Ed.). (1990). *Glutathione: metabolism and physiological functions*. Crc Press. •
- Virgili, F., & Marino, M. (2008). Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(9), 1205-1216. •
- Vogiatzoglou, A., Mulligan, A. A., Luben, R. N., Lentjes, M. A., Heiss, C., Kelm, M., ... & Kuhnle, G. G. (2014). Assessment of the dietary intake of total flavan-3-ols, monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins in the European Union. *British Journal of Nutrition*, 111(08), 1463-1473. •
- Volkovova, K., Barančoková, M., Kažimírová, A., Collins, A., Rašlová, K., Smolkova, B., et al. (2005). Antioxidant supplementation reduces inter-individual variation in markers of oxidative damage. *Free radical research*, 39(6), 659-666. •
- Vollaard, N. B., Shearman, J. P., & Cooper, C. E. (2005). Exercise-induced oxidative stress. *Sports Medicine*, 35(12), 1045-1062. •
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(21):6532-6538. •
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Nguyen, M., & Roach, P. D. (2010). Extraction and isolation of catechins from tea. *Journal of separation science*, 33(21), 3415-3428. •
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2011). Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Journal of separation science*, 34(21), 3099-3106. •

## W

- Wan, H., & Helliwell, K. (2000). Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70(3), 337-344. •
- Wang 2014b. Wang, W., Yang, Y. E., Zhang, W., & Wu, W. (2014). Association of tea consumption and the risk of oral cancer: a meta-analysis. *Oral oncology*, 50(4), 276-281. •
- Wang, H., & Helliwell, K. (2000). Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70(3), 337-344. •
- Wang, H., Helliwell, K., & You, X. (2000a). Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, 68(1), 115-121. •
- Wang, H., Provan, G. J., & Helliwell, K. (2000b). Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 11(4), 152-160. •

- Wang, H., Provan, G. J., & Helliwell, K. (2003). HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food chemistry*, 81(2), 307-312. •
- Wang, L., Zhang, X., Liu, J., Shen, L., & Li, Z. (2014). Tea consumption and lung cancer risk: a meta-analysis of case-control and cohort studies. *Nutrition*, 30(10), 1122-1127. •
- Wang, R., Zhou, W., & Jiang, X. (2008). Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8), 2694-2701. •
- Wang, S.Y. and Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4977-4982. •
- Wang, Y., Yu, X., Wu, Y., & Zhang, D. (2012). Coffee and tea consumption and risk of lung cancer: A dose-response analysis of observational studies. *Lung cancer*, 78(2), 169-170. •
- Wang, Z. Y., Khan, W. A., Bickers, D. R., & Mukhtar, H. (1989). Protection against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced skin tumor initiation in mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 10(2), 411-415. •
- Ward, W. F., Qi, W., Van Remmen, H., Zackert, W. E., Roberts, L. J., & Richardson, A. (2005). Effects of age and caloric restriction on lipid peroxidation: measurement of oxidative stress by F2-isoprostane levels. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(7), 847-851. •
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R. C., & Locke, S. J. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 924(3), 408-419. •
- Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., & Youdim, M. B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(9), 506-516. •
- Weng, C. J., & Yen, G. C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer treatment reviews*, 38(1), 76-87. •
- WHO, CDC. (2004). Assessing the iron status of populations: including literature reviews: report of a Joint World Health Organization. Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level, Geneva, Switzerland, 6-8. •
- WHO. (1997). Obesity – preventing and managing the global epidemic. Rep. WHO Consult. Obes. WHO/NUT/NCD 33/98.1, World Health Organisation, Geneva, Switzerland. •
- Will, F., Hilsendegen, P., Bonerz, D., Patz, C. D., & Dietrich, H. (2005). Analytical composition of fruit juices from different sour cherry cultivars. *Journal of applied botany and food quality*, 79(1), 12-16. •
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology and Medicine* 2004;36:838-49 ••
- Williams, S., Tamburic, S., & Lally, C. (2009). Eating chocolate can significantly protect the skin from UV light. *Journal of cosmetic dermatology*, 8(3), 169-173. •
- Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 243S-255S. ••
- Williner, M. R.; Pirovani, M. E.; Guemes, D. R. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *J. Sci. Food Agric.* 2003, 83, 842-845. •

Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J*, 313, 17-29. •

Wiswedel, I., Hirsch, D., Carluccio, F., Hampl, H., & Siems, W. (2005). F2-Isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. *Biofactors*, 24(1-4), 201-208. •

Wiswedel, I., Hirsch, D., Kropf, S., Gruening, M., Pfister, E., Schewe, T., & Sies, H. (2004). Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F2-isoprostane concentrations in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 411-421. • •

Wiswedel, I., Peter, D., Gardemann, A., Carluccio, F., Hampl, H., & Siems, W. (2008). Serum concentrations of F2-isoprostanes and 4-hydroxynonenal in hemodialysis patients in relation to inflammation and renal anemia. *Biomarker insights*, 3, 419. • •

Witztum, J. L. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet*, 344(8925), 793-795. • •

Witztum, J. L., & Steinberg, D. (2001). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?. *Trends in cardiovascular medicine*, 11(3), 93-102. •

Wojdyło, A., Teleszko, M., & Oszmiański, J. (2014). Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds. *Food chemistry*, 152, 261-270. •

Wolfram, S. (2007). Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(4), 373S-388S. •

Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, C. N., & Sunderman, F. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, 33(2), 214-220. •

Wood, J. M., Jimbow, K., Boissy, R. E., Slominski, A., Plonka, P. M., Slawinski, J., ... & Tosk, J. (1999). What's the use of generating melanin?. *Experimental dermatology*, 8(2), 153-164. •

World Economic and Social Survey 2007: development in an ageing world. New York: United Nations Department of Social and Economic Affairs; 2007 (Report No. E/2007/50/Rev.1 ST/ESA/314; [http://www.un.org/en/development/desa/policy/wess/wess\\_archive/2007wess.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/policy/wess/wess_archive/2007wess.pdf)). •

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), 4026-4037. • •

## X

Xiao, X., Yang, Z. Q., Shi, L. Q., Liu, J., & Chen, W. (2008). [Antiviral effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on influenza A virus]. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 33(22), 2678-2682. •

## Y

Yach, D., Stuckler, D., & Brownell, K. D. (2006). Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nature medicine*, 12(1), 62-66. •

Yamaguchi, Y., Coelho, S. G., Zmudzka, B. Z., Takahashi, K., Beer, J. Z., Hearing, V. J., & Miller, S. A. (2008). Cyclobutane pyrimidine dimer formation and p53 production in human skin after repeated UV irradiation. *Experimental dermatology*, 17(11), 916-924. •

Yamamoto, T., Juneja, L. R., & Kim, M. (1997). *Chemistry and applications of green tea*. CRC press. •

- Yang, B., & Kortenesniemi, M. (2015). Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Current Opinion in Food Science*, 2, 36-42. ●●
- Yang, C. S., Maliakal, P., & Meng, X. (2002). Inhibition of Carcinogenesis by Tea\*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42(1), 25-54. ●
- Yarosh, D. B., Canning, M. T., Teicher, D., & Brown, D. A. (2005). After sun reversal of DNA damage: enhancing skin repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1), 57-64. ●
- Yashin, A. Y., Nemzer, B. V., Combet Aspray, E., & Yashin, Y. I. (2015). Determination of the chemical composition of tea by chromatographic methods: a review. *Journal of Food Research*, 4(3), 56-87. ●
- Yasui, H., & Sakurai, H. (2000). Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(1), 131-136. ●
- Yiannakopoulou, E. C. (2014). Interaction of Green Tea Catechins with Breast Cancer Endocrine Treatment: A Systematic Review. *Pharmacology*, 94(5-6), 245-248. ●
- Yonish-Rouach, E., Resnftzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., & Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. ●
- Yoon, H. S., Kim, J. R., Park, G. Y., Kim, J. E., Lee, D. H., Lee, K., & Chung, J. H. (2015). Cocoa Flavanol Supplementation Influences Skin Conditions of Photo-Aged Women: A 24-Week Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. *The Journal of Nutrition*, jn217711. ●
- Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E. R., & Mizuno, Y. (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(7), 2696-2701. ●
- You, Q., Wang, B., Chen, F., Huang, Z., Wang, X., & Luo, P. G. (2011). Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry*, 125(1), 201-208. ●
- Young, A. R. (1997). Chromophores in human skin. *Physics in Medicine and Biology*, 42(5), 789. ●●
- Young, A. R., Chadwick, C. A., Harrison, G. I., Hawk, J. L., Nikaido, O., & Potten, C. S. (1996). The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *Journal of investigative dermatology*, 106(6), 1307-1313. ●
- Young, J. F., Dragstedt, L. O., Haraldsdottir, J., Daneshvar, B., Kal, M. A., Loft, S., Nilsson, L., Nielsen, S. E., Mayer, B., Skibsted, L. H., Huynh-Ba, T., Hermetter, A. & Sandstrom, B. (2002) Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet. *Br. J. Nutr.* 87:343-355. ●●
- Yu, H., & Huang, Q. (2010). Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chemistry*, 119(2), 669-674. ●
- Yuan, J. M. (2013). Cancer prevention by green tea: evidence from epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 98(6), 1676S-1681S. ●

## Z

Zafrilla, P., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651-3655. • •

Zamora-Ros R, Touillaud M, Rothwell JA, Romieu I, Scalbert A (2014) Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *Am J Clin Nutr* 100:11–26. •

Zamora-Ros, R., Knaze, V., Rothwell, J. A., Hémon, B., Moskal, A., Overvad, K., ... & Scalbert, A. (2015). Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European journal of nutrition*, 1-17. •

Zhang, Z. F., Li, Q., Liang, J., Dai, X. Q., Ding, Y., Wang, J. B., & Li, Y. (2010). Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. *Phytomedicine*, 17(1), 14-18. •

Zheng, X. X., Xu, Y. L., Li, S. H., Liu, X. X., Hui, R., & Huang, X. H. (2011). Green tea intake lowers fasting serum total and LDL cholesterol in adults: a meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 94(2), 601-610. •

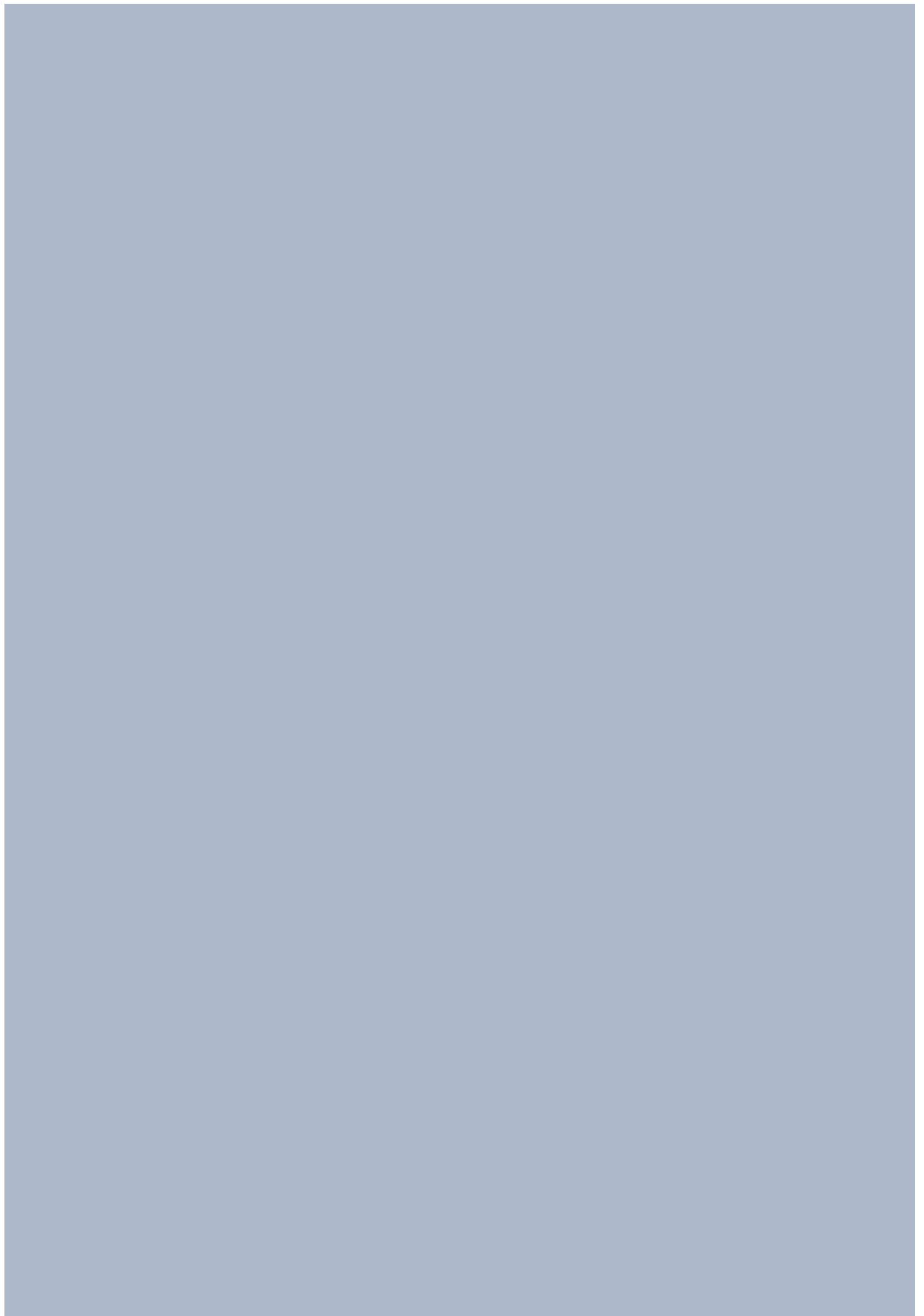
Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffelt, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., ... & Brash, D. E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, 372(6508), 773-776. •

Zuo, Y., Chen, H., & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57(2), 307-316. • •

#

**ANEXOS**





# Documentos

- 1. INFORMACION PARA EL PARTICIPANTE**
- 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO**
- 3. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOPSIA CUTÁNEA**
- 4. APROBACIÓN COMISIÓN BIOÉTICA**

**EVALUACIÓN CLÍNICA EN SUJETOS SANOS DE UN PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES SOBRE EL ESTADO REDOX SISTÉMICO Y EL DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR UVB EN PIEL**



Ante todo permítanos agradecerle sinceramente su interés por participar en este estudio titulado EVALUACIÓN CLÍNICA EN SUJETOS SANOS DE UN PRODUCTO RICO EN POLIFENOLES SOBRE EL ESTADO REDOX SISTÉMICO Y EL DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR UVB EN PIEL.

Este documento ha sido elaborado para explicarle, de forma sencilla y comprensible, en que consiste el proyecto de investigación, los posibles riesgos y los beneficios que de éste pueden derivarse.

Este documento consta de varias partes:

- 1. INFORMACION PARA EL PARTICIPANTE**
- 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO**
- 3. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOPSIA CUTÁNEA**

Le rogamos que lea y complete las hojas adjuntadas.  
Muchas Gracias

El Equipo de Investigación del estudio

Murcia, Junio de 2008



# 1. INFORMACION PARA EL PARTICIPANTE

<b>TITULO DEL ESTUDIO</b>	
<b>Evaluación clínica en sujetos sanos de un producto rico en polifenoles sobre el estado redox sistémico y el daño oxidativo inducido por UVB en piel.</b>	
<b>FECHA PREVISTA DE INICIO</b>	<b>09/09/08</b>
<b>FECHA PREVISTA FINALIZACIÓN</b>	<b>04/12/08</b>
<b>PROMOTOR</b>	<b>HERO ESPAÑA, S.A.</b>
<b>MONITOR</b>	<b>UNIVERSIDAD DE MURCIA</b>
<b>INVESTIGADOR RESPONSABLE</b>	<b>Dr. Luis F. Carbonell Meseguer</b> <a href="mailto:luisfer@um.es">luisfer@um.es</a> Departamento de Fisiología Facultad de Medicina Universidad de Murcia 30.071 Campus de Espinardo - Murcia Tfno: 968363951
<b>MÉDICO RESPONSABLE</b>	<b>Dr. Jorge Martínez Escribano</b> <a href="mailto:jorge@martinezescribano.es">jorge@martinezescribano.es</a> CLÍNICA DERMATOLÓGICA OPENDERMA (COD) Calle Trapeería 3, 3º Dcha. 30001 Murcia. Tfno: 968220202
<b>COORDINADOR DEL PROYECTO</b>	<b>Luis Manuel Sánchez Siles</b> <a href="mailto:luisma.sanchez@hero.es">luisma.sanchez@hero.es</a> Departamento de Investigación, Calidad y Desarrollo Avda. de Murcia nº 1, 30.820 Alcantarilla ,Murcia Tfno: 968898900/ MOVIL: 651892744

## INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre este estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

## PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento.



## DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

### Descripción del Producto

Es una **bebida antioxidante rica en polifenoles** diseñada por el equipo de Investigación y Desarrollo del Instituto de Nutrición Hero.

### ¿Cuál es su composición?

La bebida está elaborada a base de zumos y purés de frutas y extractos vegetales en proporciones de acuerdo a la legislación vigente en la Unión Europea.

### ¿Qué son los polifenoles?

Son compuestos naturales antioxidantes presentes en frutas y vegetales que según diversas investigaciones pueden:

- ‡ Proteger a las células del daño oxidativo producido por los radicales libres.
- ‡ Participar en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer.
- ‡ Intervenir en la mejora del sistema inmune y antiinflamatorio.
- ‡ Retrasar el envejecimiento prematuro de la piel.

### ¿Cuál es el Objetivo del estudio?

Demostrar que el consumo diario del producto antioxidante rico en polifenoles puede proteger al organismo del daño oxidativo mediante el aumento de las defensas antioxidantes.

### ¿En qué consiste el estudio?

En este estudio participarán 40 personas con edades comprendidas entre 30 y 65 años.

20 personas tomarán el producto y las otras 20 tomarán un producto placebo (el mismo producto pero sin los polifenoles). El estudio es triple ciego, y esto significa que ni los participantes, ni los investigadores, ni el monitor del estudio sabrán hasta el final del estudio quien ha tomado el placebo o el producto. La asignación de los participantes a cada uno de los grupos será de forma aleatoria.

**Duración del estudio:** 10 semanas

**Dosis diaria:** 1 botella de 100ml al día (antes de desayunar)



## ¿Qué análisis vamos a realizar?

Se llevaran a cabo una serie de pruebas, utilizando parámetros funcionales biológicos, bioquímicos, inmunológicos y físicos que aportaran datos relevantes sobre el estado de salud de cada individuo.

- ‡ **Análítica general** (Glucosa, colesterol total, HDL, LDL, Triglicéridos, Creatinina, ácido úrico, albúmina, bilirrubina, GOT, GPT etc...)
- ‡ **Niveles de daño celular (ADN, proteínas y lípidos).**
- ‡ **Grado de stress oxidativo y status antioxidante.**
- ‡ **Marcadores de riesgo cardiovascular.**
- ‡ **Análisis dermatológico integral (Nivel de Elasticidad-Hidratación de la piel).**
- ‡ **Nivel de fotoprotección cutánea.**
- ‡ **Estudio de composición corporal y valoración nutricional.**
- ‡ **Nivel de protección Genómica e Inmunológica de la piel.**



## ¿A qué se compromete al participar?

1. A **cumplir las Instrucciones y el calendario personalizado** que se le proporcionará a cada participante, donde se especificará el lugar, la fecha y la hora de cada una de las siete visitas que han de realizar.
2. A **rellenar el cuestionario de ingesta de alimentos** que previamente se les entregará.

### INSTRUCCIONES

1. No exponerse, más que lo estrictamente necesario, a luz solar durante los dos meses y medio de duración del estudio.
2. Evitar la ingesta de alcohol y analgésicos, y actividad física vigorosa 2-3 días antes de las visitas.
3. Tratar de mantener los hábitos de ejercicio físico y alimentación durante su participación en el estudio.
4. Intentar no sobrepasar diariamente la ingesta máxima de los siguientes alimentos:

Vegetales	3 servicios/día
Frutas o zumos	2 servicios/día
Té verde, té negro o café	1 taza/día
Chocolate	2 barras/día
Vino	1 copa/día
Cerveza	0,5 L/día



## EJEMPLO DE CALENDARIO PERSONALIZADO

	VISITA	DÍA/Hora	LUGAR	MEDIDAS
SEPTIEMBRE	1	Lunes 15 8:00 am.	Laboratorio de Análisis Munuera	Análisis de Sangre
	2	Martes 16 16:00 pm.	CLÍNICA DERMATOLÓGICA OPENDERMA	Historia Clínica Evaluación de parámetros cutáneos. Radiación UVB
	3	Mie 17 16:00 pm.	CLÍNICA DERMATOLÓGICA OPENDERMA	Determinación de MED Biopsia
DICIEMBRE	5	Lunes 1 16:00 pm.	Laboratorio de Análisis Munuera	Análisis de Sangre
	6	Martes 2 16:00 pm.	CLÍNICA DERMATOLÓGICA OPENDERMA	Historia Clínica Evaluación de parámetros cutáneos. Radiación UVB
	7	Mie 3 16:00 pm.	CLÍNICA DERMATOLÓGICA OPENDERMA	Determinación de MED Biopsia

### Direcciones

#### CLÍNICA DERMATOLÓGICA OPENDERMA

Dr. Martínez Escribano

Calle Trapería 3, 3º Dcha. 30001 Murcia.

Teléfono: 968220202.

#### Laboratorio de Análisis Clínicos.

Munuera

Calle Bolos nº2 Murcia, 30005 Murcia

Teléfono: 968299959

## 7. Beneficios y Riesgos del estudio

Mientras participe en el estudio, usted se beneficiará de los controles médicos previstos y recibirá un informe explicativo sobre los resultados obtenidos en sus muestras. También se realizará un estudio pormenorizado del estado de su piel.

El beneficio general derivado de este estudio es proteger al organismo del daño oxidativo mediante el aumento de las defensas antioxidantes y el establecimiento del equilibrio redox con el consumo regular de un producto rico en polifenoles.

Siempre existe un mínimo riesgo cuando se realizan punciones venosas y biopsias, aunque se tomarán todas las precauciones oportunas.

Con las **punciones venosas** requeridas para las extracciones sanguíneas (15 ml), no se prevé ningún riesgo más de los normales en esta práctica clínica habitual como:

- ‡ Ligera incomodidad debido al pinchazo de la aguja.
- ‡ Posibilidad de un pequeño hematoma alrededor del pinchazo de la aguja.
- ‡ Posibilidad remota de infección.

Con la **irradiación de UVB**, sólo pequeñas molestias pasajeras en la zona de máxima radiación similar a una exposición solar excesiva.





**En el caso que usted sea uno de los voluntarios que se someta a las dos biopsias cutáneas requeridas en el estudio,** debe saber que éstas se realizarán bajo anestesia local en la zona de la nalga y que existen mínimas posibilidades de infección, aunque podrían ocurrir ligeras molestias, inflamación, sangrado leve y dolor no severo. Sólo en casos excepcionales, la cicatrización de la zona de biopsia puede resultar en cicatrización hipertrófica y/o queloide, aunque por la zona donde se realizará la biopsia es muy poco probable. La muestra de piel extraída es será de 4 mm de diámetro y aproximadamente 7 mm de profundidad.

## **9. Confidencialidad**

El tratamiento de comunicación y cesión de los datos de carácter personal de los sujetos participantes en el ensayo se ajustarán a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. El personal médico, sin embargo, puede enseñar sus datos a los representantes autorizados de las Autoridades Sanitarias, al Investigador o personas que el Promotor designe, los cuales tienen el derecho de verificar todos los datos del estudio. El personal autorizado por Hero España S.A. puede igualmente controlar las historias médicas para comprobar el cumplimiento del protocolo. En las publicaciones de los resultados de este estudio se mantendrá en todo momento el anonimato de los sujetos participantes en el ensayo.

## **10. Póliza de Seguro**

Se proporcionará un certificado de la póliza de seguro específico para este estudio.

## **11. Finalización del estudio:**

El dermatólogo, el investigador responsable y el promotor del estudio pueden dar fin a su participación en este ensayo en cualquier momento, si lo consideran apropiado, debido a la falta de cumplimiento de los procedimientos o en su beneficio.

## **12. Información adicional.**

Cualquier pregunta que desee plantear en relación con el estudio será atendida por:

El dermatólogo de la clínica OPENDERMA, **Dr. Jorge Martínez Escribano**, en sus horas de consulta (Tfno: 968220202.)

El coordinador del estudio, **Luis M. Sánchez Siles** (HERO España S.A.) llamando al 651892744.

El investigador responsable, **Dr. Luis F. Carbonell Meseguer** llamando en horario de mañanas al 968 363951.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del ensayo:** Evaluación clínica en sujetos sanos de un producto rico en polifenoles sobre el estado redox sistémico y el daño oxidativo inducido por UVB en piel.

Yo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ años de edad y DNI \_\_\_\_\_

- He sido informado/a de los posibles perjuicios que la extracción de una muestra de 15 ml de sangre puede tener sobre mi bienestar y salud.
- He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.
- He leído las hojas de información que se me han entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- He hablado con (nombre del investigador: \_\_\_\_\_)

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que esta información es confidencial

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Murcia, a..... de.....de 2008

Firma del participante

Nombre y Firma del Investigador      Fecha:



# DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOPSIA CUTÁNEA

## DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO

La biopsia de piel consiste en la toma de una muestra de 4 mm de diámetro de piel con el empleo de un aparato especial (Punch de Biopsia). Para este estudio de investigación es necesaria la toma de dos muestras (una al principio del estudio y otra al final) en la zona de la nalga. Es un procedimiento de baja complejidad, con riesgos mínimos como cualquier procedimiento de tipo invasivo. Se requiere la aplicación de anestesia local.

## RIESGOS DE LOS PROCEDIMIENTOS

Los riesgos son mínimos, aunque podría ocurrir inflamación, sangrado leve, dolor no severo y en muy raras ocasiones infección local.

En el sitio donde se hace la Biopsia puede quedar una pequeña cicatriz que puede ser tratada. Si la persona tiende a formar cicatrices grandes (queloides) en respuesta a las lesiones en la piel, hay probabilidad de que se forme una sobre el área de la biopsia.

El médico que efectuará la biopsia es experto en esta técnica.

La finalidad de la biopsia es estudiar a nivel celular diferentes parámetros de su piel como el nivel de protección genómica e inmunológica.

Don/Doña.: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_ y DNI: \_\_\_\_\_

## DECLARO

Que el Doctor Jorge Martínez Escribano, me ha explicado el objetivo, los riesgos y beneficios de practicar una BIOPSIA CUTÁNEA.

- 1.- El médico me ha explicado que a lo largo del tratamiento puede ser necesaria la administración de anestesia.
- 2.- El tratamiento consiste en la toma, con un material especial, de una muestra de mi piel para analizarla en el Laboratorio de Anatomía Patológica.
- 3.- Comprendo que a pesar de la adecuada elección de la técnica y de su correcta realización pueden presentarse efectos indeseables, como reacción a los anestésicos empleados y que puede quedar una cicatriz poco estética.

Otros riesgos o complicaciones que pueden aparecer teniendo en cuenta mis circunstancias personales (estado previo de salud, edad, profesión, creencias, etc.) son:

Se harán todas las pruebas y tratamientos necesarios para que los riesgos de la intervención se reduzcan al mínimo.



He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos de la biopsia cutánea.

Y en tales condiciones

### **CONSENTO**

que se me realice **TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE BIOPSIA CUTÁNEA.**

Murcia, a..... de.....de 2008

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Voluntario





**INFORME DE LA COMISIÓN DE BIOÉTICA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DE MURCIA**

D. Francisco Alonso de Vega, Profesor Titular de Universidad, miembro de la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia, en funciones de Secretario.

**CERTIFICA:**

Que D. Luis F. Carbonell Meseguer ha presentado el proyecto titulado "*Evaluación clínica en sujetos sanos de un producto rico en polifenoles sobre el estado redox sistémico y el daño oxidativo inducido por UVB en piel*" a la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia.

Que la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día 9 de julio de 2008<sup>1</sup>, acuerda por unanimidad emitir informe favorable.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión, en Murcia 9 de julio de 2008.

Vº Bº  
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN  
DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Fdo.: Gaspar Ros Berruezo

<sup>1</sup> A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

