

**PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS PRODUCTOS
DE LA REACCIÓN DE MAILLARD Y SU INFLUENCIA
EN LA ABSORCIÓN DE HIERRO Y COBRE. RELACIÓN
CON LA CAPACIDAD QUELANTE DE METALES**

**PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS
PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE
MAILLARD Y SU INFLUENCIA EN LA
ABSORCIÓN DE HIERRO Y COBRE.
RELACIÓN CON LA CAPACIDAD
QUELANTE DE METALES**

TESIS DOCTORAL



Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada



Unidad de Nutrición Animal
Estación Experimental del Zaidín
CSIC, Granada

BEATRIZ RUIZ ROCA
Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Beatriz Ruiz Roca
D.L.: GR. 1775-2009
ISBN: 978-84-692-1435-0

Los trabajos de investigación que constituyen la Memoria de Tesis Doctoral “Propiedades antioxidantes de los productos de la reacción de Maillard y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales”, han sido realizados bajo nuestra dirección por la Licenciada Beatriz Ruiz Roca, en las instalaciones de la Unidad de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), de Granada, para aspirar al grado de Doctora en Farmacia. Esta Memoria refleja fielmente los resultados obtenidos.

Dra. Isabel Seiquer Gómez-Pavón

Dra. M^a del Pilar Navarro Martos

Granada, 2009

Esta Memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a una beca predoctoral I3P, concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y forma parte del proyecto de investigación:

“Capacidad quelante de los productos de la reacción de Maillard: efectos sobre la actividad antioxidante y la absorción y metabolismo de hierro y cobre”
(AGL2003-06327)

Bajo la dirección de:

Isabel Seiquer Gómez-Pavón y M^a del Pilar Navarro Martos

Licenciada Beatriz Ruiz Roca

Granada, 2009

Parte de los resultados expuestos en la presente Memoria de Tesis Doctoral han sido presentados y publicados en:

Congresos:

- COST ACTION 927- IMARS JOINT WORKSHOP. “Thermally processed foods: possible health implications”.
“In vitro antioxidant activity of diets rich in Maillard Reaction Products”.
Nápoles (Italia), 24-27 de Mayo de 2006
- COST ACTION 927- IMARS JOINT WORKSHOP. “Thermally processed foods: possible health implications”.
“Studies on the antiradical activity and iron chelating power of glucose-lysine Maillard Reaction Products”.
Nápoles (Italia), 24-27 de Mayo de 2006
- “X Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEN) y 1er Simposio de la Fundación Española de la Nutrición (FEN)”: “Malnutrición en los países industrializados, un reto para el siglo XXI”
“Estudio de las propiedades antioxidantes de mezclas calentadas de glucosa-lisina”. Nutrición Hospitalaria, 2008. Vol. 1 (2); S125.
Segovia (España), 21-24 de noviembre de 2007.
- “X Congreso de la Sociedad Española de Nutrición (SEN) y 1er Simposio de la Fundación Española de la Nutrición (FEN)”: “Malnutrición en los países industrializados, un reto para el siglo XXI”
“Modificaciones de la absorción de cobre en presencia de productos de la reacción de Maillard: estudios en células Caco-2”. Nutrición Hospitalaria, 2008. Vol. 1 (2); S125.
Segovia (España), 21-24 de noviembre de 2007.

Publicaciones:

- “The antioxidant effect of a diet rich in Maillard reaction products is attenuated after consumption by healthy male adolescents. In vitro and in vivo comparative study”. Seiquer I, **Ruiz-Roca B**, Mesías M, Galdó G, Muñoz-Hoyos A., Ochoa JJ, Navarro MP. J. Sci. Food Agric. 2008 May; 88 (7): 1245-1252.
- “Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures: relationships with mineral absorption across Caco-2 cell monolayers”. **Ruiz-Roca B**, Navarro MP, Seiquer I. J. Agric. Food Chem. 2008 Oct 8; 56 (19): 9056-9063.

A mis padres
A mi hermana

La diferencia entre pasado, presente y futuro es sólo
una ilusión persistente

A. Einstein

Estando siempre dispuestos a ser felices, es
inevitable no serlo alguna vez

B. Pascal

AGRADECIMIENTOS

Me parece mentira que hayan pasado cuatro años. Al principio parecían muchos y ahora noto que han pasado muy rápido, quizá demasiado. Dicen que puede ser porque el balance ha sido positivo y porque los buenos momentos siempre pasan sin que te des cuenta... Sin duda, ese es mi caso y ha ocurrido gracias a todos los que, durante este tiempo, han estado a mi lado ayudándome y trabajando conmigo.

En primer lugar, quiero agradecerse a mis directoras Isabel y Pilar, por darme la oportunidad de realizar esta Tesis, por la confianza que depositaron en mí desde el primer día que llegué al Departamento, por su paciencia, por los consejos “científicos” y por los “empíricos”... Por su amistad y su cariño, miles de gracias.

A Paloma Cabo, por orientarme dentro de este campo y ponerme en contacto con el mundo de la ciencia.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por concederme la beca que me ha permitido llevar a cabo este trabajo, a la Estación Experimental del Zaidín y sobre todo al Departamento de Nutrición Animal que ha puesto a mi alcance todos los medios necesarios para conseguir este objetivo.

A mis padres y a mi hermana, por su constante apoyo en los momentos más difíciles, por sus consejos... simplemente, por estar a mi lado siempre, por estar ahí. A Juande por resolver mis interminables dudas informáticas y por estar siempre dispuesto a echar una mano en todo.

Sin duda, y esperando no olvidar a nadie, debo darle las gracias a todo el personal del Departamento de Nutrición Animal por ayudarme en cualquier momento que lo he necesitado, y en especial:

A mis compis de minerales: Marta, Luisa y Ginesa, por su acogida durante los primeros meses, y, como no, por el “mejor imposible” ambiente de trabajo; a Cristina, “mi traductora e intérprete personal”; gracias por tus consejos y, sobre todo, por tu apoyo y por los momentos de risas tan necesarios durante la escritura de esta Tesis; a Ana Haro por ser una amiga con la que se puede contar y confiar en todo momento.

A los veteranos de la sala de becarios: Gloria, Eva, Rosa G., Jose Ramón, Carlos, Julia y Gonzalo por su apoyo durante el comienzo que siempre resulta difícil; y a los más jovencitos: Tamara, Rosa y Manolo a los que espero seguir conociendo.

A Arancha, Ana y Mari Luz, amigas de verdad desde el principio y para siempre. A Alicia y Eva, mis compis de marcha nocturna; a Lucrecia, Jose y Virginia por trabajar siempre con una sonrisa, a Fran por ser tan original y a Julio por serlo aun más.

A Roberto, por la cerveza, las tapitas y el rioja (siempre en ese orden, por supuesto) y como no podría ser menos, por las largas y divertidas conversaciones durante “la menta poleo-time” en las que, como no, debo incluir a Alberto (y a Patroclo...).

A Alejandro, por su inmensa paciencia y su ayuda para escribir esta Tesis y, sobre todo, por sus consejos y sus ánimos.

A Luis Lara, por su ayuda tan estadísticamente significativa.

A Raquel, Encarnita y M^a Ángeles por los ratillos de charla y de risas.

A todos los que han pasado por el Departamento y me han dedicado aunque sea un minuto de su tiempo ha hacerme sonreír... Gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1. REACCIÓN DE MAILLARD.....	9
1.1. Descripción y aspectos generales	9
1.2. Factores que afectan a la reacción de Maillard	15
1.2.1. Naturaleza y estructura química de los reactantes.....	15
1.2.2. Contenido en humedad y estado físico-químico del sistema.....	18
1.2.3. pH	19
1.2.4. Temperatura y tiempo de calentamiento	20
1.2.5. Presión hidrostática	22
1.2.6. Presencia de minerales.....	23
1.3. Absorción y metabolismo de los productos de la reacción de Maillard.....	24
1.4. Consecuencias y efectos de los productos de la reacción de Maillard.....	27
1.4.1. Modificación de las características organolépticas del alimento.....	27
1.4.2. Aspectos nutritivos	30
a. Efectos sobre la ingesta y el peso	30
b. Efectos sobre las proteínas y aminoácidos	31
c. Efectos sobre los carbohidratos	33
d. Efectos sobre las vitaminas	34
e. Efectos sobre los minerales	35
1.4.3. Capacidad quelante de metales de los productos de la reacción de Maillard.....	35
1.4.4. Aspectos fisiopatológicos.....	41
a. Efectos sobre los microorganismos	42
b. Efectos mutagénicos, antimutagénicos y cancerígenos.....	42
c. Efectos alérgicos y antialérgicos.....	44
d. Reacción de Maillard <i>in vivo</i>	45
e. Actividad antioxidante.....	46

2. ESTRÉS OXIDATIVO	47
2.1. Generalidades	47
2.1.1. Radicales libres.....	48
a. Fuentes de producción celular o endógena de radicales libres.....	51
b. Fuentes de producción exógena de radicales libres.....	54
2.2. Papel de los metales (hierro y cobre) en el estrés oxidativo	55
2.3. Efectos de los radicales libres y de las especies reactivas sobre los sistemas biológicos	59
2.4. Prevención y reparación del daño oxidativo: ANTIOXIDANTES.....	66
2.4.1. Mecanismos enzimáticos.....	66
2.4.2. Mecanismos no enzimáticos.....	72
3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD (PRM)	81
3.1. Estudios de la actividad antioxidante de los PRM de sistemas modelo.....	81
3.2. Estudios de la actividad antioxidante de los PRM de alimentos.....	85
3.3. Estudios de la actividad antioxidante de los PRM <i>in vivo</i>	88
4. HIERRO.....	91
4.1. Aspectos generales	91
4.2. Absorción, transporte y eliminación	93
4.2.1. Absorción	94
4.2.2. Transporte.....	96
4.2.3. Eliminación.....	98
4.3. Factores que afectan la absorción de hierro	98
4.3.1. Factores fisiológicos.....	98
4.3.2. Factores alimentarios.....	99
5. COBRE	102
5.1. Aspectos generales	102
5.2. Absorción, transporte y eliminación	104
5.2.1. Absorción	104
5.2.2. Transporte.....	106
5.2.3. Eliminación.....	107

5.3. Factores que afectan la absorción de cobre	107
5.3.1. Factores fisiológicos	107
5.3.2. Factores alimentarios	108
MATERIAL Y MÉTODOS	115
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	115
2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO. 116	
2.1. Preparación de las muestras	116
2.2. Caracterización de las muestras	119
2.2.1. Descripción del aspecto	119
2.2.2. Determinación del peso	119
2.2.3. Determinación del pH.....	120
2.2.4. Determinación del porcentaje de lisina libre	120
2.2.5. Desarrollo del pardeamiento y determinación del rango de absorción espectrofotométrico	120
3. MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA- LISINA <i>in vitro</i>.....	121
3.1. Capacidad para retardar la peroxidación lipídica (TBARS)	121
3.2. Actividad antiradical o neutralizadora de radicales libres (DPPH).....	125
4. MEDIDA DE LA CAPACIDAD QUELANTE DE METALES DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA	126
4.1. Determinación de la capacidad quelante de hierro.....	126
4.2. Determinación de la capacidad quelante de cobre	127
5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN CULTIVOS CELULARES (Línea celular Caco-2)	129
5.1. Siembra y mantenimiento.....	129
5.2. Ensayos de viabilidad celular	132
5.2.1. Método de tinción con azul tripán	132
5.2.2. Método de tinción con rojo neutro	134
5.3. Ensayos de citotoxicidad	136

5.4. Inducción del daño oxidativo	136
5.5. Evaluación del daño oxidativo	138
5.5.1. Determinación de lípidos peroxidados (dienos conjugados).....	139
5.5.2. Determinación de la actividad enzimática.....	140
a. Técnica de determinación de la catalasa (CAT).....	140
b. Técnica de determinación de la superóxido dismutasa (SOD).....	141
c. Técnica de determinación de la glutatión peroxidasa (GP _x)	143
5.5.3. Determinación cuantitativa de proteínas	145
5.6. Evaluación del papel protector de las mezclas de glucosa-lisina ante la presencia de agentes prooxidantes	146
6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN LA ABSORCIÓN DE HIERRO Y COBRE	147
6.1. Ensayos de captación y transporte de hierro y cobre	147
6.1.1. Integridad y confluencia de la monocapa	148
6.1.2. Desarrollo de los ensayos	149
6.2. Determinación analítica de hierro y cobre	151
6.3. Precisión y exactitud de los análisis	152
7. RESUMEN DE LAS DETERMINACIONES REALIZADAS	154
8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	155
RESULTADOS.....	159
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	160
1.1. Medida del pH y de la pérdida de peso de las mezclas de glucosa-lisina tras el calentamiento.....	160
1.2. Medida del color.....	161
1.3. Espectros de absorción UV-visible	163
1.4. Porcentaje de lisina libre	165
2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>.....	167
2.1. Determinación del porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica.....	167

2.2. Determinación del porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica en presencia de compuestos con reconocida actividad antioxidante	171
2.3. Determinación de la actividad neutralizadora del DPPH.....	172
3. MEDIDA DE LA CAPACIDAD QUELANTE DE METALES (hierro y cobre)	177
3.1. Determinación de la capacidad quelante de hierro.....	177
3.2. Determinación de la capacidad quelante de cobre	179
4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA FRENTE A UN DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO EN CULTIVOS CELULARES (Línea celular Caco-2).....	182
4.1. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina en células Caco-2.....	182
4.2. Evaluación de la actividad antioxidante de las mezclas de glucosa-lisina en células Caco-2	184
4.2.1. Efectos sobre la viabilidad celular.....	184
a. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro	184
b. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre	186
c. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno.....	188
4.2.2. Efectos sobre la peroxidación lipídica.....	190
a. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina.....	190
b. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro	192
c. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre	194
d. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno.....	196
4.2.3. Efectos sobre la actividad enzimática (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa).....	198

a.	Ensayos sobre la actividad CATALASA	198
a.1.	Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina	198
a.2.	Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro	200
a.3.	Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre	202
a.4.	Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno	204
b.	Ensayos sobre la actividad SUPERÓXIDO DISMUTASA	206
b.1.	Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina	206
b.2.	Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro	208
b.3.	Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre	210
b.4.	Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno	212
c.	Ensayos sobre la actividad GLUTATION PEROXIDASA	214
c.1.	Ensayos sobre la actividad glutacion peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina	214
c.2.	Ensayos sobre la actividad glutacion peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro	216
c.3.	Ensayos sobre la actividad glutacion peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre	218
c.4.	Ensayos sobre la actividad glutacion peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno	220
5.	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA SOBRE LA DISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE HIERRO Y COBRE (Línea celular Caco-2)	222
5.1.	Ensayos de captación y transporte de hierro	222
5.2.	Ensayos de captación y transporte de cobre	224

5.3. Medida de la absorbancia de las muestras tras los ensayos de captación y transporte	226
DISCUSIÓN.....	235
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS	235
1.1. Elección de los reactantes y condiciones de la reacción	235
1.2. Determinación del peso	239
1.3. Determinación del pH	240
1.4. Determinación de la lisina libre.....	242
1.5. Determinación de la absorbancia	245
2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	249
2.1. Determinación de la reducción de la peroxidación lipídica	250
2.2. Determinación de la actividad neutralizadora del DPPH.....	259
3. CAPACIDAD QUELANTE DE HIERRO Y COBRE.....	266
4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN CULTIVOS CELULARES.....	276
4.1. Ensayos de viabilidad celular	277
4.1.1. Viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina	277
4.1.2. Viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de hierro o cobre.....	279
4.1.3. Viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de peróxido de hidrógeno	281
4.2. Efectos sobre la peroxidación lipídica.....	284
4.2.1. Modificaciones en la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina.....	284
4.2.2. Modificaciones en la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de hierro o cobre.....	287
4.2.3. Modificaciones en la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de peróxido de hidrógeno	290
4.3. Efectos sobre la actividad enzimática	294

4.3.1. Efectos de las mezclas de glucosa-lisina sobre la actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa	295
4.3.2. Efectos de las mezclas de glucosa-lisina sobre la actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en presencia de hierro o cobre.....	300
4.3.3. Efectos de las mezclas de glucosa-lisina sobre la actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno.....	305
5. INFLUENCIA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN LA ABSORCIÓN DE HIERRO Y COBRE	310
5.1. Ensayos de captación y transporte de hierro y cobre	310
5.1.1. Hierro.....	312
5.1.2. Cobre	317
RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	325
BIBLIOGRAFÍA.....	331

LISTADO DE ABREVIATURAS

- 4-HNE: 4- hidroxinonenal
- AA: actividad antiradical
- AOX: actividad antioxidante
- Abs: absorbancia
- AAPH: 2,2'-azobis-(2-aminopropano)dihidroclorhídrico
- ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)
- ACG: ácido clorogénico
- ADN: ácido desoxiribonucleico
- ADP: adenosín difosfato
- AGE: advanced glycation end products (productos finales avanzados de la glicación)
- AQ: actividad quelante
- ARN: ácido ribonucleico
- ATP: adenosín trifosfato
- BHA: butilhidroxianisol
- BHT: butilhidroxitolueno
- CAT: catalasa
- CML: carboximetil-lisina
- DBM: dibenzoilmetano
- DCYTB: duodenal cytochrome b (citocromo duodenal b).
- DMEM: Dubelcco's modified minimal essentials medium (medio de cultivo Dubelcco)
- DMT-1: divalent metal transporter 1 (transportador divalente de metales)
- DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrácilo
- EAA: espectrofotometría de absorción atómica
- ECACC: colección Europea de cultivos celulares
- EDTA: ácido etilendiaminotetracético

- ER: especie reactiva /especies reactivas
- ERO: especie reactiva del oxígeno/ especies reactivas del oxígeno
- FL: fructosil-lisina
- G-L: glucosa-lisina
- GP: galato de propilo.
- GP_x: glutathion peroxidasa
- GR: glutathion reductasa
- GSH: glutathion reducido
- GSSG: glutathion oxidado
- GST: glutathion-S-transferasa
- HBSS: Hank's balanced salt solution
- hCTR1/CTR-1: human copper transporter 1 (transportador humano de cobre)
- HDL: lipoproteínas de alta densidad
- HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- HMF o 5-HMF: hidroximetilfurfural
- HPLC: High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
- IFN- γ : interferón γ
- IL-12: interleucina 12
- IMAC: Immobilized metal ion affinity chromatography (cromatografía de iones metálicos inmovilizados)
- LDL: lipoproteínas de baja densidad
- LH: ácido linoleico
- LOOH: hidroperóxido lipídico
- MT: melatonina
- MDA: malondialdehído
- NAD⁺/NADH: nicotinamida adenín dinucleótido oxidado/reducido

- NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NOS: óxido nítrico sintasa
- NTA: nitrilotriacetato
- ORAC: oxygen radical absorbance capacity
- PBS: phosphate buffer solution (tampón fosfato)
- PRM: productos de la reacción de Maillard
- PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados
- RAGE: advanced glycation end products receptors (receptores de los productos finales avanzados de la glicación)
- RL: radical libre/radicales libres
- RM: reacción de Maillard
- RPL: reducción de la peroxidación lipídica
- SH: sulfidrilo
- SOD: superóxido dismutasa
- STEAP: six-transmembrane epithelial antigen of the prostate
- TBA: ácido tiobarbitúrico
- TBARS: sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
- t-BOOH: terbutilhidroperóxido
- TEER: resistencia eléctrica transepitelial
- TF: transferrina
- TGN: trans Golgi network
- TOPO: trioctilfosfina óxido
- UV: ultravioleta

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Existen multitud de tratamientos culinarios domésticos e industriales que se emplean en el procesado de los alimentos con la finalidad de hacerlos comestibles y agradables al consumidor. Entre ellos destaca el tratamiento térmico (horneado, tostado, fritura, etc.) durante el cual se originan diversas reacciones que dan lugar a una serie de compuestos que confieren a los alimentos una adecuada textura, aromas y sabores agradables, destruyen microorganismos y factores antinutritivos y que, en definitiva, los convierten en comestibles y apetecibles.

Entre estas reacciones una de las más frecuentes es la reacción de Maillard, que se origina, típicamente, en alimentos que forman parte de nuestra dieta habitual ricos en proteínas y azúcares reductores, tanto durante su procesado como durante su conservación y almacenamiento. Como consecuencia, se forman los denominados productos de la reacción de Maillard (PRM) o de pardeamiento no enzimático que, en la mayoría de los casos, proporcionan características organolépticas deseadas y buscadas, pero que, además, tienen repercusiones nutricionales que, en algunos casos, pueden ser positivas, y en otros negativas. La presencia en la dieta de este tipo de productos ha sufrido un aumento importante en los últimos años en los países desarrollados debido a las modificaciones en los hábitos alimentarios, que muestran un aumento en el consumo de precocinados, comidas rápidas o *fast foods*, *snacks*, etc., alimentos todos ellos ricos en PRM. Por estos motivos estos compuestos son, actualmente, objeto de estudio de numerosos investigadores y existe una creciente necesidad de conocer sus efectos en profundidad.

Uno de los aspectos positivos más novedosos de los productos de la reacción de Maillard es la actividad antioxidante. Es conocido que el estrés oxidativo, caracterizado por una sobreproducción de radicales libres o una disminución de las defensas antioxidantes, está implicado en multitud de patologías, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, cáncer, y en procesos como el envejecimiento, por lo que la búsqueda de compuestos con propiedades

antioxidantes es hoy día un reto para mejorar la salud y el bienestar de la población. El hecho de que los PRM se generen de manera natural en los alimentos, podría convertirlos en antioxidantes de elección que incluso sustituirían a los compuestos antioxidantes sintéticos que se utilizan normalmente y cuya inocuidad, hoy día, aún es discutida. Los mecanismos de acción por los que actúan de esta forma todavía son desconocidos pero, el hecho de que se comporten como polímeros aniónicos capaces de quelar metales como el hierro y el cobre, implicados en reacciones de oxidación en las que se generan multitud de radicales libres y especies reactivas muy nocivos para la célula, podría estar implicado. Se han propuesto, además, otras vías de actuación como la neutralización de radicales libres o la modulación de la actividad de ciertas enzimas antioxidantes implicadas en procesos de detoxificación.

Sin embargo, el hecho de que los PRM sean capaces de atrapar metales, implicados en procesos de oxidación, aumentando, así, la protección frente al daño oxidativo, podría suponer la aparición de ciertas modificaciones sobre la absorción mineral, alterándose la biodisponibilidad y el metabolismo de ciertos nutrientes minerales en el organismo.

Por todos los antecedentes descritos, el objetivo de esta Tesis fue evaluar *in vitro* y *ex vivo* la capacidad antioxidante de compuestos de la reacción de Maillard procedentes de un sistema modelo aminoácido-azúcar y estudiar además, si ésta capacidad estaba relacionada con su habilidad quelante de hierro y cobre y si afectaba de algún modo la captación y el transporte intestinal de dichos minerales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. REACCIÓN DE MAILLARD

1.1. Descripción y aspectos generales

La reacción de Maillard, también conocida como de pardeamiento no enzimático, es una de las reacciones que se dan con más frecuencia durante el procesado de los alimentos, principalmente en el calentamiento pero también durante el almacenamiento a temperatura ambiente o incluso, aunque de forma mucho más moderada, a bajas temperaturas (Mlotkiewicz, 1998; Somoza, 2005).

Se origina entre el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína y el grupo carbonilo de un azúcar reductor o un lípido oxidado que sufren una serie de complejas reacciones químicas, originando los denominados productos de la reacción de Maillard (PRM) (Baxter, 1995; Ho, 1996), compuestos presentes en la mayoría de los alimentos que se consumen diariamente en la dieta habitual (Koschinsky y col., 1997).

Ya en 1908 fue descrita por Ling y Malting (1908), quienes estudiaron la aparición y formación de color en el proceso de fermentación de la cerveza, pero sin percatarse que durante el mismo se producía pérdida de agua, se formaba anhídrido carbónico y que el nitrógeno estaba presente en los productos de la reacción.

Fue Louis-Camille Maillard quién en 1912 publicó un artículo sobre lo que él denominaba pigmentos melanoideos que se formaban como resultado de la reacción entre la glucosa y el aminoácido glicina, observando además que uno de los productos finales era el anhídrido carbónico (Maillard, 1912a, 1912b). La importancia de sus investigaciones fue postular que estas reacciones se producían tanto en el procesado de los alimentos como a nivel biológico. Posteriormente, se describieron las primeras etapas de la reacción, visualizándose la formación de una serie de productos intermedios denominados “compuestos de Amadori” en honor al químico italiano Mario Amadori que determinó el proceso que lleva su nombre (Amadori, 1925).

En el organismo, la reacción de Maillard es muy parecida a la que ocurre en el procesado de los alimentos, pero transcurre más lentamente y generalmente se relaciona con ciertas patologías como la diabetes y procesos de envejecimiento. El estudio de la formación de productos de la reacción de Mailard *in vivo* es de actual interés. Es conocido que la generación de enlaces cruzados entre proteínas como el colágeno y carbohidratos origina una serie de PRM que al generarse en el organismo son denominados productos avanzados de la glicación (AGE, del inglés *advanced glycation end products*), y pueden contribuir a la degeneración de los tejidos (Baynes y Monnier, 1989). Muchos de estos productos pueden ser reconocidos por las defensas del organismo, siendo eliminados por los macrófagos (Vlassara y col., 1989) o degradados por las enzimas (Thornalley, 1998).

La gran complejidad química que entraña esta reacción (Finot y col., 1990), así como la frecuencia con la que se produce en los alimentos, ha suscitado un enorme interés (Labuza y col., 1994; O'Brien y col., 1998). Esta reacción es especialmente importante para la industria alimentaria, ya que se da frecuentemente en los alimentos durante procesos como el horneado, tostado, fritura, etc., confiriéndoles nuevos colores, olores, sabores y texturas agradables para el consumidor (Rizzi, 1994), aunque también pueden originarse sustancias aromáticas y compuestos pardos indeseados (Baltes, 1982). Además la reacción de Maillard puede disminuir el valor nutritivo de los alimentos, principalmente al afectar la calidad de las proteínas, debido a la destrucción de aminoácidos o disminución de su disponibilidad (Catrillón y col., 1996), y la de otros nutrientes (Finot, 1993). Sin embargo, las consecuencias nutritivas de la reacción no están estandarizadas debido a que varían en función de una serie de parámetros como la estructura química de los reactantes, sus concentraciones, la temperatura, el pH, la presión, el tiempo y la actividad de agua (Friedman, 1996; Wijewickreme y Kitts, 1997; Naranjo y col., 1998).

La reacción de Maillard puede dividirse en tres etapas (Mauron, 1981) (Fig.1):

- **Etapa temprana:** esta etapa corresponde a una serie de reacciones químicas, conocidas y caracterizadas, en las que aún no se produce pardeamiento. Comienza con la condensación entre el grupo carbonilo del azúcar reductor o un lípido oxidado y el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína, originando la base de Schiff, que sufre una reorganización llamada de Amadori. Esto origina ya una pérdida de valor nutritivo, porque el grupo amino queda bloqueado y no es disponible. El producto que se obtiene se llama compuesto de Amadori (N-sustituido-1-amino-1-deoxi-2-cetosa) (Hodge, 1953; Yaylayan, 1997), y se ha detectado en alimentos calentados, liofilizados y almacenados.
- **Etapa avanzada:** en condiciones de temperatura más extremas se forman gran cantidad de compuestos que son los responsables de los olores que desprenden los alimentos cocinados. En esta etapa se produce la fragmentación de los azúcares y la degradación de los aminoácidos, formándose compuestos coloreados y fluorescentes. El pH influye decisivamente en el desarrollo de la reacción, de manera que pueden seguirse tres rutas diferentes a partir del compuesto de Amadori:
 - ✓ Pérdida de moléculas de carbono por escisión que da lugar a la formación de compuestos que pueden contener nitrógeno y reaccionar con otros productos intermedios de la reacción, responsables de los aromas característicos.
 - ✓ Deshidratación media dando reductonas y dihidrorreductonas que pueden reaccionar con aminoácidos que sufren la denominada degradación de Strecker dando lugar a piracinas y aldehídos componentes del olor y sabor de los alimentos cocinados (Cremer y Eichner, 2000). El compuesto de Amadori puede degradarse mediante reacciones de enolización, dando compuestos como las 1- o 3-

deoxisonas (Namiki, 1988) y deoxihexosulosas como la 1-deoxi-2,3-hexosulosa y la 3-deoxi-2-hexosulosa (procedentes de una hexosa) que pueden fragmentarse al sufrir reacciones de condensación vía retroaldol o β -eliminación dando compuestos α -dicarbonílicos y α -hidroxicarbonílicos bastante reactivos como el gliceraldehído, metilglioxal o hidroxiacetona que son considerados precursores de los PRM (Weenen, 1998). En concreto la hidroxiacetona es un precursor de la piracina mientras que el gliceraldehído y el metilglioxal son más propensos a participar en los mecanismos de pardeamiento (Weenen y Tjan, 1994). La 3-deoxi-2-hexosulosa, el glioxal y metilglioxal son considerados precursores responsables de la formación de productos avanzados de la glicación (AGE) (Biemel y Lederer, 2003). Parece ser que la formación de estos compuestos carbonílicos está modulada mediante ciclos redox (Yaylayan, 2003).

- ✓ Deshidratación fuerte que produce furfural y derivados responsables del aroma.
- **Etapa final:** envuelve una serie de reacciones de condensación, originando oligómeros y polímeros insolubles de elevado peso molecular. Se trata de pigmentos pardos llamados *melanoidinas*, difíciles de aislar y cuya estructura y caracterización todavía son objeto de estudio. Estas macromoléculas pueden tener distinta estructura dependiendo de las condiciones en las que haya tenido lugar la reacción (Tressl y Rewicki, 1999; Andriot y col., 2004).

Son muchos los autores que han intentado dilucidar la posible estructura de las melanoidinas. Ya en 1981, Kato y Tsuchida propusieron como fórmula general la siguiente: Azúcar + aminoácido \approx 2-3 H₂O, mientras que Motai e Ioune (1974) establecieron como fórmula empírica general C₈H₁₁NO₆. Más recientemente se han propuesto tres posibles estructuras:

- Sustancias coloreadas de bajo peso molecular capaces de enlazar grupos amino libres de lisina o arginina de las proteínas dando lugar a la formación de melanoidinas coloreadas de elevado peso molecular (Hofman, 1998).
- Unidades de furanos y/o pirroles que a través de reacciones de policondensación dan lugar a la formación de melanoidinas constituidas por las unidades repetidas de los productos iniciales (Tressl y col., 1998).
- Melanoidinas cuya formación se produce a partir de los productos de degradación de un azúcar durante las primeras etapas de la reacción, que sufren una serie de polimerizaciones mediante reacciones de condensación aldólica y se unen o ligan mediante grupos amino (Cammerer y Kroh, 1995).

La formación de productos pardos y, por tanto, el desarrollo del color, es una de las consecuencias más buscadas de la reacción. Así, se han llevado a cabo algunos estudios relacionados con la formación de productos coloreados con propiedades fluorescentes (Morales y col., 1996), que pueden ser los precursores de los pigmentos pardos (Baisier y Labuza, 1992; Morales y Van Boekel, 1998), aunque tanto la fluorescencia como el pardeamiento pueden darse simultáneamente (Tarassuk y Simonson, 1950).

Un esquema general de la reacción sería el siguiente:

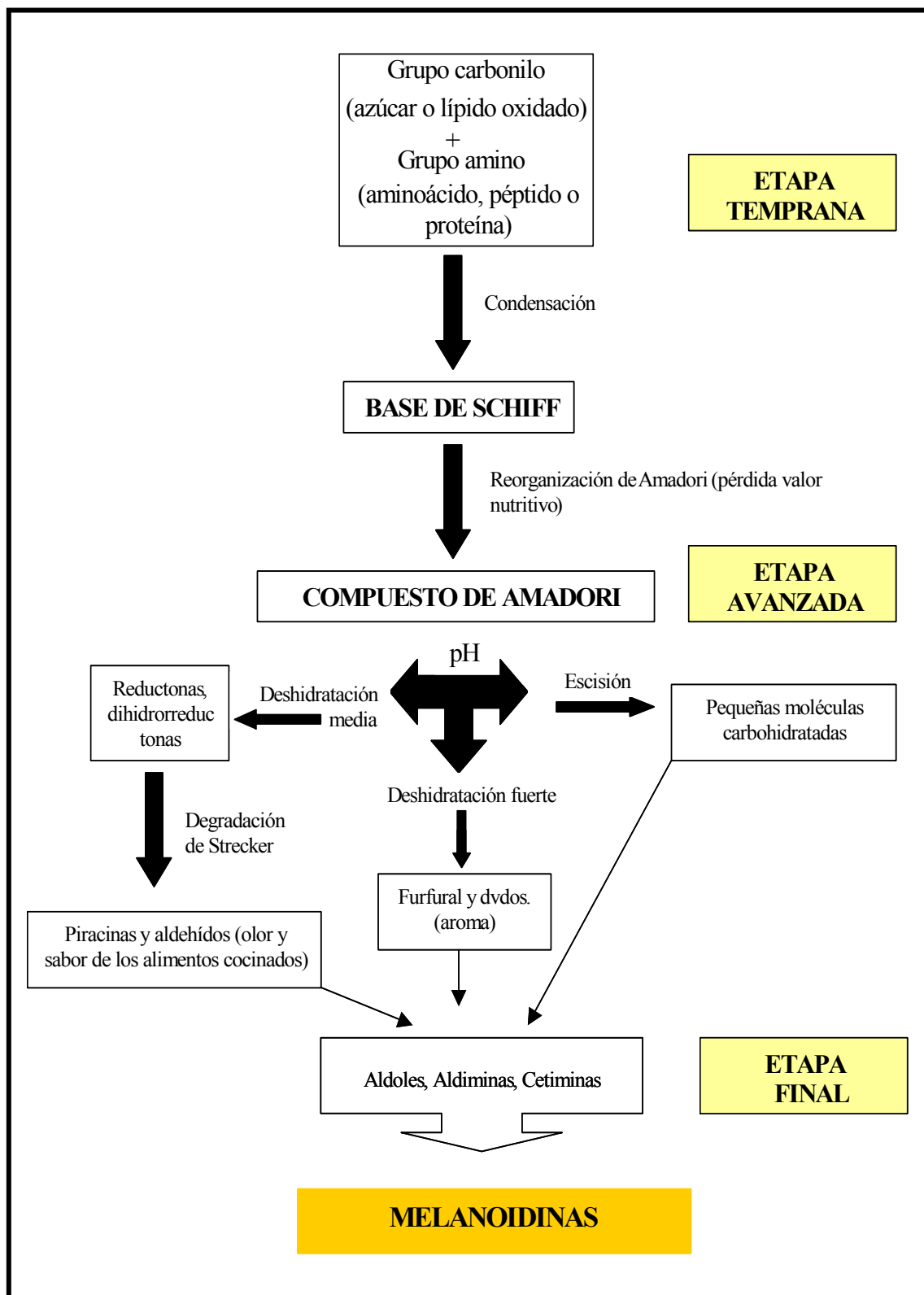


Figura 1. Esquema de la reacción de Maillard (Mauron, 1981)

1.2. Factores que afectan a la reacción de Maillard

El desarrollo de la reacción depende de una serie de factores como son la estructura química de los reactantes y su concentración, la actividad de agua, el pH, la temperatura y tiempo de calentamiento, la presión hidrostática, etc., (O'Brien y Morrissey, 1989b; Wijewickreme y Kitts, 1997).

1.2.1. Naturaleza y estructura química de los reactantes

La intensidad de la reacción, así como el tipo de productos que se obtienen, dependen en gran medida de la naturaleza del azúcar implicado en el proceso. Determinados estudios han demostrado que el tipo de azúcar no solo afecta a las características espectroscópicas, como el desarrollo del pardeamiento o color de los productos que se forman, sino que también podría estar asociado a las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos productos (Jing y Kitts, 2004a). Las cetosas favorecen la formación de productos intermedios de la reacción como los productos de Heyns (Krause y col., 2008), mientras que las aldosas favorecen la formación de productos de Amadori (Hodge, 1953). Los primeros suelen ser menos coloreados que los segundos, de ahí que los PRM obtenidos tras el calentamiento de sistemas modelo que contienen fructosa presenten menor grado de pardeamiento que los que contienen glucosa (Pilcova y col., 1990) y diferente composición, como un mayor contenido en piracina (Rewicki y col., 1994). Sin embargo, otros autores han observado que en ambos casos los productos obtenidos poseían un elevado grado de pardeamiento independientemente del tipo de azúcar utilizado (Baxter, 1995; Wijewickreme y col., 1997).

La glucosa es un azúcar reductor que muchos autores consideran más reactivo que otros azúcares como la fructosa, debido a que contiene un grupo carbonilo aldehídico más hidratado (O'Brien y Morrissey, 1989b), de naturaleza más reactiva que el grupo cetónico de la fructosa (Wijewickreme y Kitts, 1997;

Morales y Jiménez Pérez, 2001), en contra de otros autores que afirman que la fructosa es más reactiva (Hollnagel y col., 1998; Leong y Wedzicha, 2000). En un estudio en el que se calentaron dos mezclas de glucosa y fructosa con caseína en idénticas condiciones (120°C, 60min, pH 6.7), se observó que la cetosa se pardeaba mucho más rápido que la aldosa (Jing y Kitts, 2002).

Durante las distintas etapas de la reacción se forman compuestos de bajo y alto peso molecular, que absorben la luz a distintas longitudes de onda. El rango comprendido entre 280-290nm está relacionado con la formación de compuestos de bajo peso molecular (Jing y Kitts, 2004a), mientras que la absorbancia a 420nm es un índice de la formación de compuestos de elevado peso molecular y coloreados (Ajandouz y col., 2001). Muchos autores han comprobado que el tipo de azúcar utilizado también afecta la absorbancia de estos compuestos, en concreto la de los compuestos de elevado peso molecular, observándose que aumenta de acuerdo con el siguiente orden: ribosa > glucosa > fructosa (Jing y Kitts, 2004a). En un estudio realizado por Kwak y Lim (2004) se analizó la influencia de cinco azúcares unidos a lisina en el desarrollo del pardeamiento, siendo el orden establecido el siguiente: xilosa- >arabinosa- >glucosa- >maltosa- >fructosa-. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los de otros autores (Kato y col., 1968; Hayashi y Namiki, 1986) que consideran que las pentosas (xilosa) forman compuestos con un mayor grado de pardeamiento que las hexosas (glucosa) (Lingnert, 1990), debido a que son mucho más reactivas (Reynolds, 1963).

La cinética de la reacción también puede verse afectada por la estructura química del azúcar, de manera que la isomaltosa produce mayor coloración respecto a la maltosa (Kato y col., 1989). La sacarosa no es un azúcar reductor que pueda participar propiamente en la reacción de Maillard, pero cuando es sometido a un calentamiento por encima de los 130°C, se hidroliza liberando glucosa y fructosa, que si pueden hacerlo (Hurrell y Carpenter, 1977). No obstante, es difícil comparar el grado de pardeamiento producido por

monosacáridos y disacáridos (Hollnagel y Kroh, 1998; Morales y Jiménez-Pérez, 2001).

En cuanto a la cantidad de los reactantes, un exceso de azúcares reductores con respecto a los aminoácidos, favorece y promueve el desarrollo de la reacción según algunos autores (Lea y Hannan, 1951; O'Brien y Morrissey, 1989b). En algunos casos, sin embargo, se han establecido las proporciones de azúcar y aminoácidos que producen mayor pardeamiento (Wolfrom y col., 1974b; Warmbier y col., 1976).

La naturaleza del componente amino también afecta al desarrollo del pardeamiento (Hayashi y Namiki, 1986; Ajandouz y Puigserver, 1999). La lisina es un aminoácido que se encuentra en muchos alimentos, siendo uno de los más sensibles al tratamiento térmico y de los más reactivos en la reacción (Ashoor y Zent, 1984; Delgado-Andrade y col., 2004a). Esta reactividad se ha comprobado en diversos estudios como el que la compara con otros once aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, serina, cisteína, fenilalanina y arginina que formaban parte de un sistema modelo unidos a diferentes azúcares calentados a 100°C durante 3 horas (Kwak y Lim, 2004). La intensidad del color de los PRM formados a partir de aminoácidos básicos y no polares como arginina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina, fue superior a la de los formados a partir de aminoácidos ácidos como el ácido aspártico y el ácido glutámico, mientras que los PRM constituidos a partir de cisteína presentaban el menor grado de pardeamiento, lo cual puede deberse a que los aminoácidos azufrados son capaces de inhibir las reacciones de pardeamiento no enzimático (Adrian, 1974). La intensidad del color de los PRM procedentes de la lisina, lo que estaría relacionado con su reactividad, fue de 2 a 3 veces mayor que para el resto de aminoácidos. Otro estudio determinó que la lisina era incluso de 5 a 15 veces más reactiva que el resto de aminoácidos (Adrian, 1974), lo cual se ha atribuido a la presencia en su estructura de dos grupos amino (α , ϵ) (Miller y col., 1984; Ashoor y Zent, 1984; Ajandouz y Puigserver, 1999).

Cuando la reacción tiene lugar con aminoácidos incluidos en una cadena proteica, no todos son capaces de reaccionar con los azúcares por encontrarse ocultos en la estructura tridimensional, siendo el grupo amino terminal el más reactivo, seguido de los aminoácidos básicos y, por último, los azufrados (O'Brien y Morrisey, 1989b). Cuando se trata de péptidos, cuanto mayor sea la longitud de sus cadenas más reactivos serán y más aumentará el pardeamiento (de Kok y Rosing, 1994), aunque algunos como el glutatión actúan del mismo modo que la cisteína, inhibiendo el desarrollo de la reacción (Adrian, 1974).

1.2.2. Contenido en humedad y estado físico-químico del sistema

Uno de los factores que más influyen el desarrollo de la reacción de Maillard es el agua presente en los alimentos, expresada normalmente como actividad de agua (a_w) (Labuza y Saltmarch, 1981; Ames, 1990).

La velocidad de la reacción aumenta de manera exponencial con el contenido de humedad del sistema (Labuza y col., 1970) hasta un máximo de actividad de agua entre 0,3 y 0,7 (Karel, 1960; Heiss, 1968). A partir de 0,8, la velocidad de la reacción disminuye, debido a la dilución del soluto en la fase acuosa, ya que cuanto más diluido esté más difícil será la reacción entre sus moléculas (Kane y Labuza, 1989). Algunos autores han indicado que el grado de pardeamiento se incrementa al aumentar la actividad de agua sin llegar a un máximo (Jones, 1954; 1956), mientras que otros consideran que aumenta al descender el contenido de humedad del alimento (Rosen y col., 1953; Loncin y col., 1965; Reineccius, 1990) excepto en sistemas en los que la movilidad de los reactantes se encuentre limitada por el aumento de la viscosidad (Eichner y Karel, 1972).

Estudios más recientes indican que cuando los alimentos ricos en proteínas, como la soja, son almacenados a una temperatura inferior a 4°C y con un contenido de humedad por debajo de 0,3, se frena el desarrollo de la reacción de Maillard. Por el contrario, cuando las proteínas se conservan a una temperatura de 30°-45°C y una actividad de agua entre 0,33 y 0,75, el pardeamiento y la

fluorescencia aumentan linealmente en el tiempo hasta alcanzar un máximo, que es favorecido, además, por la presencia en el sistema de azúcares como la glucosa (Davies y col., 1998). Determinados estudios indican que actividades de agua entre 0,07 y 0,22, en un sistema modelo constituido por glucosa-asparagina, no aumentan la formación de compuestos volátiles de la reacción como la acrilamida, es decir, su formación y, por tanto, el desarrollo de la reacción, no está relacionado con la actividad de agua en los rangos ensayados (Robert y col., 2005). Estos resultados señalan que la aparición de compuestos como la acrilamida no se produce en sistemas extremadamente viscosos, del mismo modo que desaparece en caso de soluciones extremadamente diluidas (Adrian, 1974). Por tanto, podría decirse que el estado fisicoquímico influye ya que, por ejemplo, en los estados amorfos se acumula más cantidad de agua que en un estado cristalino en el que la actividad de agua es menor y la reacción se ve menos favorecida (Cremer y Eichner, 2000; Robert y col., 2005).

1.2.3. pH

El desarrollo de la reacción de Maillard está fuertemente condicionado por el pH inicial de los reactantes así como por la capacidad tampón del sistema. En general, un incremento en el pH favorece su desarrollo y la aparición de color (Ames, 1990), mientras que a pH ácido, cercano a un valor de 3, la velocidad de la reacción es mínima y su desarrollo escaso (Lea y Hannan, 1949).

Según Alais y Linden (1990), la zona comprendida entre pH 6 y 8 es la más favorable para el desarrollo de la reacción, mientras que otros autores amplian el rango hasta 10, valor a partir del cual la relación con el desarrollo del color se invierte (Wolfrom y col., 1974b; Ashoor y Zent, 1984). Ashoor y Zent (1984) observaron que cuando el pH desciende por debajo de 6 en un sistema aminoácido-azúcar no se produce pardeamiento, siendo máximo a un pH próximo a 10.

Lee y col., (1984) demostraron que en un sistema modelo glucosa-lisina, calentado a 100°C, el aumento del pH de 4 a 8 era directamente proporcional al desarrollo del pardeamiento. Sin embargo otros autores han comprobado que en un sistema aminoácido-azúcar calentado a diferentes temperaturas (40°-60°C), bajo una presión atmosférica de 600mPa, el inicio de la reacción se retarda cuando el pH está comprendido entre 5,1 y 6,5, aumentando significativamente entre 8 y 10,1 (Hill y col., 1996).

El pH también tiene una fuerte influencia en el desarrollo de los compuestos volátiles y de los productos intermedios de la reacción (Apriyantono y Ames, 1993), pudiendo determinar la aparición de determinadas características organolépticas en los alimentos. Por ejemplo, los principales productos volátiles obtenidos tras el calentamiento del sistema glutatión-glucosa en condiciones ácidas, pH 3-6, suelen ser furanos, mientras que a medida que aumenta este valor, entre 6 y 8, se forman principalmente compuestos carbonílicos, sulfurados y heterociclos nitrogenados (Tai y Ho, 1998).

1.2.4. Temperatura y tiempo de calentamiento

Como ya se ha comentado, uno de los factores que afecta el desarrollo de la reacción de Maillard es la temperatura, cuyo aumento favorece de forma exponencial el pardeamiento (Shallenberger y Birch, 1975; Vernin, 1980). Esto ha sido comprobado en sistemas modelo aminoácido-azúcar (Anet 1959; Miller y col., 1980; Masayo y Toshiharu, 1982). Ya en 1916, Maillard estudió la influencia del aumento de la temperatura (34°, 40°, 100°C) en la aparición de color en el sistema xilosa-glicina.

En estudios posteriores se vió que cuando el sistema constituido por cantidades equimolares de xilosa-glicina era calentado a 22°, 68° y 100°C, la formación de productos pardos de alto y bajo peso molecular era superior a la temperatura intermedia de 68°C (70%), mientras que a 100°C fue del 46%, posiblemente debido a que a elevadas temperaturas se favorece la formación de

compuestos volátiles. Cuando se calentó a 22°C, la mezcla permaneció prácticamente intacta (Benzing-Purdie y col., 1985).

En sistemas modelo aminoácido-azúcar constituidos por glucosa-lisina o fructosa-lisina calentados a 90°-110°C/40-45 minutos, se ha visto que la cantidad de PRM formados es escasa. Sin embargo, cuando la temperatura asciende hasta los 125°-160°C y se aplica durante 45-120 minutos, se observa como se incrementa la formación de productos pardos (Wijewickreme y col., 1997).

El efecto de la temperatura también se ha estudiado en alimentos. Concretamente en zumos almacenados durante 14 días a dos temperaturas diferentes, 30° y 50°C. En ambos casos se produjo pardeamiento o color debido a la degradación de los aminoácidos presentes en el zumo de naranja, pero se observó como a 50°C la aparición de productos pardos aumentó bruscamente, mientras que a 30°C sólo se originó un ligero pardeamiento. Durante el almacenamiento se produjeron reducciones considerables de aminoácidos y azúcares lo cual es indicativo de que la reacción estaba teniendo lugar a pesar de no manifestarse coloración (del Castillo y col., 1998).

Ya en 1990, Kennedy y col., observaron que el almacenamiento del zumo de naranja a elevada temperatura producía desarrollo del pardeamiento. Éste se veía incrementado al añadirle aditivos tales como el ácido ascórbico que, al degradarse, puede actuar como posible precursor del inicio de la reacción (Roig y col., 1999).

El desarrollo de la reacción puede tener lugar también durante el almacenamiento de los alimentos a temperatura ambiente, aunque de forma más lenta, como en el caso de la leche en polvo (Villamiel y Corzo, 2000). El elevado contenido en lactosa y proteínas ricas en lisina de la leche y otros productos derivados, con una actividad de agua intermedia, los convierte en alimentos muy sensibles al desarrollo de la reacción de Maillard (Morales y col., 1997). Cuando la leche en polvo se almacena a 37°, 45° y 55°C durante intervalos de tiempo diferentes, se observa que la concentración de productos tempranos de la

reacción como la furosina, y de productos intermedios, como el hidroximetilfurfural (HMF), se incrementa gradual y casi linealmente, a pesar de seguir una cinética de orden cero. No obstante, los procesos a los que es sometida la leche antes de su liofilización pueden tener cierta influencia en la formación de furosina (Van Renterghem y De Block, 1996). El incremento en la actividad del agua que se produce como consecuencia de la cristalización de la lactosa, también influye e induce la formación de productos avanzados de la reacción (Thomsen y col., 2005).

1.2.5. Presión hidrostática

La aplicación de elevadas presiones (100-1000mPa) es un procedimiento muy utilizado a nivel industrial en diversos tratamientos tecnológicos de los alimentos, que está ganando gran importancia en la tecnología alimentaria (Tewari y col., 1999). Su combinación con la aplicación de temperaturas moderadas (30°-60°C) puede favorecer el desarrollo de la reacción de Maillard y, por tanto, la aparición de nuevos y mejores sabores, colores y olores. Sin embargo, sólo unos pocos estudios han evaluado los efectos que la presión tiene en el desarrollo de ésta reacción. Tamaoka y col., (1991), indicaron que la aplicación de presión no tiene efectos importantes en las etapas tempranas de la reacción, mientras que Isaacs y Coulson (1996) establecieron que la presión aceleraba las reacciones de condensación características del inicio del proceso de pardeamiento. Respecto a las etapas avanzadas de la reacción, se ha descrito que la formación de compuestos heterocíclicos, volátiles y melanoidinas se ve ampliamente suprimida bajo presión, debido a que se retarda la degradación del compuesto de Amadori (Isaacs y Coulson, 1996; Tewari y col., 1999; Bristow e Isaacs, 1999). Otros autores han postulado que el efecto de la presión en el desarrollo de la reacción está intensamente influenciado por el pH, de manera que a pH ácido se reduce el desarrollo del pardeamiento, mientras que a valores próximos a la neutralidad, el pH del sistema se hace independiente de la

aplicación de presión y se favorece la aparición de melanoidinas (Hill y col., 1996). El rendimiento más bajo en la producción de compuestos volátiles se ha encontrado en sistemas incubados bajo presión a pH 10,1, quizás debido a que estas condiciones aceleran las reacciones de condensación aldólica (Hill y col., 1999). Sin embargo, la formación de pentosidina, un marcador avanzado de la reacción de Maillard, se incrementa en función del aumento de presión a pH neutro (Schwarzenbolz y col., 2000).

Los efectos de la aplicación de presión en el desarrollo de la reacción de Maillard, se han estudiado recientemente en un sistema modelo glucosa-lisina calentado a 60°C durante 1-3 horas, en un rango de pH de 5-10 (Moreno y col., 2003). Los resultados obtenidos indicaron que elevadas presiones afectan el desarrollo del pardeamiento en sus distintas etapas y tales efectos están influenciados por los cambios de pH ocasionados por la aplicación de dichas presiones. Por otra parte, cuando el medio no está tamponado y el pH es inferior o igual a 8, la presión no retrasa significativamente el inicio de la reacción pero si el desarrollo de las etapas intermedias y avanzadas, debido posiblemente a que se retarda la degradación de los productos generados a partir del compuesto de Amadori. Sin embargo, si el pH aumenta por encima de 8 la presión acelera la reacción desde las etapas iniciales, coincidiendo con los resultados obtenidos en un sistema tamponado y a pH elevado (pH 10,2) (Hill y col., 1996).

1.2.6. Presencia de minerales

La presencia de cationes metálicos influye de manera importante en la reacción de Maillard, ya que mediante reacciones de oxidación, pueden favorecer la formación de compuestos dicarbonílicos que participan en la reacción (Wolf, 1996), o bien de complejos capaces de catalizarla (Kato y col., 1981; O'Brien y Morrisey, 1997) y, por tanto incrementar el desarrollo del pardeamiento. Tal es el caso de metales como el hierro (III) y el cobre (II) que favorecen su desarrollo (Kato y col., 1981; Alais y Linden, 1990). Sin embargo, en algunos casos los

metales como el manganeso (II) o el selenio (II) pueden inhibirlo, otros como el calcio (II) minimizarlo (Kwak y Lim, 2004), o incluso producir la insolubilización de las melanoidinas (Gomyo y Horikoshi, 1976).

Kwak y Lim (2004) determinaron que cuando mezclas aminoácido-azúcar se incubaban durante 3h en presencia de hierro (II) y cobre (II), el pardeamiento aumentaba en un 80 y 90% respectivamente si el aminoácido utilizado era cisteína. Cuando se trataba de valina y fenilalanina así como del resto de aminoácidos ensayados, los valores obtenidos se incrementaron entre un 10-40%, mientras que en presencia de arginina la intensidad del color se inhibió en torno a un 5-15%.

Por el contrario la adición de FeCl_2 a un sistema modelo glucosa-fenilalanina, pH 5, calentado durante 30 minutos a 140°C , produjo una inhibición del desarrollo del color. No obstante, el nivel de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) se incrementó (Fallico y Ames, 1999). Resultados similares se han obtenido al adicionar otras sustancias minerales como NaCl, el cual puede llegar a disminuir la intensidad del color desde un 15 hasta un 50% en función del aminoácido utilizado (Kwak y Lim, 2004).

1.3. Absorción y metabolismo de los productos de la reacción de Maillard

Diariamente consumimos cantidades significativas de melanoidinas y otros PRM procedentes de los alimentos que forman parte de la dieta habitual, sin embargo se sabe muy poco acerca de su metabolismo en humanos (Somoza, 2005). Los productos de Amadori suelen estar presentes en casi todos los alimentos que consumimos diariamente (Delgado-Andrade y col., 2005b) y su ingesta ha sido estimada por algunos autores en aproximadamente 1g al día, siendo los más abundantes la N- ϵ -fructosil-lisina, N- ϵ -maltulosil-lisina y N- ϵ -lactulosil-lisina (Henle, 2003). Aún no está claro si estos y otros PRM pueden ser absorbidos en el intestino totalmente intactos o sufren alguna modificación por los microorganismos presentes en el cólon (Erdersdobler y col., 1970).

En diferentes estudios en humanos, relacionados con el tránsito metabólico de la N- ϵ -fructosil-lisina, se ha comprobado que tras la posible acción de los microorganismos de la flora intestinal, solamente el 3% de la proteína alimentaria modificada unida a este compuesto es excretada por orina, mientras que el 1% se excreta por heces. Estudios similares realizados en ratas muestran una excreción fecal del 1,5% y urinaria del 9,7% (Erbersdobler y Faist, 2001). Otro estudio realizado en humanos que ingirieron una dieta rica en PRM, ha indicado que la excreción urinaria de estos productos depende estrechamente del tipo de alimentos que compongan la dieta diaria. Se comprobó que la mayor parte de los productos de Amadori consumidos se reabsorbieron durante la digestión y/o fueron degradados mediante mecanismos aun desconocidos, y menos de un 3% se eliminaron por orina sin apenas transformación (Förster y col., 2005).

Estudios en ratas han mostrado que al administrar mediante una inyección intravenosa N- ϵ -fructosil-lisina marcada radiactivamente, ésta se acumulaba principalmente en los riñones y cerca del 6% era eliminada por orina. Menos del 10% en estómago, pulmones, hígado e intestino, un 8% en la sangre y el resto en el músculo. La cantidad excretada por orina lo hizo sin sufrir modificaciones de acuerdo con otros autores (Perkins y col., 1981), y sólo un tercio fue metabolizada (Hultsh y col., 2006). Sin embargo, distintos estudios indican que generalmente la principal vía de eliminación de los PRM es la fecal (Valle-Riestra y Barnes, 1969; Homma y Fujimaki, 1981).

Finot y Mangnenat (1981) estudiaron ampliamente el tránsito metabólico de los PRM en ratas, comprobando que cerca de un 27% se eliminaba por orina. La porción absorbida fue mayor para los PRM de bajo peso molecular que para las fracciones de elevado peso molecular. En otros estudios se ha comprobado que tanto los compuestos de bajo peso molecular como los productos resultantes del metabolismo intestinal de las melanoidinas son absorbidos en una proporción que ronda el 30% (Henle y col., 2000; Erbersdobler y Faist, 2001; Bergmann y col.,

2001; Foerster y Henle, 2003). Otros autores reflexionan sobre la posibilidad de que los PRM de elevado peso molecular de la dieta sean degradados en compuestos de menor peso por acción de la flora intestinal y que muchos de estos metabolitos puedan ser absorbidos en el intestino (Homma y Fujimaki, 1981). Buetler y col., (2008) han observado en ratas, que la biodisponibilidad de ciertos PRM es distinta según se trate de compuestos menos o más procesados, observando que los primeros se excretan mayoritariamente con las heces (85%) y que sólo un 3% es absorbido. Compuestos tempranos como la fructosil-lisina se excretan tanto por vía fecal (40%) como por vía urinaria (30%), mientras que otros como la glucosa unida a β -lactoglobulina y la carboximetil-lisina se eliminan principalmente por orina (26% y 51% respectivamente frente al 14% y 23% recogido en las heces).

En un estudio realizado en células Caco-2, se investigó el transporte y la disponibilidad del HMF, producto intermedio de la reacción, tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de distintos cereales de desayuno y del medio de cultivo enriquecido con HMF. Los resultados indicaron que parte de dicho compuesto pudo ser transformado durante la digestión y retenido en la fracción no soluble, ya que la cantidad disponible para ser absorbida no era directamente proporcional al contenido inicial. En general, la disponibilidad del HMF presente en los cereales de desayuno fue baja, entre 4,98% y 12,99%. Las variaciones que se observaron posiblemente están relacionadas con la composición particular de los cereales donde la fibra puede tener un efecto directo en la disminución de su disponibilidad (Delgado-Andrade y col., 2008b).

Por último, otros autores han estudiado la posibilidad de que compuestos de la reacción como la fructosil-lisina, la carboximetil-lisina, la hiperil-fructosil-lisina y la hiperil-carboximetil-lisina, puedan entrar en el enterocito a través de transportadores de péptidos y aminoácidos como los de la L-lisina o la L-leucina, situados en la membrana apical de la célula. Los resultados indican que el flujo transepitelial de estos compuestos a través de la monocapa de células Caco-2 es

muy bajo y que los transportadores antes mencionados no participan en este proceso, de manera que la entrada en el enterocito podría producirse por difusión simple (Grundwald y col., 2006).

1.4. Consecuencias y efectos de los productos de la reacción de Maillard

1.4.1. Modificación de las características organolépticas del alimento

Como se ha comentado anteriormente, la reacción de Maillard participa en la formación de productos coloreados, como las melanoidinas, y en la generación de aromas, sabores y nuevas texturas durante el procesado doméstico e industrial de los alimentos que mejoran sus características organolépticas y resultan agradables para el consumidor.

Los productos que confieren olor y sabor son muy variados y suelen desarrollarse en las etapas intermedias y avanzadas de la reacción, dando lugar al aroma y sabor típico de alimentos y bebidas como la carne asada, el pescado al vapor, las patatas fritas, el chocolate, el cacao, el pan tostado, el café, té, cerveza y whisky (Cerny, 2008).

Los compuestos de Amadori suelen ser incoloros, pero se consideran precursores de las melanoidinas responsables del color de algunos alimentos como el pan. Durante el horneado, el contenido de agua de la superficie del pan disminuye con respecto al de su interior, y ésta pérdida de agua, unida a las elevadas temperaturas, son factores responsables de que la corteza del pan se oscurezca lo cual es un efecto deseado durante su fabricación (Thorvanldsson y Skjöldebrand, 1998). Durante las primeras etapas de la reacción se forman compuestos de Amadori como la N- ϵ -fructosil-lisina, N- ϵ -lactulosil-lisina y N- ϵ -maltulosil-lisina que por hidrólisis ácida dan lugar a la furosina (Erbersdobler y Hupe, 1991), la cual ha sido determinada en otros alimentos como en la pasta (Resmini y Pellegrino, 1994), en productos de panadería como el pan de molde

(Ramírez-Jiménez, 1998) o en cereales infantiles (Guerra-Hernández y col., 1999), etc.

El hidroximetilfurfural es un producto intermedio de la reacción (Morales y col., 1997), formado también a partir de la degradación de los azúcares a elevadas temperaturas (Kroh, 1994). Se encuentra en la corteza del pan y puede generarse durante la fabricación de otros alimentos como los cereales infantiles (Guerra-Hernández y col., 1999; Garcia-Villanova y col., 1993), los cereales de desayuno (Delgado-Andrade y col., 2008a) o en la pasta liofilizada (Resmini y col., 1993).

Otra reacción responsable de la coloración de los alimentos que puede darse simultáneamente con la reacción de Maillard, es la caramelización a partir de la degradación de los azúcares que existe en condiciones más drásticas: temperatura superior a 120°C, pH inferior a 3 o superior a 9 y baja actividad de agua (Kroh, 1994).

Por otra parte, los compuestos volátiles son los responsables de la aparición de nuevos aromas y olores y determinan el flavor de los alimentos. Generalmente se encuentran a bajas concentraciones entre 1µg-1mg/kg (Cerny, 2008). Dentro de este grupo se incluyen aldehídos, cetonas, furanos, piracinas, furfurales y reductonas, responsables del aroma de alimentos como las patatas fritas envasadas (Wagner y Grosch, 1998; Van Loon y col., 2005) en las que se han identificado hasta 429 sustancias volátiles responsables de su flavor (Carlin, 1983), o en el pollo asado (Kerscher y Grosch, 1998; 2000). En el café y el té (Semmerlroch y col., 1995; Czerny y Grosch, 2000) se han detectado unas 570 y más de 800 sustancias volátiles respectivamente (Nijssen y col., 1996). Otros alimentos en los que se ha estudiado la formación de estos compuestos son la leche desnatada liofilizada (Karagül-Yüceer y col., 2001; 2002) o pescados como el salmón (Methven y col., 2007), etc.

En la carne se ha analizado ampliamente la formación de compuestos aromáticos debidos a la reacción de Maillard (Gasser y Grosch, 1990; Guentert y

col., 1993; Grosch y col., 1993). Durante su cocinado, tanto la tiamina como la ribosa y cisteína juegan un papel importante en la producción de aromas y sabores característicos, dando lugar a la formación de tioles como el 2-metil-3-furantiol, el 2-furfuritiol o el 3-mercapto-2-pentanona, que han sido identificados en la carne cocinada (Evers y col., 1976; Gasser y Grosch, 1988; Gasser y Grosch, 1990). También se ha analizado en derivados de la carne como el jamón y el lomo la formación de aldehídos ramificados, compuestos nitrogenados y azufrados a partir de aminoácidos que se degradan en la reacción de Strecker, y confieren nuevos olores a los alimentos (Ramírez y Cava, 2007).

En general, la formación de aromas depende de muchos factores como temperatura, tiempo, pH, contenido de agua y naturaleza o tipo de aminoácido implicado en la reacción. La cisteína y la tiamina están relacionados con el sabor de la carne mientras que la prolina está asociada al sabor del pan, del arroz o de las palomitas (Van Boekel, 2006). El tipo de azúcar utilizado tiene menor influencia en este sentido.

Los estudios realizados sobre los cambios en la textura que sufren los alimentos debido a la reacción de Maillard son escasos y han recibido muy poca atención (Hill y Easa, 1998; Gerrard y col., 2002a). Los mecanismos implicados en la modificación de la textura no son bien conocidos, sin embargo, algunos estudios sugieren que la formación de enlaces cruzados entre compuestos dicarbonílicos y las proteínas del alimento la afecta profundamente, especialmente en alimentos como el pan y productos de panadería como los croissant (Gerrard y col., 2000; 2001; 2002b).

1.4.2. Aspectos nutritivos

a. Efectos sobre la ingesta y el peso

A pesar del efecto positivo que tienen los productos pardos sobre el consumo de los alimentos por la mejora de sus características organolépticas, algunos estudios *in vivo*, realizados en animales, han mostrado que la presencia de PRM en la dieta afecta negativamente a la ingesta y al peso, produciendo su disminución con respecto a los que no los consumen. Delgado-Andrade y col., (2006) compararon el efecto del consumo en ratas de PRM procedentes de mezclas de glucosa-lisina y glucosa-metionina calentadas a distintos tiempos y observaron que el consumo de glucosa-lisina solo deprimía la ingesta alimentaria si las mezclas se calentaban durante un tiempo prolongado, coincidiendo con autores como Abu-Dweih y col., (2000), quienes indican que la disminución del consumo alimentario aumenta paralelamente al incremento del pardeamiento.

Otros autores también han observado una disminución de peso en ratas alimentadas con fórmulas infantiles líquidas esterilizadas con respecto a las que consumieron las fórmulas en polvo. Esto puede deberse a que durante la esterilización de la leche, la lactosa se hidroliza dando lugar a la formación de un azúcar denominado lactulosa (Sarriá y col., 2001; Sarriá y Vaquero, 2004) que puede modificar el flavor y olor de la leche haciéndola menos aceptable (Burton, 1984). De igual modo, Navarro y col., (2000) observaron que en ratas alimentadas con dietas que contenían una mezcla calentada de caseína, glucosa y fructosa se producía una disminución en la ingesta con respecto a la mezcla no calentada.

En la mayoría de los estudios descritos, realizados en animales, se ha visto una reducción del crecimiento asociada al consumo de PRM procedentes de sistemas modelo aminoácido-azúcar incluidos en la dieta (Furniss y col., 1989; Chuyen y col., 1991), aunque existen datos que indican una ausencia en la variación del peso (Kitts y col., 1993). Los efectos que el consumo de PRM tenga

en este sentido dependen de las dosis consumidas (Abu-Dweih y col., 2000), del tipo de reactivos utilizados y del tiempo durante el que se consumen (Friedman, 1996).

Sin embargo, estudios realizados en humanos, no muestran diferencias significativas en la ingesta alimentaria ni en la evolución ponderal de los individuos tras el consumo de dietas ricas en PRM, comparado con dietas pobres en PRM (Seiquer y col., 2006).

b. Efectos sobre las proteínas y aminoácidos

Una de las consecuencias más importantes de la reacción de Maillard es la degradación de las proteínas producida durante el calentamiento de los alimentos, ya que supone la interacción de grupos amino terminales con grupos carbonilo asociados a azúcares reductores o lípidos oxidados, produciéndose, por tanto, el bloqueo del aminoácido (Hurrell, 1984; Alkanhal y col., 2001; Somoza, 2005). La disminución en la calidad nutritiva de la proteína se produce debido a la reducción de la disponibilidad de aminoácidos (Moughan y col., 1996; Rerat y col., 2002), ya que éstos pueden quedar retenidos por muchos compuestos derivados de la descomposición de los productos de Amadori impidiendo su absorción (Mauron, 1981; Ledl, 1990); también por la inhibición de la actividad de determinadas enzimas implicadas en su digestión (Schumacher y Kroh, 1996; Simonato y col., 2002), o por la reducción de la digestibilidad de la proteína debido a cambios estructurales de la misma (Kato y col., 1986).

Aminoácidos como la metionina, el triptófano, la arginina e histidina pueden afectarse durante el tratamiento térmico de los alimentos (Björck y col., 1983; Finot, 1993), pero el aminoácido más sensible es la lisina, debido a la reactividad de su grupo ϵ -amino incluso cuando forma parte de una cadena peptídica. Aun cuando el calor aplicado no sea excesivo, la pérdida de lisina disponible puede traducirse en una disminución del valor biológico (Mauron, 1982; Björck y col., 1983; Finot, 1993). Sin embargo, cuando la intensidad del tratamiento térmico es

máxima, la reducción de la calidad de la proteína puede ser mayor que la consecuente a la pérdida aparente de lisina disponible (Adrian, 1982; Björck y col., 1983, Erbersdobler, 1989). Estudios en alimentos como la leche y sus derivados con un elevado contenido en lisina, indican que cuando este aminoácido reacciona con el grupo carbonilo de la lactosa, queda bloqueado y, por tanto no es biodisponible, de manera que el valor nutricional de este alimento desciende considerablemente (Van Boeckel y Brands, 1998). Rerat y col., (2002), evaluaron las consecuencias de la ingesta de leche con un alto contenido en lactulosil-lisina en la dieta de los cerdos, pudiendo comprobar que la lisina unida a la lactosa no era biodisponible y que la pérdida del valor nutritivo de la proteína era proporcional al deterioro de la lisina durante el calentamiento de la leche y, en menor grado, a la disminución de su digestibilidad.

La disponibilidad de la lisina también puede afectarse durante el tratamiento térmico de otros alimentos como el pan, las galletas, las pastas, fórmulas infantiles, etc. (Finot, 1993; Rerat y col., 2002). No obstante, el grado de reducción del valor nutricional de la proteína depende de muchos factores comentados anteriormente, tales como la naturaleza de los azúcares y proteínas, temperatura, tiempo, actividad de agua, etc. (Dworschak, 1980; Mauron, 1982).

Existen numerosos estudios *in vivo* encaminados a dilucidar los posibles mecanismos implicados en la disminución de la digestibilidad de la proteína (Öste y Sjödin, 1984; Erbersdobler y col., 1990; Rerat y col., 2002). Adrian (1982) indicó que las melanoidinas procedentes del sistema modelo glucosa-glicina pueden modificar la absorción de algunos aminoácidos y reducir la digestibilidad de la proteína y, otras veces ésta reducción puede deberse a la inhibición de determinadas enzimas implicadas en su digestión, como las enzimas pancreáticas (Valle-Riestra y Barnes, 1969), o las enzimas proteolíticas intestinales como la aminopeptidasa N (Öste y col., 1986).

Estudios recientes realizados en humanos manifiestan que la ingesta de dietas ricas en PRM afecta negativamente la digestibilidad de la proteína, y tiende a mermar la utilización global del nitrógeno de la dieta (Seiquer y col., 2006).

c. Efectos sobre los carbohidratos

El desarrollo de la reacción de Maillard produce también el bloqueo progresivo de los azúcares presentes en los alimentos y además afecta a enzimas intestinales implicadas en su digestión.

Öste y col. (1984) observaron como los PRM de bajo peso molecular, procedentes de mezclas calentadas de glucosa-lisina, inhiben débilmente la actividad de enzimas como la lactasa, invertasa, maltasa y trealasa, mientras que los PRM de elevado peso molecular se comportan como potentes inhibidores de esas disacaridasas, a concentraciones de 1,4-2,8mg/ml, siendo las más afectadas la sacarasa y lactasa. Por el contrario la α -amilasa no se ve afectada, indicativo de que la digestión intestinal de almidón no suele modificarse en presencia de los productos de la reacción de Maillard.

Cuando estos ensayos se realizaron *in vivo*, se comprobó que a pesar de incluir en la dieta de las ratas una elevada concentración de PRM de alto peso molecular (>40mg/Kg), no se produjo una disminución en la actividad de la lactasa o sacarasa y, por tanto, la absorción de lactosa y sacarosa no se vio afectada (O'Brien y Morrissey, 1989a). Otros, incluso han comprobado un incremento en la actividad de ciertas enzimas, como en el caso de las disacaridasas en presencia de melanoidinas procedentes del sistema modelo glucosa-glicina (Gomyo y Miura, 1986). Sin embargo, se ha observado una reducción significativa de la actividad de lactasa, sacarasa y maltasa en la mucosa de ratas consumiendo una dieta que contenía albaricoques pardos, albúmina de huevo con pardeamiento o una mezcla de glucosa-triptófano (Lee y col., 1977a).

Se ha visto que la inhibición de la actividad de estas enzimas por parte de los PRM, con la consecuente disminución en la absorción de los hidratos de carbono, puede causar diarrea y un descenso en el peso de ratas alimentadas con dietas ricas en PRM (Lee y col., 1977b), debido posiblemente a un efecto osmótico de los carbohidratos no absorbidos en el intestino (Pergolizzi y col., 1977). Estos efectos varían en función de la naturaleza de los productos de la reacción, y pueden ser más pronunciados cuanto mayor sea su grado de pardeamiento.

Además de la influencia de los PRM sobre la actividad de las enzimas citadas, se ha visto que en la elaboración y almacenamiento de fórmulas enterales se producen cambios en la composición de los carbohidratos, con la consiguiente disminución de la biodisponibilidad de nutrientes esenciales para el organismo (Lowry y col., 1989). Su almacenamiento durante 6 meses a 30°C produjo una disminución en el contenido total de carbohidratos, sobre todo al final del periodo de almacenamiento, mucho más rápida y acusada cuando se almacenaron a 50°C (García-Baños y col., 2005).

d. Efectos sobre las vitaminas

Son escasos los estudios realizados sobre este tema aunque se ha observado que durante el calentamiento de alimentos como la leche, en la que se forman PRM, se produce un aumento en la destrucción y pérdida de vitaminas como es el caso de algunas del grupo B y el ácido pantoténico mientras que otras como el ácido nicotínico y la biotina apenas se afectan (Finot y Furniss, 1989).

La destrucción de vitaminas también se ha estudiado en alimentos almacenados a elevadas temperaturas como la leche en polvo, en la que se observaron pequeñas pérdidas de tiamina, vitamina B6 y B12, descensos que aumentaron con el avance del pardeamiento (Ford y col., 1983). De igual modo, determinados procesos utilizados en la tecnología alimentaria como la extrusión, en la que llegan a aplicarse temperaturas superiores a 200°C, favorecen el desarrollo de la reacción de Maillard generando productos que pueden reducir la

biodisponibilidad de las vitaminas (Singh y col., 2007b). La vitamina A, E, C, tocoferoles y β -caroteno pueden degradarse durante la aplicación de un calor excesivo en el proceso de extrusión (Anderson y Hedlund, 1990; Killeit, 1994).

e. Efectos sobre los minerales

Son muchos los factores que pueden influenciar la disponibilidad mineral siendo especialmente importantes aquellos que actúan a nivel digestivo, ya que pueden modificar la captación y absorción por el enterocito. Durante la digestión tienen lugar una serie de reacciones químicas y físicas en las que los minerales pueden interaccionar con otros componentes de la dieta viéndose modificada su solubilidad y, por tanto, su utilización posterior (Delgado-Andrade y col., 2004a); tal es el caso de los productos de la reacción de Maillard.

Dada la importancia del efecto de los PRM sobre la biodisponibilidad mineral en el desarrollo de ésta memoria de Tesis Doctoral, su estudio se va a tratar a continuación.

1.4.3. Capacidad quelante de metales de los productos de la reacción de Maillard

Numerosos autores han sugerido que la capacidad quelante de los PRM se debe a que estos compuestos se comportan como polímeros aniónicos capaces de formar complejos con ciertos iones metálicos (Rendleman 1987; 1990; Migo y col., 1997; Delgado-Andrade y col., 2001b) pudiendo modificar su forma fisicoquímica (especie) en la dieta o en el lumen intestinal, alterar el proceso de absorción o afectar su normal metabolismo y excreción (Andrieux y Saquet, 1984; Navarro, 2003), alterando, en definitiva, la biodisponibilidad de los mismos (Navarro y col., 2000; Seiquer y col., 2000).

Son muchos los métodos propuestos con el fin de conocer la habilidad de los PRM para quelar metales, por ejemplo la titración potenciométrica, la diálisis y

la espectrofotometría (Gomyo y Horikoshi, 1976; Homma y col., 1986). Otros autores han propuesto la cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC, del inglés Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) como técnica para dividir las melanoidinas en fracciones homogéneas en función de su habilidad quelante de metales (Terasawa y col., 1991; Wijewickreme y col., 1997; Borrelli y col., 2002).

Hashiba (1986) indicó que los grupos cetona e hidroxilo de los residuos de piranona y piridona, presentes en las melanoidinas, actúan como grupos donadores de protones participando así en la quelación de metales y afirmó que la unión de los iones metálicos a las melanoidinas se produce de acuerdo con la hipótesis del desplazamiento de los hidrogeniones propuesta por Rendleman e Inglett (1990), los cuales determinaron que los H^+ son sustituidos por un ión cobre o calcio uniéndose así a la melanoidina. Además, estos autores indicaron la cantidad de metal que puede unirse a la melanoidina en función de su contenido de nitrógeno. El desplazamiento de protones es evidente en la mayoría de los sistemas, utilizando para estas reacciones la denominación de “reacciones de protonización”. Así, O’Brien y col., (1994) ordenan los minerales en función de la fuerza de formación de los complejos de la siguiente forma:

magnesio > cobre = calcio < zinc

Esta secuencia discrepa de la sugerida inicialmente por Irving-Williams (1953), que propuso la siguiente:

cobre > zinc > magnesio > calcio

La capacidad quelante de los PRM ha sido estudiada tanto en alimentos como en sistemas modelo. Ya en 1976, Hrdlicka mostró *in vitro* que los productos resultantes del calentamiento de mezclas de glucosa-glicina o fructosa-lisina eran capaces de actuar como agentes quelantes en presencia de hierro y cobre, originando pigmentos insolubles que podían influir en la utilización digestiva de

estos minerales (Hrdlicka, 1976). Posteriormente, Stegink y col., (1981) observaron que tras la administración intravenosa de soluciones parenterales esterilizadas que contenían PRM, se producía un aumento en la excreción urinaria de cobre, hierro y zinc en humanos mientras que la administración oral de las soluciones aparentemente no influía en la excreción urinaria de estos minerales. Por el contrario, Johnson y col., (1983) comprobaron en humanos la influencia del consumo de dietas que contenían PRM en la excreción urinaria del ^{65}Zn , observando una reducción en la retención del mineral, relacionada con la presencia en la orina de compuestos pardos de elevado peso molecular capaces de quelarlo. Estudios en ratas demostraron que la excreción urinaria de zinc aumentó significativamente tras la ingesta de dietas que contenían una mezcla calentada de caseína-glucosa (Furniss y col., 1989), glucosa-glutamato (O'Brien y col., 1994), ó caseína-glucosa-fructosa (Navarro y col., 2000). Estudios de solubilidad, tras digestión *in vitro*, de mezclas de caseína-glucosa-fructosa han demostrado que la cantidad de zinc precipitado es significativamente mayor en presencia de la mezcla calentada frente la no calentada, produciendo cambios en la solubilidad que disminuyen la disponibilidad del elemento en células Caco-2 (Navarro y col., 2000). Melanoidinas obtenidas tras esterilizar mezclas de glucosa y diferentes aminoácidos como prolina, leucina, glicina, ácido glutámico o lisina son capaces de quelar zinc y disminuir su disponibilidad aparente, siendo los productos derivados de la lisina los que lo atrapan en mayor medida (Whitelaw y Weaver, 1988).

Se ha observado que tanto las melanoidinas solubles como las insolubles, obtenidas tras el calentamiento de diferentes sistemas modelo aminoácido-azúcar, son capaces de quelar minerales como calcio y cobre (Rendleman, 1987; Moon y col., 1994; Wijewickeme y Kitts, 1997). PRM derivados de mezclas constituidas por glucosa y glutamato monosódico pueden quelar calcio, zinc, cobre y magnesio (O'Brien y Morrisey, 1997).

Estudios realizados en el café han demostrado la capacidad quelante de las melanoidinas que contiene y su afinidad por metales como el hierro, cobre y zinc (Hashiba, 1986; Homma y col., 1986; Homma y Murata, 2001). Resultados parecidos se han observado para el calcio, el cual puede ser quelado débilmente por los productos pardos presentes en el pan tostado. La adición de lactosa al pan y su posterior tostado incrementa la afinidad de estos PRM por el calcio, llegando a afectar significativamente su solubilidad (Rendleman, 1987).

El **hierro** es uno de los minerales más sensible a la presencia de los PRM, tanto de bajo como de elevado peso molecular y su habilidad para quelarlo ha sido previamente demostrada (Tonkovic y col., 1996; Yoshimura y col., 1997). En un estudio, realizado por nuestro grupo de investigación (Seiquer y col., 2001), se intentó determinar si los PRM procedentes de mezclas de glucosa con lisina o metionina modificaban la solubilidad del hierro en condiciones intestinales y, por tanto, su disponibilidad. Los productos tempranos formados al inicio de la reacción cuando el calentamiento era moderado (30 minutos) lo acomplejaban y favorecían su solubilidad, pero a medida que aumentaba el tiempo de calentamiento la solubilidad disminuía (Delgado-Andrade y col., 2004a). Un estudio posterior corroboró que los PRM obtenidos tras el calentamiento moderado de mezclas de glucosa-lisina, aumentaban la solubilidad y biodisponibilidad del hierro tanto *in vitro* como *in vivo*. Mediante ensayos *in vitro*, realizados en cultivos celulares utilizando células Caco-2, se observó que la mezcla cruda (GLO) aumentó ligeramente el transporte de hierro a través de las células sin alterar significativamente su captación intestinal. En presencia de la mezcla calentada en condiciones suaves (30 minutos) se observó un aumento de la solubilidad del hierro, lo cual pudo deberse a la formación de complejos solubles con las melanoidinas que, además, favorecieron la captación del mineral por el enterocito (Delgado-Andrade y col., 2004b). De acuerdo con el estudio comentado anteriormente, el incremento del tiempo de calentamiento de la

mezcla se tradujo en una disminución de la lisina libre y en la formación de melanoidinas insolubles. Estos dos factores podrían explicar la progresiva disminución de la solubilidad de hierro en relación con el calentamiento (Delgado-Andrade y col., 2004b).

Con la finalidad de establecer un procedimiento útil que permita analizar la capacidad quelante de hierro de los productos de la reacción de Maillard, Morales y col., (2005) estudiaron la quelación del mineral mediante la incubación de FeCl_2 con las melanoidinas obtenidas tras el calentamiento durante 24 horas a 100°C de diferentes sistemas modelo aminoácido-azúcar, comparándolas con las procedentes de bebidas como el café, vino y cerveza. Mediante ensayos de saturación se analizó la afinidad por el hierro (II) de cada una de las melanoidinas obtenidas, y se observó que las procedentes de sistemas modelo tienen mucha más habilidad para quelarlo que las procedentes del café, cerveza o vino dulce. De todas formas, casi todos los sistemas modelo fueron capaces de quelar más del 85% del hierro presente al inicio del periodo de incubación, excepto aquellos que contenían cisteína. Las melanoidinas obtenidas, al tener diferente origen, pueden tener diferente estructura y en función de ella su capacidad quelante de hierro puede variar. Por ejemplo, es conocido que las fracciones de bajo peso molecular son las principales responsables de la quelación del mineral en el café (Nakamura-Takada y col., 1994). Se piensa que la estructura de las melanoidinas procedentes de alimentos es más compleja que las obtenidas a partir de un sistema modelo.

Por otra parte se determinó que las melanoidinas poseen en su estructura al menos dos sitios diferentes de unión para el hierro en función de la fuerza de coordinación hacia el mismo. De acuerdo con esta determinación, se calcularon los miligramos de hierro quelados por gramo de melanoidina, clasificándolas en melanoidinas con baja, media y alta capacidad quelante de hierro, determinándose, además, que no existe relación entre este parámetro y el pardeamiento de los PRM expresado como absorbancia a 420nm. Asimismo, se

observó que las melanoidinas de sistemas modelo constituidos por glucosa tienen más capacidad quelante de hierro que las obtenidas de un sistema que contenga lactosa, independientemente del tipo de aminoácido usado (Morales y col., 2005).

Es conocida la afinidad de los PRM para quelar al **cobre** (O'Brien y Morrissey, 1997). En concreto Wijewickreme y col., (1997) indicaron que esta capacidad de las melanoidinas viene influenciada por el tipo de azúcar y las condiciones de la reacción utilizadas para su síntesis. La cantidad de cobre quelada por PRM obtenidos en el calentamiento de mezclas de glucosa-lisina y fructosa-lisina es muy parecida y varía en función de las condiciones experimentales de la reacción. Diversos autores han mostrado que el cobre puede unirse a PRM solubles (Adikari y Tappel, 1973; Moon y col., 1994), mientras que otros indican que es capaz de unirse fuertemente a PRM insolubles procedentes del sistema modelo glucosa-glicina (Rendleman e Inglet, 1990) y glucosa-lisina (Wijewickreme y Kitts, 1998). La fuerza con la que estos compuestos forman complejos con el cobre (II) puede variar, y se ha estudiado en concreto para los PRM denominados N- ϵ -fructosil-lisina y N- ϵ -carboximetil-lisina unidos a un péptido llamando N- α -hipuril-lisina que como tal no forma complejos con el cobre, pero sí tras su glicación, debido posiblemente a que se forman nuevos centros de coordinación para el metal dentro de la cadena proteica. A la vez se observó que la estabilidad de los complejos formados con el mineral es superior para N- α -hipuril-lisina-N- ϵ -carboximetil-lisina, lo cual puede deberse a que el cobre (II) se une, no sólo al nitrógeno del grupo ϵ -amino, sino también al átomo de oxígeno del grupo carboxilo (Seifert y col., 2004). Esta capacidad quelante también se ha observado en otros PRM derivados del sistema modelo glucosa-histidina (Bersuder y col., 2001) y de distintos sistemas constituidos por D-glucosa y aminoácidos como glicina y valina entre otros (Gyurcsik y col., 1993).

Estudios en alimentos como el tomate, indican que determinados productos de Amadori como la D-fructosa-L-histidina, se comportan como potentes quelantes de cobre (II) a pH fisiológico, capaces de formar complejos más estables que otros ligandos de reconocida actividad quelante y antioxidante como la L-histidina y la L-carnosina (Mossine y Mawhinney, 2007).

Estudios *in vivo* pueden sugerir la capacidad quelante de cobre de los PRM, al observar que en ratas alimentadas con dietas ricas en estos compuestos, se incrementa la cantidad de cobre absorbido cuando las necesidades lo requieran, lo cual puede ser favorable (Delgado-Andrade y col., 2001a; Sarriá y Vaquero, 2006).

Esta quelación tiene un significado importante, ya que, por un lado, puede alterar, aumentar o disminuir la biodisponibilidad de metales *in vivo* y, por otro, resultaría beneficiosa como antioxidante al retardar muchas reacciones de oxidación que son catalizadas por este mineral y por el hierro (Wijewickreme y Kitts, 1998).

1.4.4. Aspectos fisiopatológicos

Dada la escasa información disponible sobre la relación entre estructura-efecto de los PRM de la dieta tanto en el propio alimento como en el organismo humano, se han llevado a cabo una serie de investigaciones científico-técnicas financiadas a nivel nacional y europeo denominadas acciones COST que desarrollan su investigación sobre esta temática. Ya en 1999, la acción COST 919 llamada “*Melanoidins in Food and Health*” comenzó a investigar la formación de las melanoidinas en los alimentos y, sus efectos en la salud. Actualmente, en la acción COST 927 denominada “*Thermally Processed Foods: possible health implications*” participan 20 países europeos, entre ellos España, cuyo objetivo principal es el de investigar los métodos para obtener alimentos procesados más saludables y conocer más ampliamente los riesgos y beneficios

de los compuestos que se forman durante el tratamiento térmico de los mismos, como son los productos de la reacción de Maillard (Somoza, 2005).

a. Efectos sobre los microorganismos

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre melanoidinas y microorganismos están orientadas hacia el estudio de cómo afectan los PRM al crecimiento bacteriano, incluyendo un posible incremento en su vida media (Viswanathan y Sarma, 1957; de Lara y Gilliland, 1985), la habilidad de los microorganismos para degradar o decolorar a las melanoidinas (Murata y col., 1992; Terasawa y col., 1996) y el efecto de las mismas en la composición de la flora intestinal (Jemmali, 1969; Horikoshi y col., 1981). Según algunos autores, melanoidinas procedentes de sistemas modelo glucosa-lisina estimulan el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas (Ames y col., 1999; Dell'Aquila, 2003) y se ha comprobado el efecto prebiótico de las melanoidinas procedentes de bebidas como el café (Borrelli y col., 2004) y la corteza del pan (Borrelli y Fogliano, 2005). Sin embargo otros estudios sugieren la actividad antibiótica (de Lara y Gilliland, 1985; Einarsson y col., 1988) y antibacteriana de algunos PRM, como los procedentes de mezclas de lactosa-caseína, capaces de inhibir a la ureasa del *Helicobacter pilory* e impedir su adherencia a la mucosa gástrica (Hiramoto y col., 2004).

b. Efectos mutagénicos, antimutagénicos y cancerígenos

Determinados factores relacionados con la dieta han sido asociados con el desarrollo de diversos tipos de cáncer en humanos. Algunos de estos factores pueden ser potentes compuestos químicos capaces de actuar como mutágenos; entre estas sustancias destacan las aminas heterocíclicas procedentes de la reacción entre aminoácidos, monosacáridos y creatinina durante el tratamiento térmico de los alimentos (Skog y col., 1998). Según algunos autores (Bogen, 1994; Starvic y col., 1995) estos compuestos representan un potencial factor de

riesgo en la etiología del cáncer en humanos, en concreto, los procedentes de las carnes rojas asadas o del pescado a la parrilla (Johansson y Jagerstad, 1994) que se han relacionado, junto con otros metabolitos tóxicos, con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de colon (Sugimura y col., 2004; Vulevic y col., 2004) y cáncer hepático (Itoh y col., 2000). Además, estas aminas, una vez absorbidas pueden ser transformadas a nivel hepático en compuestos incluso más tóxicos y reactivos y ser reabsorbidos por la microbiota intestinal (Boobis y col., 1994). Otro compuesto clasificado como carcinógeno en ratas y ratones es la acrilamida formada mediante la reacción de Maillard, especialmente en alimentos ricos en almidón (Eckburg y col., 2005), cuya actividad y riesgo para la salud en humanos aun están siendo evaluados (Dybing y col., 2005).

Muchos datos de la bibliografía sugieren efectos mutagénicos o genotóxicos de diferentes mezclas de PRM o melanoidinas capaces de inducir aberraciones cromosómicas en las células ováricas de hamster (Powrie y col., 1981), conversión de genes en levaduras (Rosin y col., 1982) y mutaciones en *Salmonella typhimurium* producidas por PRM procedentes de un sistema glucosa-lisina calentado a 100°C durante 10 horas (Shinohara y col., 1980) o a 121°C durante 1 hora (Kitts y col., 1993). Los PRM procedentes de sistemas constituidos por glucosa y otros aminoácidos también muestran esta actividad, pero no es tan marcada como con la lisina, dada la reactividad de sus grupos ϵ -amino (Powrie y col., 1981; Shinohara y col., 1983). El tipo de azúcar utilizado también influye en este sentido y se ha visto que las diferencias en su mutagenicidad vienen determinadas por las variaciones existentes entre sus mecanismos de reacción. Brands y col., (2000) han mostrado que la glucosa y galactosa exhiben una elevada actividad mutagénica relacionada con su participación en la reacción de Maillard. Disacáridos como la lactulosa mostraron una ligera actividad mutagénica o incluso nula en el caso de la lactosa en comparación con sus correspondientes monosacáridos, mientras que la

mutagenicidad de cetosas como la fructosa y tagatosa fue notablemente más alta en comparación con la de sus isómeros, glucosa y galactosa.

Por otro lado, se ha propuesto que ciertas melanoidinas podrían disminuir la absorción de compuestos tóxicos con actividad mutagénica y cancerígena, como son las aminas aromáticas heterocíclicas (Somoza, 2005), mediante la quelación de las mismas (Solyakov y col, 2002). La actividad antimutagénica de los PRM ha sido estudiada en sistemas modelo glucosa-lisina, glucosa-glicina, sacarosa-glicina y xilosa-lisina (Chan y col., 1979; Kato y col., 1985; Kim y col., 1986; Yamaguchi e Iki, 1986; Yen y col., 1992), estableciéndose que esta capacidad puede deberse a la presencia de sustancias reactivas en la melanoidina que actúan como neutralizadores de radicales libres, inactivadores de mutágenos o inhibidores de enzimas (Kim y col., 1986; Hayase y col., 1989).

c. Efectos alérgicos y antialérgicos

Son numerosos los estudios que han demostrado la asociación entre los productos de la reacción de Maillard y el desarrollo de alergias alimentarias, especialmente en la leche (Bleumink y Young, 1968; Mukoyama y col., 1977; Kaminoagawa y col., 1984) y en los cacahuets (Chung y Champagne, 1999), sugiriéndose que los productos formados durante el tratamiento térmico al que son sometidos los alimentos pueden aumentar la alergenicidad de ciertos nutrientes que los constituyen (Maleki y col., 2000).

Sin embargo, estudios en alimentos como la soja (Babiker y col., 1998) y en sistemas modelo reconocen el papel antialérgico de estos productos, de tal modo que se ha visto que PRM procedentes de mezclas de glucosa-ácido-6-aminocaproico ejercen un efecto supresor de la reacción alérgica, ya que inducen la expresión del IFN- γ y de la IL-12 en células de bazo de ratón expuestas a un alérgeno como la ovoalbúmina y en macrófagos de la línea celular J774.1 (Hayase y col., 2005; 2006). Algunas proteínas presentes en frutas como la cereza, la manzana y en vegetales como el apio pueden perder su alergenicidad

debido a su unión con carbohidratos reductores durante su tratamiento térmico (Vieths y col., 1998; Gruber y col., 2004). Estudios realizados en alimentos como el pescado han señalado que la alergenicidad de la tropomiosina del calamar, el mayor alérgeno presente en invertebrados marinos, disminuye al reaccionar con la ribosa durante la reacción de Maillard (Nakamura y col., 2006), en contra de los resultados obtenidos en un estudio previo en el que la alergenicidad de esta proteína en las vieiras se incrementó durante el progreso de la reacción de Maillard con glucosa y ribosa (Nakamura y col., 2005).

d. Reaccion de Maillard *in vivo*

La reacción de Maillard *in vivo* da lugar a compuestos conocidos como “productos de glicación avanzada” ó AGE (del inglés, advanced glycation end-products), que serían realmente los homólogos endógenos de los PRM de la dieta. La formación de estos compuestos en el organismo se produce de forma mucha más lenta, debido a las menores temperaturas, viéndose favorecida por la presencia de hidratos de carbono y proteínas endógenas como el colágeno y las enzimas (Somoza, 2005). Su presencia ha sido relacionada con ciertas enfermedades como diabetes (Bucala y col., 1994; Stitt y col., 2002), neuropatías, retinopatías (Forbes y col., 2003; Stitt y col., 2004), desórdenes oculares como formación de cataratas, glaucoma y degeneración macular (Stitt, 2005), impotencia (Jiaan y col., 1995; Seftel y col., 1997), fibrosis pulmonar (Matsuse y col., 1998), enfermedades vasculares (Wautier y Guillausseau, 1998), aterosclerosis (Stitt y col., 1997), o enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Munch y col., 2003). Se postula que inducen el estrés oxidativo con el consecuente daño neuronal (Yan y col., 1994), provocan la muerte celular programada o apoptosis (Min y col., 1999) y están relacionados con el envejecimiento (Monnier y Sell, 1994). La relación entre los PRM de la dieta y los AGE endógenos es hoy día motivo de estudio, ya que aún se desconoce si poseen efectos sinérgicos o antagónicos.

e. Actividad antioxidante

A pesar de lo que se ha comentado en el apartado anterior sobre el posible papel de los AGE relacionado con el desarrollo de situaciones de estrés oxidativo, uno de los aspectos más interesantes y novedosos de los PRM es la actividad antioxidante que se les atribuye, actualmente objeto de estudio de muchos investigadores, tema que será abordado en el capítulo siguiente.

2. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1. Generalidades

El oxígeno puede considerarse un nutriente esencial para los mamíferos, ya que a partir de él obtienen la energía necesaria para satisfacer sus necesidades en la respiración celular. Además, no puede ser sintetizado ni ser sustituido por otro elemento. A pesar de ser esencial, puede resultar tóxico suministrado en concentraciones elevadas e incluso en concentraciones similares a las del aire. Carl Wilhem Scheele describió en 1777 por primera vez los efectos negativos del oxígeno sobre los seres vivos, sólo dos años después de que Sheele y Joseph Priestley (1775) descubrieran a la vez e independientemente esta molécula. Aunque inicialmente se pensó que la toxicidad del oxígeno se debía a que inactivaba directamente las enzimas celulares, posteriormente Gershman y Gilbert propusieron que los efectos nocivos del oxígeno se debían a los radicales libres y a otras especies reactivas del oxígeno (ERO) que se originaban a partir de él (Gershman, 1964). Esta hipótesis fue desarrollada y totalmente aceptada cuando se descubrió la superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fridovich, 1975).

Los combustibles biológicos son oxidados por el oxígeno que se reduce escalonadamente en la cadena respiratoria liberando energía gradualmente. Esta reducción es completa en su mayor parte, pero hay una pequeña proporción (2-5%) en que se produce de manera incompleta, formándose moléculas con electrones no apareados en su última capa electrónica, que son extremadamente reactivas y se denominan radicales libres (Mataix y Battino, 2002).

2.1.1. Radicales libres

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura (Halliwell y col., 1992); como consecuencia son extremadamente reactivos y, por tanto, tienen una semivida corta y una concentración baja en situación estacionaria (Pryor, 1986; Cadenas, 1989). Pueden ser catiónicos, aniónicos o neutros y normalmente son muy nocivos para la célula (**Fig. 2**).

Dependiendo del elemento al que pertenezca el electrón desapareado, serán radicales libres del carbono, azufre, oxígeno...etc., siendo, estos últimos, los más abundantes y de mayor importancia biológica.

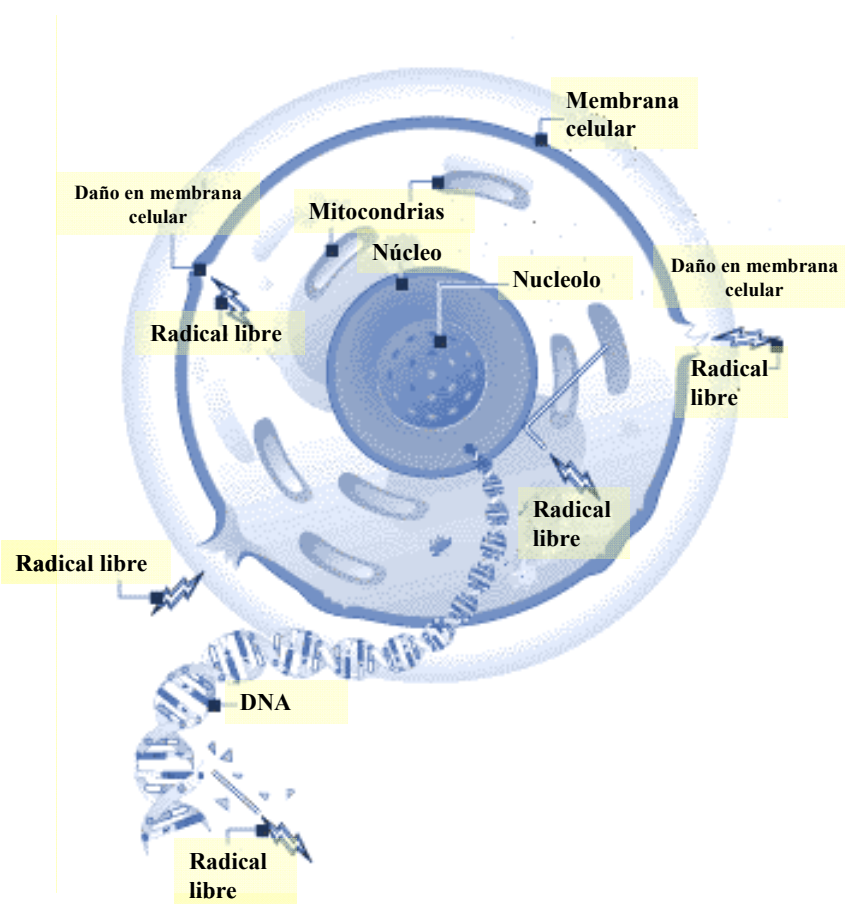


Figura 2. Ataque de los radicales libres a la célula (Austad, 1997)

En este contexto son también interesantes las denominadas especies reactivas (ER), entre las que se incluyen tanto los radicales libres propiamente dichos como compuestos con gran reactividad. Destacan las especies reactivas del oxígeno (ERO) donde se engloban radicales libres como: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el anión peróxido (O_2^{2-}), el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y compuestos no radicales, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2), el ozono (O_3) y el ácido hipocloroso ($ClOH$) (Mataix y Battino, 2002). Estas moléculas se están produciendo continuamente en los sistemas biológicos, muchas son productos intermedios en diferentes reacciones enzimáticas y algunas resultan beneficiosas para el organismo (Southorn y Powis, 1988; Chanock y col., 1994). No obstante, también algunas de estas especies tan reactivas pueden provocar graves daños celulares (Halliwell y Gutteridge, 1999). Así, el radical **superóxido** que se genera principalmente en la mitocondria de las células, afecta a enzimas como la xantino oxidasa y aldehído oxidasa y se ha observado su participación en numerosos procesos citotóxicos, a pesar de ser una especie menos reactiva que otros radicales (Fridovich, 1976; McCord, 1979); parece que es un agente que no actúa directamente, sino que, al metabolizarse por la superóxido dismutasa a peróxido de hidrógeno, puede actuar como fuente del mismo o de otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (Cheeseman y Slater, 1993).

El **peróxido de hidrógeno** se produce principalmente en los peroxisomas (35%), en las mitocondrias (15%) y en el citosol (5%) y, debido a su capacidad para atravesar las membranas biológicas (Chance y col., 1979), puede producir lisis eritrocitaria, inactivación de enzimas como la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa en células de mamífero, oxidación de ácidos grasos insaturados...etc., (Halliwell y col., 1992). Al igual que el anión superóxido presenta una reactividad química limitada. La importancia de la generación del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno se centra en su capacidad para generar especies mucho más reactivas y peligrosas como **el radical hidroxilo**

que ataca prácticamente a todas las moléculas biológicas mediante reacciones en las que se ven implicados metales de transición, principalmente hierro y cobre (Halliwell y Gutteridge, 1989; 1990). Su reactividad es alta y prácticamente indiscriminada considerándosele uno de los principales iniciadores de la peroxidación lipídica (Ursini y col., 1982).

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero sí mediatizada por iones metálicos de transición. En células animales ésta producción puede ser derivada del cumplimiento de las funciones fisiológicas o bien producirse de manera accidental.

Los mecanismos de formación de los RL son tres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Rotura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

Una vez que se ha formado el radical libre en la reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de ceder el electrón a cualquier otro compuesto, originándose nuevos radicales en cadena, lo cual constituye la reacción de propagación que puede amplificarse tanto que llegue a afectar a los tejidos corporales (**Fig. 3**).

A continuación se expone el mecanismo de formación de radicales libres derivados del oxígeno:

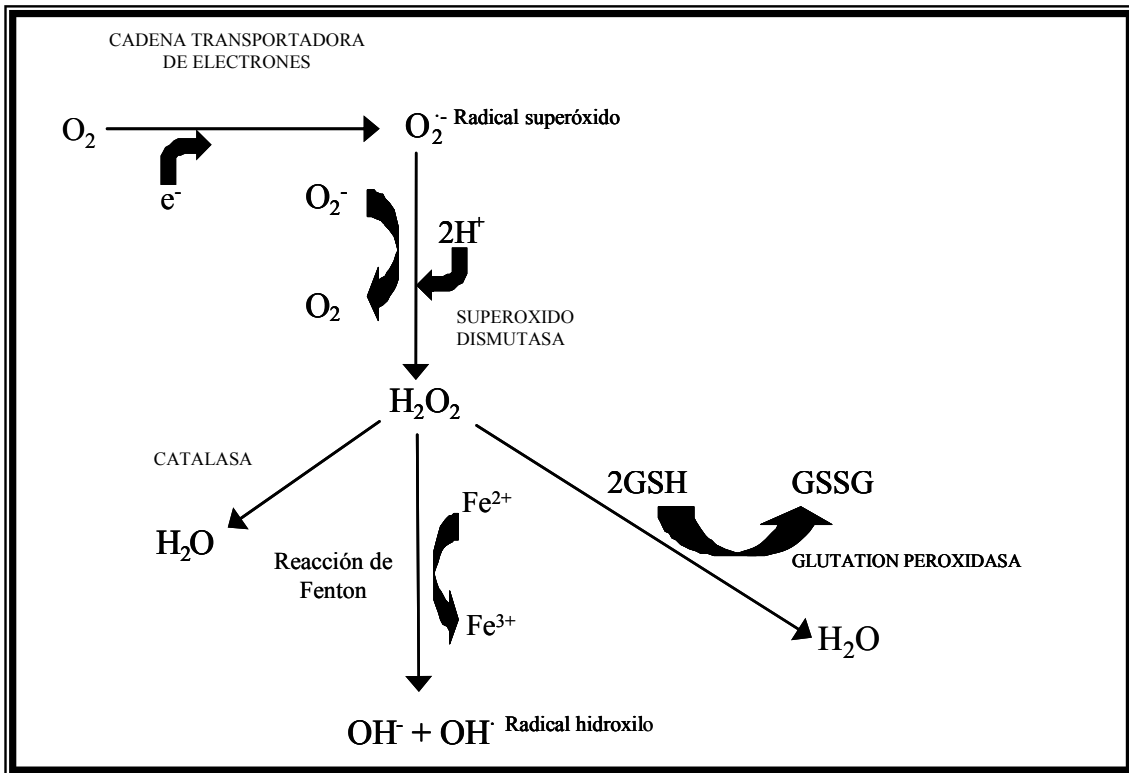


Figura 3. Radicales oxigénicos (Nevado, 2000)

a. Fuentes de producción celular ó endógena de radicales libres

Las principales fuentes de producción de radicales libres a nivel celular se describen a continuación:

- **Cadena de transporte de electrones mitocondrial:** en condiciones fisiológicas es considerada como la mayor fuente de formación de radicales libres de carácter accidental. Del total del oxígeno que llega a la mitocondria, el 5-10% se reduce por la acción de los electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria que escapan de ésta (Borevis y Chance, 1973), siendo responsable de la formación del anión superóxido que por acción de la superóxido dismutasa pasa a peróxido de hidrógeno (Boreris y Cadena, 1975) y éste a radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss (**Fig. 3**). Cualquier situación que produzca un aumento en el

consumo de oxígeno aumentará de forma proporcional la generación del radical superóxido, debido a que su formación es flujo dependiente de la cadena respiratoria mitocondrial.

- **Sistema xantina-oxidasa:** la xantina-oxidasa es la primera oxidasa identificada como productora de radicales libres. Está ampliamente distribuida en distintos tejidos de los mamíferos (Woolfolk y Downard, 1977). En el hombre se encuentra en el hígado, yeyuno, glándulas mamarias, músculo esquelético y riñones (Linder y col., 1999). Aunque esta enzima cataliza la oxidación de un variado número de sustratos endógenos como las purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos, y exógenos como el etanol, está considerada como una enzima constituyente del catabolismo de las purinas en la mayoría de las células, que cataliza los pasos terminales de la vía de degradación de la purina y la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, acoplando a dicha oxidación una reducción monovalente del oxígeno molecular (Roy y McCord, 1983). Como consecuencia se producen peróxido de hidrógeno y anión superóxido, el cual solo se forma cuando se altera la homeostasis celular, por ejemplo en situaciones de isquemia (Bracci, 1992). En condiciones fisiológicas se encuentra como xantina deshidrogenasa, la cual utiliza NAD^+ como aceptor de electrones produciendo NADH (Parks y Granger, 1986).
- **Metabolismo del ácido araquidónico:** el ácido araquidónico es un ácido graso insaturado de cadena larga que posee cuatro dobles enlaces ($\text{C}_{20:4\omega 6}$). Es un precursor esencial de las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, en cuya síntesis se oxida por acción la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, generándose anión superóxido cuando hay NADH o NADPH disponibles (Kukreja y col., 1986). La actividad hidroperoxidasa también conduce a la formación del radical superóxido y la lipooxigenasa parece estar involucrada en la síntesis de

oxígeno singlete (Duran y col., 1984). A la vez, tanto por la vía de la ciclooxigenasa como de la lipooxigenasa pueden generarse peróxidos intermedios (Flitter, 1993).

- **Fagocitos y otras fuentes de radicales:** las células fagocíticas constituyen otra fuente biológica importante de radicales libres, principalmente de anión superóxido. Su formación se produce durante la fagocitosis de los microorganismos cuando su membrana plasmática entra en contacto con ellos, provocando un aumento en el consumo de oxígeno (Babior, 1984). El anión superóxido pasa a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa y éste a ácido hipocloroso por acción de la mieloperoxidasa. En los fagolisosomas el peróxido de hidrógeno puede dar lugar a la formación del radical hidroxilo a través de la clásica reacción de Fenton (Winrow y col., 1993). Otro de los radicales libres que pueden formarse durante la fagocitosis es el óxido nítrico, cuya reacción con el superóxido produce la formación de peroxinitrilos que al descomponerse dan lugar a hidroxilo.
- **Autooxidación de pequeñas moléculas:** iones divalentes, tioles, quinonas, catecolaminas, tetrahidropterinas y flavinas pueden sufrir reacciones de oxidación generando radicales libres, principalmente anión superóxido. Cuando estas moléculas oxidadas se vuelven a reducir, se establece un ciclo redox que puede implicar un consumo desproporcionado de oxígeno molecular y equivalentes redox (Freeman y Grapo, 1982; Proctor y Reynolds, 1984).
- **Oxidación de hemoglobina y mioglobina:** la oxidación de estas hemoproteínas puede producir radicales libres de oxígeno. Cuando el hierro en forma ferrosa de la hemoglobina liga oxígeno molecular, se forma una molécula de hemoglobina oxigenada que puede descomponerse dando lugar a anión superóxido y hemo-Fe³⁺, pasando

a metahemoglobina por acción de las metahemoglobina reductasas (Valenzuela y Videla, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1999).

- **Peroxisomas:** estos orgánulos tienen una gran capacidad para producir peróxido de hidrógeno debido a la gran concentración de oxidasas que contienen, las cuales catalizan la reducción divalente del oxígeno sin formación de radical superóxido (del Río y col., 1988).
- **Transporte electrónico microsomal:** el denominado citocromo P₄₅₀ es, en realidad, un conjunto de citocromos localizados en el retículo endoplásmico y en otros orgánulos implicados en la oxidación de sustratos a expensas de oxígeno que requiere poder reductor en forma de NADPH, aportado por la NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa, liberándose peróxido de hidrógeno y anión superóxido (Sevanian y col., 1990).
- **Metales:** la génesis de derivados oxigénicos reactivos más agresivos que el anión superóxido o que el peróxido de hidrógeno suponen normalmente la participación de metales de transición disponibles como el hierro y el cobre. Dada su importancia y la relación con el objetivo de esta tesis, se mencionaran detalladamente en un capítulo aparte.

b. Fuentes de producción exógena de radicales libres

Dentro de este grupo destacan las radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta, luz visible en presencia de fotosensibilizadores y activación de xenobióticos que ejercen su acción tóxica mediante su metabolización a productos intermedios reactivos considerados como radicales libres. Entre ellos se encuentran diversos pesticidas, el humo del tabaco, antimicrobianos como la adriamicina, capaz de incrementar el estrés oxidativo y la formación de productos derivados de la peroxidación lipídica (Nevado, 2000), fármacos anticancerígenos y otros medicamentos (Martínez-Cayuela, 1998).

2.2. Papel de los metales (hierro y cobre) en el estrés oxidativo

Numerosos estudios indican la evidente participación de los metales de transición como catalizadores de los procesos oxidativos a nivel biológico y, por tanto, su toxicidad puede estar en parte relacionada con el daño oxidativo celular y tisular. Metales como el hierro, cobre, cadmio, cromo, plomo, mercurio, níquel y vanadio entre otros, exhiben la habilidad de producir especies reactivas del oxígeno que intervienen en procesos de peroxidación lipídica, daño en el ADN, depleción de proteínas con grupos sulfhidrilo (SH), alteraciones en la homeostasis del calcio, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y neurotoxicidad. No obstante, existen diferencias en cuanto a estos efectos en función de su solubilidad, absorción, transporte, reactividad química y capacidad para formar complejos con otras moléculas (Stocs y Bagchi, 1995).

Algunos metales tienen un doble papel en situaciones de estrés oxidativo, por un lado su participación como promotores en las reacciones de oxidación, y, por otro, su papel en la defensa antioxidante al formar parte de enzimas antioxidantes, como son la catalasa y la superóxido dismutasa. Por ejemplo, la estructura de la catalasa contiene hierro, mientras que el zinc y el cobre forman parte de la superóxido dismutasa citosólica. El zinc, además, tiene actividad antioxidante por sí mismo, habiéndose propuesto dos mecanismos de acción diferentes: por un lado, protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la oxidación (Gibbs y Jordan, 1981) y, por otro, previene la generación de especies reactivas del oxígeno mediante competencia por los sitios de unión con metales como el hierro y el cobre, de los que se diferencia por tener un solo estado de oxidación, impidiendo su participación en la reacción de Fenton (Bray y Bettger, 1990; Zago y Oteiza, 2001).

La versatilidad del hierro y del cobre en el metabolismo oxidativo confiere a estos metales la capacidad de ejercer funciones prooxidantes y/o antioxidantes según el complejo o la estructura de la que formen parte. Son nutrientes esenciales para el ser humano y tanto su sobrecarga como su deficiencia,

controlada mediante la alimentación, afectan a la salud (Cardoso y Galleano, pág.web). Una gran variedad de estudios han demostrado la habilidad del hierro en forma de quelatos o complejos para catalizar la formación de radicales libres y estimular la peroxidación lipídica en cuyo desarrollo juega un papel crucial, tanto en forma ferrosa como férrica, formando parte de un complejo dioxígeno-Fe. Este proceso también se ve favorecido cuando el hierro se encuentra unido a otros quelantes como el ADP, histidina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o citratos (Alleman, 1985; Minotti y Aust, 1987; Aust, 1989; Ryan y Aust, 1992). Ligandos como el nitrilotriacetato (NTA) y ATP quelan al hierro favoreciendo la oxidación de los lípidos y daños en el ADN (Iqbal y col., 2003); la unión del hierro al EDTA puede provocar un daño oxidativo a través de su participación en la reacción de Fenton (Engelmann y col., 2003). Se ha observado que la autooxidación del hierro (II) se ve incrementada por el EDTA y el NTA. El NTA permite al hierro (II) reaccionar con el peróxido de hidrógeno con la consiguiente formación de radicales hidroxilo. La actividad redox del complejo EDTA-Fe puede deberse a que este ligando no satura completamente los sitios de coordinación del hierro, de manera que aquellos que quedan libres pueden ser ocupados por el agua y otros reductores celulares.

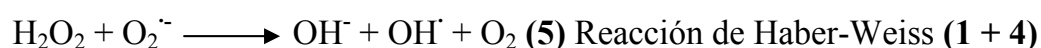
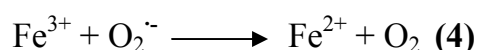
El cobre actúa de una forma similar al hierro catalizando estos mismos procesos (Chan y col., 1982).

Como ya se ha comentado, un ejemplo conocido es la implicación de estos dos metales en la reacción de Fenton, en la que actúan como agentes catalíticos promoviendo la formación del radical hidroxilo (Nevado, 2000).

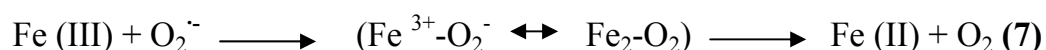
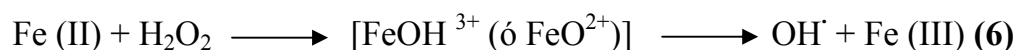
La reacción de Fenton **(1)** se ve favorecida por la presencia de agentes reductores como el ascorbato **(2)** y el anión superóxido **(3)** que reducen el ión férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), el cual reacciona con el peróxido de hidrógeno iniciándose el proceso.

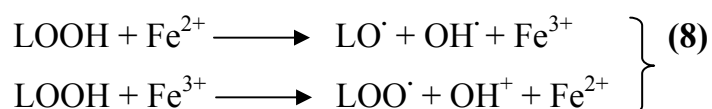


Cuando el agente reductor es el anión superóxido se inicia la denominada reacción de Haber- Weiss o “reacción de Fenton conducida por el $\text{O}_2^{\cdot -}$ ” (Halliwell y col., 1992) (5), siendo ésta, la suma de la reacción de Fenton (1) y la capacidad del anión superóxido para reducir metales de transición (4).

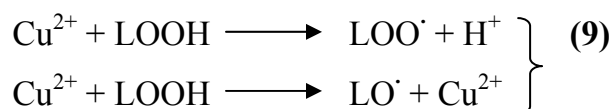


Por otra parte, los complejos de hierro son considerados como los auténticos iniciadores de la peroxidación lipídica que consiste en un daño oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados producido mediante un proceso autocatalítico e incontrolable. A pesar de que se observa una tendencia a favor de las especies ferrilo (6) y perferrilo (7), se cree que es realmente un complejo $\text{Fe}^{2+}\text{-Fe}^{3+}\text{-O}_2$ el que inicia el proceso (Shaich, 1992). Los hidroperóxidos lipídicos (LOOH) que se forman en esta etapa son muy inestables en presencia de hierro y de cobre. Las sales ferrosas, reaccionan rápidamente con estos productos, generando radicales alcoxilo lipídicos y sales férricas que pueden generar radicales peroxilo (8).





El cobre (Cu^{2+}) participa como catalizador de las reacciones de lipoperoxidación (9) en presencia de trazas de peróxidos lipídicos. Por este motivo es utilizado frecuentemente *in vitro* para estimular la lipoperoxidación (Estrebauer y col., 1992), observándose que tanto en forma cúprica como cuprosa posee mayor capacidad que el hierro para formar especies reactivas del oxígeno, produciendo un daño mayor a bases del ADN, así como la rotura de sus hebras (Guyton y Kensler, 1993; Brezova y col., 2003). Además, a diferencia del hierro, la peroxidación lipídica catalizada por el cobre puede ocurrir sin la producción de radical superóxido y es independiente del peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo (Lynch y Frei, 1993).



Por otra parte, determinados estudios *in vitro* han demostrado el papel del cobre en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Haidari y col., 2001; Burkitt, 2001), e incluso más en las de alta densidad (HDL) (Raveh y col., 2000). No sólo los iones de cobre libres intervienen en la oxidación de las LDL, sino que también lo hacen enzimas como la ceruloplasmina que actúa como una fuente de cobre que puede ser atacada por radicales libres como el peroxinitrato favoreciéndose de un exceso del mineral (Mukhopadhyay y Fox, 1998). No obstante, también se ha observado que una depleción en los niveles de cobre puede disminuir la capacidad de las células de producir enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), con lo que se produciría un incremento en el daño oxidativo provocado por radicales oxigénicos (Pan y Loo, 2000) que

también se ha comprobado cuando se origina una sobreexpresión de la Cu-Zn superóxido dismutasa (Lombardi y col., 1998).

2.3. Efectos de los radicales libres y de las especies reactivas sobre los sistemas biológicos

La capacidad de cada radical libre o especie reactiva como agentes prooxidantes está determinada por factores como su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. De este modo, el radical hidroxilo reaccionará con cualquier molécula cercana, dada su elevada reactividad y baja especificidad, y su peligro dependerá del compartimento celular en el que se origine o las moléculas a las que ataque. Especies menos reactivas, como el anión superóxido, reaccionarán menos indiscriminadamente pero de forma mucho más específica y selectiva, teniendo incluso mayores consecuencias biológicas.

El orden creciente de reactividad es $O_2^{\cdot-} < H_2O_2 < OH^{\cdot}$. Estos tres compuestos pueden introducirse en determinados compartimentos celulares dada su habilidad para atravesar las membranas e interactuar con pequeñas biomoléculas de bajo peso molecular como las vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos y lípidos, con macromoléculas como las proteínas y ácidos nucleicos o con estructuras supramoleculares como las membranas y lipoproteínas, produciendo los efectos que se describen a continuación:

- **Hidratos de carbono:** son dañados en menor proporción que otras moléculas. Monosacáridos como la glucosa, el manitol y ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo produciendo sustancias reactivas (Sies, 1985; Blake y col., 1987). En dicha reacción se produce la pérdida de un hidrógeno, generándose una desoxirribosa con un radical centrado en el cuarto carbono. Reacciones sucesivas de este radical pueden producir roturas del ADN, liberándose la base intacta o el azúcar modificado (Mataix y Battino, 2002). Los polisacáridos pueden ser

atacados por las ERO fragmentándose en unidades más sencillas. Así, el ácido hialurónico puede despolimerizarse en presencia de una elevada concentración de radicales hidroxilo, produciendo un descenso en la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones, lo que justificaría el desarrollo de la artritis (Greenwald y Moy, 1980).

- **Aminoácidos:** los radicales libres pueden reaccionar con aminoácidos que contengan grupos insaturados o azufre como la fenilalanina, histidina, triptófano, cisteína, tirosina o metionina sufriendo modificaciones oxidativas que producen alteraciones en su papel fisiológico que pueden ser reversibles como la óxido-reducción de los tioles o irreversibles como la rotura del anillo de histidina o triptófano (Mataix y Battino, 2002).
- **Colesterol:** a partir de él pueden formarse hidroperóxidos de colesterol, oxiesteroles oxidados y derivados oxidados implicados en enfermedades como la aterosclerosis o la enfermedad cardiovascular (Mataix y Battino, 2002).
- **Proteínas:** las consecuencias biológicas más graves son la oxidación de enzimas, con la consiguiente pérdida de funcionalidad y de las proteínas estructurales, lo que produce alteraciones graves en la arquitectura celular. El hecho de que una proteína sea atacada por un RL o ERO depende de la composición en aminoácidos y de la accesibilidad a los mismos. Estos RL o ERO pueden modificar el estado redox de los ligandos metálicos de muchas metaloproteínas, iniciando una reacción en cadena de formación de más RL y formando complejos en el interior del ambiente proteico. Tal es el caso de la oxihemoglobina que se convierte en metahemoglobina al reaccionar con el anión superóxido o con el peróxido de hidrógeno (Freeman y Grapo, 1982; Valenzuela y Videla, 1989) y de una hemoproteína como la catalasa que es inhibida por los radicales superóxido, convirtiéndola en sus formas inactivas ferrilo y ferroxi (Halliwell y Gutteridge, 1999). El resultado es la conversión de algunos

residuos aminoacídicos en derivados carbonilos. La concentración de grupos carbonilo es una buena medida de la oxidación proteica mediada por las especies reactivas de oxígeno. Estos grupos pueden reaccionar con carbohidratos durante la reacción de Maillard generando los denominados productos avanzados de la glicación (AGE), la mayoría inestables y reactivos (Dalle-Donne y col., 2005). Los AGE mejor caracterizados químicamente encontrados en humanos son la pentosidina y la carboximetil-lisina.

Otras enzimas que pueden verse afectadas por los RL al reaccionar con ellos sus aminoácidos constituyentes son la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, papaína y superóxido dismutasa. Estas interacciones pueden dar lugar a alteraciones estructurales en las proteínas, provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Stadtman, 1992; Gebicki y Gebicki, 1993). Los enlaces peptídicos también pueden ser dañados por las ERO y como consecuencia pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por acción de los radicales hidroxilo y peróxido (Wolf y Dean, 1986).

Por otra parte la proteína puede ser atacada por radicales secundarios procedentes de la peroxidación lipídica o incluso por subproductos obtenidos por la propia interacción de los RL con las proteínas (Stadtman, 1992).

- **Ácidos nucleicos:** tanto el ARN como el ADN son objetivos de los RL y ERO. El radical hidroxilo puede reaccionar tanto con bases púricas como pirimidínicas así como con las pentosas ribosa y desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1999). Esto se traduce en aberraciones cromosómicas, reacciones de entrecruzamiento y, en muchos casos, la ruptura de las hebras del ADN (Demple y Linn, 1982; Harman, 1992; Higuchi y Linn, 1995). Los daños producidos pueden escapar a los mecanismos de

reparación, dando lugar a mutaciones, cáncer o a la muerte celular (Cerutti, 1985; Davies y col., 1990).

- **Lípidos y peroxidación lipídica:**

La *peroxidación lipídica* es un mecanismo bien conocido de daño celular, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo y como biomarcador de contaminación ambiental (Di Giulio, 1991). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son fundamentales en la célula ya que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares y son responsables de su fluidez. Su función es mantener la integridad celular (Muriel, 1997) encontrándose en la membrana plasmática, la membrana celular del retículo endoplásmico y la membrana mitocondrial. Los PUFAs son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación se denomina peroxidación lipídica. Esto se debe a que poseen dobles enlaces C=C de tipo cis separados por un CH₂ alílico lo que les hace especialmente susceptibles al ataque de los RL. Tal es el caso, por ejemplo, del ácido linoleico (C18:2n6), el araquidónico (C20:4n6) y el docosahexaenoico (C22:6n3). Los ácidos grasos monoinsaturados son más resistentes, mientras que los saturados solo son oxidados bajo condiciones extremas (Cheeseman, 1993). Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres en la célula, ya que la destrucción de los PUFAs, junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y su ruptura, provoca un desmoronamiento de la estructura de membrana que conduce a una pérdida de la permeabilidad y, por tanto, a la muerte celular. La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación lipídica depende del grado de instauración de los ácidos grasos de las mismas, de la posición de los dobles enlaces y de la presencia de iones hierro (Ursini y col., 1989), que, como se ha comentado previamente, participa en numerosas reacciones de oxidación. Una vez iniciado, el proceso adquiere forma de cascada de producción de radicales libres hasta la formación de peróxidos orgánicos y otros productos como los hidroperóxidos de ácidos grasos y una serie de

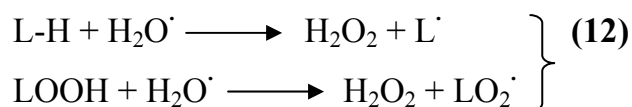
metabolitos, algunos muy tóxicos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Díaz y col., 1998) (**Fig. 4**).

En general, la peroxidación lipídica se divide en tres fases: iniciación, propagación y terminación.

- a. Iniciación:** las reacciones de iniciación dan lugar a la formación de radicales libres a partir de los PUFAs y/o peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. El comienzo consiste en el ataque de las especies radicales capaces de sustraer un átomo de hidrógeno del metilo de la cadena del ácido graso, formándose un radical lipídico centrado en el carbono (**10**) (Halliwell y Chirico, 1993; Cheeseman, 1993).



Existe una baja probabilidad de que este proceso se realice espontáneamente, surgiendo la duda sobre la vía a través de la cual se inician los procesos de propagación de la peroxidación lipídica. Dentro de las ERO, el radical hidroxilo se considera como iniciador, dado que puede atacar todas las moléculas biológicas como los lípidos de membrana (**11**) y la forma protonada del anión superóxido (**12**).



Además, los metales de transición juegan un papel central en la génesis de los radicales libres que actúan como iniciadores de la peroxidación lipídica, ya que pueden ejercer como catalizadores en la formación de las ERO (Aust y col., 1985), tal y como se ha indicado en

el apartado 2.2. Los sistemas experimentales utilizados para generar la peroxidación lipídica suelen usar sales de hierro y cobre como metales catalizadores (Aust y Svingen, 1982). Existen estudios que indican que tanto el hierro libre (Gutteridge y col., 1982) como unido a proteínas, como la ferritina, pueden inducir la peroxidación lipídica (Gutteridge y col., 1983). La quelación del hierro por sustancias como EDTA (Pucheu y col., 1993), ADP y ATP (Hochstein, 1981) produce un potencial redox que favorece su acoplamiento con las reacciones de reducción de oxígeno y, por tanto, el inicio de la peroxidación.

- b. Propagación:** se trata de la activación de la peroxidación lipídica por un radical lipídico con la consiguiente acumulación de peróxidos lipídicos (Cheeseman, 1993), siendo muchos los factores que influyen en la extensión de la cadena de propagación. En esta etapa, los hidroperóxidos formados durante la iniciación, suelen reaccionar con metales como hierro y cobre, cuya presencia es casi imprescindible para romperlos, generando nuevos radicales capaces de iniciar nuevas cadenas de lipoperoxidación (apartado 2.2., reacciones 8 y 9), siendo difícil distinguir entre la iniciación por complejos metálicos y las reacciones de propagación a partir de los hidroperóxidos preformados, demostrándose que una gran cantidad de compuestos que transportan hierro como la hemoglobina, el complejo cisteína- Cl_3Fe y el EDTA- Fe^{3+} , facilitan su descomposición (Hamberg, 1975; Gardner y col., 1978; Svingen y col., 1979).
- c. Terminación:** en esta última fase se produce la combinación de los radicales lipídicos para dar lugar a la formación de compuestos no radicales (**13**) como el MDA y el 4-HNE, hidrocarburos volátiles oxigenados y no oxigenados como el pentano y etano (Cohen, 1982; Paraidathathu y col., 1992), o incluso compuestos no reactivos

mediante reacciones con antioxidantes tipo “scavenger”, como la vitamina E (14).

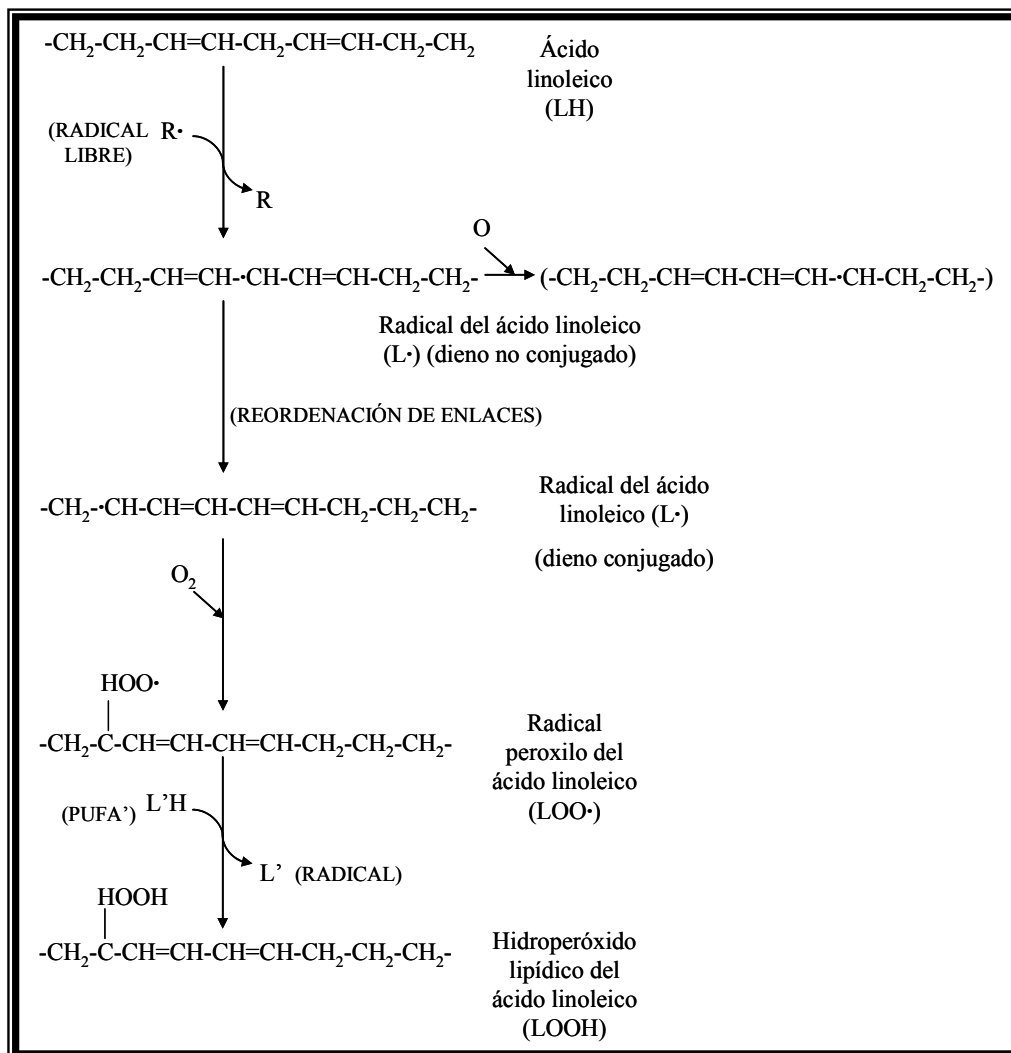
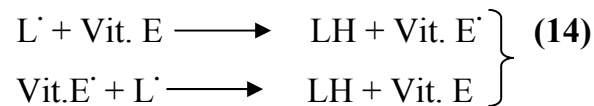
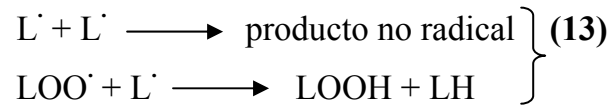


Figura 4. Esquema de la peroxidación lipídica a partir del ácido linoleico (Mataix y Battino, 2002).

2.4. Prevención y reparación del daño oxidativo: ANTIOXIDANTES

A pesar del daño oxidativo que pueden originar estos compuestos, el organismo cuenta con una serie de sistemas de defensa antioxidante que intentan neutralizar la agresión; un antioxidante se define como “cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo.” (Halliwell y Gutteridge, 1988; Mataix y Battino, 2002). Según Valko y col., (2006), en general, un buen antioxidante debería:

- Atenuar, reducir o incluso anular específicamente la actividad de los radicales libres.
- Quelar metales implicados en el estrés oxidativo como el hierro y cobre.
- Interactuar con otros antioxidantes.
- Tener un efecto positivo sobre la expresión génica.
- Ser rápidamente absorbido.
- Tener una concentración adecuada a nivel fisiológico para poder ejercer su acción en tejidos y fluidos.
- Ser hidrosolubles y/o liposolubles.

Los sistemas antioxidantes del organismo se caracterizan por su heterogeneidad, ya que pueden estar localizados intra y extracelularmente en multitud de tejidos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles y proceder de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes propiamente dichos o provienen de ellos y otros son productos del metabolismo.

Hay varias clasificaciones de antioxidantes, según distintos aspectos de los mismos (localización, función, procedencia...). La más ampliamente aceptada es la que los agrupa en función de su mecanismo de acción en **(Tabla 1)**:

- a. Antioxidantes de prevención: impiden la formación de radicales libres mediante la descomposición no radical de lípidos peroxidados (LOO) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el secuestro de metales por quelación y la inactivación del O₂ activo.
- b. Antioxidantes eliminadores de radicales libres: neutralizan radicales al inhibir el inicio de la cadena o romper su propagación.
- c. Sistemas enzimáticos de reparación o de síntesis de novo: reparan los daños producidos y reconstituyen la membrana.

TIPO DE DEFENSA	MECANISMO DE ACCIÓN	ANTIOXIDANTE
Prevención	Impiden la formación del RL: - Descomposición de H ₂ O ₂ - Quelación de metales	Catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa Transferrina, ceruloplasmina ¿Productos de Maillard?
Eliminadores de radicales (scavenger)	Inhiben el inicio de la cadena y rompen la propagación	Vitamina A, E, C Coenzima Q ₁₀ Flavonoides y polifenoles ¿Productos de Maillard?
Reparación y síntesis de novo	Reparan los daños y reconstituyen la membrana	Enzimas de reparación del ADN, proteasas, transferasas

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes en función de su mecanismo de acción

Estos sistemas antioxidantes se producen de forma constante en el organismo al igual que los radicales libres que pueden agredir la propia estructura celular con pérdida de la misma así como de su funcionalidad. Ante esta agresión oxidante, el organismo responde intentando neutralizarla, utilizando la defensa antioxidante. Cuando la agresión supera la defensa se habla de una situación de **estrés oxidativo** (Mataix y Battino, 2002), es decir, el balance oxidativo existente entre la producción de radicales libres y la de defensas antioxidantes se

rompe, bien por una superproducción de los primeros o por una reducción de las segundas (Halliwell y col., 1992; Halliwell y Chirico, 1993) (**Fig. 5**).

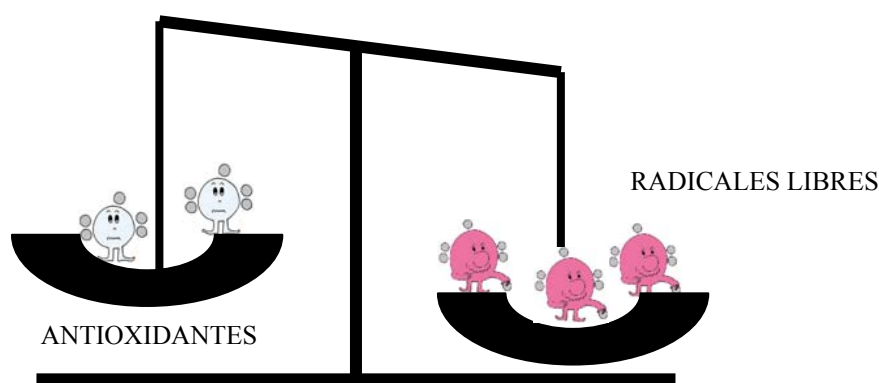


Figura 5. **Pérdida de equilibrio entre radicales libres y antioxidantes: estrés oxidativo**

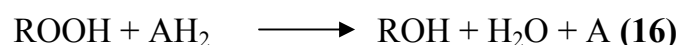
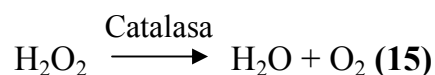
Las especies reactivas generadas en la situación de estrés oxidativo pueden iniciar procesos patológicos graves y favorecer su progresión (Lindsay y Astley, 2002).

Los radicales libres del oxígeno se han relacionado con patologías como cáncer, diabetes (Okamoto, 1985), procesos reumáticos (Wolf y col., 1986), patologías cardiovasculares (Byers, 1993), afecciones broncopulmonares y patologías gastroentéricas (Slade, 1993), así como con el proceso de envejecimiento (Harman, 1992) o las alteraciones aparecidas a consecuencia del ejercicio físico extenuante (Viña, 2001; Aguiló y col., 2003; 2005).

2.4.1. Mecanismos enzimáticos

Se trata de enzimas que proporcionan una función protectora frente a los oxidantes biológicos, disminuyendo la concentración intracelular de radicales libres. Entre ellas destacan la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH-quinona oxidorreductasa y la epóxido hidrolasa entre otras.

- Catalasa:** se trata de una enzima presente en todas las células animales, plantas y bacterias aeróbicas (Mates y col., 1999). Dentro de las células se encuentra principalmente en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%) (Nieto, 1993), aunque también se ha localizado en las mitocondrias (Prasad y col., 1994), mostrando una mayor actividad en hígado y eritrocitos. Se trata de una hemoproteína ferroporfirínica con un peso molecular aproximado de 240kDa (Djordjevic, 2004) que presenta una doble función catalítica-peroxídica. Por un lado, cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno **(15)**, observándose que una sola molécula de catalasa puede reducir unos 6 millones de moléculas de peróxido de hidrógeno por minuto (Valko y col., 2006). Esta enzima tiene constantes de velocidad relativamente elevadas, pero presenta una baja afinidad por el sustrato, de manera que son necesarias altas concentraciones de peróxido de hidrógeno para activarla. Sin embargo, se ha observado que puede verse inactivada a concentraciones de H₂O₂ superiores a 0,1M. Por otro lado, su papel peroxídico se basa en la oxidación de un dador de hidrógeno como el metanol, etanol, fenoles, etc., con el gasto de un mol de peróxido o con el consumo de los hidroperóxidos alquilo **(16)**. El predominio de una actividad u otra depende de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de peróxido de hidrógeno en el sistema (Aebi, 1984).



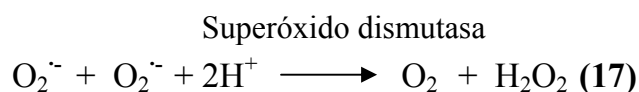
- **Superóxido dismutasa (SOD):** son las principales enzimas implicadas en la desintoxicación de las ERO mediante el secuestro del radical $O_2^{\cdot-}$ que sufre una dismutación para producir peróxido de hidrógeno y oxígeno (17). Se trata de un grupo de metaloproteínas (CuZnSOD, MnSOD, FeSOD y NiSOD), que contienen el correspondiente ión o cofactor metálico (Fridovich, 1998). La FeSOD ha sido aislada en plantas y procariotas y la CuZnSOD, MnSOD y la FeSOD han sido descritas en mamíferos. La CuZnSOD es una enzima intracelular localizada en el citosol, núcleo y peroxisomas de todas las células eucariotas (Crapo y col., 1992). Su peso molecular aproximado es de 32kDa y está constituida por dos subunidades idénticas (Tainer y col., 1982), conteniendo cada una Cu (II) y Zn (II). El Cu (II) es el responsable de su actividad catalítica, y puede alternarse entre el estado cuproso y cúprico durante el ciclo catalítico, mientras que el Zn (II) estabiliza la conformación de la enzima (Rotilio y col., 1972). En el citosol, esta enzima puede ser inactivada por el peróxido de hidrógeno con la consiguiente formación de Cu (II)-OH o bien su forma ionizada Cu (II).O⁻ (Hodgson y Fridovich, 1975). Además, puede catalizar la peroxidación de numerosos compuestos.

La MnSOD se localiza en la mitocondria donde puede existir en forma dimérica o tetramérica, de manera que cada subunidad contiene un ión Mn (II). En las células eucariotas se encuentra como un homotetrámero localizado en la matriz mitocondrial. Las ERO inducen la expresión de esta enzima, la cual protege la mitocondria de su toxicidad, sobre todo frente al radical $O_2^{\cdot-}$ producido durante el transporte electrónico mitocondrial. Además de las citoquinas, una amplia variedad de metabolitos de las ERO pueden inducir su expresión en distintas células que juegan un papel decisivo en la patogénesis de determinadas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Yoshioka y col., 1994). Su mayor actividad se expresa en hígado, corazón y páncreas.

Por último, las SOD extracelulares presentan menos actividad que las intracelulares y actúan principalmente en el útero, glándulas tiroideas, páncreas, cordón umbilical y vasos sanguíneos, constituyendo cerca del 70% de su actividad aquella que realiza en las arterias tanto a nivel pulmonar como sistémico (Oury y col., 1996a).

Regulan tanto los niveles extracelulares del anión superóxido como la actividad del óxido nítrico (Oury y col., 1996b).

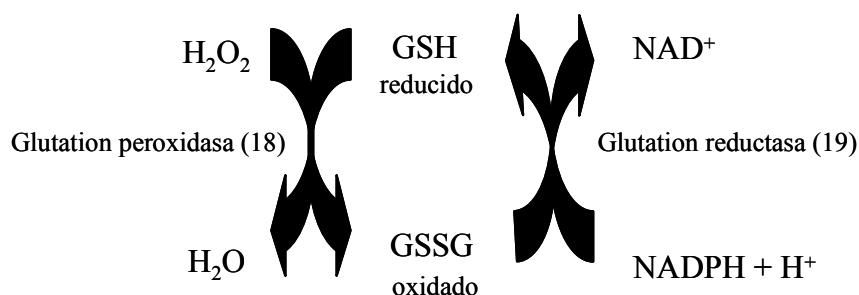
El mecanismo general de actuación de la SOD sería el siguiente:



Una actividad excesiva de SOD debe ir acompañada de actividad catalasa o glutatión peroxidasa, ya que de no ser así, se acumularía peróxido de hidrógeno y se promovería la formación del peligroso radical hidroxilo.

- **Glutation peroxidasa (GP_x):** esta enzima forma parte del grupo de las peroxidases, las cuales utilizan una gran variedad de donantes de electrones para reducir el peróxido de hidrógeno obteniendo dos moléculas de agua. Están ampliamente distribuidas en las levaduras, plantas, bacterias y en los mamíferos. La glutatión peroxidasa está presente tanto en el citosol (70%) como en la mitocondria (30%) de las células eucariotas (Spalholz y Boylan, 1991). Es un homotetrámero con un peso molecular aproximado de 80kDa. Cuenta en su estructura con cuatro átomos de selenio y grupos sulfhidrilo libres (Nakamura y col., 1974; Chiu y col., 1976). Existen dos formas de esta enzima, una independiente de selenio, activa frente a hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, y otra, dependiente de selenio, cuya afinidad por el peróxido de

hidrógeno es menor. En humanos se han identificado cuatro tipos diferentes de glutathion peroxidadas Se-dependientes (Mates y col., 1999). Todas catalizan la reacción de los hidroperóxidos, como la del peróxido de hidrógeno con el glutathion reducido (GSH) formándose glutathion disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de la reducción del hidroperóxido (18). Estas reacciones llevan acoplado el ciclo del glutathion, de manera que su forma oxidada es reducida por la glutathion reductasa en un proceso dependiente de un reductor como es el NADPH (19), el cual se ha propuesto recientemente como antioxidante capaz de neutralizar radicales libres tóxicos y reparar biomoléculas derivadas de los radicales (Kirsch y de Groot, 2001). La reacción es esencial para el mantenimiento de los niveles de glutathion reducido.



Cuando se produce una situación de estrés oxidativo, la actividad peroxidasa aumenta y es llevada a cabo por las glutathion transferasas, proceso que se ha observado a nivel hepático en ratas (Warholm y col., 1985; Aniya y Nieto, 1993).

2.4.2. Mecanismos no enzimáticos

Las enzimas descritas constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo. Existe una segunda línea compuesta por secuestradores de radicales libres residuales que no hayan podido ser neutralizados por las enzimas antioxidantes. Entre ellos podemos citar: glutathion, ácido úrico, transferrina, lactoferrina, taurina, ceruloplasmina, ubiquinol, bilirrubina, carotenoides como la

vitamina A, vitamina E, vitamina C, butilhidroxitolueno (BHT), melatonina y quelantes de metales como los productos de la reacción de Maillard.

A continuación se hará un repaso de los antioxidantes más destacados y relacionados con el tema de esta Tesis:

- **Vitamina E:** es la vitamina liposoluble distribuida más ampliamente en la naturaleza (**Fig. 6**). En realidad se trata de un conjunto de compuestos estrechamente relacionados denominados tocoferoles, de los cuales el α -tocoferol es la forma más abundante y con actividad antioxidante más potente (Burton y Traber, 1990), ejercida en la protección de las membranas celulares, plasmática y mitocondrial. Su principal función es la de inactivar la lipoperoxidación, reaccionando con los radicales superóxido, hidroxilo y peroxilo, cediéndoles un hidrógeno y transformándolos en hidroperóxidos lipídicos poco reactivos capaces de romper la propagación de la peroxidación lipídica (Basu y Dickerson, 1996; Pryor, 2000). Estudios recientes sugieren que el α -tocoferol actúa junto con el ácido ascórbico durante la reacción antioxidante, de manera que la vitamina C favorece la regeneración de los radicales α -tocoferoxilo a α -tocoferol (Kojo, 2004).

En general, la función fisiológica de la vitamina E es la de actuar como *scavenger* o neutralizador de radicales libres, previniendo la lesión oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados y lipoproteínas de las membranas celulares, protegiendo así la integridad de los orgánulos subcelulares (Niki, 1995).

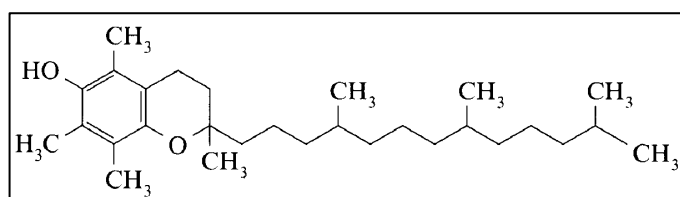


Figura 6. **Vitamina E**

• **Vitamina C o ácido ascórbico:** es considerado uno de los antioxidantes hidrosolubles más potente y eficaz tanto *in vivo* como *in vitro* (Niki, 1991), presente intra y extracelularmente en la mayor parte de los sistemas biológicos y el menos tóxico identificado en los mamíferos (Frei, 1991) (**Fig. 7**). Posee dos grupos hidroxilo ionizables y por tanto es un compuesto diácido (AscH_2) que a pH fisiológico se encuentra en forma de anión ascorbato (AscH^-) (99,9%) y en muy baja proporción en forma de AscH_2 (0,05%). En forma de anión ascorbato actúa como un donador de hidrógeno al reaccionar con los radicales libres transformándose en el radical semidihidroascorbato ($\text{Asc}^{\cdot-}$). Este radical es muy poco reactivo y es utilizado como parámetro de medida del grado de estrés oxidativo producido en los sistemas biológicos (Cuzzocrea y col., 2004; Kasparova y col., 2005). Es considerado como un neutralizador de radicales libres, principalmente del radical superóxido, del hidroxilo y del singlete de oxígeno (Frei, 2002). La vitamina C, por tanto, protege a las membranas frente a la oxidación (Retsky y col., 1999), y participa en la regeneración del radical α -tocoferoxilo comentado previamente.

No obstante, algunos estudios *in vitro* han sugerido que, de manera indirecta, el ácido ascórbico puede tener actividad prooxidante, sobre todo cuando se utilizan dosis elevadas y están presentes metales como el hierro (III) (Kang y col., 1998); el ácido ascórbico favorecería su reducción a hierro (II) y, por tanto, el inicio de la reacción de Fenton con la consiguiente formación de radicales libres hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno (Halliwell, 1999), resultando contradictorio que en algunos casos pueda generar radicales libres que en otras condiciones destruye (Stadtman, 1991).

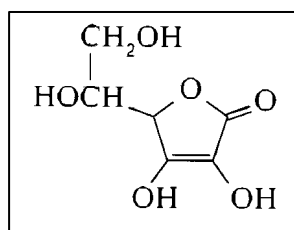


Figura 7. **Vitamina C**

- **Butilhidroxitolueno (BHT):** este compuesto es uno de los antioxidantes fenólicos sintéticos más utilizado en la industria alimentaria (**Fig. 8**). Se trata de un compuesto lipofílico que suele incorporarse a productos derivados del pescado, aceites minerales, cosméticos, productos farmacéuticos...etc. Normalmente suele usarse en combinación con otros antioxidantes como el butilhidroxianisol (BHA) o ácido cítrico.

Existe una gran controversia sobre el uso de los antioxidantes sintéticos debido a la posibilidad de que tengan efectos adversos (Shahidi y Wanasundara, 1992; Aruoma y col., 1993). Sin embargo, algunos estudios indican la capacidad del BHT de inhibir la actividad de muchos carcinógenos químicos (Slaga, 1995), observándose además que no es un compuesto que tenga actividad cancerígena en animales (National Toxicology Program, 1979).

Soares y col., (2003), estudiaron la capacidad de antioxidantes naturales como las vitaminas C y E y el resveratrol y de otros sintéticos, como el galato de propilo (GP) y el BHT, de secuestrar y neutralizar los radicales libres DPPH, ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazol 6-ácido sulfónico) e hidroxilo. En concreto observaron que el BHT tenía una mayor capacidad para neutralizar al ABTS y al DPPH que el GP o la vit.C; unido al resveratrol mostró la mayor capacidad de neutralizar radicales hidroxilo. Por otra parte se observó un efecto protector del BHT y la vitamina C frente a un daño oxidativo inducido en cultivos de células de *S. cerevisiae* por la apomorfina, alcaloide capaz de generar radicales superóxido e hidroxilo en presencia de iones metálicos (Mena y col., 1997; Blum y col., 2000), por el paraquat, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, de acuerdo con resultados obtenidos por otros autores (Halliwell y Gutteridge, 2000).

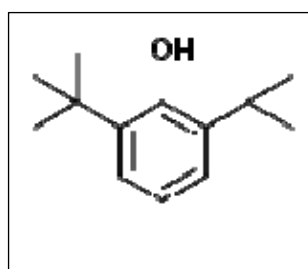


Figura 8. **Butilhidroxitolueno (2,6-di-terbutil-p-cresol) (BHT)**

- **Melatonina (5-metoxi-N-acetil-triptamina):** es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal a partir del triptófano, aunque también existen evidencias de su producción en otros órganos como el tracto gastrointestinal (Huether y col., 1992), testículos (Tijimes y col., 1996) y médula ósea (Conti y col., 2000; Tan y col., 1999) (**Fig. 9**). Esta molécula se sintetiza generalmente durante la noche (Arendt, 1995) es decir, siguiendo un ritmo circadiano, aunque a edades avanzadas su producción decrece tanto en animales como en humanos (Touitou, 2001; Korkusho y col., 2004). Se encuentra presente en todos los compartimentos subcelulares y atraviesa fácilmente las barreras fisiológicas (Reiter, 1991; 1998b) ya que es altamente lipofílica (Costa, 1995) y algo soluble en medio acuoso (Shida, 1994). En el interior de las células, la melatonina se halla en el citosol, en la membrana celular y, a altas concentraciones en el núcleo y las mitocondrias (Menendez-Pelaez y Reiter, 1993; Costa y col., 1997; Martin y col., 2000a). Dentro de las membranas celulares se sitúa en una posición que le permite actuar como neutralizador de radicales libres (Ceraulo y col., 1999), debido a su capacidad para funcionar como donante de electrones lo cual le confiere una serie de propiedades que permiten atribuirle su función como antioxidante (Reiter, 1997). Fue en el año 1993 cuando se la identificó como neutralizador de radicales libres (Tan y col., 1993), y a partir de ese

momento son numerosos los estudios publicados confirmando su habilidad para proteger las células del daño oxidativo, existiendo evidencias de que directamente puede neutralizar especies reactivas como el radical hidroxilo (Chyan y col., 1999), el oxígeno singlete (Qi y col., 2001), el peróxido de hidrógeno (Barlow-Walden y col., 1995), el óxido nítrico (NO \cdot) (Turjanski y col., 2000; Reiter y col., 2001) y el anión peroxinitrito (ONOO \cdot) (Blanchard y col., 2000). Su habilidad para interactuar con el radical peroxilo (LOO \cdot) es controvertida, ya que su actividad como rompedor de cadenas no ha sido confirmada (Pieri y col., 1994; 1995; Antunes y col., 1999). Por otra parte, puede inhibir la peroxidación lipídica y esquivar indirectamente el estrés oxidativo, mediante la estimulación de un gran número de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, mieloperoxidasa y γ -glutamylcisteína sintasa (Montilla y col., 1997; Pablos y col., 1998; Cuzzocrea y col., 1999), y por su capacidad para regenerar el glutatión, el mayor antioxidante intracelular. A su vez, puede inhibir la actividad de otras enzimas prooxidantes como la óxido nítrico sintasa (NOS) y la lipooxigenasa (Bettahi y col., 1996). Además, la melatonina incrementa la eficacia de la cadena de transporte electrónico mitocondrial con la consecuente reducción en la generación de radicales libres (Martin y col., 2000a; 2000b; Absi y col., 2000).

Aparte de su función como antioxidante, es fundamental en la protección frente a numerosas patologías experimentales (Reiter, 1998a; 1999; 2000; Reiter y col., 1998; 2000), y se ha demostrado su actividad como un potente compuesto anticancerígeno, antitumoral y geroprotector (Anisimov y col., 2006).

A pesar de que la melatonina ha sido considerada siempre como un compuesto con actividad antioxidante, estudios más recientes indican que en determinadas situaciones puede actuar como prooxidante (Clapp-Lilly y col., 2001; Wolfler y col., 2001; Taileux y col., 2002; Fowler y col. 2003).

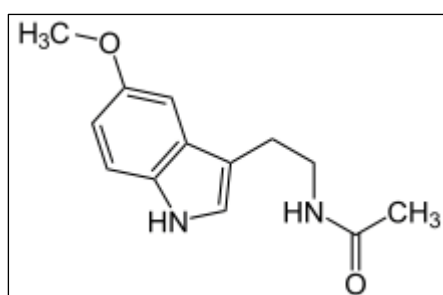


Figura 9. **Melatonina**

- **Minerales:** existen ciertos minerales que en determinadas circunstancias pueden tener carácter antioxidante, principalmente el **cobre**, el **zinc** y el **selenio**. Estos micronutrientes actúan como cofactores de enzimas implicadas en reacciones que impiden la formación de radicales hidroxilo y favorecen la eliminación de peróxido de hidrógeno, como la citocromo C-oxidasa y la ceruloplasmina para el cobre, la Cu, Zn-superóxido dismutasa para el cobre y el zinc (Prohaska, 1990; Martínez-González, 2002) y la glutatión peroxidasa dependiente de selenio para este mineral (Coombs, 1999). La estructura de la catalasa, por otra parte, contiene **hierro hemo**.
- **Quelantes de metales:** como hemos comentado previamente, algunos metales, como hierro y cobre, tienen un peligroso “doble efecto”. El hierro, especialmente en su forma ferrosa, es capaz de desencadenar reacciones de oxidación mediante la descomposición y reducción de peróxido de hidrógeno y tanto su déficit como su exceso pueden

afectar la salud. En general, un antioxidante puede proteger de la toxicidad del hierro mediante la quelación del hierro ferroso previniendo, de este modo, su participación en la reacción de Fenton y la producción de radicales libres. Un gran número de sustancias presentes a nivel intracelular son capaces de quelar hierro *in vivo* limitando, por tanto su participación en la formación de radicales libres. Existen compuestos quelantes hexadentados que pueden saturar completamente la esfera de coordinación de un átomo de hierro, cuyo máximo número de sitios de coordinación es de seis y como consecuencia, este quelante impide totalmente la actividad del hierro libre. Numerosos quelantes inhiben las reacciones del hierro con el oxígeno y sus metabolitos (Lovejoy y Richardson, 2003). Un ejemplo de quelante hexadentado es la desferroxamina, la cual disminuye marcadamente la actividad redox del hierro, siendo muy efectiva como antioxidante. Los quelantes bidentados, tal y como indica su nombre, sólo saturan dos de los sitios de coordinación del hierro, siendo un ejemplo el ferricromo, de manera que tres moléculas de este compuesto pueden inmovilizar completamente a un átomo de hierro (Toyokuni, 1996); tanto los quelantes bidentados como los tridentados impiden la acción del hierro en el daño oxidativo. El EDTA es un compuesto sintético presente en los alimentos que también puede quelar hierro, pero no es capaz de prevenir la reducción del oxígeno mediada por este mineral y, como ya se ha comentado no satura completamente los sitios de coordinación del hierro.

Entre los quelantes de cobre destaca la D-penicilamina y trientina, utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Wilson en la que existen bajas concentraciones de ceruloplasmina, produciéndose un fuerte ataque de los radicales libres estimulados por el cobre (Ferenci, 1998).

Como se ha comentado anteriormente, parte de la capacidad antioxidante de los productos de la reacción de Maillard radica en su habilidad para quelar metales implicados en la generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, sin descartar otros mecanismos que serán explicados detalladamente en el capítulo siguiente.

3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD (PRM)

Uno de los aspectos más interesantes y novedosos de los PRM es la actividad antioxidante que se les atribuye, actualmente objeto de estudio de muchos investigadores. Fué observada por primera vez por Franzke e Iwainsky (1954), los cuales descubrieron un incremento en esta actividad paralelo al aumento del tiempo de calentamiento. Debido a esta capacidad, se ha propuesto que algunos de estos compuestos podrían utilizarse como aditivos alimentarios que se incorporarían directamente al alimento, o bien se formarían durante la aplicación de tratamientos térmicos, contribuyendo así a la estabilidad oxidativa de algunos alimentos y a la mejora de sus propiedades (Bressa y col., 1996). Por ello algunos autores consideran que los PRM podrían utilizarse como ingredientes funcionales en los alimentos capaces de contrarrestar el deterioro de la oxidación (Chevalier y col., 2001a). Ahora bien, el mecanismo de acción de la actividad antioxidante de los PRM y sus posibles efectos en el organismo está aun por dilucidar.

Esta actividad ha sido estudiada *in vitro* mayoritariamente en sistemas modelo aminoácido-azúcar y en alimentos, siendo muy escasos los estudios *in vivo*.

3.1. Estudios de la actividad antioxidante de los PRM de sistemas modelo

La capacidad antioxidante de los PRM ha sido evaluada en diversos sistemas modelo aminoácido-azúcar, tales como los formados durante el calentamiento de la mezcla histidina-glucosa a 120°C durante 10, 20 y 30 minutos. Tras el calentamiento se obtuvieron PRM solubles en solución acuosa, cuya actividad antioxidante *in vitro* se midió usando el método que determina la capacidad de estos compuestos de absorber radicales del oxígeno, observándose un aumento de la actividad neutralizadora del radical peroxilo y, por tanto, de la actividad antioxidante, conforme aumentó el tiempo de calentamiento (Yilmaz y Toledo,

2004). Resultados parecidos se obtuvieron a partir de PRM procedentes de sistemas modelo constituidos por glucosa-prolina; la capacidad antioxidante de las muestras, medida mediante su habilidad neutralizadora de radicales libres, aumentó paralelamente a la duración del tratamiento térmico en condiciones moderadas (60° y 90°C). Ahora bien, en condiciones más extremas (220°C) se observó una disminución de la actividad antioxidante, por lo que los autores proponen que el tratamiento térmico muy severo puede producir la destrucción parcial de compuestos con propiedades antioxidantes (Samaras y col., 2005a). Además, los resultados indican que a temperaturas moderadas (60° y 90°C) son los PRM de bajo peso molecular como las reductonas los responsables de la actividad antioxidante (Eichner, 1981), mientras que a 220°C, lo son los de elevado peso molecular de acuerdo con otros autores (Yen y Tsai, 1993).

Otros sistemas modelo evaluados en cuanto a sus propiedades antioxidantes son los formados por glucosa-lisina y fructosa-lisina, que utilizando diversas combinaciones de tiempo, temperatura de calentamiento, pH inicial y actividad de agua, dieron lugar a la formación de distintos PRM, cuya actividad antioxidante fue determinada midiendo su capacidad de retardar la peroxidación lipídica en una emulsión de ácido linoleico (TBARS). Se observó que los PRM procedentes de ambas mezclas no poseían actividad prooxidante y si antioxidante, siendo menor para los de la mezcla que contenía fructosa (Wijewickreme y Kitss, 1998) coincidiendo con los resultados obtenidos por Yamaguchi y Fujimaki (1974). La capacidad antioxidante de los PRM procedentes de las mezclas ensayadas por estos autores fue evaluada utilizando otro método, el de la degradación oxidativa de la desoxirribosa, obteniéndose resultados parecidos en el grado de inhibición de la oxidación (Jing y Kitts, 2000).

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar la actividad antioxidante de los PRM, es determinar su capacidad para neutralizar radicales libres implicados en la propagación en cadena de la oxidación (Yoshimura y col. 1997;

Wijewickreme y Kitts, 1997, 1998; Mastrocola y Munari, 2000). Varios trabajos han mostrado que las fracciones de elevado peso molecular, procedentes de mezclas de glucosa, fructosa y ribosa con lisina, tienen una mayor capacidad para neutralizar al radical hidroxilo y al DPPH que las de bajo peso molecular (Jing y Kitts, 2004a; Kitts y Hu, 2005), capacidad que depende del tipo de radical, de los propios reactantes y de las condiciones en las que se de la reacción de Maillard. Cuando el sistema modelo está constituido por una proteína como la caseína, la neutralización del radical hidroxilo es evidente para los PRM procedentes de los tres sistemas modelo, sin embargo, no se observa esta capacidad frente al radical DPPH, excepto en el caso de los PRM de ribosa-caseína (Jing y Kitts, 2002).

De acuerdo con los anteriores autores, diversos investigadores han mostrado que las fracciones de alto peso molecular tienen mayor actividad antioxidante que las de bajo peso molecular, por lo que han relacionado que la capacidad antioxidante aumenta paralelamente al desarrollo del pardeamiento (Monti y col., 1999; Benjakul y col., 2005). Sin embargo, otros trabajos han observado que son los compuestos de bajo peso molecular los responsables de esta actividad (Nienaber y Eichner, 1995). Según Morales y Jiménez-Pérez (2001) la capacidad de neutralización de radicales como el DPPH no está directamente relacionada con el grado de pardeamiento de los PRM de mezclas de glucosa/lactosa con lisina, alanina o glicina, formados tras un calentamiento prolongado. Por otra parte se ha comprobado que la capacidad de las melanoidinas para neutralizar radicales libres se debe en gran medida a los compuestos ligados a ellas más que a las melanoidinas puras (Rufián-Henares y Morales, 2007).

La capacidad antioxidante de los PRM procedentes de sistemas modelo también ha sido evaluada en cultivos celulares. A pesar de que algunos autores han observado que ciertos PRM presentan efectos tóxicos (O'Brien y Morrissey, 1989b) y citotóxicos (Wang y col, 1987; Vagnarelli y col, 1991), estudios realizados utilizando la línea celular Caco-2, han puesto de manifiesto que muchos de los PRM obtenidos en los estudios descritos anteriormente no solo no

presentan efectos tóxicos para las células Caco-2 (Jing y Kitts, 2002), sino que, además, reducen el daño oxidativo previamente inducido por oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el radical libre 2,2'-azobis-(2-aminopropano) dihidroclorhídrico (AAPH) y metales de transición como el hierro y el cobre (Jing y Kitts, 2004a; 2004c).

En otro estudio se evaluó el efecto protector de los PRM procedentes del sistema glucosa-glicina frente al estrés oxidativo en hepatocitos de rata inducido por adriamicina. La citotoxicidad, lipoperoxidación y la oxidación de proteínas descendió significativamente en presencia de estas melanoidinas. Además, el daño producido a nivel mitocondrial se redujo y se produjo un aumento en la concentración intracelular de glutathion (Valls-Bellés y col., 2004).

Las propiedades antioxidantes de algunos PRM también han sido examinadas en macrófagos de ratón RAW264.7 (Kitts y Hu, 2005). Estos autores atribuyen la capacidad antioxidante de los PRM a su habilidad para secuestrar metales de transición, tanto cobre como hierro, implicados en reacciones de oxidación como la reacción de Fenton. En cuanto al poder quelante de hierro, en PRM procedentes de mezclas de glucosa-glicina la fracción de alto peso molecular mostró una mayor capacidad quelante de hierro que la de bajo peso molecular, inhibiéndose la formación del radical hidroxilo en más de un 90% al retardarse indirectamente la reacción de Fenton. Este porcentaje de inhibición fue mucho más bajo en el caso del radical superóxido, ya que durante la etapa temprana de la reacción se forman pequeñas cantidades de este radical (Hayashi y Mase, 1986).

3.2. Estudios de la actividad antioxidante de los PRM de alimentos

Los estudios sobre PRM obtenidos de alimentos son más escasos, y muchos de ellos han sido llevados a cabo en bebidas como el café. En un trabajo se investigó la composición de los granos de café y se examinó la contribución de sus componentes a la capacidad antioxidante, atribuida mayoritariamente a la presencia de un compuesto fenólico llamado ácido clorogénico (ACG) (del Castillo y col., 2002). Durante el tostado del café se forman compuestos de bajo y alto peso molecular que contribuyen a la actividad antioxidante de las muestras, pero las temperaturas elevadas causan la degradación parcial de otros compuestos, incluido el ACG. Estos autores han observado que la actividad antioxidante no aumenta conforme lo hace el grado de tostado del café, alcanzándose un máximo para las muestras con un grado de tostado intermedio y un mínimo cuando es mayor, demostrando así que la fracción de bajo peso molecular posee mayor actividad antioxidante que la de alto peso molecular (del Castillo y col., 2002), resultados que coinciden con los obtenidos por Delgado-Andrade y Morales (2005) y Delgado-Andrade y col., (2005a), los cuales determinaron que más del 50% de la actividad antioxidante del café era debida a los compuestos de bajo peso molecular formados durante el calentamiento. Es decir, a pesar de la pérdida parcial de compuestos naturales con actividad antioxidante que se puede producir durante el procesado de los alimentos, las propiedades antioxidantes podrían mantenerse e incluso mejorarse gracias a la formación de nuevos compuestos, como los PRM. Estos compuestos también se forman durante el tratamiento térmico utilizado en la fabricación de otros alimentos como el chocolate, y son capaces de neutralizar la actividad de radicales libres como el DPPH y el ABTS, en función del grado de tostado (Summa y col., 2006; 2008). En bebidas como el vino, el proceso de cocción del mosto favorece la activación de reacciones de pardeamiento no enzimático, con la consecuente formación de PRM (Di Mattia y col., 2007) que incluso se forman

durante el secado de las uvas utilizadas en la fabricación del vino dulce (Moreno y col., 2007).

Estudios en cultivos celulares confirman las propiedades antioxidantes del café natural y tostado observándose que la protección de células hepáticas microsomales de ratas frente a la peroxidación lipídica aumenta con la intensidad del tratamiento térmico (Daglia y col., 2000). El efecto protector de las melanoidinas del café frente al estrés oxidativo inducido por terbutilhidroperóxido en hepatocitos humanos, se traduce en una reducción en la producción de malondialdehído y un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como la glutathion peroxidasa y glutathion reductasa (Goya y col., 2007). Por otra parte, esta capacidad antioxidante podría explicar los efectos neuroprotectores de los PRM del café, ya que estudios en cultivos de neuroblastos humanos IMR32 muestran una marcada actividad antiradical de estos compuestos, siendo capaces de protegerlos frente a la toxicidad inducida por el peróxido de hidrógeno e incluso de aumentar la viabilidad celular (Daglia y col., 2004).

Por otra parte, se comparó el poder antioxidante de muestras de puddings de natillas preparados con leche, huevo y diferentes azúcares: sacarosa, ribosa y D-psicosa. Los resultados indicaron que tanto el poder reductor de hierro como el porcentaje de actividad neutralizadora del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) fueron mucho mayores para las muestras que contenía ribosa y D-psicosa y que aumentaba en función del incremento de temperatura al que se sometían con el fin de favorecer el desarrollo de la reacción de Maillard. Además, la D-psicosa, unida a las proteínas del huevo, hace a estos postres mucho más estables y resistentes al aumento de temperatura, mejorando las propiedades o características reológicas del alimento. Según este estudio, la actividad antioxidante de los alimentos podría verse mejorada añadiendo azúcares poco comunes como la D-psicosa que, al reaccionar con las proteínas

durante el procesado del alimento a temperaturas elevadas, favorecería el desarrollo de la reacción de Maillard (Sun y col. 2006a).

Estudios realizados con malta demostraron que la actividad antioxidante aumentaba con la intensidad del calentamiento. Cuando el tratamiento utilizado era el horneado, esta actividad se atribuyó tanto a los compuestos fenólicos de la malta como a los PRM formados durante el calentamiento. Sin embargo, la contribución de los PRM a esta capacidad aumentó con el grado de tostado y paralelamente al desarrollo del color medido como absorbancia a 420nm, siendo superior para la malta negra, chocolate y para la cebada tostada (Samaras y col., 2005b). En alimentos como las galletas, se observó una correlación directa entre la concentración de acrilamida, indicativo del desarrollo de la reacción, y la actividad antioxidante de los PRM que se formaban durante su horneado, la cual aumentó con el tiempo de aplicación de este tratamiento (Summa y col., 2006). Además se evaluó la influencia del tipo de azúcar en la capacidad antioxidante, siendo mayor en aquellas galletas preparadas con fructosa que con sacarosa, debido a la presencia de grupos carbonilo reactivos en la primera que contribuyen a la formación de los PRM (Eichner, 1981; Lingnert y col., 1983). En estudios realizados en la miel, el incremento de la actividad antioxidante va acompañado tanto de la formación de pigmentos pardos, expresada como absorbancia a 420nm, como del aumento en el tiempo y temperatura de calentamiento (Turkmen y col., 2006), coincidiendo con la tendencia observada en otros alimentos como el zumo de tomate (Anese y col., 1999c) y la leche (Calligaris y col., 2004).

Durante la cocción, almacenamiento y envejecimiento del vinagre puede tener lugar el desarrollo de la reacción de Maillard y la formación de melanoidinas, cuya actividad antioxidante ha sido demostrada *in vitro* (Xu y col., 2005). He y col., (2004) observaron que el vinagre posee una elevada concentración de tetrametilpirazina que, junto con otros PRM, serían responsables de esta actividad (Li y col., 2004). Algunos autores consideran que la ejercen mediante

su habilidad para neutralizar radicales libres como el DPPH, el radical hidroxilo y a través de su capacidad para reducir iones férricos (Xu y col., 2007).

Otro proceso tecnológico que favorece el desarrollo de la reacción de Maillard es el horneado del pan, en el que se ha demostrado la formación de PRM de elevado y bajo peso molecular, localizados principalmente en la corteza. Estos compuestos, junto con la pronil-L-lisina, son los responsables de su actividad antioxidante (Manzoco y col, 2001; Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Hofmann y col., 2005), por su capacidad de neutralizar radicales como el ABTS y el radical peroxilo (Michalska y col., 2008).

3.3. Estudios de la actividad antioxidante de los PRM *in vivo*

Los estudios realizados sobre la actividad antioxidante de los productos de la reacción de Maillard *in vivo* son escasos. Uno de los más destacados se ha llevado a cabo en ratas alimentadas con dietas que contenían un compuesto aislado de la corteza del pan, la N-ε-carboximetil-lisina, implicada en la inducción de enzimas como la glutation-S-transferasa (GST) (Faist y col., 2002a), cuya deficiencia está asociada con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de colon (Wilkinson y Clapper, 1997). El consumo de esta dieta produjo un aumento en los niveles de la enzima, demostrándose, por tanto, el efecto quimiopreventivo de los PRM presentes en el pan. La actividad quimiopreventiva de la corteza del pan fue posteriormente investigada *in vitro* en células Caco-2, en las que se observó la inducción de la GST tras la incubación con extractos de corteza de pan (Lindenmeier y col., 2002). El compuesto responsable de esta inducción fue identificado como pronil-L-lisina, que sólo, y unido a determinadas proteínas, es el responsable de la actividad antioxidante y quimiopreventiva. Su contenido en el alimento depende de la intensidad del tratamiento térmico responsable de la coloración oscura de la corteza del pan (Lindenmeier y Hofmann, 2004). Este compuesto también podría ser el responsable de la actividad antioxidante de otros alimentos como la malta (Faist

y col., 2002b). A pesar de los resultados obtenidos, aun existía la duda sobre si la ingesta de una dieta que contuviera tanto corteza de pan como proteínas proniladas, producía los mismos efectos *in vivo*. Para resolverla, se realizó un estudio en ratas a las que se administraron dietas que contenían corteza de pan, malta y albúmina pronilada (Somoza y col., 2005), observándose un aumento en la capacidad antioxidante total, una disminución en plasma de los niveles de compuestos finales de la peroxidación lipídica (MDA) y un aumento del color en la orina de los animales; todo ello indicativo de que los PRM presentes en las dietas administradas habían sido absorbidos. Sin embargo, un aspecto a tener en cuenta, sería el supuesto papel que esta dieta podría tener en la formación *in vivo* de productos avanzados de la glicación (AGE). Los AGE interaccionan con receptores de membrana celulares (RAGE) (Schmidt y col., 1999), que se activan y liberan aniones superóxido y citoquinas implicadas en procesos pro-inflamatorios (Schmidt y col., 2001), acumulándose en órganos como los riñones. Se vió que los niveles circulantes de AGE en riñón y pulmón aumentaron en los animales alimentados con las dietas que contenían malta y albúmina pronilada, pero no en los que consumieron la corteza de pan. Tras este aumento, cabría esperar la activación de sus receptores (RAGE) y la liberación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, pero, sin embargo, no se encontraron efectos sistémicos relacionados con el estrés oxidativo. Por tanto, tras el consumo de las tres dietas, se demostró por primera vez *in vivo* que los PRM son capaces de mantener el balance oxidativo inclinado hacia la producción de antioxidantes y de incrementar la activación de enzimas implicadas en la quimiopreención de la aparición del cáncer (Zill y col., 2003).

Así, el consumo de dietas ricas en estos PRM podría resultar beneficioso, siempre que no se produjera un acúmulo excesivo en el organismo de AGE con el consiguiente efecto prooxidante. Estudios en humanos han indicado que el consumo de café (5 tazas al día/1 semana), produce un incremento de la

concentración plasmática de glutatión cercano al 16%, y los niveles de hidroperóxidos no se ven modificados (Esposito y col., 2003).

Un estudio reciente realizado en adolescentes sanos mostró que el consumo de una dieta rica en PRM no produjo modificaciones en los biomarcadores del estrés oxidativo frente a otra dieta pobre en PRM. Sin embargo, si se observó una protección frente a un estrés oxidativo inducido (Seiquer y col., 2008).

Como se ha comentado, uno de los mecanismos atribuidos para justificar la acción antioxidante de los PRM es la quelación de metales, al retardar muchas reacciones de oxidación que son catalizadas por los minerales (Wijewickreme y Kitts, 1998). Esta quelación tiene un significado fisiológico importante, ya que, por un lado, puede producir alteraciones de la disponibilidad y el metabolismo de metales *in vivo* y, por otro, resultaría beneficiosa como antioxidante.

Dos de los minerales más estudiados en este aspecto son el hierro y el cobre. Por este motivo en el capítulo siguiente se incluyen nociones fundamentales sobre su metabolismo e importancia fisiológica.

4. HIERRO

4.1. Aspectos generales

El hierro es un micronutriente esencial para los organismos por ser integrante o cofactor de numerosas proteínas entre las que se incluyen enzimas, algunas de ellas involucradas en el mantenimiento de la integridad celular, como las catalasas, peroxidasas y oxigenasas (Andrews y Bridge, 1998). Es el elemento traza más abundante en el organismo de hombres y animales. El contenido corporal total de hierro es muy variable: en el hombre es de 3,8g aproximadamente y 2,3g en la mujer, aunque estos valores dependen del estado nutricional del individuo. Se trata de un elemento de transición que forma parte de la materia viva en la que puede existir en dos estados estables de oxidación: como forma férrica (Fe^{3+}) o ferrosa (Fe^{2+}). El paso de un estado a otro le permite actuar como catalizador de las reacciones redox, participar en la transferencia de electrones en los citocromos y unirse reversiblemente a diversos ligandos, entre los que destacan el oxígeno, nitrógeno y azufre. En medio acuoso, el Fe^{2+} se oxida espontáneamente a Fe^{3+} , formándose hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). La solubilidad del hierro en un ambiente oxidante, como pueden ser los fluidos extracelulares, se ve limitada por la constante del producto de solubilidad del hidróxido férrico. A pH 7,0, la solubilidad del Fe^{3+} es muy baja, de 10^{-7}M , mientras que para el Fe^{2+} es mucho mayor, de 10^{-1}M . Debido a la baja solubilidad del hierro en presencia de oxígeno, los organismos se ven forzados a evolucionar y utilizar proteínas que sean capaces de unirse al hierro (III) para transportarlo y mantenerlo estable y, al mismo tiempo, que pueda ser utilizado en múltiples procesos y reacciones biológicas (Arredondo y Núñez, 2005).

El elemento se encuentra como hierro funcional, transportado y almacenado **(Fig. 10)**.

- Hierro funcional: representa aproximadamente 2,5g del hierro total (más del 70%), y se encuentra formando parte de las proteínas hemo (hierro hemo) y no hemo. Las proteínas que contienen el grupo no hemo son responsables del metabolismo oxidativo, como la catalasa. Entre las que contienen hierro hemo se encuentra la hemoglobina, cuya función es transportar oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos. Esta proteína supone el 95% de las proteínas de los glóbulos rojos. Otra proteína de la que forma parte es la mioglobina, cuya función es almacenar oxígeno en el músculo y liberarlo durante su contracción. El hierro funcional también forma parte de las enzimas transportadoras de electrones localizadas en las mitocondrias y el retículo endoplásmico, implicadas en reacciones de oxidación-reducción, como las oxidorreductasas, peroxidasas y citocromos.
- Hierro transportado: supone el 0,1-0,2% del hierro corporal total y como hierro férrico se encuentra unido a una proteína transportadora denominada transferrina, que transporta la mayor parte del hierro circulante en plasma.
- Hierro almacenado: supone aproximadamente un 20-25% del hierro corporal. Las dos formas de almacenamiento de hierro son la ferritina y la hemosiderina. La ferritina contiene en su núcleo hasta 4.500 átomos de hierro y es la forma básica de almacenamiento, siendo el principal estímulo para su síntesis la presencia de un exceso de hierro en la célula. La hemosiderina representa el almacén no movilizable y cualitativamente más importante en los individuos con exceso de hierro, cuya liberación aumenta en casos de eritropoyesis incrementada y disminuye en determinados procesos inflamatorios, infecciosos o tumorales (Mataix y Llopis, 2002; Muñoz y Molina, 2005).

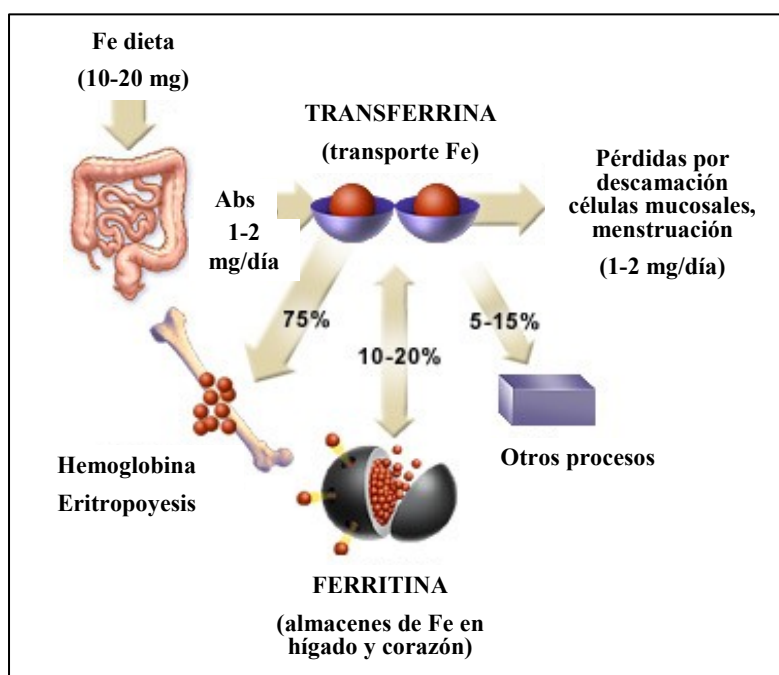


Figura 10. **Distribución de hierro en el organismo** (Andrews, 1999)

4.2. Absorción, transporte y eliminación

La absorción del hierro se produce principalmente en el duodeno y parte proximal del yeyuno (Muir y Hopfer, 1985). En un individuo normal las necesidades diarias de hierro son muy bajas, por lo que solo se absorbe una pequeña proporción del total ingerido. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad y el tipo de hierro presente en los alimentos, las necesidades corporales determinadas por el estado de los depósitos corporales del mineral y la actividad eritropoyética y por una serie de factores luminales e intraluminales que interfieren o facilitan la absorción (de Maeyer, 1989). La cantidad que se absorbe es variable, pero puede establecerse como valor medio de absorción entre un 10% y un 15% del hierro ingerido (Mataix y Llopis, 2002).

La absorción depende en primer lugar de la forma en la que el hierro esté presente en la dieta, hemo y no hemo o inorgánico. El hierro de la dieta se encuentra principalmente en forma férrica, sin embargo, es poco absorbible debido a que no es soluble al pH intestinal (Wollenberg y Rummel, 1987), de

manera que es necesaria su reducción a la forma ferrosa. Ésta ocurre a nivel gástrico por la acción de enzimas y ácido clorhídrico que ayudan no solo a liberar al hierro de la matriz alimentaria sino también a solubilizarlo (Skikne y col., 1981; Carpenter y Mahoney, 1992; Hernandez-García, 1993).

El hierro hemo se encuentra principalmente en alimentos como la carne y el pescado y el no hemo en los vegetales y en los lácteos. El proceso de absorción del hierro puede dividirse en tres etapas: captación por la célula intestinal, transporte del elemento en su interior y/o transferencia a la circulación a través de la membrana basolateral. Además, en concentraciones superiores a las consideradas fisiológicas el hierro se absorbe aparentemente por vía paracelular.

4.2.1. Absorción

El hierro hemo y no hemo presentan distintos mecanismos de absorción.

- **Hierro no hemo:**

El primer paso de la absorción del hierro no hemo es su transporte desde el lumen intestinal al interior de los enterocitos a través de una proteína transportadora de membrana llamada transportador de metales divalentes (DMT-1, del inglés divalent metal transport) (Flanagan, 1989; Fleming y Trenor, 1997; Anderson y Frazer, 2005), cuya expresión está fuertemente regulada por el estatus corporal de hierro. Este transportador es eficiente a bajos niveles de pH (Gunshin y col., 1997), y es específico para los cationes divalentes (Gunshin y col., 1997; Mckenzie y Hediger, 2004; Garrick y Garrick, 2004), de manera que el hierro (III) debe ser reducido a su forma ferrosa antes de ser transportado al interior del enterocito, bien por el ácido ascórbico procedente de la dieta y de las secreciones biliares o gástricas, o por el ácido clorhídrico del estómago. En la reducción previa del hierro (III) al hierro (II) está implicada una enzima con actividad ferrireductasa denominada citocromo duodenal b (DCYTB, del inglés duodenal cytochrome b), situada en la superficie de la membrana apical de la

célula cerca del DMT-1 (McKie y col., 2001), que podría utilizar el ácido ascórbico para facilitar la ferroreducción. Su expresión se incrementa en respuesta a una deficiencia de hierro y a la hipoxia. También han sido propuestas como reductasas presentes en la membrana de los enterocitos unas metaloreductasas pertenecientes a la familia de las proteínas STEAP (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate) (Oghami y col., 2006).

Una vez dentro del enterocito, la apotransferrina del citosol contribuye a aumentar la velocidad y eficiencia del transporte de hierro (Huebers y col., 1983).

- **Hierro hemo:**

El hierro hemo presenta una mayor biodisponibilidad que el hierro no hemo, es decir, se absorbe en mayor proporción, en torno a un 20-30% (Dallman, 1991). Este tipo de hierro atraviesa la membrana celular como una metaloporfirina intacta, en concreto como protoporfirina IX. Algunos autores consideran que es captado directamente por la célula mediante endocitosis (Uzel y Conrad, 1998), aunque estudios recientes confirman la identificación de un transportador intestinal del hierro hemo (Shayeghi y col., 2005). Una vez en el citosol, el hierro es liberado por la digestión proteolítica de la hemoglobina y/o mioglobina, al interaccionar con determinadas enzimas como la hemoxigenasa que libera el hierro de la estructura tetrapirrólica al interior de los endosomas y lisosomas, por un mecanismo en el que intervienen determinadas proteínas cuya identidad aún es desconocida y, a partir de aquí, sigue la misma ruta que el hierro inorgánico.

Ambos tipos de hierro pueden almacenarse en forma de ferritina dentro del enterocito, aunque al cabo de varias horas el hierro almacenado suele perderse y pasar al lumen intestinal debido a la descamación de la mucosa.

4.2.2. Transporte

Tanto el hierro hemo como el no hemo, en forma ferrosa, pasan a la circulación sanguínea por acción de la ferroportina (Abboud y Haile, 2000). La ferroportina es muy importante en la transferencia del hierro de la madre al embrión, en el transporte basolateral del hierro fuera de los enterocitos, en su salida desde los macrófagos, y en menor grado en la salida del hierro desde los hepatocitos. Para su actuación la ferroportina requiere de una actividad ferroxidasa asociada que, según los distintos autores, es llevada a cabo por la ceruloplasmina y/o la hefaestina (Harris y col., 1999; Vulpe y col., 1999; Cherukuri y col., 2005). Estas enzimas son las responsables de su oxidación a la forma férrica, lo cual es requisito para su posterior unión a la transferrina (Mckenzie y Garrick, 2005). Ambas enzimas constituyen una intersección clave entre el metabolismo del cobre y del hierro. El mecanismo por el cual el hierro pasa de la membrana apical a la basolateral del enterocito aún es objeto de estudio por los investigadores.

El hierro absorbido se une rápidamente a la transferrina, proteína con una elevada afinidad por él. Bajo circunstancias normales, el hierro sérico ocupa aproximadamente el 30% de los sitios de unión a la transferrina que amortigua su reactividad. El hierro, en mínima cantidad, puede perderse unido a la albúmina o a otras pequeñas moléculas. La saturación de la TF varía según el ciclo diurno, y en función de la situación del organismo (Uchida y col., 1983). Esta saturación suele ser elevada en la circulación portal donde la TF transporta el hierro recién absorbido en el intestino, y menor en el plasma que abandona la médula ósea, donde gran parte del hierro ha sido retenido. Además, las proteínas que se encargan de su transporte lo captan para evitar que el hierro libre reaccione con especies de oxígeno generando radicales libres.

El hierro unido a la transferrina es transportado a todos los tejidos que lo requieran (Wick y col., 1996), puede ser almacenado como ferritina y hemosiderina en hígado, bazo y en la médula ósea para la síntesis de

hemoglobina y formación de glóbulos rojos, en la placenta para cubrir las necesidades del feto, y en todas las células para la síntesis de enzimas y proteínas que lo necesiten de cofactor, como los citocromos, mioglobina y peroxidasas. El hierro almacenado como ferritina puede movilizarse rápidamente en caso de necesidad para el mantenimiento de las diferentes funciones orgánicas y celulares, mientras que la hemosiderina, como ya se ha comentado, es de difícil movilización (Mataix y Llopis, 2002) (**Fig. 11**).

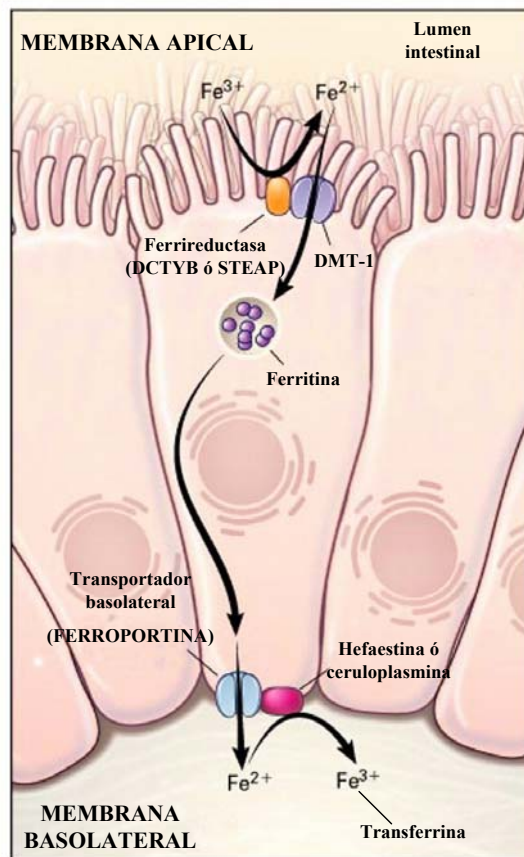


Figura 11. Absorción y transporte de hierro a través del epitelio intestinal (Andrews, 1999)

4.2.3. Eliminación

Una vez absorbido, la capacidad de excreción de hierro del organismo es muy limitada. Los cambios que se producen en los depósitos de hierro condicionan las variaciones en su eliminación. Las pérdidas endógenas diarias oscilan entre 1 y 2mg/día realizándose a través de las heces, piel y orina. La cantidad eliminada es diferente en el hombre, entre 0,9 a 1,5mg/día, que en la mujer (Bothwell y col., 1995), en la que hay que sumarle las pérdidas menstruales, incrementándose hasta un valor de 1,6mg/día (Worwood, 1995).

4.3. Factores que afectan la absorción de hierro

El balance de hierro debe estar regulado meticulosamente para que el organismo cubra sus necesidades pero, al mismo tiempo, evite la toxicidad asociada al exceso del mineral. Su regulación comienza a nivel de su absorción intestinal pero ésta solo implica el reciclado de hierro en los macrófagos y su movilización en los hepatocitos. Los estímulos que modulan la absorción de hierro en el organismo son las necesidades de los eritrocitos, la hipoxia, la deficiencia de hierro así como la sobrecarga y la inflamación. Se sabe que la hepcidina, una hormona proteica circulante, controla gran parte de esta regulación (Nicolas y col., 2001; Park y col., 2001; Pigeon y col., 2001).

Existen diversos factores que afectan la absorción intestinal de hierro, los cuales podrían agruparse en factores alimentarios o de la dieta y factores dependientes del estatus de hierro en el organismo (fisiológicos o corporales).

4.3.1. Factores fisiológicos

La deficiencia de hierro conduce a un aumento en la absorción del mineral. Esta deficiencia puede producirse por causas diversas como baja ingesta, cuadros hemorrágicos, sobrecrecimiento bacteriano, anoxia, situaciones que estimulan la eritropoyesis, anemia...etc. Sin embargo, cuando en el organismo hay una

sobrecarga de hierro y los depósitos corporales están saturados, la cantidad de hierro absorbido disminuye, de forma que las necesidades del organismo son las determinantes de la absorción del mineral, existiendo otros factores que se detallan a continuación.

4.3.2. Factores alimentarios

Existen una serie de factores de la dieta que son capaces de potenciar la absorción de hierro y otros que la inhiben o dificultan.

a. Potenciadores:

- El **ácido ascórbico**, aumenta la biodisponibilidad del hierro no hemo aún en presencia de factores inhibidores, tales como los fitatos, taninos y el calcio. Su efecto positivo se debe a que puede formar complejos solubles con los iones férricos, manteniendo esta solubilidad incluso en medios con un pH básico como el duodeno (Martínez y col., 1999). Además, favorece y mantiene el pH ácido en el estómago que permite la reducción del hierro a forma ferrosa, más fácilmente absorbible. Otros ácidos orgánicos que favorecen la absorción del hierro son el ácido cítrico, málico, tartárico y láctico (Allen y Ahluwalia, 1997).
- La **vitamina A y el β -caroteno**, incrementan la biodisponibilidad del hierro no hemo al formar complejos solubles con los iones férricos (Larysse y col., 2000), previniendo el efecto inhibidor de los polifenoles y fitatos (Martínez y col., 1999).
- Las **proteínas de origen animal** procedentes de carne, pollo y pescado, además de ser una fuente de hierro hemo disponible (Hunt, 2003), aumentan tanto la absorción del hierro hemo (Larysse y col., 1984) como la del no hemo de la dieta (Hurrell y col., 2006), contrarrestando el efecto inhibidor de fitatos y taninos (Hallberg y Hulthen, 2002). El mecanismo por el cual ocurre no ha sido claramente establecido. Sin embargo, existen evidencias experimentales que sugieren que se debe fundamentalmente a su composición en aminoácidos,

asignándole a la cisteína, a los aminoácidos azufrados y a los péptidos que los contienen el efecto promotor (Martinez-Torres y col., 1981; Layrisse y col., 1984; Taylor y col., 1986). Parece ser que los péptidos liberados durante la digestión de las proteínas forman complejos con el hierro dentro del lumen intestinal, aumentando su solubilidad (Baech y col., 2003).

b. Inhibidores:

- Los **fitatos** se encuentran en los cereales como el arroz, el trigo y el maíz, legumbres y frutos secos en un 1-2%. Estos compuestos pueden disminuir la absorción del hierro no hemo hasta un 80% (Sharma, 2003), debido probablemente a la formación de quelatos insolubles con fitatos di y tetra férricos (Allen y Ahluwalia, 1997).

- Los **polifenoles**, principalmente los taninos, reducen la biodisponibilidad del hierro debido a la formación de complejos insolubles que no pueden ser absorbidos (Samman y col., 2001). Se encuentran en el vino tinto, algunos vegetales y principalmente en el té y el café.

- Los **oxalatos** están presentes principalmente en las leguminosas, en vegetales como las espinacas, y en el chocolate. Interfieren en la absorción del hierro, pero debido a su carácter termolábil, su concentración disminuye notablemente con el proceso de cocción, reduciéndose de este modo la inhibición en la absorción del mineral (Vía del Crespo, 2002).

- Entre las **proteínas** que inhiben la absorción del hierro no hemo encontramos una amplia variedad, tanto de origen animal como vegetal. Las proteínas de origen animal que poseen un efecto inhibitor más significativo son la caseína, las proteínas del suero de la leche, la seroalbúmina bovina y las fosfoproteínas de la yema de huevo (Ishikawa y col., 2007) que, junto con los fosfatos, afectan tanto al hierro presente en el huevo como al total de la misma comida (Cook y Monsen, 1976). De las proteínas de origen vegetal la más importante es una fracción derivada de la proteína de soja denominada 7S-congicina que posee un

efecto inhibitor sobre la absorción del hierro no hemo similar al producido por los fitatos (Kane y Millar, 1984; Hurrell y col., 1992; Lynch y col., 1994).

- Interacciones con otros minerales:

Fe + Cu/Zn: estos minerales son elementos esenciales que interaccionan entre sí y posiblemente compiten por su transporte y utilización en el organismo. La interacción del hierro con cobre y zinc ocurre en el lugar de la absorción, debido probablemente a la presencia de un transportador común, el DMT-1 (Gushin, 1997; Peres y col., 1999, Arredondo, 2003; 2005; 2006). Además, la ceruloplasmina, enzima que contiene cobre en su centro activo, es requerida para la unión del hierro a la transferrina por su actividad ferroxidasa. Así un descenso de la ceruloplasmina puede conducir a la acumulación del hierro (Lee y col., 1968; Rincker y col., 2005).

Fe + Ca: según algunos autores el calcio interviene considerablemente en los porcentajes de absorción tanto del hierro hemo como del no hemo (Gleerup y col., 1995; Hallberg, 1998), reduciendo la tasa de biodisponibilidad entre un 30 y un 60% (Sharma, 2003). El mecanismo de reducción en la biodisponibilidad, parece ser debido a un paso intracelular común para ambos elementos y, por tanto, una competencia en la absorción.

Fe + Mn: altas dosis de manganeso pueden disminuir la utilización del hierro debido a la competencia de ambos minerales a nivel de absorción intestinal, pero aún no hay evidencia de que este efecto sea importante en dietas mixtas y es probable que actúe sumado a otros nutrientes y compuestos inhibidores (Rossander-Hulthen, 1991). Otros autores han visto que la absorción del hierro tanto en su forma férrica como ferrosa no se afecta en presencia de manganeso (Iturri y Núñez, 1998).

- Productos de la reacción de Maillard: como ya se ha comentado en el apartado 1.4.3., diversos estudios han observado como los productos de la reacción de Maillard, pueden interaccionar con minerales de la dieta como el hierro, afectando su utilización. El hecho se debe a que estos compuestos se

comportan como polímeros aniónicos capaces de formar complejos con éste y otros minerales, con lo que su metabolismo podría verse alterado (Andrieux y Saquet, 1984).

5. COBRE

5.1. Aspectos generales

El cobre es un elemento traza esencial para el organismo. El contenido total en un adulto (70Kg) es de alrededor de 110mg, y se encuentra en todos los tejidos y fluidos corporales, principalmente en el esqueleto (46mg, incluida la médula ósea), el músculo esquelético (26mg), hígado (10mg), cerebro (8,8mg), y sangre (6mg) (Linder y col., 1998). La ingesta diaria de cobre en los adultos oscila entre 0,6 y 1,6mg/día (Walker, 1982; Turnlund y col., 1989; Linder, 1991; Scout y Turnlund, 1994, Linder y Hazegh-Azam, 1996), y las principales fuentes son los mariscos, los granos enteros, nueces, legumbres, pescado e hígado.

Este elemento presenta tres estados de oxidación: Cu^0 , Cu^{1+} y Cu^{2+} . En los sistemas biológicos suele encontrarse como Cu^{2+} . Los cambios en el estado de oxidación pueden alterar los sistemas biológicos, y al igual que el hierro, el cobre puede participar en reacciones de oxidación produciendo especies reactivas del oxígeno responsables de la peroxidación lipídica de las membranas, daño en el ADN y ARN y oxidación directa de proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1984).

El cobre forma parte de numerosas enzimas y es indispensable para múltiples funciones corporales: participa en el crecimiento, los mecanismos de defensa, la mineralización ósea, la maduración de glóbulos rojos y blancos, el transporte de hierro, el metabolismo del colesterol, la contractilidad del miocardio, el metabolismo de la glucosa, el desarrollo cerebral, etc. Su concentración en la sangre se estima que es del orden de 10^{-13}M . En exceso el cobre puede ser citotóxico.

Algunas de las enzimas en las que el cobre participa como cofactor y componente alostérico son la superóxido dismutasa (SOD), citocromo C oxidasa, tirosinasa, lisil oxidasa, dopamina- β -oxigenasa y ceruloplasmina, entre otras (Uauy y col., 1998; Vulpe y col., 1999; Harris, 1999).

Dado que el cobre es un elemento esencial y tóxico a la vez, los organismos deben desarrollar los mecanismos necesarios para extraerlo de los alimentos, transportarlo a través de las membranas biológicas, llegar hasta las células que lo requieran, así como regular determinados procesos implicados en prevenir y evitar su acumulación en el organismo (**Fig. 12**). La importancia de mantener este balance y una adecuada homeostasis del mineral, viene determinada, además, por la existencia de dos enfermedades genéticas relacionadas con el metabolismo del cobre como son la enfermedad de Wilson y la de Menkes (Chelly y col., 1993; Bull y Cox, 1994).

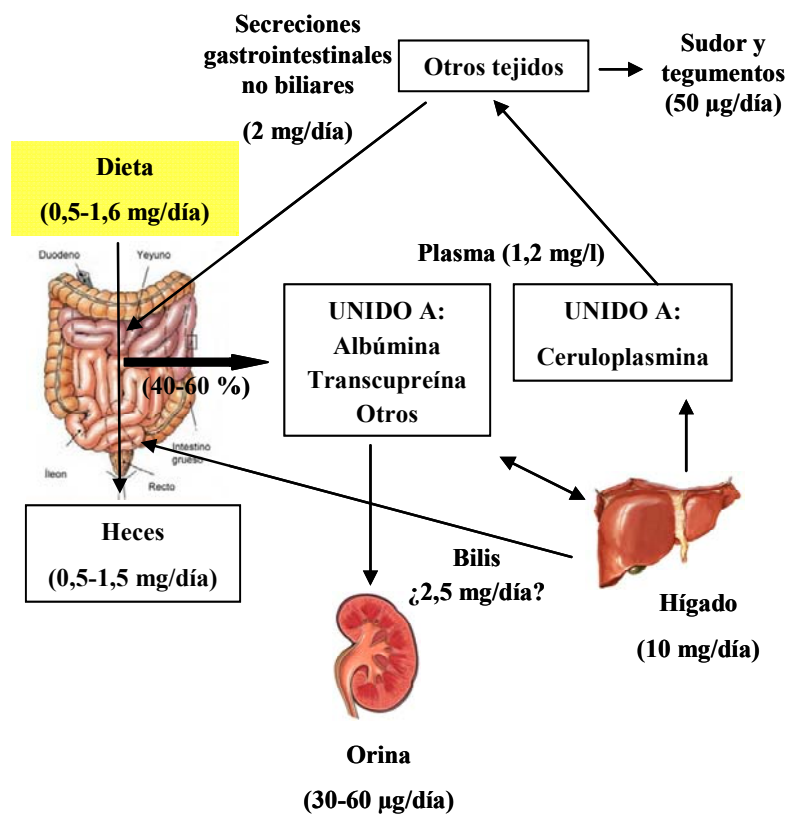


Figura 12. **Metabolismo corporal del cobre** (Linder y Hazegh-Azam, 1996)

5.2. Absorción, transporte y eliminación

La absorción de cobre ocurre principalmente en el duodeno y yeyuno aunque una pequeña fracción es absorbida en el estómago (Crampton y col., 1965; Van Campen, 1965). Tanto la absorción de cobre, como su transporte y eliminación, son factores determinantes en el control de su homeostasis, fenómeno que depende de la cantidad de cobre presente en el lumen intestinal, la proporción de inhibidores y facilitadores de la absorción y del estatus de cobre en el organismo. La forma química en la que el cobre se encuentre en el lumen intestinal afecta intensamente su absorción. Cuanto mayor sea su solubilidad, favorecida por el pH gástrico, más eficiente será la absorción del mineral (Wapnir, 1998).

5.2.1. Absorción

Aunque el centro regulador del metabolismo del cobre es la célula hepática, existe regulación en su entrada a través del enterocito. Su entrada puede producirse por difusión pasiva cuando la concentración de cobre es elevada en el lumen o a través de transportadores cuando es baja (Linder, 1991). En la célula intestinal, el cobre es captado por el transportador DMT-1 y en menor medida por el transportador hCTR-1 (human copper transporter) (Zhou y Gitschier, 1997). Para que pueda ser captado por éste último, el cobre (II) debe ser reducido a cobre (I) por acción de unas óxido-reductasas presentes en la membrana apical de la célula.

Dentro del citosol el cobre es quelado por las metalotioneínas y transportado a las distintas chaperonas de cobre en la célula (Harrison y col., 1999; 2000; O'Halloran y Culotta, 2000). Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína muy importantes en la captación y almacenamiento de metales como el cobre (Kägi, 1991; Palmiter, 1998; Egli y col., 2003). Las chaperonas son las encargadas de transportar el cobre a las diferentes

cuproenzimas y a la membrana basolateral de la célula para su posterior paso a la circulación sanguínea (Puig y Thiele, 2002; Prohaska y Gybina, 2004).

Cuando la concentración sanguínea de cobre es deficitaria, el enterocito lo capta y lo entrega rápidamente a la sangre para ser utilizado por los distintos órganos. En cambio, cuando hay un exceso intracelular del metal la célula capta menos cobre, aunque la cantidad neta entregada a la membrana basolateral es mayor debido al aporte propio de cobre de esta célula. La salida del cobre a la circulación se realiza utilizando una ATPasa llamada ATPasa de Menkes (Sharp, 2003) (**Fig. 13**).

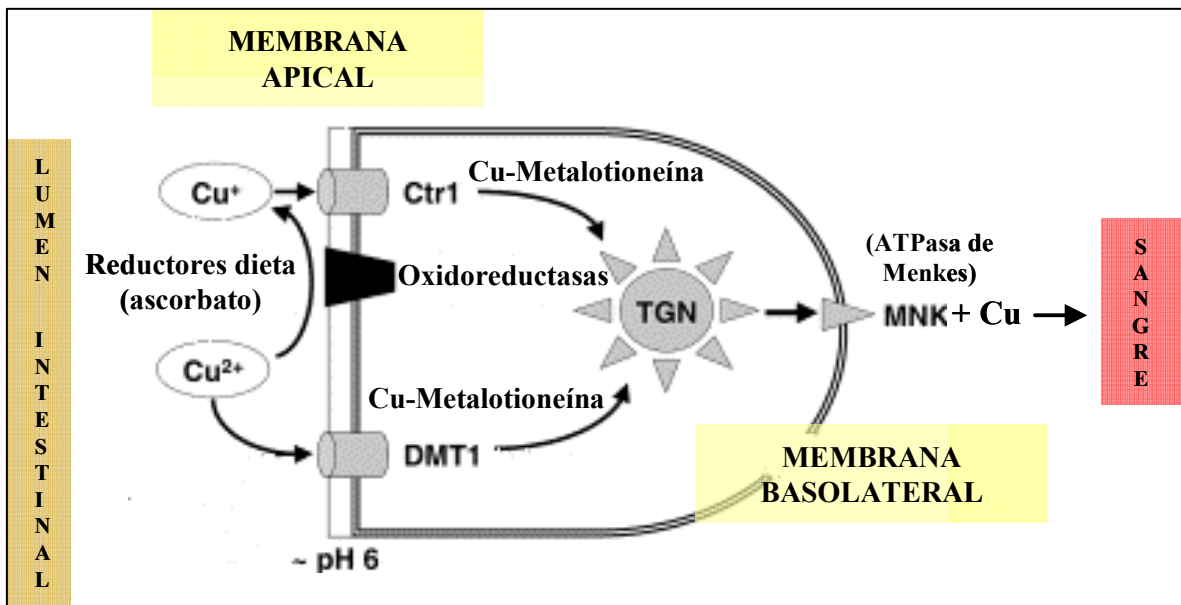


Figura 13. Absorción del cobre a través del epitelio intestinal (Sharp, 2003)

5.2.2. Transporte

Una vez que el cobre atraviesa la célula intestinal, puede ser transportado desde la mucosa intestinal a la sangre portal unido a diferentes transportadores. Entre ellos está la albúmina que quela al cobre (10-12%) debido a la presencia en su estructura de aminoácidos como la histidina (Wirth y Linder, 1985; Barrow y Tanner, 1988; Linder y col., 1999). En menor proporción puede unirse a aminoácidos libres como la treonina, cisteína o histidina (4%), a péptidos que contengan estos aminoácidos y a una macroglobulina llamada trasncupreína (9%) (Masouka y col., 1993; Masouka y Saltman, 1994; Linder y col., 1999). El cobre unido a los transportadores mencionados alcanza la célula hepática. La entrada del cobre en el hepatocito así como su almacenamiento y/o distribución se produce mediante mecanismos similares a los de las células intestinales. Dentro del hígado puede almacenarse unido a la metalotioneína o ser distribuido por las chaperonas a diferentes orgánulos como la mitocondria y al TGN (trans-golgi network), y a enzimas como la Cu/Zn superóxido dismutasa. La ATPasa de Wilson localizada en la membrana del aparato de Golgi capta al cobre y lo introduce en esta red desde la que llegará a los lisosomas para su posterior liberación al plasma o eliminación biliar.

Bajo circunstancias normales, el cobre unido a la ceruloplasmina (65-90%) es la principal fuente de cobre para la mayoría de los tejidos no hepáticos (Harris y col., 1995; Hilton y col., 1995; Meyer y col., 2001), existiendo receptores específicos de membrana para este transportador en el corazón y la placenta (Stevens y col., 1984; Kataoka y Tavassoli, 1985; Tavassoli y col., 1986).

En la sangre el cobre se distribuye principalmente en los eritrocitos y el plasma. En los eritrocitos un 60% se encuentra unido a la superóxido dismutasa y un 40% a otras proteínas y aminoácidos.

5.2.3. Eliminación

La regulación de la excreción de cobre parece ser el principal mecanismo que controla su homeostasis (Scout y Turnlund, 1994, Turnlund y col., 1998), y en ella juega un papel importante el hígado. El primer paso en su excreción se produce desde los hepatocitos a través de la bilis. Su eliminación ocurre principalmente por el tracto gastrointestinal, ya sea por la excreción biliar unido a la ceruloplasmina o como cobre no absorbido. El cobre presente en la bilis es mucho menos reabsorbible (10-15%) que el de los fluidos gastrointestinales. Ésta reabsorción varía en función de la concentración de cobre en los hepatocitos (Chowrimootoo y Seymour, 1994).

Con las heces se suelen eliminar de 0,5 a 1,5mg /día mientras que las pérdidas por el sudor, menstruación y orina son mínimas (30-60µg/día). Por último a la proporción de cobre ingerida, que no es absorbida, hay que sumarle la cantidad excretada por el tracto biliar, la saliva, otras secreciones gastrointestinales y la descamación de los enterocitos (Linder y Hazegh-Azam, 1996).

Estudios realizados en humanos con isótopos estables de cobre indican que la mayor parte del cobre circulante es reciclado por el organismo diariamente (Scout y Turnlund, 1994, Turnlund y col., 1998).

5.3. Factores que afectan la absorción de cobre

5.3.1. Factores fisiológicos

- **Efecto del pH y la digestión:** el ambiente ácido del estómago contribuye a la liberación del cobre presente en los alimentos (Gollan, 1975). Las secreciones ácidas permiten la disociación del cobre de los alimentos permitiendo, de éste modo, que pequeñas cantidades del mineral difundan a través de las paredes del estómago. Una vez que el contenido gástrico entra en el duodeno, el aumento del pH luminal afecta de manera negativa la solubilidad del cobre, por lo que debe formar complejos con aminoácidos orgánicos u otros quelantes para mantenerse

soluble (Harris, 1997). La digestibilidad del cobre también se afecta por la digestión pancreática (Wolters y col., 1993) disminuyendo su absorción como le ocurre también al transportado en la bilis (Gollan y Deller, 1973).

5.3.2. Factores alimentarios

Tanto los macronutrientes como los elementos minerales pueden alterar la disponibilidad y los mecanismos de absorción del cobre. Entre ellos destacan los efectos producidos por:

- **Fibra y fitatos:** el efecto de la fibra vegetal sobre el cobre es variado. En el caso del fitato sódico y la α -celulosa, la absorción de cobre suele afectarse de manera negativa (Turnlund y col., 1985), habiendo evidencias de que puede aumentar la precipitación cuando el fitato está en presencia de un exceso de calcio (Wise y Gilbert, 1982). Por otra parte la hemicelulosa también puede inducir un balance negativo de cobre según se ha demostrado en adolescentes varones (Drews y col., 1979). Otras fibras y gomas refinadas así como la carboximetilcelulosa no parecen afectar el balance mineral del cobre (Behall y col., 1987).

- **Carbohidratos:** determinados estudios en ratas muestran como la fructosa de la dieta puede intensificar los efectos de una ingesta insuficiente de cobre (Reiser y col., 1983; Fields y col., 1984). Los requerimientos de cobre pueden verse incrementados si la dieta contiene fructosa, aunque su efecto puede depender de la especie y el sexo. La deficiencia de cobre provocada por la interacción con el azúcar parece estar asociada con cambios que se producen en el metabolismo energético de los lípidos (Koh, 1990; Wapnir y Devas, 1995). Estos resultados también se han visto en humanos (Reiser y col., 1985). Por el contrario, los polímeros de glucosa presentes en preparados de cereales como el jarabe de maíz, pueden aumentar la absorción de cobre debido a la estimulación del transporte de agua a través del lumen intestinal (Wapnir y Balkman, 1991).

- **Grasas:** estudios realizados en humanos indican que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados no afectan a la retención de cobre (Lukaski y col., 1983). Ácidos grasos saturados como el palmítico (16:0) y esteárico (18:0) reducen considerablemente la cantidad de cobre eliminado desde el yeyuno, mientras que el caprílico (8:0) y el caproico (6:0) no tienen ningún efecto (Wapnir y Sia, 1996).

- **Proteínas y derivados:** los cambios en la cantidad, tamaño y estructura de las proteínas naturales pueden afectar la asimilación del cobre (Moore y col., 1964). Estudios en humanos demuestran que la naturaleza de la proteína y la cantidad de fósforo consumido pueden tener un efecto importante, hasta tal punto que la retención de cobre aumenta cuando la dieta es pobre en fósforo pero rica en proteína (Greger y Snedeker, 1980).

Sin embargo, un exceso de aminoácidos en la dieta produce una mala absorción de cobre y hasta su deficiencia (Harvey y col., 1981). La cisteína es un efectivo agente quelante de cobre, de manera que disminuye su disponibilidad al reducirlo a un estado monovalente en el que es más difícilmente absorbible (Baker y Czarnechi-Maulden, 1987). Por el contrario cuando los complejos están formados por cobre y metionina o lisina, su biodisponibilidad puede aumentar hasta un 90% y un 120% respectivamente (Kies y col., 1989; Aogayi y Baker, 1994).

- **Ácidos orgánicos:** la interacción más significativa entre un ácido orgánico y el cobre durante la absorción tiene lugar con el ácido ascórbico ya que la vitamina C reduce al cobre a su forma cuprosa y, en consecuencia, su biodisponibilidad disminuye (Van Campen y Gross, 1968). No obstante, cuando el ácido ascórbico se administra durante la etapa postabsortiva, la utilización del cobre por los tejidos aumenta considerablemente (DiSilvestro y Harris, 1981).

Otros ácidos como el cítrico, láctico, acético y málico pueden contribuir a su solubilización e incrementar su biodisponibilidad al formar complejos estables con éste mineral (Shan, 1981).

- Interacciones con otros minerales:

Cu + Zn: el antagonismo que existe entre estos dos minerales es ampliamente conocido (Van Campen y Scaife, 1967; Hall y col., 1979). Un exceso de zinc puede afectar negativamente la absorción de cobre, debido a que es capaz de aumentar indirectamente los niveles de metalotioneínas. De este modo, un exceso de dichas proteínas quelan al cobre impidiendo su salida del enterocito y, por tanto, su utilización por los distintos tejidos (Scarino y col., 1991; Oestreicher y Cousins, 1985). Los niveles de cobre en suero e hígado disminuyen linealmente en función de la concentración de zinc en la dieta (Fischer y col., 1981).

Cu + Fe/Sn: los cationes divalentes pueden competir con el cobre a nivel de su absorción intestinal, sobre todo cuando están presentes en la dieta en elevadas concentraciones (Yu y col., 1994; Wapnir y col., 1993; Pekelharing y col., 1994).

Cu + Mb: tanto el molibdeno libre como en forma de tiomolibdato quelan al cobre de la dieta disminuyendo su absorción intestinal (Brewer y col., 1991).

- Efecto del procesado de los alimentos y productos de la reacción de Maillard: los tratamientos químicos en los alimentos pueden disminuir la biodisponibilidad del cobre, especialmente cuando se trata de procesos de oxidación y reducción que tienen lugar por la acción de agentes oxidantes o, simplemente, por la exposición del alimento al aire. Un factor que influye decisivamente es la fuente de cobre así como los tratamientos culinarios a los que se somete el alimento, ya que se ha visto que en alimentos procesados su absorción es mucho menor que en los naturales tanto de origen vegetal como animal (Johnson y Lee, 1988). Los efectos derivados de la presencia de PRM sobre la absorción y el metabolismo del cobre ya han sido previamente expuestos en el apartado 1.4.3.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En primer lugar, se prepararon mezclas de glucosa-lisina que fueron calentadas bajo distintas condiciones de temperatura (100° y 150°C) y tiempo de calentamiento (desde 15 hasta 90 minutos), y caracterizadas con diversos parámetros indicativos del desarrollo de la reacción.

Ya que el objetivo global de esta memoria ha sido el estudio de las propiedades antioxidantes de dichas muestras, su relación con la capacidad quelante de metales y la absorción de hierro y cobre, para el correcto desarrollo del mismo se evaluaron tres aspectos diferentes:

- La capacidad quelante de hierro y cobre de las muestras.
- Sus propiedades antioxidantes. Estas propiedades fueron analizadas *in vitro* (mediante el estudio de la capacidad de las muestras para reducir la peroxidación lipídica en una emulsión de ácido linoleico, y a través de la medida de la habilidad para neutralizar radicales libres) y en cultivos celulares, utilizando células Caco-2. En ellas se estudiaron diversos marcadores del daño oxidativo (viabilidad celular, peroxidación lipídica y modificaciones en la actividad de enzimas antioxidantes), analizando el efecto sobre los mismos de las muestras y su papel protector ante la presencia de agentes prooxidantes.
- Los efectos de las muestras en la absorción de hierro y cobre en ensayos con células Caco-2.

A continuación se describe de forma detallada el desarrollo de los ensayos, y las técnicas utilizadas para evaluar cada uno de los aspectos mencionados.

2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO

Todos los reactivos utilizados para la preparación de las muestras y en el desarrollo de los análisis, fueron de alto grado de pureza, y comprados a Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Alemania) y Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany).

Es bien conocida la variabilidad de los productos de la reacción de Maillard en función de la naturaleza de los reactantes, la concentración de los mismos, el pH, la temperatura, la presión, el tiempo, la actividad de agua, etc. En base a ensayos previos y tras consultar la bibliografía al respecto (Delgado-Andrade, 2002), las condiciones experimentales seleccionadas para la obtención de las muestras objeto de estudio fueron las siguientes:

- Reactantes: mezcla equimolar del sistema glucosa-lisina.
- Temperatura de calentamiento: 100°C y 150°C.
- Tiempos de calentamiento: 15, 30, 60 y 90 minutos.
- Humedad: 40%.
- Sistema no tamponado.
- Modo: en recipientes abiertos de vidrio de horno resistente al calor (Arcuisine, Arc, Francia), de uso frecuente en el calentamiento doméstico de alimentos.

2.1. Preparación de las muestras

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

Cantidades equimolares de glucosa anhidra (Sigma, G-7528) y lisina anhidra (Sigma, L-5501) se pesaron en balanza de precisión (Mettler Toledo, AB204, España) y homogeneizaron en un mortero. 30g de la mezcla se depositaron en los citados recipientes de vidrio, pesados previamente, y se añadieron 20ml de agua

milli-Q (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corp., Bedford, Mass., USA), de forma que el contenido final de humedad fuera del 40%. No se modificó el pH de las mezclas, es decir, se trataba de un sistema no tamponado. La mezcla fue homogeneizándose y distribuyéndose cuidadosamente sobre la superficie del recipiente con ayuda de una pequeña espátula de cerámica. A continuación, la mezcla se dejó en reposo durante 5 minutos con el fin de permitir su completa humectación y se procedió a su pesada antes del calentamiento. Las mezclas se calentaron a 100°C y a 150°C en una estufa (Selecta, J.P. Selecta S.A.) durante diferentes tiempos (15, 30, 60 y 90 minutos) (n= 3).

Tras el calentamiento, cada recipiente se sacó de la estufa y la reacción se detuvo metiéndola en agua fría y después en hielo picado. Las muestras se pesaron para conocer la pérdida de peso producida durante la reacción, se extrajeron de los recipientes y, estos se enjuagaron con agua milli-Q, con la finalidad de extraer la muestra en su totalidad; a continuación, fueron liofilizadas (Génesis SQ 25 EL, Virtis) y guardadas en bolsas de polietileno herméticamente cerradas en un congelador a -80°C (Termo Forma -86C ULT Freezer, Madrid, España) para su correcta conservación, utilizando silica gel para prevenir la humectación (**Fig. 14**).

Se obtuvieron un total de ocho muestras: cuatro correspondientes a 100°C (100-15, 100-30, 100-60 y 100-90) y cuatro a 150°C (150-15, 150-30, 150-60 y 150-90), según estuvieran calentadas durante 15, 30, 60 y 90 minutos, respectivamente.

Los ensayos se realizaron con las mezclas de glucosa-lisina (G-L), tanto cruda como calentadas, así como con la glucosa y lisina de forma independiente, con la finalidad de evaluar la posible contribución del azúcar y del aminoácido a los resultados.

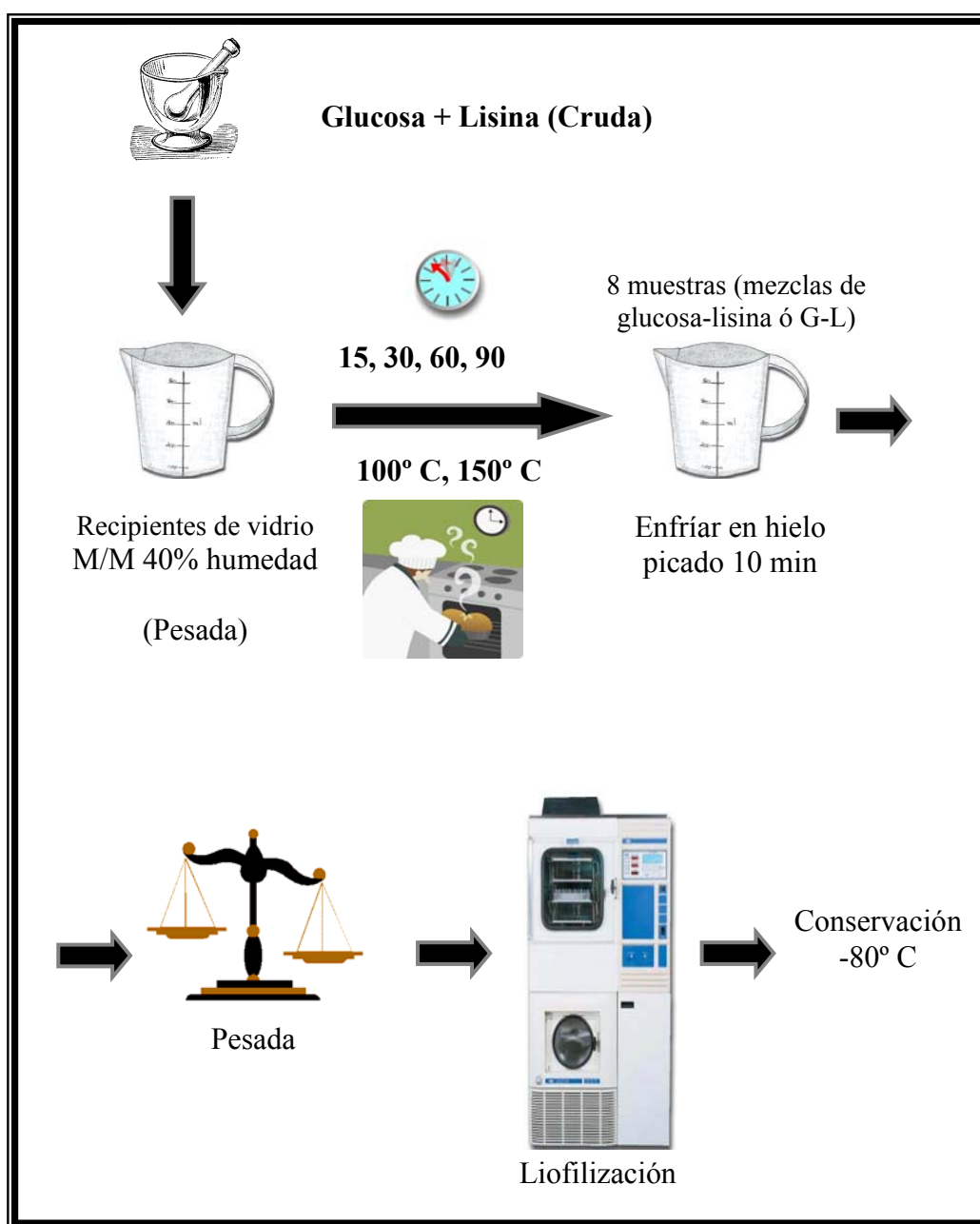


Figura 14. Esquema de la preparación de las mezclas de glucosa-lisina

2.2. Caracterización de las muestras

Las muestras se caracterizaron en cuanto a la descripción del aspecto, determinación de peso, medida del pH, medida del porcentaje de lisina libre, desarrollo del pardeamiento y determinación del rango de absorción espectrofotométrico.

2.2.1. Descripción del aspecto

Cada una de las muestras obtenidas presentaba un aspecto y color diferentes que permanecieron inalterados tras su liofilización.

El aspecto de las muestras tras el calentamiento se describe a continuación:

100-15: pasta de color marrón claro, que no llega a estar caramelizada.

100-30: pasta de color marrón caramelizada.

100-60: pasta de color marrón más oscuro caramelizada.

100-90: pasta de color marrón oscuro intenso caramelizada.

150-15: pasta de color y olor a caramelo de consistencia semilíquida.

150-30: cristales de color marrón intenso, brillante.

150-60: polvo de color marrón oscuro, casi negro y muy brillante con olor a tostado.

150-90: polvo de color negro, brillante con olor a tostado.

2.2.2. Determinación del peso

Las muestras (50g de peso inicial) se pesaron antes y después del proceso de calentamiento con el objeto de determinar su pérdida de peso. En balanza de precisión se pesaron: recipiente vacío, recipiente + muestra, recipiente + muestra tras el calentamiento. De este modo, por diferencia, se calculó el rendimiento del proceso de obtención.

2.2.3. Determinación del pH

Se prepararon soluciones de cada una de las muestras a una concentración de 1mg/ml en agua desmineralizada (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corp., Bedford, Mass., USA). Se agitaron vigorosamente durante 10 minutos en un vortex y se centrifugaron a 5.000rpm durante 45 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810R, Minnesota, USA). No se observó la aparición de precipitado en ninguna de las muestras excepto en 150-90. El pH fue medido en las soluciones o en sus correspondientes sobrenadantes (PHM250 ion analyzer. MeterLab, Radiometer Copenhagen, Denmark).

2.2.4. Determinación del porcentaje de lisina libre

La medida del porcentaje de lisina libre tras el calentamiento se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Waters, Milford, MA) usando el método Pico Tag (Cohen y col., 1979) tras la derivación con fenil isotiocianato utilizando un módulo de separación Waters 2695 (Waters Cromatografía, S. A., Madrid, España), omitiendo la hidrólisis ácida.

2.2.5. Desarrollo del pardeamiento y determinación del rango de absorción espectrofotométrico

El color de las muestras es un indicativo del grado de pardeamiento, es decir, del desarrollo de la reacción, y se determinó mediante la medida de la absorbancia en soluciones de las distintas muestras a la concentración de 1mg/ml. Para ello fueron individualmente suspendidas en agua desmineralizada, agitadas vigorosamente durante 10 minutos en un vortex y centrifugadas a 5.000rpm durante 45 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810R, Minnesota, USA). La absorbancia se midió a 280 y 420nm (λ) en las distintas soluciones o bien en los correspondientes sobrenadantes en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700, Model TCC-240A, Columbia, USA).

La determinación del rango de absorción espectrofotométrico UV-visible, se realizó entre las longitudes de onda de 200 a 700nm, siguiendo la metodología descrita por Jing y Kitts (2004a) ligeramente modificada. Para ello, 1mg de muestra se diluyó en 1ml de tampón fosfato (PBS), pH 7,4 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04M, NaH_2PO_4 0,008M, NaCl 0,15M) y se procedió a la medida de su absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700). Se realizó una lectura/segundo durante aproximadamente 2 minutos.

3. MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA *IN VITRO*

La actividad antioxidante *in vitro* de las mezclas de G-L obtenidas se determinó mediante su capacidad para reducir o retardar la peroxidación lipídica y su habilidad para neutralizar radicales libres.

3.1. Capacidad para retardar la peroxidación lipídica (TBARS)

Se siguió el método descrito por Wijewickreme y Kitts (1998), ligeramente modificado (**Fig. 15**). El método se basa en la determinación de la capacidad de las muestras para retardar la peroxidación lipídica en una emulsión de ácido linoleico. La formación de peróxidos lipídicos se evalúa mediante el análisis de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, especialmente el MDA (malondialdehído). El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un pigmento rojo. La reacción es de alta sensibilidad pero baja especificidad. El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

En primer lugar, se preparó una emulsión de ácido linoleico añadiendo 1,5g de dicho ácido graso a 200ml de una mezcla de tampón fosfato (PBS) 0,1M, pH 6,8 y Tween 80 (0,4g). A continuación, diferentes cantidades de las muestras de G-L (2, 4, y 6 mg) se incubaron con 5ml de emulsión y 5ml de PBS a 45°C

durante 24 horas en condiciones de oscuridad en una estufa (Selecta, J.P. Selecta S.A.).

Tras la incubación, las muestras se sacaron de la estufa, se agitaron y se colocaron en un baño de hielo picado para detener la reacción. Una vez enfriadas, se volvieron a agitar y se diluyeron en proporción 1:1 (v:v) con tampón Tris 25mM, pH 7,4 conteniendo azida sódica al 0,02%.

Paralelamente, se realizaron controles en las mismas condiciones pero sin muestras de G-L.

Posteriormente se efectuó el análisis de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). El TBA se preparó al 0,8% en agua milli-Q, añadiendo butilhidroxianisol (BHA) al 0,02%. El TBA es poco soluble y requiere la aplicación de agitación y calor (25°C) para su total disolución. A continuación, se mezcló 1ml de TBA con 1ml de la solución conteniendo cada muestra de G-L en tubos de vidrio protegidos de la luz, se taparon con algodón, se agitaron suavemente en un vortex y se sumergieron en un baño de agua a 100°C durante 15 minutos. Después, se enfriaron a temperatura ambiente y se añadieron 1,5ml de n-butanol. Cada tubo se agitó vigorosamente durante 2 minutos, de manera que la capa acuosa y la orgánica se mezclaran adecuadamente y se centrifugaron a 3.000rpm durante 20 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810R).

La absorbancia del sobrenadante se midió a una longitud de onda de 532nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700).

La cuantificación del contenido de MDA en las muestras se hizo a partir de una curva patrón preparada con 1,1,3,3-tetraetoxipropano en ácido sulfúrico al 1%. Este compuesto se utiliza habitualmente como patrón, sustituyendo al MDA, ya que éste es extremadamente reactivo.

Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica (%RPL), definido como sigue:

$$\% \text{ RPL} = \frac{(\text{TBA control} - \text{TBA muestra}) \times 100}{\text{TBA control}}$$

Se realizó el mismo análisis a compuestos de reconocida actividad antioxidante, tales como melatonina, vitamina C, vitamina E y butilhidroxitolueno (BHT) (2, 4, 6 mg).

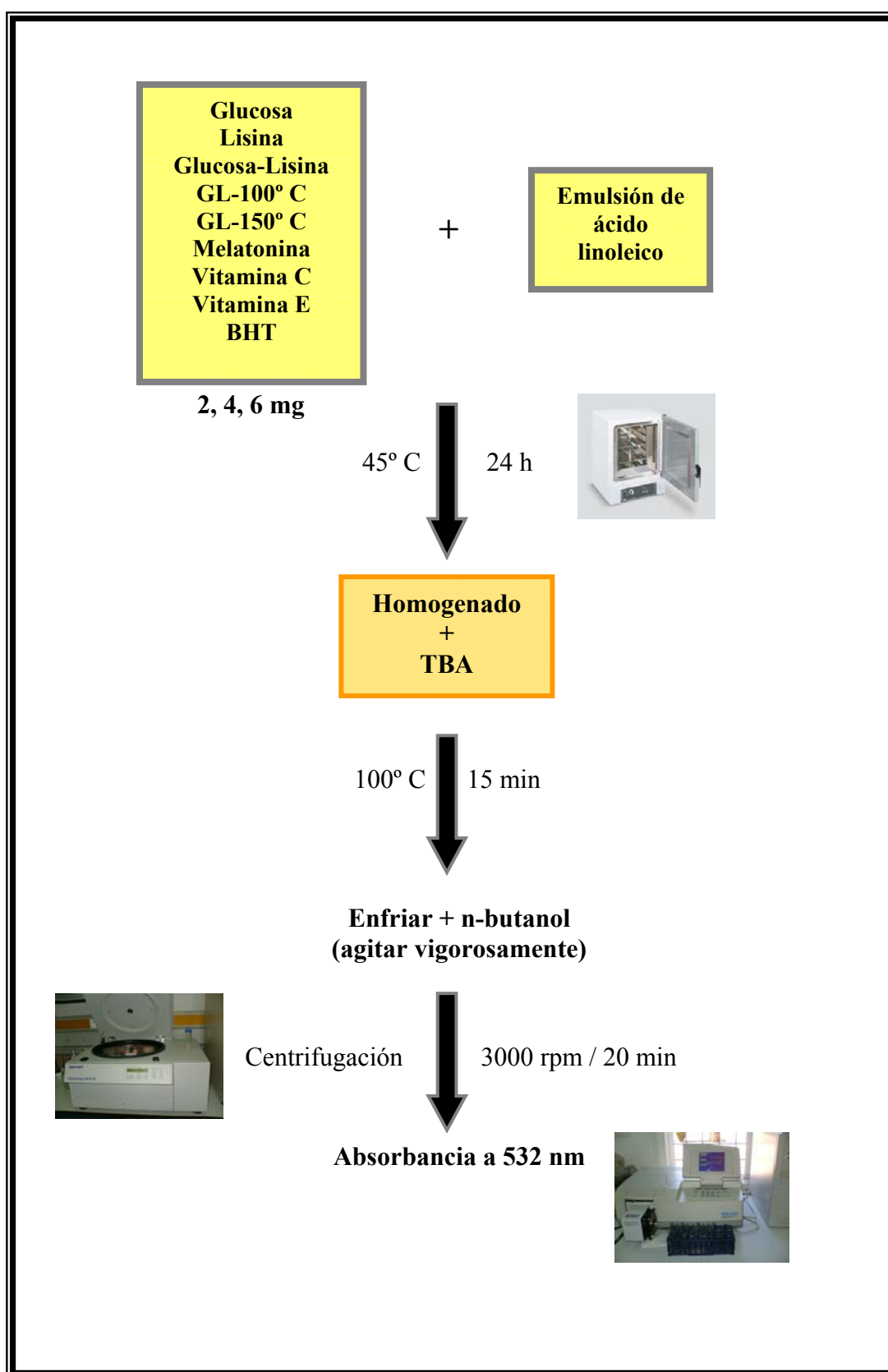


Figura 15. Determinación de la capacidad para retardar la peroxidación lipídica (TBARS)

3.2. Actividad antiradical o neutralizadora de radicales libres (DPPH)

La capacidad antiradical o neutralizadora de las muestras frente al radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH) se determinó siguiendo el método descrito por Jing y Kitts (2004a), ligeramente modificado. El método se basa en la desaparición del color púrpura debido al DPPH; a mayor reducción del color, mayor habilidad neutralizadora de la muestra.

Se ensayaron distintas concentraciones de cada una de las muestras de G-L (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 y 1mg/ml) con el fin de conocer si el aumento en la cantidad de las mismas incrementaba el porcentaje de DPPH neutralizado, es decir, si existía una correlación positiva entre ambos parámetros. 1ml de cada una de las muestras de G-L, disueltas en PBS, pH 7,4, se mezcló con 1ml de una solución 0,1mM de DPPH en etanol, en tubos de vidrio protegidos de la luz. Se agitaron suavemente en un vortex y se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Paralelamente, se realizaron controles en las mismas condiciones pero sin muestras.

Pasado este tiempo, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 517nm (Shimadzu UV-1700).

La capacidad antiradical de las muestras se calculó como porcentaje de desaparición del color púrpura, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Actividad antiradical (AA)} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} \times 100$$

De nuevo, se realizó el mismo análisis a compuestos de reconocida actividad neutralizadora de radicales libres, tales como melatonina, vitamina C, vitamina E y butilhidroxianisol (BHT) (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 y 1mg/ml).

4. MEDIDA DE LA CAPACIDAD QUELANTE DE METALES DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA

4.1. Determinación de la capacidad quelante de hierro

El método de Yoshimura y col., (1997), ligeramente modificado, fue aplicado en la valoración de la capacidad quelante de hierro de las mezclas de G-L:

0,05g de las muestras de G-L y 1,4mg de sulfato amónico de Fe (II) hexahidratado (concentración final = 357 μ M) fueron disueltos en 10ml de tampón HEPES 30mM, pH 7,4, mediante agitación vigorosa en un vortex. Esta solución se mezcló enérgicamente con 10ml de tolueno conteniendo 10mM de dibenzoilmetano (DBM) y 1mM de trioctilfosfina óxido (TOPO) y se centrifugó a 3.500rpm durante 30 minutos a 20°C (Eppendorf Centrifuge 5810R). Seguidamente, se procedió a la lectura de la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 408nm (Shimadzu UV-1700). La cuantificación del contenido de hierro libre no quelado por las muestras de G-L (hierro extraído por el complejo DBM-TOPO) se hizo a partir de una curva patrón preparada con sulfato amónico ferroso con concentraciones de hierro comprendidas entre 0 y 357 μ M.

La cantidad de hierro quelado por los mezclas de G-L, se calculó mediante la diferencia entre la cantidad de hierro total inicial y la cantidad de hierro libre por el complejo DBM-TOPO en la capa orgánica.

$$\text{Fe quelado} = \text{Fe total} - \text{Fe libre}$$

El porcentaje de capacidad quelante de hierro se expresó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Capacidad quelante de Fe} = \frac{(\text{Fe total} - \text{Fe libre})}{\text{Fe total}} \times 100$$

Fe total: 200 μ g

4.2. Determinación de la capacidad quelante de cobre

Se siguió el método de la tetrametilmurexida (Terasawa y col., 1991), ligeramente modificado, para determinar la capacidad quelante de cobre de las mezclas de G-L obtenidas. Según esta técnica, se determina la cantidad de cobre libre presente en la muestra y por diferencia con el cobre total se calcula el porcentaje de cobre quelado.

Partiendo de una solución madre de cada una de las muestras de G-L (500 μ g/mL) disueltas en tampón hexamina·HCl 10mM, pH 5, conteniendo KCl 10mM, se realizaron distintas pruebas con concentraciones crecientes de las mismas (50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ g/ml). En tubos de vidrio protegidos de la luz se mezclaron 1ml de la solución correspondiente de cada mezcla, 1ml de solución de CuSO₄ 0,1mM en tampón hexamina y 0,1ml de murexida 1mM en tampón hexamina. Las mezclas se agitaron en un vortex y se dejaron reposar durante 10 minutos.

Transcurrida la reacción, el cobre libre presente en las muestras se determinó mediante la medida del ratio o relación de absorbancia entre las longitudes de onda $\lambda_1 = 460\text{nm}$ y $\lambda_2 = 530\text{nm}$ en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700). La cuantificación del contenido de cobre libre total se hizo a partir de una curva patrón con concentraciones de cobre comprendidas entre 0,01 y 0,2mM.

La cantidad de cobre quelado por las mezclas de G-L se obtuvo calculando la diferencia entre la cantidad de cobre total y la cantidad de cobre inicial presentes en el sistema:

$$\text{Cu quelado} = \text{Cu total} - \text{Cu libre}$$

El porcentaje de capacidad quelante de cobre se expresó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Capacidad quelante de Cu} = \frac{(\text{Cu total} - \text{Cu libre}) \times 100}{\text{Cu total}}$$

Cu total: 6.35 μ g.

5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN CULTIVOS CELULARES (Línea celular Caco-2)

5.1. Siembra y mantenimiento

Las células Caco-2 fueron suministradas por la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en el pase número 40, utilizándose en estos ensayos entre los pases 50-60. El medio de cultivo para el mantenimiento de las células, así como los reactivos adicionados para su reconstitución y para los ensayos, todos ellos específicos para cultivos celulares, fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Los recipientes para el cultivo eran de la marca comercial Corning Costar (Cambridge, M.A., USA). Inicialmente, las células se sembraron en frascos de poliestireno tratados para cultivos celulares (falcon) de 75cm² de superficie (**Foto 1**), conteniendo medio esencial mínimo de Dulbecco, enriquecido en glucosa (DMEM, Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium), cuya composición es la siguiente:

- DMEM en polvo (Sigma D-5648)
- CO₃HNa (S-5761)35mM
- Suero Bovino Fetal inactivado (F-7524).....15%
- Aminoácidos no esenciales (M-7145).....1%
- Mezcla antibiótico / antimicótico (A-9909).....1%
- Insulina Bovina (I-6634)0,1U.I. / ml
- HEPES (H-2387).....15mmol / l



Foto 1. **Siembra de las células en falcon**

Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador (modelo 3111, Forma Scientific Inc., USA), en atmósfera 95:5 aire/CO₂, con una humedad del 90%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días, procediéndose a la tripsinización y siembra de las células en frascos nuevos cuando se alcanzaba una confluencia aproximada del 70%. Para la tripsinización, las células se lavaron con HBSS (Hank's balanced salt solution) (Sigma H-2387) exenta de calcio y magnesio, seguido del tratamiento con tripsina (0,25%) y ácido etilendiaminotetraacético (2mM) (T-3924) durante 5 minutos a 37°C. Después de que la monocapa celular fuera ligeramente despegada de la superficie del frasco, se adicionó medio de cultivo completo para detener la tripsinización, se homogeneizó la suspensión suavemente con pipeta pasteur y se traspasó a tubos de centrifuga de 50ml.

Las células se centrifugaron a 850rpm, a 20°C, durante 5 minutos, y una vez obtenido el pellet o botón celular (**Foto 2**), se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en DMEM, distribuyéndose en los nuevos frascos para continuar el crecimiento celular.



Foto 2. **Pellet de células**

Todas la manipulaciones de los cultivos celulares se llevaron a cabo en condiciones de asepsia y bajo campana de flujo laminar (Modelo AV-100 Telstar, España) con el fin de mantener las condiciones estériles.

Las fotografías 3 y 4 muestran el aspecto de los cultivos y su adecuado desarrollo.

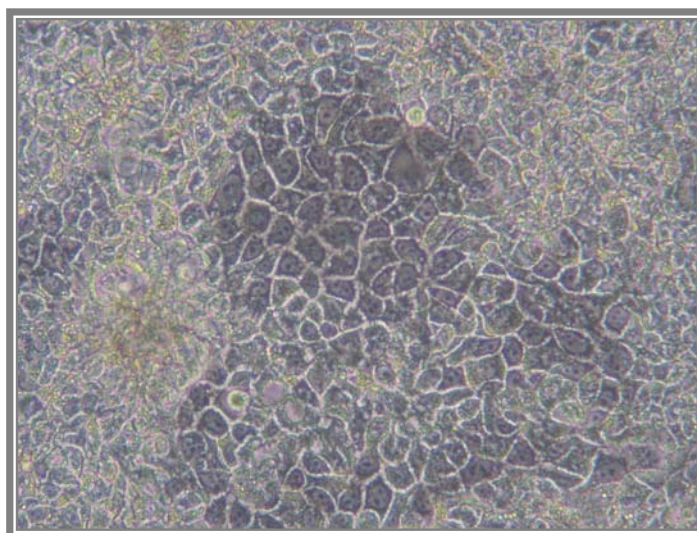


Foto 3. **Monocapa de células Caco-2 en confluencia con estructura típica de mosaico (Microscopía óptica)**

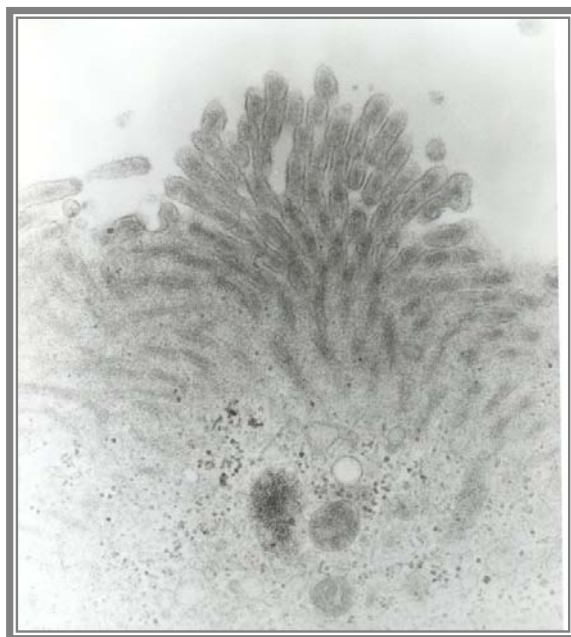


Foto 4. **Desarrollo de microvellosidades de las células Caco-2 (Microscopía electrónica)**

5.2. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad de las células en presencia de las soluciones de las mezclas de G-L, objeto de estudio, se evaluó utilizando dos métodos diferentes que se describen a continuación.

5.2.1. Método de tinción con azul tripán

Las células obtenidas tras la tripsinización, se sembraron en placas petri de 9,2cm² de superficie a una densidad de 40.000 células/cm², a las que se les cambió el medio de cultivo cada 2-3 días (**Foto 5**). Se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad durante unos 10 días y una vez alcanzada la confluencia, se tripsinizaron. Tras la tripsinización y una vez obtenido el pellet de células, se procedió a la medida de la viabilidad mediante el test de tinción con azul tripán, en el que las células no viables aparecen teñidas con el colorante debido a la destrucción de sus membranas celulares. Para ello, 200µl de la suspensión de

células, previamente homogeneizada, se mezclaron con 200µl de colorante azul tripán. Aproximadamente 20µl de la mezcla fueron transferidos con una micropipeta a la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de células viables y no viables en un microscopio invertido (CK40, OLYMPUS) (**Foto 6**). La viabilidad con las soluciones utilizadas en los ensayos nunca fue inferior al 90%.

El porcentaje de viabilidad se expresó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totales}} \times 100$$

Siendo:

- Células totales: células vivas + células muertas

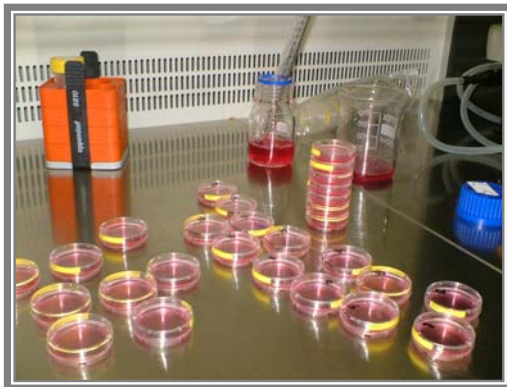


Foto 5. Placas Petri



Foto 6. Recuento de células en cámara de Neubauer

5.2.2. Método de tinción con rojo neutro

Las células obtenidas tras la tripsinización, se sembraron en placas multipocillo de 96 pocillos de la marca comercial Corning Costar (Cambridge, M.A., USA) a una densidad de 75.000 células/pocillo en 100µl de medio de cultivo (**Foto 7**).

Con el objetivo de permitir la adhesión de las células a la superficie de los pocillos, se incubaron durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio gastado, aspirando con una pipeta Pasteur, y se efectuó la medida de la viabilidad mediante el test de tinción con rojo neutro, colorante que tiñe las células viables al incorporarse dentro de sus lisosomas. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

Una vez retirado el medio de cultivo, se añadieron, a cada pocillo, 200µl de la solución de tinción de rojo neutro, previamente calentada a 37°C. Esta solución se preparó a partir de una inicial al 0,4% (w/v) en agua milli-Q que se diluyó 80 veces con medio de cultivo. Las células se incubaron durante 2 horas con el colorante, que luego se desechó aspirándolo con pipeta pasteur. A continuación se llevó a cabo la fijación de las células, sumergiendo cada placa en una bandeja que contenía 1 litro de una solución de fijación (formaldehído 0,5%, CaCl₂ 0,1%) durante 30 segundos, seguido de una fase de lavado consistente en la inmersión de las placas en tampón fosfato 0,1M (PBS), pH 7,4, al menos dos veces, desechando el medio cada vez.

Tras secar las placas, se procedió al lisado de las células, añadiendo a cada pocillo 200µl de una solución de solubilización (ácido acético glacial al 1% en una mezcla agua:etanol al 50%), se envolvieron con papel film transparente para evitar la evaporación del alcohol y se incubaron a 4°C durante una noche.

Al día siguiente se realizó la lectura de la absorbancia del contenido de cada pocillo a 540nm en un lector de placas (BioRad Model 550) (**Foto 8**), previa homogenización en una placa osciladora.

El porcentaje de viabilidad se expresó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\boxed{\phantom{\text{Ecuación}}}$$

Se utilizaron como control aquellos pocillos en los que las células fueron incubadas con medio de cultivo.



Foto 7. **Placa multipocillo**



Foto 8. **Lector de placas**

El método del azul tripán se utilizó para aquellas soluciones que iban a ser empleadas en los ensayos de captación y transporte de minerales. Para el resto de los ensayos, se empleó el método de tinción con rojo neutro.

5.3. Ensayos de citotoxicidad

Dado el posible efecto citotóxico que se le ha atribuido a los PRM procedentes de sistemas modelo azúcar-lisina, se realizaron ensayos de citotoxicidad con el objetivo de determinar la concentración ideal de mezclas de G-L que no dañara a las células y, por tanto, no redujera de forma significativa su viabilidad. Para ello se utilizó el método de tinción con rojo neutro, incubando las células, previamente a la tinción, con las mezclas de G-L disueltas en una solución tamponada (glucosa 5mM, ClK 10mM, ClNa 130mM, SO₄Mg 1mM, HEPES 50mM, pH 7) a diferentes concentraciones (0,5, 1 y 2mg/ml) durante 3 horas.

5.4. Inducción del daño oxidativo

Con el objeto de conocer el posible papel protector de los PRM frente a un daño oxidativo inducido, se realizaron ensayos previos provocando en las células un insulto oxidativo. Para ello, se incubaron con distintos agentes prooxidantes tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hierro (FeSO₄) y cobre (CuSO₄), que se añadieron a la solución tamponada mencionada en el apartado 5.3.

En primer lugar, utilizando el método de tinción con rojo neutro, se seleccionaron las concentraciones de los prooxidantes que produjeran un daño celular significativo sin llegar a la muerte celular absoluta, es decir que no redujeran la viabilidad por debajo del 50% aproximadamente.

Las células se incubaron durante 3 horas con soluciones tamponadas de peróxido de hidrógeno 0,05-21mM, hierro 0,1-6,5mM y cobre 5-100μM. Las soluciones seleccionadas fueron las siguientes:

- Fe: 1,5mM
- Cu: 50μM
- H₂O₂: 0,5mM

Para evitar la evaporación de las soluciones a ensayar durante éste periodo, se adicionó medio de cultivo a todos los pocillos de la periferia, que no contenían células (**Fig. 16**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
B	D	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	D
C	D	AO	AO	AO	AO	AO	AO	AO	AO	AO	AO	D
D	D	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	D
E	D	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	D
F	D	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	D
G	D	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	AO + GL	D
H	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Figura 16. **Placa multipocillo**

D: DMEM (medio de cultivo)

CP: control positivo (Buffer de captación)

AO: agente oxidante: Fe, Cu o H₂O₂ individualmente

G-L: mezcla de glucosa-lisina. En cada fila se añadió una mezcla de glucosa-lisina distinta adicionada del agente oxidante correspondiente, por ej.:

- Fila D: 100-15 + Fe
- Fila E: 100-30 + Fe
- Fila F: 100-60 + Fe
- Fila G: 100-90 + Fe.....etc., y así se ensayaron todas las muestras.

5.5. Evaluación del daño oxidativo

Los marcadores del estrés oxidativo que se determinaron en las células Caco-2 fueron: el daño a la viabilidad celular, el grado de peroxidación lipídica y los mecanismos antioxidantes enzimáticos. Estas determinaciones se efectuaron en las células tras su incubación individual con: las muestras, los agentes prooxidantes, y con los prooxidantes en presencia de las muestras.

La viabilidad celular se evaluó sembrando las células en placas multipocillo mediante la tinción con rojo neutro tal y como se ha descrito. Para determinar el efecto sobre la formación de lípidos peroxidados y sobre la actividad enzimática, se procedió del siguiente modo:

Inicialmente, las células se sembraron en frascos de poliestireno (falcon) de 25cm² de superficie tratados para cultivos celulares, conteniendo medio esencial mínimo de Dulbecco, enriquecido en glucosa (DMEM), a una densidad de 50.000 células/cm². Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador, en atmósfera 95:5 aire/CO₂ y con una humedad del 90%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y una vez alcanzada la confluencia (a los 7 días de la siembra) se procedió a la incubación de las células con las soluciones conteniendo las muestras y/o los agentes prooxidantes. Previamente, se lavaron las células con 5ml de solución tamponada, que fueron luego aspirados suavemente con una pipeta pasteur para retirar posibles restos de medio de cultivo.

Las células se incubaron con estas soluciones y, transcurridas 3 horas, se tripsinizaron, siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.1., obteniéndose un pellet de células al que se le dio un lavado con tampón PBS (5ml, pH 7,4, 37°C).

Tras desechar el sobrenadante, inmediatamente se procedió a la obtención del citosol de las células mediante la **técnica de lisado** descrita por Jing y Kitts (2004b):

Las células fueron sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación introduciendo los tubos en un congelador a -80°C durante 2 horas y en un baño de agua (J. P. Selecta, S. A., Barcelona, España) a 37°C durante 5 minutos. De este modo, y debido al cambio brusco de temperatura, se producía la rotura de sus membranas celulares y la liberación del citosol. Seguidamente se añadieron 5ml de tampón PBS (pH 7,4, 0°C), se agitaron en un vortex y se centrifugaron en una ultracentrífuga (RC5C Giralt, Sorvall Instruments) a 10.000rpm, 4°C durante 10 minutos. Los sobrenadantes, que contenían el citosol, se pasaron a tubos eppendorf de 3ml utilizando una pipeta pasteur y se conservaron a -80°C hasta el momento de ser utilizados para las dos técnicas que se describen a continuación (5.5.1. y 5.5.2.).

5.5.1. Determinación de lípidos peroxidados (dienos conjugados)

La peroxidación lipídica es una forma de producción de daños tisulares y celulares que puede iniciarse por las especies reactivas del oxígeno. Una vez que comienza, el proceso toma forma de cascada de producción de radicales libres que, a partir de los ácidos grasos poliinsaturados, lleva a la formación de hidroperóxidos y otros productos como son los dienos conjugados, cuya cuantificación permite conocer la extensión del daño oxidativo que previamente se induce en las células. Siguiendo la técnica de Buege y Aust (1978) ligeramente modificada, 0,5ml de citosol se mezclaron con 5ml de cloroformo:metanol (2:1) mediante agitación en un vortex durante 2 minutos hasta la aparición de dos fases (orgánica y acuosa). A continuación se centrifugó a 2.200rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R) durante 15 minutos. El sobrenadante, constituido por metanol, se desechó mediante succión con pipeta pasteur y los

3ml de la capa inferior de cloroformo se transfirieron a otro tubo, procediéndose a su evaporación en una centrífuga de vacío (Gyrovap, Howe) durante 2 horas y 30 minutos.

El residuo lipídico obtenido se disolvió en 1,5ml de ciclohexano inmediatamente después de su obtención. La absorbancia de la solución se leyó a 233nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700) frente a un blanco de ciclohexano.

La cuantificación de dienos conjugados se expresó como unidades de absorbancia a 233nm.

5.5.2. Determinación de la actividad enzimática

Como se ha comentado anteriormente, las células Caco-2 son un modelo útil para evaluar la respuesta fisiológica de los enterocitos al daño oxidativo.

Uno de los parámetros utilizados para evaluar la respuesta al daño celular inducido es la medida de la actividad enzimática, ya que se sabe que estas células expresan la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa (Grisham y col., 1990; Baker y Baker, 1992).

a. Técnica de determinación de la catalasa (CAT)

Su determinación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Aebi (1984), ligeramente modificado. Este método se basa en el seguimiento de la descomposición de H_2O_2 para dar H_2O y O_2 como consecuencia de la actividad catalítica de la catalasa (**Fig. 17**).

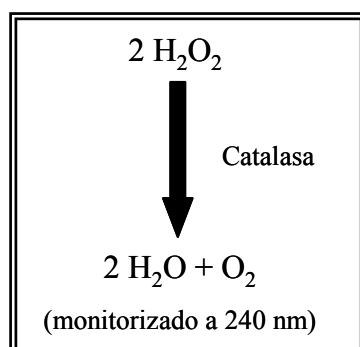


Figura 17. Esquema de la actividad catalasa (CAT)

Previamente, con el fin de elegir la cantidad de citosol que produjera un descenso significativo de absorbancia (es decir, de la desaparición de H₂O₂), se realizaron ensayos mediante los que se seleccionaron los volúmenes de citosol adecuados.

Se procedió del siguiente modo: a una cubeta de cuarzo se añadió la muestra y se completó hasta un volumen final de 3ml con tampón fosfato 50mM (0,05M KH₂PO₄, 0,04M Na₂HPO₄·12H₂O), pH 7,0, mezclándolo bien con una varilla. A continuación se introdujo la cubeta en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700) y, para iniciar la reacción, se añadieron 100µl de una solución de peróxido de hidrógeno 1M en tampón fosfato 50mM, pH 7,0, procurando su perfecta mezcla con la muestra. Seguidamente se procedió a la medida del descenso de absorbancia a 240nm durante un minuto. La lectura se realizó frente a un blanco sin peróxido de hidrógeno. La actividad de la enzima se expresó en unidades de actividad/mg de proteína (seg⁻¹/mg proteína).

b. Técnica de determinación de la superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es una metaloproteína que cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno. La determinación de la actividad de SOD es difícil debido a la naturaleza del sustrato que utiliza, el anión superóxido. El método utilizado está basado en la técnica original de McCord y

Fridovich (1969), aunque con ligeras modificaciones. Utiliza el sistema xantina/xantina-oxidasa como generador de anión superóxido; en presencia de este radical se produce una reducción del citocromo C, que es monitorizado a 550nm. Al añadir la muestra, que contiene la enzima, el radical superóxido se transforma en peróxido y la reducción del citocromo C se inhibe. Dicha inhibición es usada para medir la actividad de la enzima. A continuación se muestra un esquema de la reacción catalizada por la superóxido dismutasa (**Fig. 18**).

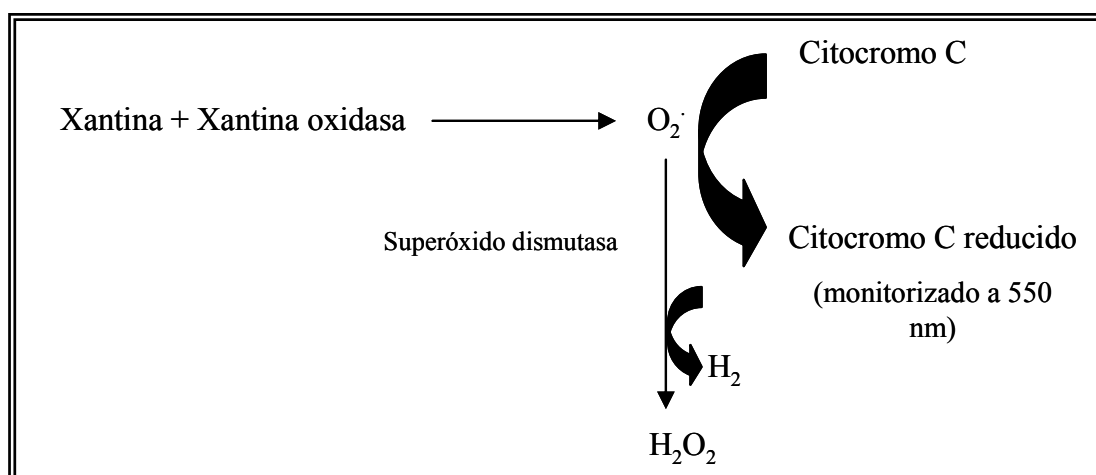


Figura 18. Esquema de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

Las lecturas se realizaron a 25°C, mezclando en microcubeta los siguientes reactivos:

- 400µl de tampón carbonato/bicarbonato sódico 20mM, pH 10, conteniendo EDTA 1mM y azida sódica 0,01mM.
- 300µl de una solución de citocromo C 0,1M en tampón carbonato/bicarbonato 20mM, pH 10 conteniendo EDTA 1mM y azida sódica 0,01mM.

- 100µl de una solución de xantina 0,5mM en tampón carbonato/bicarbonato 20mM, pH 10 conteniendo EDTA 1mM, sin azida sódica. La xantina tarda en disolverse.
- La reacción se inició al añadir 50µl de una solución de xantina-oxidasa 0,2U/ml en tampón carbonato/bicarbonato 20mM, pH 10 conteniendo EDTA 1mM, sin azida.

El incremento de absorbancia a 550nm se monitorizó durante un intervalo de tiempo de 1 a 2 minutos a una temperatura de 25°C. El espectro resultante se utilizó como control, considerándolo como el 100%.

La actividad de la enzima se expresó en unidades de actividad/mg de proteína (U/mg proteína).

Para realizar las determinaciones de la actividad de la SOD de las células que se habían incubado previamente con las muestras de G-L, solas o adicionadas del agente oxidante, se siguió el mismo protocolo descrito, añadiendo la cantidad de citosol necesario para observar esta actividad, antes de la adición de la xantina-oxidasa.

c. Técnica de determinación de la glutathion peroxidasa (GP_x)

La glutathion peroxidasa es una selenoproteína que cataliza la reducción de un gran número de hidroperóxidos desde peróxido de hidrógeno a hidroperóxidos orgánicos.

La medida de su actividad es difícil, ya que otras enzimas y compuestos pueden alterar los resultados obtenidos por la técnica, como por ejemplo la hemoglobina que presenta una actividad pseudoperoxidasa, y también debido a que la enzima presenta una cinética inusual. La metodología seguida para su determinación se basó en la técnica descrita por Flohé y Günzler (1984) con ligeras modificaciones. El método se basa en la formación instantánea de glutathion oxidado (GSSG) durante la reacción catalizada por la glutathion peroxidasa, que continuamente es reducido por un exceso de glutathion reductasa

activa y NADPH presentes en la cubeta. La consecuente oxidación de NADPH a NADP^+ es considerada un indicador de la actividad de la glutatión peroxidasa y es monitorizada espectrofotométricamente a 340nm y a 37°C. Como fuente de peróxido necesaria para la oxidación de GSH a GSSG, se utilizó terbutilhidroperóxido.

A continuación se muestra un esquema de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (**Fig. 19**).

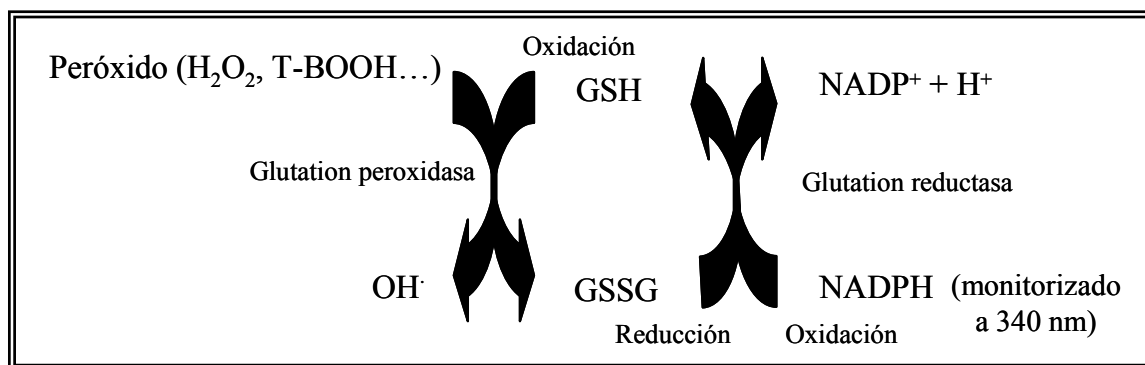


Figura 19. Esquema de la actividad glutatión peroxidasa (GP_x)

La determinación del descenso enzimático de NADPH, se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

En un tubo de ensayo de 10ml, protegido de la luz, se añadieron 100 μl de una solución de glutatión reductasa, 2,4U/ml, en tampón fosfato potásico (0,1M, pH 7,0, EDTA 1mM), 100 μl de una solución de glutatión reducido 10mM en tampón fosfato potásico, 100 μl de una solución de NADPH 1,5mM en tampón NaHCO_3 al 0,1% en agua milli-Q, la muestra y el tampón fosfato potásico necesario hasta un volumen final de 1,1ml. La mezcla se agitó vigorosamente en un vortex y se incubó durante 3 minutos a 37°C introduciendo el tubo en un baño de agua. A continuación, el contenido del tubo se pasó a una cubeta y se adicionaron, como fuente de peróxido, 100 μl de una solución de terbutilhidroperóxido (70%) 12mM en agua milli-Q.

La monitorización de la disminución de NADPH se llevó a cabo mediante la medida del descenso de absorbancia a una longitud de onda de 340nm, durante 5 minutos, a 37°C. La actividad de la enzima se expresó en unidades de actividad/mg de proteína (U/mg proteína).

Cuando se realizó la medida de la actividad de la GP_x de las células que se habían incubado con las muestras de G-L, solas o adicionadas del agente oxidante, se realizaron ensayos previos con el fin de elegir la cantidad de citosol que produjera un descenso significativo de absorbancia, es decir, la disminución de NADPH.

5.5.3. Determinación cuantitativa de proteínas

La cuantificación del contenido proteico de las distintas fracciones celulares se realizó por el **método de Lowry** ó método del Folin-Ciocalteau (Lowry y col., 1951). El método está basado en la formación de un complejo coloreado entre el cobre y los nitrógenos de los enlaces peptídicos (reacción de Biuret).

Para resaltar el color formado en esta reacción y aumentar la sensibilidad, se hace reaccionar posteriormente con el reactivo de Folin que, al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos, da un color azulado.

Por tanto, el método se basa en dos reacciones complementarias:

1. Biuret: característica de grupos NH₃. Da color violeta.
2. Folin: típica de grupos OH reductores (grupos fenólicos). Da color azul.

De acuerdo con este método se procedió del siguiente modo: en un tubo de ensayo de 10ml se añadieron 100µl de citosol, 900µl de agua milli-Q y 5ml del reactivo de Biuret (0,5% CuSO₄, tartrato sódico 1% en agua milli-Q). La mezcla se agitó vigorosamente en un vortex y se incubó en oscuridad durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 0,5ml del reactivo de Folin 2N (al 25% en agua milli-Q), se agitó en un vortex y se incubó en oscuridad durante 20 minutos.

La cuantificación del contenido de proteínas se determinó mediante la medida de la absorbancia a 640nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700), a partir de una curva patrón preparada con albúmina bovina de concentraciones comprendidas entre 0 y 600µg/ml.

5.6. Evaluación del papel protector de las mezclas de glucosa-lisina ante la presencia de agentes prooxidantes

Para evaluar la actividad antioxidante de las mezclas de G-L, las células se incubaron ante la presencia conjunta de los agentes prooxidantes y las distintas muestras de G-L a la concentración de 1mg/ml. A continuación se evaluaron las modificaciones sobre el daño oxidativo de acuerdo con las técnicas descritas anteriormente, es decir: ensayos de recuperación de la viabilidad celular, modificaciones de la peroxidación lipídica y actividad enzimática (**Fig. 20**).

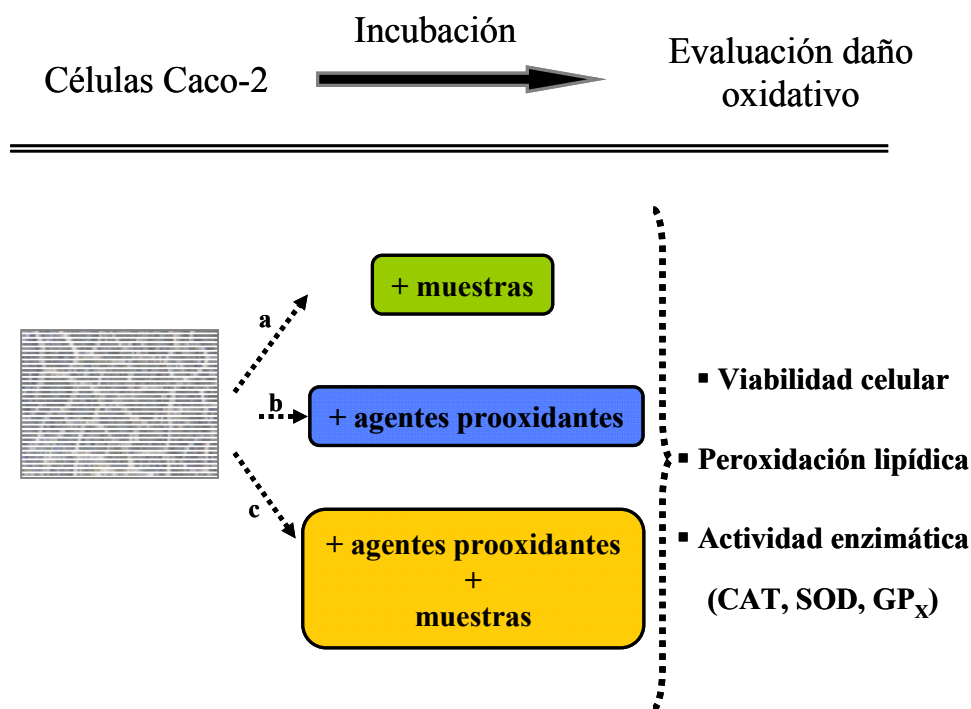


Figura 20. Esquema de la evaluación del papel protector de las mezclas de glucosa-lisina frente a un daño oxidativo inducido

6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN LA ABSORCIÓN DE HIERRO Y COBRE

6.1. Ensayos de captación y transporte de hierro y cobre

Para los ensayos de captación y transporte las células se sembraron en placas bicamerales (Transwell, 24mm de diámetro, 4,7cm² de superficie, 3mm de tamaño de poro, núm. Ref. 1414, Costar) a una densidad de 90.000 células/cm², con 2,5ml de medio de cultivo en el compartimento basolateral y 1,5ml de medio en el compartimento apical (**Foto 9**). El medio se cambió cada 2 días y los experimentos se realizaron tras 21 días desde la siembra. Durante todo este período, cada 5-6 días se comprobó la formación de estrechas uniones celulares durante la diferenciación y, por tanto, la integridad y confluencia de la monocapa.

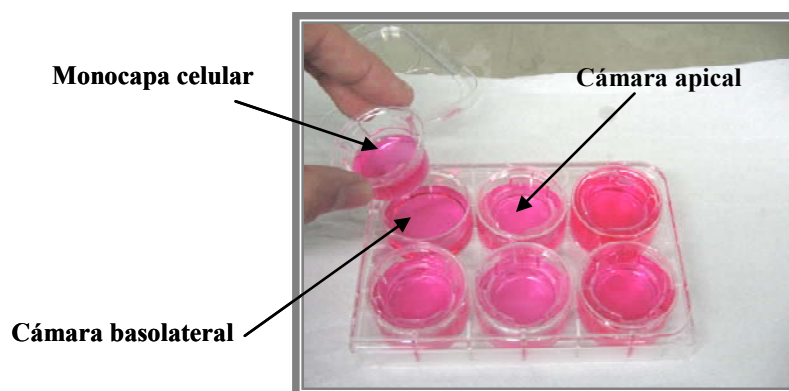


Foto 9. Placa Transwell

a. Integridad y confluencia de la monocapa

Se controló por la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y del transporte del rojo fenol.

La **resistencia eléctrica transepitelial** indica la resistencia de la monocapa de células al paso de la corriente eléctrica, y su aumento y posterior estabilidad confirman la formación de una monocapa íntegra con estrechas uniones entre las células. Valores anormalmente bajos supondrían la existencia de orificios o de anomalías en el funcionamiento celular, con lo que los pocillos no serían válidos para la realización de los experimentos. Se llevó a cabo utilizando un micropolímero (Millicell-ERS, Millipore), realizando tres medidas por pocillo.

Los valores fueron determinados mediante el siguiente cálculo:

$$\text{TEER} = (\Omega \text{ muestra} - \Omega \text{ blanco}) \times 4,7$$

Siendo:

- Ω muestra: resistencia de la monocapa celular.
- Ω blanco: resistencia de un pocillo sin células.
- 4,7: superficie del pocillo (cm^2).

Las células utilizadas en el presente ensayo alcanzaron valores estables de la TEER entre 500 y 650 Ω/cm^2 .

El **transporte de rojo fenol** a través de una monocapa celular íntegra no debe ser superior al 5% por hora. Para su determinación se aspiró el medio de las placas bicamerales lavando ambas cámaras con una solución tamponada (130mM NaCl, 5mM glucosa, 50mM HEPES, pH 7), exenta de rojo fenol. Una vez eliminados posibles restos, se añadieron 2,5ml de la solución tamponada en la cámara basolateral y 1,5ml de medio de cultivo, que contiene rojo fenol (42 μ M),

en la apical, manteniendo las células en el incubador a 37°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se recogió el contenido de la cámara basolateral, se ajustó el pH a 10 (donde sólo existe la forma básica del rojo fenol) con NaOH 5N y se midió su absorbancia a 558nm, calculándose el porcentaje de difusión del colorante. Las monocapas con porcentajes de transporte superiores al 5% fueron rechazadas para la realización de los ensayos. Los valores medios de las utilizadas se aproximaron al 3% de transporte.

La **Figura 21** representa esquemáticamente el modelo de transporte utilizado para las células Caco-2.

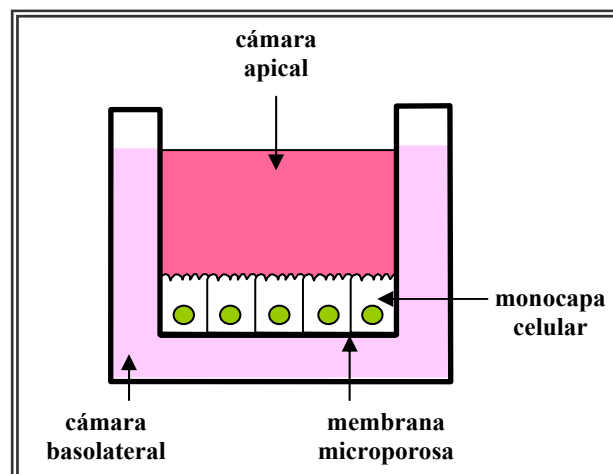


Figura 21. Esquema de una placa bicameral (sistema de transporte)

b. Desarrollo de los ensayos

Con la realización de este ensayo se pretendía conocer la influencia de la presencia de las mezclas de G-L seleccionadas sobre el transporte de hierro y cobre, así como sobre su captación por el enterocito. Para ello se siguió el procedimiento descrito por Seiquer y col., (2001).

Los ensayos para el hierro se realizaron utilizando una solución tamponada de FeSO_4 a la concentración de 0,1mM de hierro.

Antes de comenzar el ensayo, todas las soluciones se atemperaron a 37°C. Se retiró el medio gastado tanto de la cámara apical como de la basolateral, lavándose la monocapa de células dos veces consecutivas con HBSS. En todas las cámaras basolaterales se adicionaron 2,5ml de solución tamponada, mientras que en las cámaras apicales se adicionaron 1,5ml de las soluciones de las distintas mezclas de G-L (1mg/ml) en solución tamponada 0,1mM de hierro, incubándose durante 2 horas a 37°C. Como control se realizaron ensayos con las soluciones tamponadas 0,1mM Fe. Los μg de hierro captados se calcularon teniendo en cuenta la cantidad inicial que contienen las células en condiciones basales (incubadas con DMEM).

Tras este periodo, se recogió el contenido de la cámara basolateral y los pocillos se lavaron dos veces con agua milli-Q. También se retiró el contenido de la cámara apical lavando los pocillos con buffer de lavado enfriado con hielo (150mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM HEPES, pH 7). Para el estudio de la captación mineral se recogió la membrana con la monocapa de células.

Las soluciones recogidas en las cámaras basolaterales y los filtros conteniendo la monocapa de células se reservaron para analizar sus contenidos de hierro y calcular el mineral absorbido y captado, respectivamente. Utilizando como referencia el mineral añadido a la cámara apical, se calculó la eficacia de transporte (porcentaje de mineral transportado respecto de la cantidad inicial añadida). Los μg de hierro transportados se calcularon teniendo en cuenta la cantidad inicial que contienen las células en condiciones basales (incubadas con DMEM).

Los ensayos de captación y transporte de cobre se realizaron de forma similar a la descrita para el hierro, utilizando una solución tamponada de CuSO_4 , a la concentración de 60 μM de cobre.

En ambos casos, la concentración ensayada de las mezclas de glucosa-lisina que se incluyeron en las soluciones tamponadas de cada mineral, fue de 1mg/ml **(Fig. 22)**.

Tras la recogida del contenido de la cámara apical y basolateral, y previamente a su mineralización, se procedió a la lectura de su absorbancia a 280 y 420nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700) con el objetivo de conocer la posible absorción de los PRM a través de la monocapa de células. También se leyó la absorbancia de las soluciones antes de ser adicionadas a la cámara apical.

6.2. Determinación analítica de hierro y cobre

La medida de minerales en las distintas soluciones y muestras celulares se llevó a cabo por espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Previamente se realizó una mineralización de las muestras por vía húmeda, disponiéndolas en frascos adecuados resistentes al calor, que se situaron en un baño de arena (J.R. Selecta, S.A., COMBIPLAC, núm. Serie 0373930) a alta temperatura (210-220°C) (**Fig. 22**). Se las sometió a un tratamiento ácido, inicialmente con HNO₃ durante aproximadamente 1 hora y posteriormente con mezcla HNO₃:HClO₄ (1:4) hasta conseguir la total eliminación de la materia orgánica, es decir, hasta la total transparencia de la solución. Seguidamente se diluyeron con agua milli-Q para su medida en EAA en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Analyst 700).

Se prepararon soluciones estándar de todos los minerales de concentración 1g/l utilizando ampollas Tritisol (Merck, Darmstadt, Alemania), a partir de las cuales se obtuvieron las correspondientes curvas patrón.

Las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado en todas las muestras.

Para evitar la presencia de minerales, todo el material utilizado en el laboratorio fue lavado con ácido nítrico 0,1M y enjuagado con agua milli-Q.

6.3. Precisión y exactitud de los análisis

La exactitud en las determinaciones de hierro y cobre se cuantificó utilizando los siguientes patrones externos: *riñón de cerdo liofilizado* (Community Bureau of Reference B.C.R., Reference Material número 186) e *hígado liofilizado* (Community Bureau of Reference B.C.R., Reference Material número 185R), respectivamente. Los valores certificados y determinados en dichos patrones se recogen en la Tabla 2.

Mineral	Patrón	Valor certificado	Valor determinado
Fe ($\mu\text{g/g}$)	riñón liofilizado	299 ± 10.00	295.31 ± 4.77
Cu ($\mu\text{g/g}$)	hígado liofilizado	277 ± 5.00	280.96 ± 7.61

Tabla 2. **Valores certificados y determinados para los patrones externos (B.C.R.)**

Valores medios \pm desviación estándar (n = 4)

La precisión de los análisis de hierro y cobre, se controló mediante el cálculo del Coeficiente de Variación interensayo (%) siendo de 1,86% para los análisis de hierro y de 2,47% para el cobre, en las soluciones de hierro y cobre respectivamente.

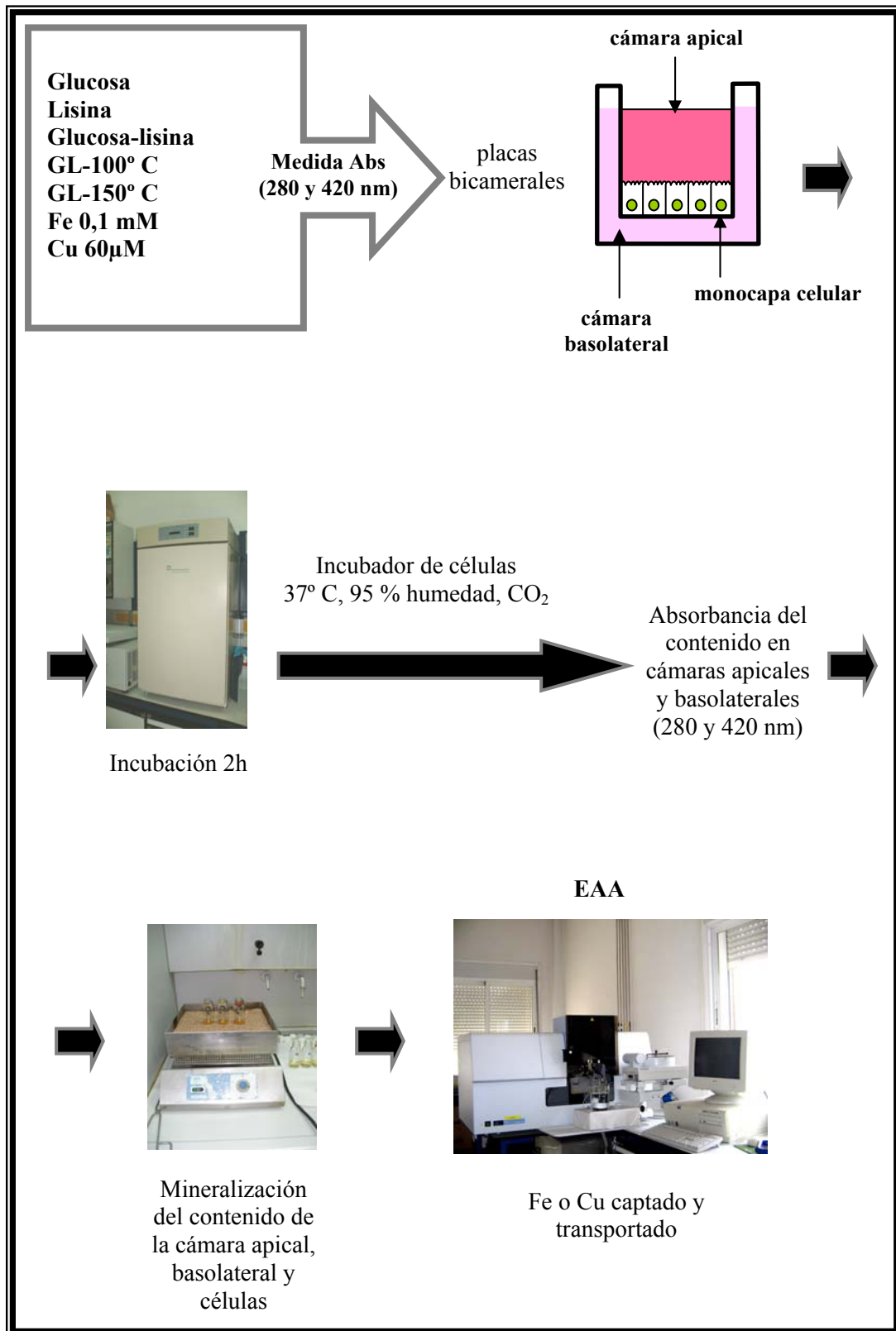


Figura 22. Esquema de los ensayos de captación y transporte de hierro y cobre

7. RESUMEN DE LAS DETERMINACIONES REALIZADAS

Las determinaciones llevadas a cabo en las distintas muestras están representadas en la siguiente Figura (23).

		MUESTRAS											
		Glucosa	Lisina	Cruda	GL 100°C	GL 150°C	Vit.C	Vit.E	MT	BHT	H ₂ O ₂	Fe	Cu
ENSAYOS IN VITRO	Pérdida peso				•	•							
	pH	•	•	•	•	•							
	Lisina libre			•	•	•							
	Abs = 280 y 420 nm			•	•	•							
	Espectros UV-visible	•	•	•	•	•							
	%RPL	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
	%AA DPPH	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
	AQ Fe	•	•	•	•	•							
	AQ Cu	•	•	•	•	•							
ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES	Viabilidad celular			•	•	•							
	Ensayos citotoxicidad			•	•	•							
	Inducción daño oxidativo									•	•	•	
	Protección frente al daño oxidativo			•	•	•							
	Lípidos peroxidados			•	•	•							
	Catalasa			•	•	•							
	Superóxido dismutasa			•	•	•							
	Glutation peroxidasa			•	•	•							
	Proteína			•	•	•							
	Ensayos captación y transporte	•	•	•	•	•						•	•

Figura 23. Determinaciones llevadas a cabo en las distintas muestras

8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico de los datos se utilizó el programa Statgraphics^R plus Windows^R versión 5.1.

Los resultados se sometieron a los siguientes análisis:

- Análisis de varianza de doble vía para conocer la influencia de los factores (temperatura × tiempo) sobre las variables estudiadas, así como la existencia de interacciones entre ellos. En los casos en los que se ensayaron distintas concentraciones de muestra el análisis empleado fue de varianza de tres vías (temperatura × tiempo × concentración). De éste análisis se excluyó la mezcla cruda, al no poseer todos los factores objeto de estudio.
- ANOVA de una vía para estudiar el efecto del tiempo de calentamiento, dentro de cada temperatura, en las variables objeto de estudio. En este análisis, la muestra cruda fue incluida, considerando que su tiempo de calentamiento fue cero.

En ambos casos se empleó el test de Duncan para determinar las diferencias significativas. Dichas diferencias se establecieron para un valor $P < 0,05$.

En aquellos análisis en los que se ensayaron, además de las mezclas, la glucosa y la lisina de forma independiente, éstas aparecen incluidas al final de las tablas. Sólo fueron comparadas frente a los controles (mezcla cruda, DMEM, Fe, Cu o H₂O₂), mediante un ANOVA de una vía empleando el test de Duncan para determinar las diferencias significativas.

Los resultados de la capacidad de reducción de la peroxidación lipídica y de neutralización del radical DPPH de los distintos compuestos con reconocida actividad antioxidante (Vit. C, Vit. E, BHT y melatonina), se compararon mediante la aplicación de un análisis de varianza de una vía empleando el test de Duncan.

RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras tras los análisis llevados a cabo.

La expresión de los resultados se ha realizado utilizando tablas y figuras. En las tablas se ha incluido una primera columna denominada muestra que corresponde al nombre de cada una de ellas, incluyendo la muestra cruda, utilizada como control, frente a la que se han comparado todas las demás. Las siguientes columnas corresponden a las variables medidas. En estas tablas se ha realizado un análisis de varianza de una vía para cada temperatura incluyendo la muestra control (cruda), con el objetivo de conocer las diferencias debidas al aumento del tiempo de calentamiento.

En algunas tablas se incluyen los resultados correspondientes a las muestras denominadas “Glucosa” y “Lisina”, expresados como valores medios \pm error estándar sin aplicarles ningún análisis estadístico. En los ensayos en cultivos celulares sí se ha realizado un análisis de varianza de una vía de la glucosa y la lisina con respecto a su control (DMEM, Fe, Cu o H₂O₂).

Cada tabla se acompaña de otra correspondiente al análisis de varianza de doble vía, para estudiar la influencia de los dos factores (temperatura y tiempo de calentamiento) y su interacción. En ellas, la columna de la izquierda incluye los 4 tiempos de calentamiento, las 2 temperaturas y la interacción “temperatura \times tiempo”, así como el error estándar residual (EER). Las siguientes columnas muestran los valores de las medias globales para cada una de las variables analizadas.

En algunos casos se ha realizado un análisis de varianza de tres vías, ya que además del estudio de los factores temperatura y tiempo, se ha intentado conocer la influencia de la concentración de la muestra. En este caso la columna de la izquierda incluye además las concentraciones utilizadas, los tiempos, las temperaturas y las interacciones “concentración \times tiempo”, “concentración \times temperatura”, “temperatura \times tiempo” y “concentración \times temperatura \times tiempo”, así como el error estándar residual.

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

1.1. Medida del pH y de la pérdida de peso de las mezclas de glucosa-lisina tras el calentamiento

Tabla 3a.- pH y pérdida de peso de las mezclas de glucosa-lisina tras el calentamiento

Muestra	pH	Pérdida peso	
		(g)	(%)
Cruda	9,72 ± 0,00 ^a	-	-
100-15	8,74 ± 0,00 ^b	0,84 ± 0,02 ^a	1,68 ± 0,05 ^a
100-30	8,49 ± 0,00 ^c	2,45 ± 0,03 ^b	4,9 ± 0,07 ^b
100-60	8,27 ± 0,00 ^d	6,46 ± 0,03 ^c	12,93 ± 0,06 ^c
100-90	7,44 ± 0,00 ^e	10,48 ± 0,03 ^d	20,96 ± 0,07 ^d
Cruda	9,72 ± 0,00 ^a	-	-
150-15	8,8 ± 0,00 ^b	3,25 ± 0,00 ^a	6,52 ± 0,02 ^a
150-30	7,73 ± 0,00 ^c	7,03 ± 0,02 ^b	14,06 ± 0,05 ^b
150-60	6,30 ± 0,00 ^d	17,6 ± 0,02 ^c	35,20 ± 0,05 ^c
150-90	5,43 ± 0,00 ^e	24,59 ± 0,15 ^d	49,18 ± 0,30 ^d

Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Peso inicial de la muestra: 50g.

Tabla 3b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre el pH, peso final y pérdida de peso de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		pH	Pérdida peso (g)	Pérdida peso (%)
tiempo (t)	15	8,77 ^a	2,05 ^a	4,10 ^a
	30	8,11 ^b	4,74 ^b	9,48 ^b
	60	7,28 ^c	12,03 ^c	24,06 ^c
	90	6,43 ^d	17,53 ^d	35,07 ^d
Temperatura (T)	100	8,23 ^a	5,06 ^a	10,12 ^a
	150	7,06 ^b	13,12 ^b	26,24 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
	T	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
	T × t	NS	NS	NS
	EER	9,51 × 10 ⁻⁴	0,02	0,04

Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

El pH fue disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de calentamiento en ambas temperaturas. La reducción en el valor del pH de las muestras calentadas a 100°C fue de 2,5 unidades aproximadamente, mientras que para las calentadas a 150°C llegó a ser de 4,5 unidades al alcanzar los 90 minutos de calentamiento (**Tabla 3a**).

La pérdida de peso en las muestras fue aumentando paralelamente al tiempo de calentamiento de forma significativa en todos los casos. En las muestras calentadas a 150°C la reducción fue superior y más drástica, llegando a perderse más de 20g de peso en la muestra 150-90 (**Tabla 3a**).

Tras realizar el análisis de varianza de doble vía, se observó un efecto significativo de ambos factores (tiempo y temperatura) en todos los casos. La interacción (T×t) no resultó significativa para ninguna de las variables estudiadas (**Tabla 3b**).

1.2. Medida del color

Tabla 4a.- Absorbancia a $\lambda_1 = 280\text{nm}$ y $\lambda_2 = 420\text{nm}$ de las mezclas de glucosilisina calentadas

Muestra	Absorbancia	
	$\lambda_1 = 280 \text{ nm}$	$\lambda_2 = 420 \text{ nm}$
Cruda	0,33 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a
100-15	1,18 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,00 ^b
100-30	2,57 ± 0,00 ^c	0,36 ± 0,00 ^c
100-60	3,61 ± 0,00 ^d	0,54 ± 0,00 ^d
100-90	3,61 ± 0,00 ^d	1,83 ± 0,00 ^e
Cruda	0,33 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a
150-15	1,14 ± 0,00 ^b	0,09 ± 0,00 ^b
150-30	3,61 ± 0,00 ^c	1,02 ± 0,00 ^c
150-60	3,61 ± 0,00 ^c	1,95 ± 0,00 ^d
150-90	3,61 ± 0,00 ^c	2,28 ± 0,00 ^e

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Tabla 4b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la absorbancia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		Absorbancia ($\lambda_1 = 280$ nm)	Absorbancia ($\lambda_2 = 420$ nm)
tiempo (t)	15	1,16 ^a	0,12 ^a
	30	3,09 ^b	0,69 ^b
	60	3,61 ^c	1,24 ^c
	90	3,61 ^c	2,05 ^d
Temperatura (T)	100	2,74 ^a	0,72 ^a
	150	2,99 ^b	1,34 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05	P < 0,05
	T	P < 0,05	P < 0,05
	T × t	P < 0,05	NS
	EER	$1,20 \times 10^{-4}$	$5,63 \times 10^{-4}$

Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

Los valores de absorbancia obtenidos a 280 y 420nm aumentaron con el tiempo de calentamiento para ambas temperaturas. A 280nm este aumento se detuvo y permaneció constante a partir de los 60 minutos de calentamiento a 100°C y a partir de 30 minutos en las de 150°C. Sin embargo, a 420nm, el aumento fue progresivo en todas las muestras y superior en las calentadas a 150°C (**Tabla 4a**).

El análisis de dos vías reveló que el tiempo y la temperatura de calentamiento, influyeron en los valores de absorbancia a 280nm, aunque las diferencias no fueron significativas en algunos casos como indica el efecto de la interacción. A 420nm, se observó un efecto significativo del tiempo y la temperatura de calentamiento en todos los casos (**Tabla 4b**).

1.3. Espectros de absorción UV-visible

A continuación, se muestra el rango de absorción espectrofotométrico, entre las longitudes de onda $\lambda = 200-700\text{nm}$, de cada una de las muestras.

Figura 24.- Espectros de absorción de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C

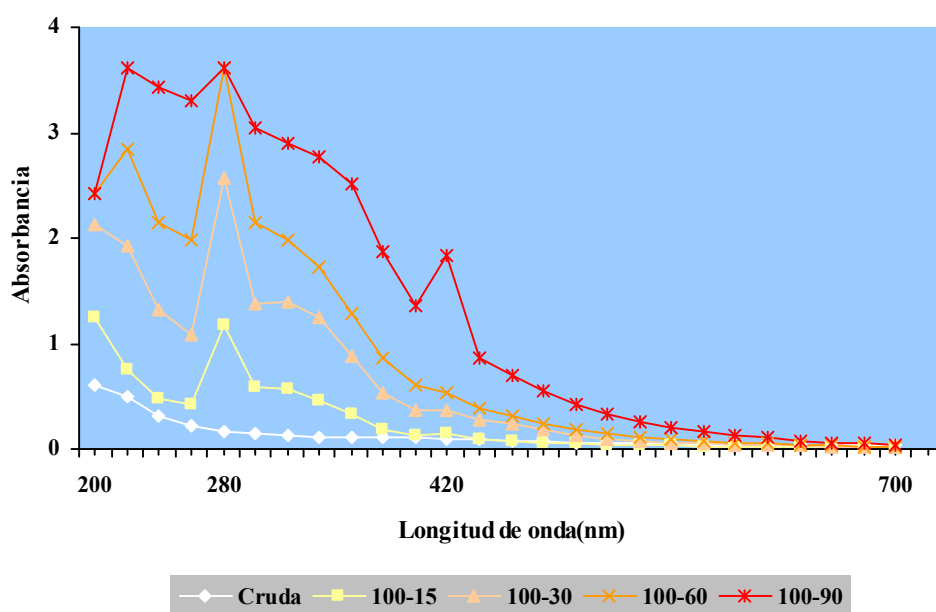


Figura 25.- Espectros de absorción de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C

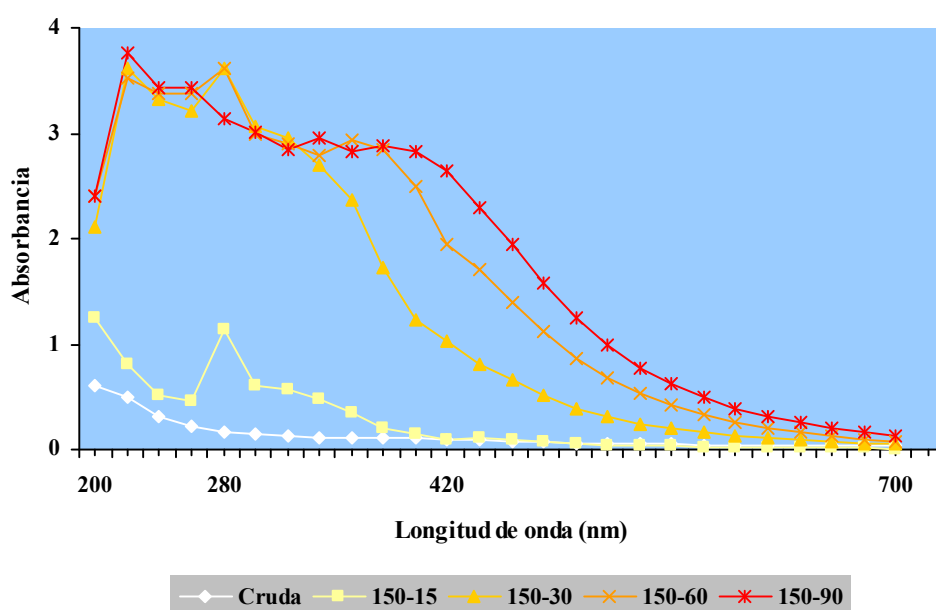
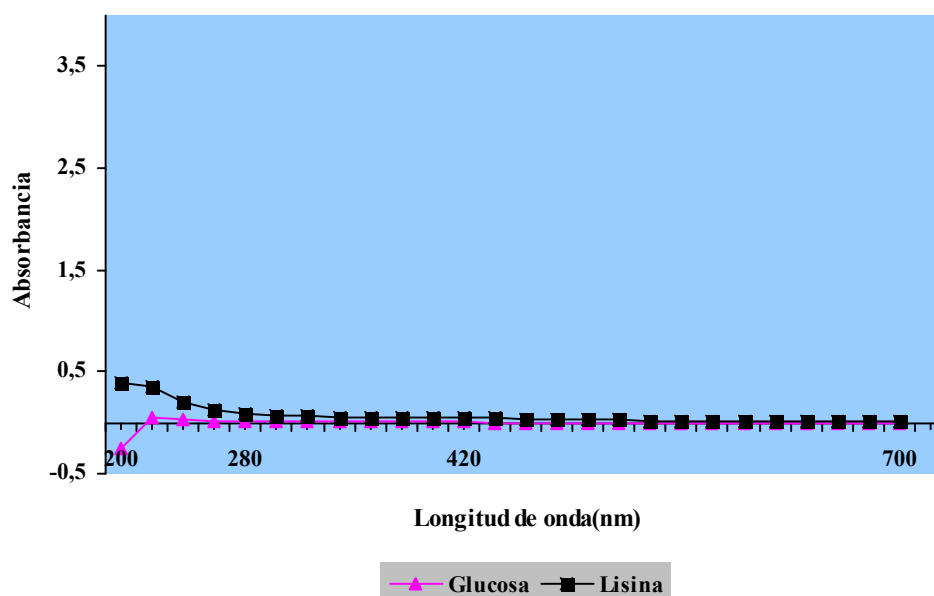


Figura 26.- Espectros de absorción de glucosa y de lisina



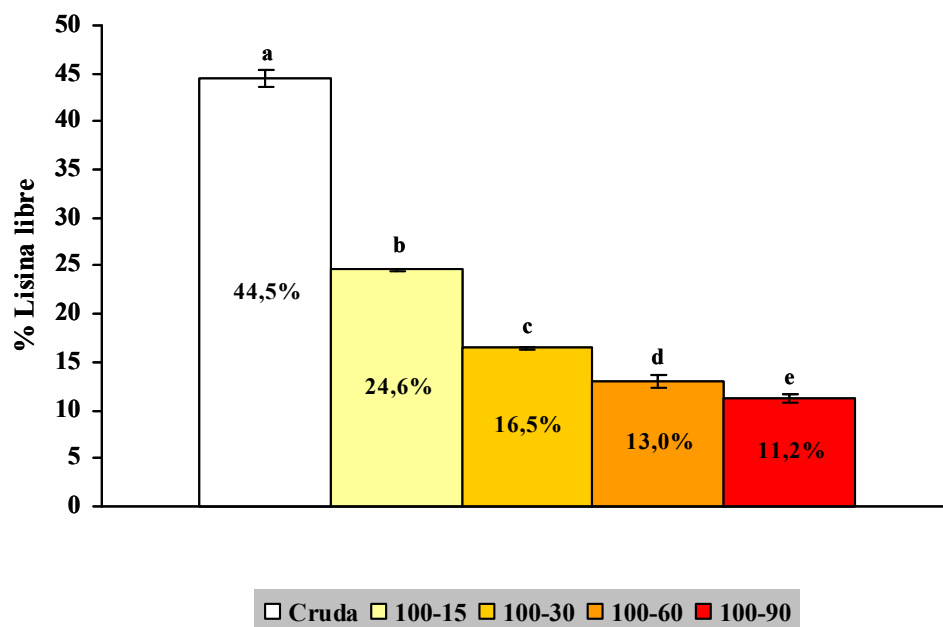
Los espectros obtenidos para las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C, mostraron la aparición de un pico de absorbancia característico a 280nm. A partir del mismo se produjo un acusado descenso en los valores de absorbancia, volviendo a incrementarse a 420nm, claramente en la muestra 100-90 (**Fig. 24**). En el caso de las muestras calentadas a 150°C los picos de absorbancia obtenidos a 420nm, fueron más pronunciados que los obtenidos con las calentadas a menor temperatura (**Fig. 25**).

Tanto a 280 como a 420nm los valores de absorbancia obtenidos coincidieron con los que se muestran en la **Tabla 4a**.

Con respecto a los espectros de absorción de glucosa y lisina pudo determinarse que su presencia no supuso aumentos en los niveles de absorbancia, ni a 280 ni a 420nm (**Fig. 26**).

1.4. Porcentaje de lisina libre

Figura 27.- Porcentaje de lisina libre tras el calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina a 100°C

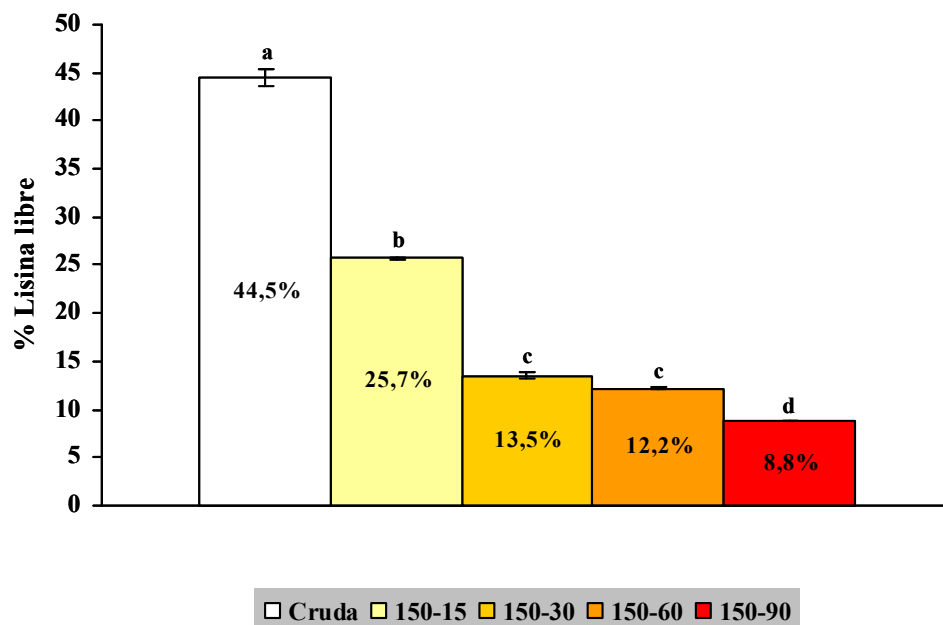


Valores medios \pm error estándar. (n = 3). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (Anova de una vía y test de Duncan). Contenido inicial de lisina (control): 44,5%.

La cantidad de lisina libre fue disminuyendo en todas las muestras conforme aumentaba el tiempo de calentamiento, siendo el descenso más marcado para las calentadas a 150°C (**Fig. 27 y 28**).

El análisis factorial muestra que las diferencias obtenidas son fruto del tiempo de calentamiento y de la temperatura aunque en algún caso no tuvieron una influencia significativa como indica la interacción (entre 150-30 y 150-60) (**Tabla 5a**).

Figura 28.- Porcentaje de lisina libre tras el calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina a 150°C



Valores medios \pm error estándar. (n = 3). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (Anova de una vía y test de Duncan). Contenido inicial de lisina (control): 44,5%.

Tabla 5a.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la pérdida de lisina de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		Lisina libre (%)
tiempo (t)	15	25,2 ^a
	30	15,0 ^b
	60	12,5 ^c
	90	10,0 ^d
Temperatura (T)	100	16,3 ^a
	150	15,0 ^b
Significación estadística	t	$P < 0,05$
	T	$P < 0,05$
	T \times t	$P < 0,05$
	EER	0,1

Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (Anova de dos vías y test de Duncan). EER (error estándar residual).

2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro*

2.1. Determinación del porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica

Tabla 6a.- Porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica (RPL) en presencia de distintas cantidades de las mezclas de glucosa-lisina calentadas (TBARS)

Muestra	% RPL		
	PRM (mg)		
	2	4	6
Cruda	6,53 ± 1,03 ^a	16,80 ± 3,12 ^a	16,32 ± 4,08 ^{ab}
100-15	-3,48 ± 0,00 ^a	7,74 ± 0,38 ^a	7,49 ± 0,00 ^a
100-30	18,94 ± 2,48 ^b	33,80 ± 0,65 ^b	32,16 ± 2,76 ^b
100-60	50,9 ± 4,23 ^c	58,88 ± 4,14 ^c	54,31 ± 3,68 ^c
100-90	21,17 ± 3,63 ^b	71,26 ± 6,77 ^c	87,76 ± 5,60 ^d
Cruda	6,53 ± 1,03 ^a	16,80 ± 3,12 ^a	16,32 ± 4,08 ^a
150-15	25,01 ± 2,22 ^a	20,35 ± 2,56 ^a	20,33 ± 6,75 ^a
150-30	43,58 ± 5,40 ^b	63,97 ± 10,06 ^b	87,87 ± 4,10 ^{bc}
150-60	63,30 ± 11,16 ^c	89,49 ± 1,23 ^c	96,97 ± 0,18 ^c
150-90	74,69 ± 5,36 ^c	86,40 ± 2,60 ^c	83,10 ± 0,67 ^b
Glucosa	1,36 ± 0,57	5,57 ± 1,13	5,50 ± 0,29
Lisina	21,38 ± 1,78	27,33 ± 0,84	29,92 ± 1,29

Valores medios ± error estándar. (n = 4). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Tabla 6b.- Efecto del tiempo, de la temperatura de calentamiento y de la cantidad de muestra sobre el porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		% RPL
cantidad (c)	2	36,76 ^a
	4	53,45 ^b
	6	58,19 ^b
tiempo (t)	15	11,44 ^a
	30	46,72 ^b
	60	68,97 ^c
	90	70,70 ^c
Temperatura (T)	100	36,01 ^a
	150	62,92 ^b
Significación estadística	c	P < 0,05
	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	c × T	NS
	c × t	P < 0,05
	t × T	P < 0,05
	c × T x t	P < 0,05
	EER	1,03

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de tres vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

Las muestras ensayadas redujeron la formación de productos finales de la peroxidación lipídica, excepto la meno calentada y a la concentración más baja (100-15, 2mg) (**Tabla 6a**).

Tanto en las muestras calentadas a 100° como a 150°C el porcentaje de actividad antioxidante aumentó al incrementar la cantidad de muestra de 2 a 4mg. Al aumentar esa cantidad disminuyó en casi todos los casos, excepto en las muestras 100-90, 150-60 y 150-90 en las que aumentó notablemente. Dentro de cada concentración, se observó un aumento generalizado en el porcentaje de actividad antioxidante paralelo al aumento del tiempo de calentamiento generalmente hasta los 60 minutos; sin embargo, a 150°C y con las mayores

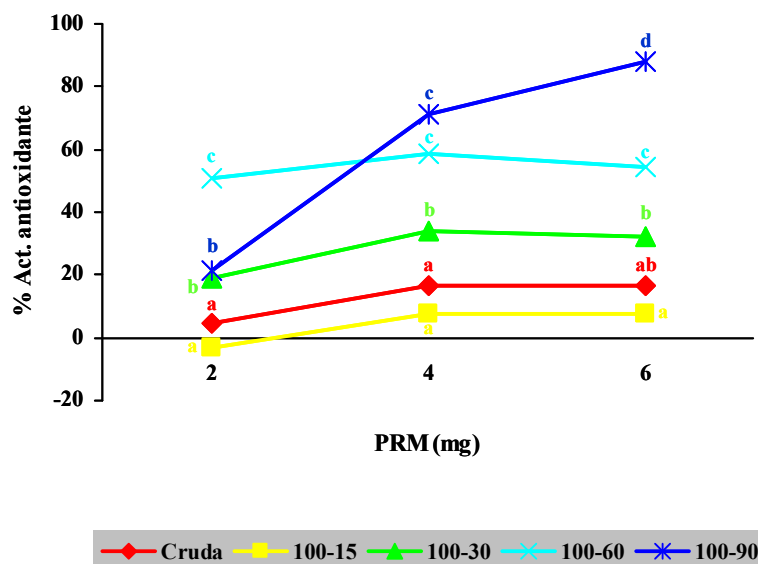
concentraciones (6mg), pareció alcanzarse un máximo a partir de los 30 minutos de calentamiento (**Fig. 30**).

Con respecto a las muestras de glucosa y lisina, el porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica aumentó con la cantidad de muestra en el caso de la lisina, alcanzándose valores cercanos al 30%. En el caso de la glucosa, los valores obtenidos no superaron el 6%, y la capacidad antioxidante sólo se incrementó al aumentar su concentración de 2 a 4mg.

El análisis factorial indicó que el tiempo de calentamiento, la temperatura y la concentración de PRM, afectaron de forma significativa a la capacidad de las muestras para reducir la peroxidación lipídica (**Tabla 6b**).

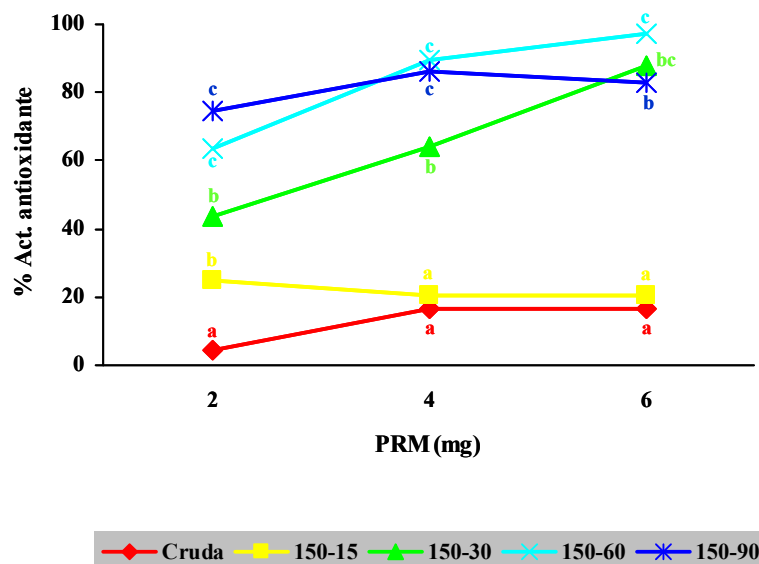
A continuación se muestran las gráficas del porcentaje de actividad antioxidante (%RPL) de las muestras de glucosa-lisina a concentraciones crecientes, para cada temperatura respecto a la muestra cruda:

Figura 29.- Porcentaje de actividad antioxidante de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C



Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). (Anova de una vía y test de Duncan).

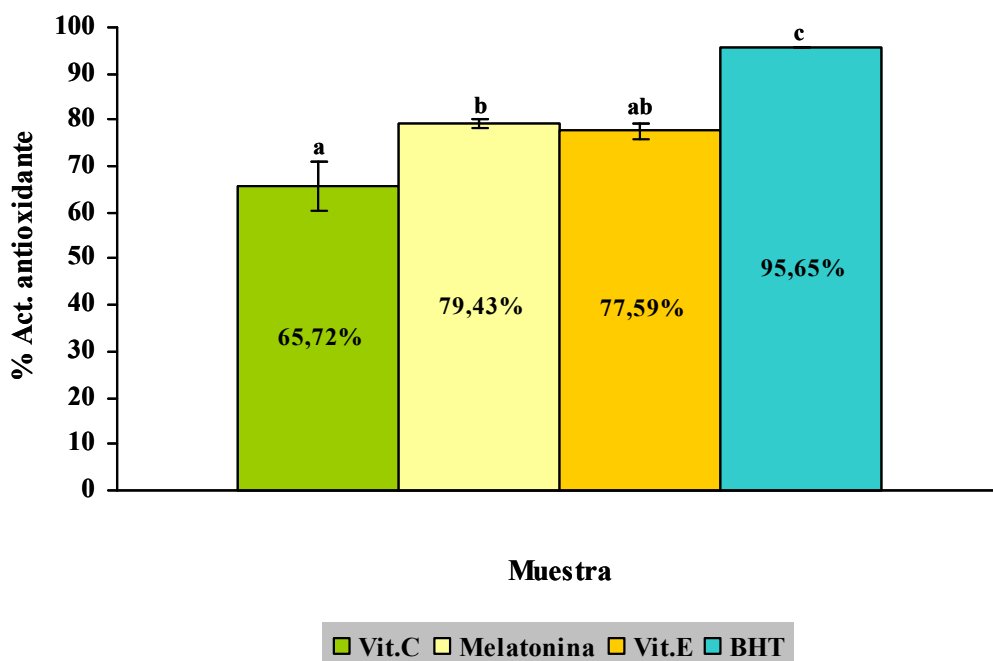
Figura 30.- Porcentaje de actividad antioxidante de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C



Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05). (Anova de una vía y test de Duncan).

2.2. Determinación del porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica en presencia de compuestos con reconocida actividad antioxidante

Figura 31.- Porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica de compuestos con reconocida actividad antioxidante



Valores medios \pm error estándar. (n = 6). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). (Anova de una vía y test de Duncan). Cantidad inicial de muestra: 4 mg.

Todas las muestras ensayadas exhibieron un elevado porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica, cercano al 100% en el caso del BHT. El análisis de estadístico reveló la existencia de diferencias significativas, excepto entre la melatonina con la vitamina E y entre ambas vitaminas (C y E) (**Fig. 31**).

2.3. Determinación de la actividad neutralizadora del DPPH

Los resultados obtenidos indican cierta capacidad de las muestras calentadas para neutralizar el radical libre DPPH (**Tabla 7a**). A ambas temperaturas se observó un aumento significativo de esta actividad con respecto a la muestra cruda, excepto a elevadas concentraciones de la muestra (0,5 y 1mg/ml). Al contrario de lo observado en el análisis anterior (%RPL), la capacidad para neutralizar radicales libres pareció disminuir, a ambas temperaturas, conforme aumentaba el tiempo de calentamiento (a partir de los 15/30 minutos de calentamiento) y desde 0,1mg/ml de muestra, alcanzándose, incluso, valores negativos (**Tabla 7b**).

En el caso de la glucosa y la lisina, prácticamente a todas las concentraciones ensayadas se obtuvieron valores positivos. Los valores obtenidos para esta muestra fueron disminuyendo con el aumento de concentración, mientras que para la lisina la tendencia fue la contraria y se obtuvieron valores superiores a los de la glucosa hasta alcanzar cerca de un 20% de actividad neutralizadora del radical DPPH (**Tabla 7a**).

Tabla 7a.- Porcentaje de actividad neutralizadora del radical DPPH en presencia de distintas concentraciones de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

Muestra	% Actividad neutralizadora				
	[PRM] (mg/ml)				
	0,05	0,1	0,2	0,5	1
Cruda	-0,05 ± 2,53 ^a	1,64 ± 0,37 ^a	6,02 ± 0,43 ^a	10,62 ± 0,76 ^a	15,39 ± 0,29 ^a
100-15	20,19 ± 0,07 ^b	48,38 ± 9,01 ^b	36,71 ± 0,25 ^b	30,71 ± 0,57 ^b	21,95 ± 0,30 ^b
100-30	28,09 ± 0,22 ^{cd}	32,28 ± 0,68 ^c	28,47 ± 1,32 ^c	14,52 ± 2,08 ^a	1,23 ± 3,09 ^c
100-60	25,61 ± 1,11 ^c	27,23 ± 0,22 ^c	25,00 ± 0,80 ^d	12,85 ± 1,32 ^a	-3,71 ± 1,04 ^d
100-90	29,71 ± 0,39 ^d	25,17 ± 0,66 ^c	17,27 ± 0,09 ^e	-9,77 ± 1,44 ^c	-57,67 ± 0,85 ^e
Cruda	-0,05 ± 2,53 ^a	1,64 ± 0,37 ^a	6,02 ± 0,43 ^a	10,62 ± 0,76 ^a	15,39 ± 0,29 ^a
150-15	19,42 ± 0,58 ^b	31,43 ± 0,18 ^b	33,05 ± 1,19 ^b	31,75 ± 0,58 ^b	24,60 ± 0,09 ^a
150-30	37,87 ± 0,70 ^c	33,85 ± 0,36 ^c	34,07 ± 1,01 ^b	20,47 ± 0,79 ^c	0,43 ± 0,69 ^a
150-60	32,07 ± 1,52 ^d	22,32 ± 0,24 ^d	14,50 ± 0,54 ^c	-12,85 ± 0,21 ^d	-63,30 ± 12,95 ^b
150-90	24,41 ± 0,48 ^e	18,41 ± 0,18 ^e	-2,68 ± 0,99 ^d	-84,14 ± 2,25 ^e	-193,05 ± 10,74 ^c
Glucosa	3,38 ± 0,76	3,26 ± 0,99	-1,95 ± 1,18	1,55 ± 0,22	0,60 ± 0,16
Lisina	3,98 ± 0,14	4,66 ± 1,38	4,02 ± 0,38	13,79 ± 1,30	19,42 ± 0,06

Valores medios ± error estándar. (n = 4). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Tabla 7b.- Efecto del tiempo, de la temperatura de calentamiento y de la concentración sobre el porcentaje de actividad neutralizadora del radical DPPH de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		% Act. neutralizadora
concentración (c)	0,05	27,17 ^a
	0,1	29,88 ^a
	0,2	23,30 ^b
	0,5	0,44 ^c
	1	-33,69 ^d
tiempo (t)	15	29,82 ^a
	30	23,13 ^b
	60	7,97 ^c
	90	-23,23 ^d
Temperatura (T)	100	17,71 ^a
	150	1,13 ^b
Significación estadística	c	P < 0,05
	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	c × T	P < 0,05
	c × t	P < 0,05
	t × T	P < 0,05
	c × T × t	P < 0,05
	EER	0,04

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de tres vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

Mediante el análisis factorial de 3 vías se determinó la influencia de la concentración de la muestra, del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la capacidad neutralizadora de las mezclas de glucosa-lisina (**Tabla 7b**).

A continuación se muestran las gráficas del porcentaje de actividad neutralizadora de las muestras de glucosa-lisina a concentraciones crecientes, para cada temperatura respecto al control y la de los antioxidantes ensayados (**Fig. 32, 33 y 34**):

Figura 32.- Porcentaje de actividad neutralizadora del radical libre DPPH para las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C

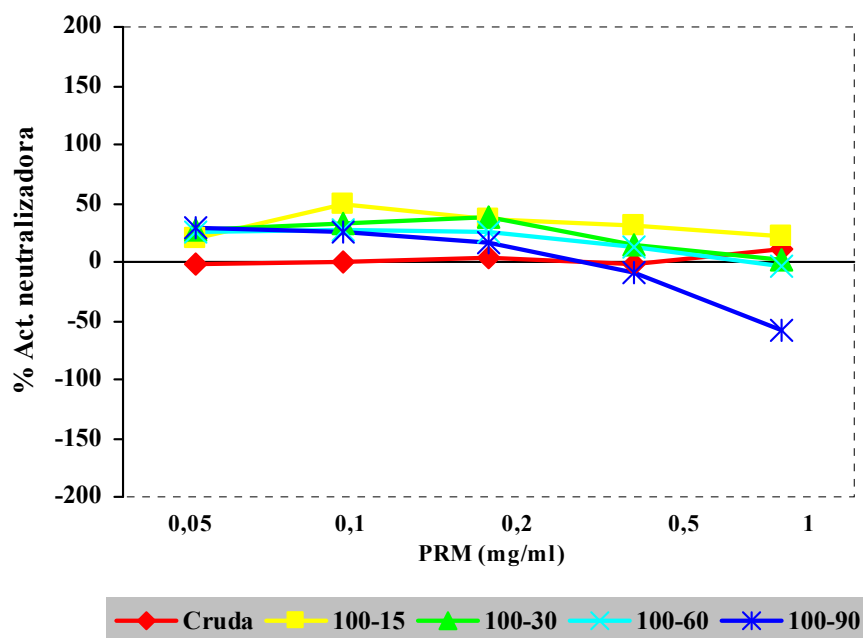


Figura 33.- Porcentaje de actividad neutralizadora del radical libre DPPH para las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C

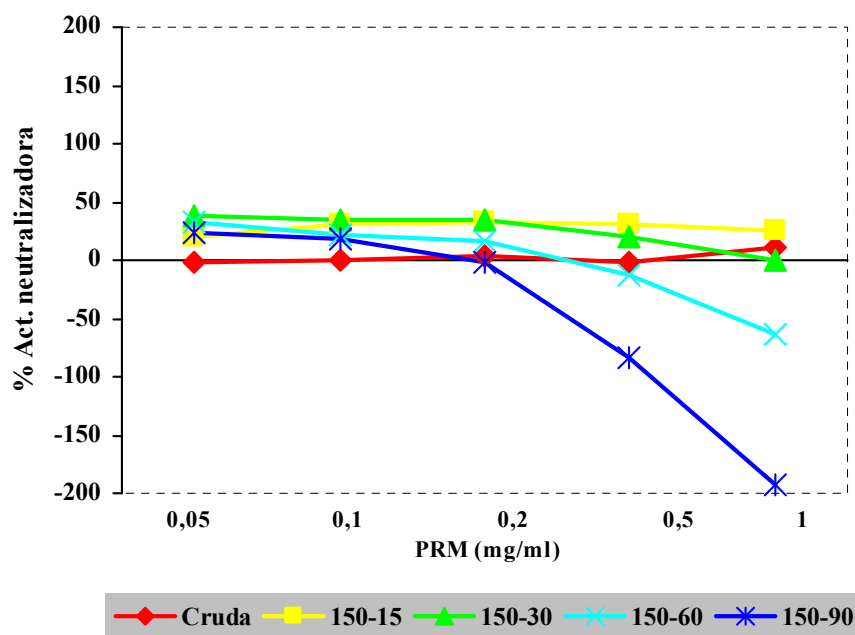
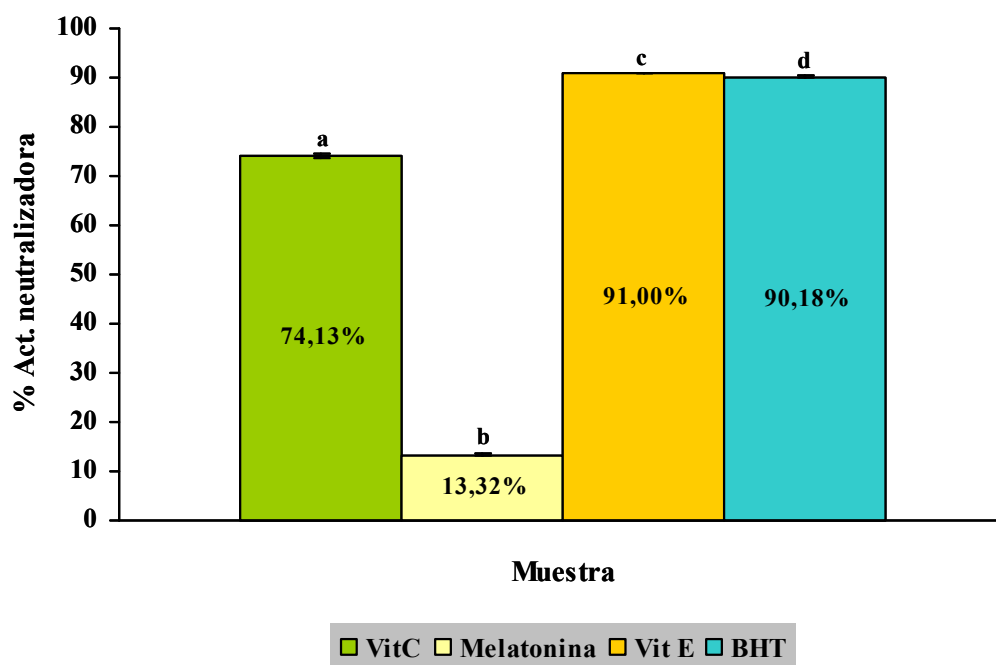


Figura 34.- Porcentaje de actividad neutralizadora del radical libre DPPH de compuestos con reconocida actividad antioxidante



Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de la muestra: 0,5mg.

La vitamina E y el BHT se mostraron como los antioxidantes de mayor capacidad para neutralizar radicales libres, alcanzando valores próximos al 100%. La actividad antiradical de la melatonina fue muy inferior a la del resto de los antioxidantes (**Fig. 34**).

3. MEDIDA DE LA CAPACIDAD QUELANTE DE METALES (hierro y cobre)

3.1. Determinación de la capacidad quelante de hierro

Tabla 8a.- Capacidad quelante de hierro de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

Muestra	Fe	
	Libre (μg)	Quelado (%)
Cruda	$5,85 \pm 0,32^a$	$97,07 \pm 0,16^a$
100-15	$29,68 \pm 2,55^b$	$85,15 \pm 1,27^b$
100-30	$11,60 \pm 1,95^a$	$94,19 \pm 0,97^a$
100-60	$18,66 \pm 1,98^c$	$90,60 \pm 0,99^c$
100-90	$7,63 \pm 2,48^a$	$96,18 \pm 1,24^a$
Cruda	$5,85 \pm 0,32^a$	$97,07 \pm 0,16^a$
150-15	$20,20 \pm 1,30^b$	$89,89 \pm 0,65^b$
150-30	$36,81 \pm 1,97^c$	$81,60 \pm 0,99^c$
150-60	$26,35 \pm 2,01^b$	$86,83 \pm 1,00^d$
150-90	$34,34 \pm 2,08^c$	$82,75 \pm 1,04^c$
Glucosa	$85,54 \pm 7,20$	$57,23 \pm 3,60$
Lisina	$0,85 \pm 0,07$	$99,86 \pm 0,03$

Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (Anova de una vía y test de Duncan). Contenido inicial de Fe: 200 μg .

Los valores del porcentaje de hierro quelado para todas las muestras oscilaron aproximadamente entre un 80 y un 95%, siendo mayor para las muestras calentadas a 100°C. Cabe destacar la elevada capacidad quelante de hierro de la muestra cruda que alcanzó un valor cercano al 100%, así como de la lisina que fue capaz de formar complejos con prácticamente todo el hierro presente. El porcentaje quelado por la glucosa no fue tan elevado pero llegó a superar el 50% del hierro total (**Tabla 8a**).

Mediante el análisis factorial de dos vías se observó que el tiempo de calentamiento no fue el responsable de las diferencias obtenidas, mientras que la temperatura sí incidió, aunque la existencia de una interacción significativa entre

ambos factores manifestó que, en ciertos casos, el tiempo también influyó (**Tabla 8b**).

Tabla 8b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la capacidad quelante de hierro de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		Fe libre (μg)	Fe quelado (%)
tiempo (t)	15	24,94 ^a	87,52 ^a
	30	24,20 ^a	87,89 ^a
	60	22,50 ^a	88,74 ^a
	90	21,06 ^a	89,46 ^a
Temperatura (T)	100	16,89 ^a	91,55 ^a
	150	29,46 ^b	85,26 ^b
Significación estadística	t	NS	NS
	T	P < 0,05	P < 0,05
	T × t	P < 0,05	P < 0,05
	EER	0,78	0,40

Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

3.2. Determinación de la capacidad quelante de cobre

Los resultados obtenidos verificaron que todas las muestras ensayadas fueron capaces de quelar el cobre (**Tabla 9a**). Todas fueron distintas significativamente de la muestra cruda, indicativo de la influencia del tiempo de calentamiento a ambas temperaturas, excepto en presencia de las muestra 100-90 (400 μ g) y 150-90 (50 μ g). En las muestras calentadas a 100°C el mayor poder quelante pareció residir en las mezclas calentadas entre 15 y 30 minutos, alcanzándose un pico máximo a los 30 minutos de calentamiento cuando la cantidad de muestra fue de 50 y 200 μ g, y a partir de los 60 minutos a la concentración máxima ensayada de muestra (400 μ g). De igual modo, se observó esta tendencia cuando las muestras se calentaron a 150°C. En concreto, el descenso comenzó a partir de los 30 minutos a la concentración de muestra mínima ensayada y, desde los 15 minutos de calentamiento con 200 y 400 μ g de muestra.

El aumento de la concentración de muestra de 50 a 200 μ g supuso un incremento del porcentaje de cobre quelado en todos los casos. Al pasar de 200 a 400 μ g de muestra el incremento solo se observó con las mezclas 100-15, 100-60 y 150-15.

Por último, pudo observarse cierta capacidad quelante de cobre por parte de la lisina, la cual aumentó con el incremento de la cantidad de muestra utilizada, alcanzándose valores cercanos al 80%. Sin embargo, la glucosa no mostró esta capacidad en ningún caso.

Tabla 9a.- Capacidad quelante de cobre de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

Muestra	Cu					
	50 (µg de PRM)		200 (µg de PRM)		400 (µg de PRM)	
	Libre(µg)	Quelado(%)	Libre(µg)	Quelado(%)	Libre(µg)	Quelado(%)
Cruda	5,72 ± 0,17 ^a	14,46 ± 2,66 ^a	3,09 ± 0,05 ^a	38,43 ± 0,86 ^a	2,66 ± 0,04 ^a	60,20 ± 0,73 ^a
100-15	4,73 ± 0,06 ^b	30,87 ± 0,86 ^b	2,04 ± 0,01 ^b	70,06 ± 0,20 ^b	1,21 ± 0,01 ^b	82,29 ± 0,15 ^b
100-30	3,25 ± 0,02 ^c	52,39 ± 0,35 ^c	1,21 ± 0,01 ^c	82,30 ± 0,14 ^c	1,22 ± 0,03 ^b	78,75 ± 8,94 ^b
100-60	4,22 ± 0,04 ^d	38,29 ± 0,62 ^d	1,87 ± 0,21 ^b	72,65 ± 3,17 ^b	1,47 ± 0,00 ^c	78,44 ± 0,08 ^b
100-90	4,46 ± 0,08 ^{bd}	34,70 ± 1,26 ^{bd}	2,04 ± 0,00 ^b	70,09 ± 0,14 ^b	2,45 ± 0,04 ^d	64,09 ± 0,59 ^a
Cruda	5,72 ± 0,17 ^a	14,46 ± 2,66 ^a	3,90 ± 0,05 ^a	38,43 ± 0,86 ^a	2,66 ± 0,04 ^a	60,20 ± 0,73 ^a
150-15	4,84 ± 0,01 ^b	30,3 ± 0,15 ^b	2,12 ± 0,01 ^b	66,59 ± 0,25 ^b	1,14 ± 0,02 ^b	83,59 ± 0,41 ^b
150-30	4,48 ± 0,13 ^c	35,49 ± 1,87 ^c	2,39 ± 0,03 ^c	62,21 ± 0,56 ^c	3,13 ± 0,03 ^c	54,89 ± 0,46 ^c
150-60	4,98 ± 0,07 ^b	30,00 ± 1,08 ^b	3,56 ± 0,02 ^d	43,83 ± 0,38 ^d	5,85 ± 0,01 ^d	17,84 ± 0,24 ^d
150-90	5,43 ± 0,06 ^a	23,62 ± 0,93 ^d	3,48 ± 0,07 ^d	45,17 ± 1,11 ^d	5,98 ± 0,04 ^e	15,89 ± 0,57 ^e
Glucosa	6,28 ± 0,02	0,96 ± 0,30	6,31 ± 0,01	0,63 ± 0,17	6,31 ± 0,10	0,63 ± 0,17
Lisina	4,72 ± 0,02	30,70 ± 0,39	2,53 ± 0,11	60,17 ± 1,78	1,51 ± 0,02	77,73 ± 0,36

Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Contenido inicial de Cu: 6,35µg.

Tabla 9b.- Efecto del tiempo, de la temperatura de calentamiento y de la concentración sobre la capacidad quelante de cobre de las mezclas de glucosalisina calentadas

		Libre(μ g)	Quelado(%)
concentración (c)	50	4,55 ^a	34,43 ^a
	200	2,34 ^b	64,11 ^b
	400	2,81 ^c	59,47 ^c
tiempo (t)	15	2,68 ^a	60,58 ^a
	30	2,61 ^a	61,00 ^a
	60	3,66 ^b	46,84 ^b
	90	3,97 ^c	42,26 ^c
Temperatura (T)	100	2,52 ^a	62,90 ^a
	150	3,95 ^b	42,44 ^b
Significación estadística	c	P < 0,05	P < 0,05
	t	P < 0,05	P < 0,05
	T	P < 0,05	P < 0,05
	c × T	P < 0,05	P < 0,05
	c × t	P < 0,05	P < 0,05
	t × T	P < 0,05	P < 0,05
	c × T × t	P < 0,05	P < 0,05
	EER	0,01	0,42

Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de tres vías y test de Duncan). EER (error estándar residual).

El análisis factorial de 3 vías reveló la influencia de los tres factores (concentración, tiempo y temperatura) en la capacidad quelante de cobre de las muestras. Asimismo, la interacción c×T×t resultó significativa (**Tabla 9b**).

4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA FRENTE A UN DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO EN CULTIVOS CELULARES (Línea celular Caco-2)

4.1. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina en células Caco-2

Tabla 10a.- Viabilidad celular tras 3 horas de incubación con las mezclas de glucosa-lisina

Muestra	[PRM] (mg/ml)		
	0,5	1	2
	Viabilidad (%)		
Cruda	117,5 ± 12,7 ^a	116,2 ± 8,4 ^a	90,8 ± 6,8 ^a
100-15	105,3 ± 11,0 ^a	100,1 ± 12,5 ^a	113,8 ± 14,8 ^a
100-30	105,6 ± 7,3 ^a	98,5 ± 6,6 ^a	110,0 ± 15,3 ^a
100-60	101,7 ± 12,4 ^a	107,8 ± 6,2 ^a	101,2 ± 13,8 ^a
100-90	116,3 ± 12,0 ^a	99,1 ± 6,6 ^a	80,5 ± 9,7 ^a
Cruda	117,5 ± 12,7 ^a	116,2 ± 8,4 ^a	90,8 ± 6,8 ^a
150-15	95,3 ± 10,0 ^a	110,5 ± 5,4 ^a	79,3 ± 6,1 ^a
150-30	117,6 ± 9,6 ^a	103,6 ± 6,3 ^a	81,4 ± 9,1 ^a
150-60	114,8 ± 12,8 ^a	103,6 ± 7,4 ^a	86,0 ± 9,7 ^a
150-90	110,5 ± 5,0 ^a	98,2 ± 6,3 ^a	69,5 ± 6,0 ^a

Valores medios ± error estándar. (n = 10). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

La viabilidad en estos ensayos fue determinada mediante el método de tinción con rojo neutro.

Los resultados indican que ninguna de las muestras afectó negativa y significativamente la viabilidad celular en las condiciones experimentales ensayadas (**Tabla 10a**). Los valores obtenidos oscilaron entre 80 y 116% en las muestras calentadas a 100°C, y entre 70 y 117% para las calentadas a 150°C. Dentro de cada temperatura pudo observarse que el tiempo de calentamiento no

influyó significativamente en el porcentaje de viabilidad celular a ninguna de las concentraciones ensayadas. Cada muestra individualmente no llegó a reducir significativamente la viabilidad celular, sin embargo se observó un efecto negativo y significativo de la concentración que se hizo patente al pasar de 1 a 2mg/ml de muestra. Las cifras inferiores de viabilidad celular se observaron con la muestra calentada en condiciones más extremas (150°C y 90 minutos).

El análisis factorial indicó que ni el tiempo ni la temperatura de calentamiento incidieron significativamente en el porcentaje de viabilidad celular, mientras que sí lo hizo la concentración de la muestra, como se ha comentado (**Tabla 10b**).

Tabla 10b.- Efecto del tiempo, de la temperatura de calentamiento y de la concentración sobre la viabilidad celular de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		Viabilidad (%)
concentración (c)	0,5	108,2 ^a
	1	102,7 ^a
	2	90,2 ^b
tiempo (t)	15	100,7 ^a
	30	102,8 ^a
	60	102,4 ^a
	90	95,6 ^a
Temperatura (T)	100	103,3 ^a
	150	97,4 ^a
Significación estadística	c	P < 0,05
	t	NS
	T	NS
	c × T	P < 0,05
	c × t	NS
	t × T	NS
	c × T × t	NS
EER	2,1	

Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de tres vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

4.2. Evaluación de la actividad antioxidante de las mezclas de glucosa-lisina en células Caco-2

4.2.1. Efectos sobre la viabilidad celular

a. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro

Tabla 11a.- Viabilidad celular tras 3 horas de incubación con soluciones conteniendo Fe y adicionadas de las mezclas de glucosa-lisina

Muestra	Viabilidad (%)
Fe	34,7 ± 1,4 ^a
Fe + Cruda	100,0 ± 8,0 ^b
Fe + 100-15	55,3 ± 3,8 ^{cd}
Fe + 100-30	66,0 ± 2,1 ^c
Fe + 100-60	54,0 ± 2,3 ^d
Fe + 100-90	42,4 ± 2,4 ^a
Fe	34,7 ± 1,4 ^a
Fe + Cruda	100,0 ± 8,0 ^b
Fe + 150-15	83,0 ± 2,1 ^c
Fe + 150-30	75,7 ± 5,0 ^c
Fe + 150-60	11,0 ± 2,6 ^d
Fe + 150-90	31,0 ± 3,3 ^a

Valores medios ± error estándar. (n = 10). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Fe: 1,5mM.

En estos experimentos el cálculo de la viabilidad se realizó en placas multipocillo mediante el método de tinción con rojo neutro.

Como puede observarse en la **Tabla 11a**, la incubación de las células con una solución de hierro 1,5mM redujo la viabilidad celular considerablemente, alcanzándose valores inferiores al 35%. Sin embargo, la adición a esta solución de la mezcla de glucosa-lisina sin calentar recuperó totalmente el efecto negativo del hierro. Por otra parte, la presencia de las muestras calentadas supuso mejoras

solamente parciales de la viabilidad celular, inferiores a las observadas con la muestra cruda pero superiores significativamente a las cifras obtenidas en presencia de hierro solo, excepto con las muestras sometidas a condiciones más extremas de calentamiento, que no fueron capaces de recuperar el daño citotóxico producido por el metal.

El análisis de dos vías reveló que la temperatura de calentamiento no fue la responsable de las diferencias obtenidas, mientras que el tiempo sí, aunque la existencia de interacción significativa entre ambos factores manifestó que, en algunos casos, la temperatura también influyó (**Tabla 11b**).

Tabla 11b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Fe

		Viabilidad (%)
tiempo (t)	15	69,2 ^a
	30	70,8 ^a
	60	32,5 ^b
	90	37,0 ^b
Temperatura (T)	100	54,4 ^a
	150	50,1 ^a
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	NS
	T × t	P < 0,05
	EER	1,1

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

b. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre

Tabla 12a.- Viabilidad celular tras 3 horas de incubación con soluciones conteniendo Cu y adicionadas de las mezclas de glucosa-lisina

	Viabilidad (%)
Cu	44,49 ± 4,43 ^a
Cu + Cruda	99,51 ± 2,97 ^b
Cu + 100-15	65,47 ± 8,09 ^c
Cu + 100-30	84,12 ± 8,40 ^b
Cu + 100-60	38,08 ± 3,68 ^a
Cu + 100-90	51,09 ± 8,66 ^{ac}
Cu	44,49 ± 4,43 ^a
Cu + Cruda	99,51 ± 2,97 ^b
Cu + 150-15	120,49 ± 4,17 ^c
Cu + 150-30	59,61 ± 6,55 ^d
Cu + 150-60	24,56 ± 4,48 ^e
Cu + 150-90	16,05 ± 0,82 ^e

Valores medios ± error estándar. (n = 10). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Cu: 50µM.

Como en el caso del hierro, la incubación de las células con la solución de cobre redujo la viabilidad celular por debajo del 45%. De nuevo la adición a esta solución de la mezcla de glucosa-lisina sin calentar recuperó el efecto citotóxico del cobre sobre las células, alcanzándose valores próximos al 100%. La adición de las mezclas calentadas a 100°C produjo un aumento de la viabilidad y, por tanto, una protección frente al daño oxidativo inducido por el cobre, que fue aumentando con el tiempo de calentamiento hasta los 30 minutos, a partir de los cuales se obtuvieron valores similares al control (Cu 50µM). En presencia de las muestras calentadas a 150°C, la viabilidad celular mejoró cuando las células se incubaron con las muestras calentadas durante 15 y 30 minutos, llegando a ser menor que con el cobre solo a partir de los 60 minutos (**Tabla 12a**).

El análisis factorial de dos vías reveló la influencia del tiempo de calentamiento en el porcentaje de viabilidad. La temperatura no influyó en esta variable, pero la existencia de interacción entre ambos factores indicó que, en algunos casos, también influyó (**Tabla 12b**).

Tabla 12b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Cu

		Viabilidad (%)
tiempo (t)	15	93,35 ^a
	30	75,65 ^a
	60	37,22 ^b
	90	35,92 ^b
Temperatura (T)	100	65,90 ^a
	150	55,18 ^a
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	NS
	T × t	P < 0,05
	EER	3,56

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

c. Efectos sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno

Tabla 13a.- Viabilidad celular tras 3 horas de incubación con soluciones conteniendo H₂O₂ y adicionadas de las mezclas de glucosa-lisina

Muestra	Viabilidad (%)
H ₂ O ₂	30,51 ± 1,81 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	46,71 ± 5,36 ^a
H ₂ O ₂ + 100-15	45,81 ± 9,30 ^a
H ₂ O ₂ + 100-30	41,77 ± 4,23 ^a
H ₂ O ₂ + 100-60	32,94 ± 4,60 ^a
H ₂ O ₂ + 100-90	32,31 ± 3,97 ^a
H ₂ O ₂	30,51 ± 1,81 ^{ab}
H ₂ O ₂ + Cruda	46,71 ± 5,36 ^c
H ₂ O ₂ + 150-15	48,09 ± 7,22 ^c
H ₂ O ₂ + 150-30	43,19 ± 4,75 ^{bc}
H ₂ O ₂ + 150-60	20,50 ± 2,85 ^a
H ₂ O ₂ + 150-90	52,84 ± 8,49 ^c

Valores medios ± error estándar. (n = 10). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de H₂O₂: 0,5mM.

La incubación de las células con una solución de peróxido de hidrógeno 0,5mM redujo la viabilidad de las células hasta un 30,51%. La presencia de las mezclas de glucosa-lisina, cruda y calentadas a 100° y 150°C no fue capaz de recuperar la viabilidad celular, ya que la mejora producida no fue significativa con respecto al control (H₂O₂ 0,5mM) (**Tabla 13a**). En la mayor parte de las mezclas, y sólo con 150-15 y 150-90 se produjeron incrementos de viabilidad significativos aunque numéricamente no muy importantes.

El análisis factorial de dos vías indicó que la temperatura no fue la responsable de las diferencias obtenidas y sí el tiempo de calentamiento. La interacción entre ambos factores no fue significativa (**Tabla 13b**).

Tabla 13b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de H₂O₂

		Viabilidad (%)
tiempo (t)	15	46,95 ^a
	30	42,48 ^a
	60	26,72 ^b
	90	45,58 ^a
Temperatura (T)	100	38,21 ^a
	150	41,15 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	NS
	T × t	NS
	EER	2,07

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

4.2.2. Efectos sobre la peroxidación lipídica

a. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Tabla 14a.- Determinación de dienos conjugados mediante la medida de la absorbancia a 233 nm en células Caco-2 incubadas con las mezclas de glucosa-lisina

	Absorbancia ($\lambda = 233$ nm)
DMEN	0,074 \pm 0,002 ^a
Cruda	0,019 \pm 0,003 ^b
100-15	0,039 \pm 0,001 ^c
100-30	0,078 \pm 0,004 ^a
100-60	0,009 \pm 0,000 ^d
100-90	0,006 \pm 0,001 ^d
DMEN	0,074 \pm 0,002 ^a
Cruda	0,019 \pm 0,003 ^b
150-15	0,017 \pm 0,000 ^b
150-30	0,025 \pm 0,008 ^b
150-60	0,019 \pm 0,002 ^b
150-90	0,033 \pm 0,006 ^b

Valores medios \pm error estándar. (n = 2). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Todas las muestras (cruda y calentadas), excepto la denominada 100-30, redujeron significativamente la formación de lípidos peroxidados en las células respecto a los valores basales, es decir, los obtenidos cuando las células fueron incubadas con el medio de cultivo (DMEM). Dentro de las calentadas a 100°C, las mezclas que más redujeron la lipoperoxidación fueron las calentadas durante más tiempo, 100-60 y 100-90 para las que se obtuvieron porcentajes de reducción en torno al 90%. En el caso de las calentadas a 150°C, el máximo descenso se situó en torno al 55-77%. La muestra cruda también mostró esta capacidad (74,32% de reducción) (Tabla 14a).

El análisis factorial reveló la influencia del tiempo y de la temperatura de calentamiento en la formación de dienos conjugados. La interacción de ambos factores también resultó significativa (**Tabla 14b**).

Tabla 14b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la peroxidación lipídica celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas

		Absorbancia ($\lambda = 233 \text{ nm}$)
tiempo (t)	15	0,028 ^a
	30	0,051 ^a
	60	0,014 ^c
	90	0,019 ^{ac}
Temperatura (T)	100	0,033 ^a
	150	0,023 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	$4,650 \times 10^{-3}$

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
EER (error estándar residual).

b. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro

Tabla 15a.- Determinación de dienos conjugados mediante la medida de la absorbancia a 233 nm en células Caco-2 incubadas con las mezclas de glucosa-lisina y adicionadas de Fe

	Absorbancia ($\lambda = 233 \text{ nm}$)
Fe	0,032 \pm 0,002 ^a
Fe + Cruda	0,016 \pm 0,005 ^b
Fe + 100-15	0,039 \pm 0,001 ^a
Fe + 100-30	0,039 \pm 0,006 ^a
Fe + 100-60	0,018 \pm 0,002 ^b
Fe + 100-90	0,041 \pm 0,001 ^a
Fe	0,032 \pm 0,002 ^a
Fe + Cruda	0,016 \pm 0,005 ^b
Fe + 150-15	0,031 \pm 0,009 ^a
Fe + 150-30	0,007 \pm 0,000 ^b
Fe + 150-60	0,001 \pm 0,000 ^b
Fe + 150-90	0,010 \pm 0,001 ^b

Valores medios \pm error estándar. (n = 2). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Fe: 0,5mM.

La incubación de las células con hierro dio lugar a bajas cantidades de peróxidos lipídicos, determinados mediante la medida de la absorbancia a 233nm.

Los resultados obtenidos indicaron que ninguna mezcla calentada a 100°C, redujo significativamente la formación de dienos conjugados y, por tanto, la peroxidación lipídica celular con respecto al control (Fe 0,5mM), a excepción de la muestra 100-60, que consiguió reducirla en un 43% aproximadamente. Por el contrario, las muestras calentadas a 150°C disminuyeron la formación de dienos conjugados a partir de los 30 minutos de calentamiento, alcanzándose valores de reducción que oscilaron entre un 70-76% (Tabla 15a).

Tras realizar el análisis de varianza de doble vía, se observó que tanto el tiempo como la temperatura de calentamiento influyeron significativamente en los datos obtenidos. La interacción de ambos factores también fue significativa para la variable estudiada (**Tabla 15b**).

Tabla 15b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la peroxidación lipídica celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Fe

		Absorbancia ($\lambda = 233 \text{ nm}$)
tiempo (t)	15	0,035 ^a
	30	0,023 ^b
	60	0,009 ^c
	90	0,025 ^b
Temperatura (T)	100	0,034 ^a
	150	0,012 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	1,448 × 10 ⁻³

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
EER (error estándar residual).

c. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre

Tabla 16a.- Determinación de dienos conjugados mediante la medida de la absorbancia a 233 nm en células Caco-2 incubadas con las mezclas de glucosa-lisina y adicionadas de Cu

	Absorbancia ($\lambda = 233 \text{ nm}$)
Cu	0,044 \pm 0,000 ^{ab}
Cu + Cruda	0,013 \pm 0,000 ^c
Cu + 100-15	0,051 \pm 0,000 ^b
Cu + 100-30	0,029 \pm 0,016 ^{abc}
Cu + 100-60	0,047 \pm 0,000 ^{ab}
Cu + 100-90	0,023 \pm 0,006 ^{bc}
Cu	0,044 \pm 0,000 ^a
Cu + Cruda	0,013 \pm 0,000 ^b
Cu + 150-15	0,015 \pm 0,010 ^b
Cu + 150-30	0,037 \pm 0,000 ^a
Cu + 150-60	0,040 \pm 0,000 ^a
Cu + 150-90	0,038 \pm 0,000 ^a

Valores medios \pm error estándar. (n = 2). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Cu: 10 μ M.

Ninguna de las muestras calentadas a 100°C redujo significativamente la formación de dienos conjugados con respecto al control (Cu 10 μ M). Este resultado también se observó para las calentadas a 150°C, a excepción de la muestra 150-15. La muestra cruda también redujo significativamente la formación de lípidos peroxidados (**Tabla 16a**).

Tabla 16b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la peroxidación lipídica celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Cu

		Absorbancia ($\lambda = 233 \text{ nm}$)
tiempo (t)	15	0,033 ^a
	30	0,033 ^a
	60	0,043 ^a
	90	0,030 ^a
Temperatura (T)	100	0,032 ^a
	150	0,038 ^a
Significación estadística	t	NS
	T	NS
	T × t	P < 0,05
	EER	$2,714 \times 10^{-3}$

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

Ni el tiempo ni la temperatura de calentamiento influyeron significativamente en los resultados obtenidos. La interacción entre ambos factores sí fue significativa (**Tabla 16b**).

d. Efectos sobre la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno

Tabla 17a.- Determinación de dienos conjugados mediante la medida de la absorbancia a 233 nm en células Caco-2 incubadas con las mezclas de glucosa-lisina y adicionadas de H₂O₂

	Absorbancia ($\lambda = 233$ nm)
H ₂ O ₂	0,052 ± 0,000 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	0,014 ± 0,001 ^b
H ₂ O ₂ + 100-15	0,009 ± 0,005 ^c
H ₂ O ₂ + 100-30	0,009 ± 0,001 ^c
H ₂ O ₂ + 100-60	0,010 ± 0,001 ^c
H ₂ O ₂ + 100-90	0,004 ± 0,001 ^d
H ₂ O ₂	0,052 ± 0,000 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	0,014 ± 0,001 ^b
H ₂ O ₂ + 150-15	0,004 ± 0,003 ^b
H ₂ O ₂ + 150-30	0,006 ± 0,001 ^b
H ₂ O ₂ + 150-60	0,008 ± 0,001 ^b
H ₂ O ₂ + 150-90	0,035 ± 0,013 ^a

Valores medios ± error estándar (n = 2). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de H₂O₂: 0,5mM.

Todas las muestras calentadas a 100°C redujeron significativamente la formación de dienos conjugados con respecto al control (H₂O₂ 0,5mM). En concreto fue la muestra 100-90 la que produjo una disminución de absorbancia mayor (~90%). Todas las muestras calentadas a 150°C disminuyeron la absorbancia de manera significativa, excepto la calentada durante más tiempo (150-90). La muestra cruda también redujo la absorbancia significativamente (Tabla 17a).

Tabla 17b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la peroxidación lipídica celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de H₂O₂

		Absorbancia ($\lambda = 233 \text{ nm}$)
tiempo (t)	15	0,006 ^a
	30	0,007 ^a
	60	0,009 ^{ab}
	90	0,019 ^b
Temperatura (T)	100	0,008 ^a
	150	0,013 ^a
Significación estadística	t	NS
	T	NS
	T × t	P < 0,05
	EER	1,740 × 10 ⁻³

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

El efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento no fue significativo en los resultados obtenidos, pero la interacción entre ambos factores sí lo fue (Tabla 17b).

4.2.3. Efectos sobre la actividad enzimática (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa)

a. Ensayos sobre la actividad CATALASA

a.1. Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Tabla 18a.- Actividad de la catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Muestra	Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
DMEM	0,918 ± 0,170 ^a
Cruda	1,327 ± 0,013 ^a
100-15	2,127 ± 0,706 ^{ab}
100-30	2,017 ± 0,838 ^{ab}
100-60	4,144 ± 1,014 ^b
100-90	4,038 ± 0,521 ^b
DMEM	0,918 ± 0,170 ^{ab}
Cruda	1,327 ± 0,013 ^a
150-15	1,447 ± 0,543 ^a
150-30	0,444 ± 0,140 ^b
150-60	0,266 ± 0,009 ^b
150-90	0,264 ± 0,010 ^b

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Todas las mezclas calentadas a 100°C tendieron a aumentar la actividad enzimática de la catalasa respecto a los niveles basales (DMEM), aunque éste incremento solo fue significativo con las calentadas durante tiempos prolongados (100-60, 100-90). Sin embargo, con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C durante más tiempo la actividad de la catalasa disminuyó significativamente. Con la muestra cruda el valor obtenido tampoco fue significativamente distinto del control (DMEM) (**Tabla 18a**).

El análisis factorial reveló la influencia de la temperatura de calentamiento en los resultados obtenidos. La interacción (T×t) no resultó significativa para el parámetro estudiado (**Tabla 18b**).

Tabla 18b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas sobre la actividad de la catalasa

		Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
tiempo (t)	15	1,787 ^a
	30	1,230 ^a
	60	2,205 ^a
	90	2,151 ^a
Temperatura (T)	100	3,081 ^a
	150	0,605 ^b
Significación estadística	t	NS
	T	P < 0,05
	T × t	NS
	EER	0,247

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

a.2. Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro

Tabla 19a.- Actividad de la catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y Fe

Muestra	Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
Fe	0,697 ± 0,066 ^a
Fe + Cruda	0,914 ± 0,033 ^b
Fe + 100-15	0,454 ± 0,056 ^c
Fe + 100-30	0,091 ± 0,049 ^d
Fe + 100-60	0,135 ± 0,032 ^d
Fe + 100-90	0,472 ± 0,114 ^c
Fe	0,697 ± 0,066 ^a
Fe + Cruda	0,914 ± 0,033 ^b
Fe + 150-15	0,055 ± 0,038 ^c
Fe + 150-30	0,171 ± 0,057 ^{cd}
Fe + 150-60	0,313 ± 0,056 ^d
Fe + 150-90	0,157 ± 0,031 ^{cd}

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Fe: 0,5mM.

A diferencia del caso anterior, cuando las células se incubaron con las mezclas de glucosa-lisina y Fe 0,5mM, no se observó un aumento en la actividad catalasa con ninguna de las muestras ensayadas, calentadas tanto a 100° como a 150°C; es más, se produjo un descenso significativo en todos los casos con respecto al control (Fe 0,5mM). Sin embargo, la muestra cruda sí incrementó significativamente esta actividad en comparación con el control y las muestras calentadas a ambas temperaturas (**Tabla 19a**).

El análisis factorial reveló que generalmente el tiempo y la temperatura resultaron significativos en los efectos del calentamiento (**Tabla 19b**).

Tabla 19b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Fe sobre la actividad de la catalasa

		Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
tiempo (t)	15	0,254 ^{ab}
	30	0,131 ^a
	60	0,224 ^{ab}
	90	0,314 ^b
Temperatura (T)	100	0,288 ^a
	150	0,174 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	0,021

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

a.3. Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre

Tabla 20a.- Actividad de la catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y Cu

Muestra	Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
Cu	0,067 ± 0,031 ^a
Cu + Cruda	0,134 ± 0,030 ^a
Cu + 100-15	1,174 ± 0,059 ^b
Cu + 100-30	1,211 ± 0,115 ^b
Cu + 100-60	2,183 ± 0,060 ^c
Cu + 100-90	0,662 ± 0,115 ^d
Cu	0,067 ± 0,031 ^a
Cu + Cruda	0,134 ± 0,030 ^a
Cu + 150-15	2,092 ± 0,049 ^b
Cu + 150-30	2,109 ± 0,032 ^b
Cu + 150-60	0,527 ± 0,115 ^c
Cu + 150-90	0,152 ± 0,056 ^a

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Cu: 10µM.

Todas las mezclas de glucosa-lisina (100° y 150°C) excepto la denominada 150-90, produjeron un aumento significativo de la actividad de la catalasa con respecto al Cu 10µM. Dentro de las calentadas a 100°C, el valor máximo correspondió a la muestra 100-60 y el mínimo a la muestra calentada durante 90 minutos. En las calentadas a 150°C, los valores máximos correspondieron a las muestras 150-15 y 150-30. De nuevo el valor mínimo se obtuvo con la muestra más procesada (150-90) (**Tabla 20a**).

El análisis factorial reveló que solamente el tiempo de calentamiento influyó en las diferencias obtenidas. Además la interacción entre los factores fue significativa (**Tabla 20b**).

Tabla 20b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Cu sobre la actividad de la catalasa

		Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
tiempo (t)	15	1,633 ^a
	30	1,660 ^a
	60	1,355 ^b
	90	0,407 ^c
Temperatura (T)	100	1,307 ^a
	150	1,220 ^a
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	NS
	T × t	P < 0,05
	EER	0,029

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

a.4. Ensayos sobre la actividad catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno

Tabla 21a.- Actividad de la catalasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y H₂O₂

	Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
H ₂ O ₂	0,524 ± 0,067 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	0,216 ± 0,057 ^a
H ₂ O ₂ + 100-15	1,200 ± 0,371 ^b
H ₂ O ₂ + 100-30	1,143 ± 0,060 ^b
H ₂ O ₂ + 100-60	0,226 ± 0,057 ^a
H ₂ O ₂ + 100-90	0,374 ± 0,114 ^a
H ₂ O ₂	0,524 ± 0,067 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	0,216 ± 0,057 ^b
H ₂ O ₂ + 150-15	0,567 ± 0,056 ^a
H ₂ O ₂ + 150-30	0,168 ± 0,056 ^b
H ₂ O ₂ + 150-60	0,218 ± 0,086 ^b
H ₂ O ₂ + 150-90	0,306 ± 0,085 ^b

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de H₂O₂ 0,5mM.

La actividad de la catalasa aumentó significativamente con respecto al H₂O₂ 0,5mM en presencia de las muestras calentadas a 100°C durante 15 y 30 minutos. A partir de ahí, la actividad comenzó a disminuir, alcanzándose valores similares a los obtenidos con el peróxido de hidrógeno solo. En el caso de las calentadas a más temperatura (150°C), el aumento del tiempo de calentamiento no supuso una subida de la actividad enzimática en ningún caso, obteniéndose el valor más bajo con la muestra 150-30 (**Tabla 21a**).

El análisis de varianza de doble vía mostró un efecto significativo del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre la actividad de la catalasa (**Tabla 21b**).

Tabla 21b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de H₂O₂ sobre la actividad de la catalasa

		Actividad CAT (seg ⁻¹ /mg proteína)
tiempo (t)	15	0,884 ^a
	30	0,655 ^{ab}
	60	0,253 ^c
	90	0,340 ^{bc}
Temperatura (T)	100	0,736 ^a
	150	0,330 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	0,054

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

b. Ensayos sobre la actividad SUPERÓXIDO DISMUTASA

b.1. Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Tabla 22a.- Actividad de la superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Muestra	Actividad SOD (U/mg proteína)
DMEM	6,32 ± 0,46 ^a
Cruda	17,45 ± 3,74 ^b
100-15	14,40 ± 1,50 ^b
100-30	15,32 ± 1,34 ^b
100-60	35,22 ± 1,32 ^c
100-90	33,45 ± 0,55 ^c
DMEN	6,32 ± 0,46 ^a
Cruda	17,45 ± 3,74 ^b
150-15	18,08 ± 0,77 ^b
150-30	24,19 ± 0,92 ^c
150-60	11,04 ± 0,36 ^a
150-90	18,94 ± 0,20 ^b

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

La actividad de la superóxido dismutasa aumentó respecto a los valores basales (DMEM), en presencia de la muestra cruda y de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y a 150°C. Dentro de las calentadas a 100°C pudo observarse que aumentó significativamente con el tiempo de calentamiento de las mezclas, obteniéndose los valores más elevados con las más procesadas (100-60 y 100-90). La tendencia observada con las calentadas a 150°C fue similar aunque, excepcionalmente, la muestra 150-60 permaneció igual que el control (**Tabla 22a**).

Tabla 22b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas sobre la actividad de la superóxido dismutasa

		Actividad SOD (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	16,24 ^a
	30	19,75 ^a
	60	23,13 ^{ab}
	90	34,71 ^b
Temperatura (T)	100	28,86 ^a
	150	18,06 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	0,35

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

El análisis factorial de dos vías reveló que tanto el tiempo como la temperatura de calentamiento influyeron significativamente en la actividad enzimática de la SOD. De igual modo, la interacción entre ambos factores resultó significativa (**Tabla 22b**).

b.2. Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro

Tabla 23a.- Actividad de la superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y Fe

Muestra	Actividad SOD (U/mg proteína)
Fe	29,24 ± 4,09 ^a
Fe + Cruda	19,59 ± 4,95 ^{abc}
Fe + 100-15	27,21 ± 3,88 ^{ab}
Fe + 100-30	15,66 ± 2,38 ^c
Fe + 100-60	17,60 ± 3,09 ^{bc}
Fe + 100-90	10,76 ± 0,44 ^c
Fe	29,24 ± 4,09 ^a
Fe + Cruda	19,59 ± 4,95 ^{ab}
Fe + 150-15	21,98 ± 3,91 ^{ab}
Fe + 150-30	20,04 ± 2,02 ^{ab}
Fe + 150-60	20,06 ± 0,33 ^{ab}
Fe + 150-90	18,02 ± 1,73 ^b

Valores medios ± error estándar. (n = 3). Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Fe: 0,5mM.

En presencia de hierro conjuntamente con las distintas muestras la actividad de la SOD tendió a disminuir, siendo este descenso significativo a partir de los 30 minutos de calentamiento a 100°C, y de los 90 minutos a 150°C. Con la muestra cruda la actividad de la enzima no fue distinta significativamente del control (Fe 0,5mM) (**Tabla 23a**).

Tabla 23b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Fe sobre la actividad de la superóxido dismutasa

		Actividad SOD (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	24,59 ^a
	30	17,85 ^b
	60	18,83 ^b
	90	14,39 ^b
Temperatura (T)	100	17,81 ^a
	150	20,02 ^a
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	NS
	T × t	NS
	EER	0,93

Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

El análisis de doble vía indicó que el tiempo de calentamiento, y no la temperatura, fue un factor significativo en las diferencias observadas (**Tabla 23b**).

b.3. Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre

Tabla 24a.- Actividad de la superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y Cu

	Actividad SOD (U/mg proteína)
Cu	21,48 ± 1,28 ^a
Cu + Cruda	24,70 ± 1,98 ^a
Cu + 100-15	19,24 ± 1,38 ^a
Cu + 100-30	122,49 ± 8,16 ^b
Cu + 100-60	156,08 ± 5,33 ^c
Cu + 100-90	47,92 ± 7,33 ^d
Cu	21,48 ± 1,28 ^{ab}
Cu + Cruda	24,70 ± 1,98 ^a
Cu + 150-15	55,51 ± 1,05 ^c
Cu + 150-30	42,98 ± 0,83 ^d
Cu + 150-60	64,09 ± 4,79 ^e
Cu + 150-90	17,39 ± 0,95 ^b

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Cu: 10µM.

La incubación de las células con cobre y con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C aumentó significativamente la actividad de la superóxido dismutasa a partir de los 30 minutos de calentamiento, produciendo incrementos cuantitativamente importantes con las muestras 150-30 y 150-60. Con las muestras calentadas a 150°C, la actividad comenzó a aumentar a los 15 minutos de calentamiento hasta alcanzar un máximo a los 60 minutos. El valor más bajo obtenido correspondió a la muestra más procesada (150-90) (**Tabla 24a**).

El análisis factorial de dos vías indicó que tanto el tiempo como la temperatura influyeron en la variable medida. La interacción de ambos factores también fue significativa (**Tabla 24b**).

Tabla 24b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Cu sobre la actividad de la superóxido dismutasa

		Actividad SOD (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	37,38 ^a
	30	82,74 ^b
	60	110,08 ^c
	90	32,66 ^a
Temperatura (T)	100	86,43 ^a
	150	44,99 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	1,54

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
EER (desviación estándar residual).

b.4. Ensayos sobre la actividad superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno

Tabla 25a.- Actividad de la superóxido dismutasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y H₂O₂

Muestra	Actividad SOD (U/mg proteína)
H ₂ O ₂	26,53 ± 0,10 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	21,95 ± 0,78 ^{ab}
H ₂ O ₂ + 100-15	21,03 ± 1,47 ^b
H ₂ O ₂ + 100-30	16,48 ± 3,63 ^c
H ₂ O ₂ + 100-60	26,39 ± 2,22 ^a
H ₂ O ₂ + 100-90	23,26 ± 2,68 ^{ab}
H ₂ O ₂	26,53 ± 0,10 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	21,95 ± 0,78 ^b
H ₂ O ₂ + 150-15	64,51 ± 0,42 ^c
H ₂ O ₂ + 150-30	28,28 ± 0,75 ^a
H ₂ O ₂ + 150-60	38,94 ± 2,30 ^d
H ₂ O ₂ + 150-90	19,14 ± 0,52 ^b

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de H₂O₂: 0,5mM.

La actividad de la superóxido dismutasa en presencia de peróxido de hidrógeno se incrementó en las células. La actividad de la SOD en presencia conjunta del peróxido de hidrógeno y las mezclas de glucosa-lisina mostró un comportamiento irregular. No varió con la muestra cruda; se mantuvo o disminuyó con las calentadas a 100°C y se mantuvo, aumentó ó disminuyó en presencia de las mezclas calentadas a 150°C (**Tabla 25a**).

El análisis de varianza de doble vía (**Tabla 25b**), mostró un efecto significativo del tiempo y la temperatura de calentamiento sobre la actividad de la superóxido dismutasa, en la que también se halló interacción significativa T×t (**Tabla 25a**).

Tabla 25b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de H₂O₂ sobre la actividad de la superóxido dismutasa

		Actividad SOD (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	42,77 ^a
	30	22,38 ^c
	60	32,67 ^b
	90	21,20 ^c
Temperatura (T)	100	21,79 ^a
	150	37,72 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	0,74

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
EER (error estándar residual).

c. Ensayos sobre la actividad GLUTATION PEROXIDASA

c.1. Ensayos sobre la actividad glutacion peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Tabla 26a.- Actividad de la glutación peroxidasa en presencia de las distintas mezclas de glucosa-lisina

Muestra	Actividad GP _x (U/mg proteína)
DMEM	0,006 ± 0,001 ^a
Cruda	0,009 ± 0,001 ^a
100-15	0,009 ± 0,000 ^a
100-30	0,008 ± 0,001 ^a
100-60	0,019 ± 0,003 ^b
100-90	0,022 ± 0,004 ^b
DMEM	0,006 ± 0,001 ^{ab}
Cruda	0,009 ± 0,001 ^{abc}
150-15	0,013 ± 0,000 ^{bc}
150-30	0,014 ± 0,003 ^c
150-60	0,005 ± 0,001 ^a
150-90	0,009 ± 0,005 ^{abc}

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Todas las muestras calentadas a 100°C tendieron a aumentar la actividad de la GP_x con respecto a los niveles basales (DMEM), pero solo fue significativamente superior en presencia de las muestras calentadas a 60 y 90 minutos. En relación a las muestras calentadas a 150°C, solamente la muestra 150-30 aumentó significativamente la actividad de la GP_x y a partir de ahí disminuyó (**Tabla 26a**).

El análisis factorial reveló un efecto significativo de la temperatura de calentamiento sobre la actividad de la enzima (**Tabla 26b**).

Tabla 26b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas sobre la actividad de la glutatión peroxidasa

		Actividad GP _x (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	0,011 ^a
	30	0,010 ^a
	60	0,012 ^a
	90	0,016 ^a
Temperatura (T)	100	0,014 ^a
	150	0,010 ^b
Significación estadística	t	NS
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	8,810 × 10 ⁻⁴

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

c.2. Ensayos sobre la actividad glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y hierro

Tabla 27a.- Actividad de la glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y Fe

Muestra	Actividad GPx (U/mg proteína)
Fe	0,011 ± 0,007 ^a
Fe + Cruda	0,022 ± 0,007 ^a
Fe + 100-15	0,011 ± 0,000 ^a
Fe + 100-30	0,009 ± 0,001 ^a
Fe + 100-60	0,008 ± 0,001 ^a
Fe + 100-90	0,009 ± 0,000 ^a
Fe	0,011 ± 0,007 ^a
Fe + Cruda	0,022 ± 0,007 ^a
Fe + 150-15	0,011 ± 0,000 ^a
Fe + 150-30	0,009 ± 0,001 ^a
Fe + 150-60	0,008 ± 0,001 ^a
Fe + 150-90	0,009 ± 0,000 ^a

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Fe: 0,5mM.

Ninguna de las muestras calentadas a 100°C ni a 150°C, así como la muestra cruda, modificaron la actividad de la GP_x frente a la oxidación provocada por el Fe 0,5mM (**Tabla 27a**).

El análisis de varianza 2×2 indicó que ni el tiempo ni la temperatura de calentamiento influyeron significativamente en la variable medida (**Tabla 27b**).

Tabla 27b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Fe sobre la actividad de la glutatión peroxidasa

		Actividad GPx (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	0,012 ^a
	30	0,011 ^{ab}
	60	0,009 ^b
	90	0,009 ^b
Temperatura (T)	100	0,009 ^a
	150	0,011 ^a
Significación estadística	t	NS
	T	NS
	T × t	NS
	EER	3,872

Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). ERR (error estándar residual).

c.3. Ensayos sobre la actividad glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y cobre

Tabla 28a.- Actividad de la glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y Cu

Muestra	Actividad GPx (U/mg proteína)
Cu	0,009 ± 0,003 ^a
Cu + Cruda	0,012 ± 0,001 ^a
Cu + 100-15	0,009 ± 0,002 ^a
Cu + 100-30	0,097 ± 0,024 ^b
Cu + 100-60	0,052 ± 0,009 ^c
Cu + 100-90	0,013 ± 0,004 ^a
Cu	0,009 ± 0,003 ^a
Cu + Cruda	0,01 ± 0,001 ^a
Cu + 150-15	0,03 ± 0,002 ^b
Cu + 150-30	0,02 ± 0,002 ^b
Cu + 150-60	0,02 ± 0,001 ^b
Cu + 150-90	0,006 ± 0,000 ^a

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de Cu: 10µM.

Los valores correspondientes a la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa fueron significativamente superiores en las muestras 100-30, 100-60, 150-15, 150-30 y 150-60 respecto al valor observado en presencia de cobre solo, y no mostrando variaciones respecto al cobre solo el resto de muestras, incluida la cruda (**Tabla 28a**).

El anova de dos vías resultó significativo para el tiempo y la temperatura de calentamiento, existiendo interacción entre ambas variables (**Tabla 28b**).

Tabla 28b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de Cu sobre la actividad de la glutatión peroxidasa

		Actividad GPx (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	0,019 ^{ab}
	30	0,060 ^b
	60	0,037 ^c
	90	0,009 ^a
Temperatura (T)	100	0,043 ^a
	150	0,020 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05
	T	P < 0,05
	T × t	P < 0,05
	EER	3,357 × 10 ⁻³

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
EER (error estándar residual).

c.4. Ensayos sobre la actividad glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y peróxido de hidrógeno

Tabla 29a.- Actividad de la glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina y H₂O₂

Muestra	Actividad GPx (U/mg proteína)
H ₂ O ₂	0,018 ± 0,004 ^a
H ₂ O ₂ + Cruda	0,013 ± 0,000 ^a
H ₂ O ₂ + 100-15	0,012 ± 0,003 ^a
H ₂ O ₂ + 100-30	0,015 ± 0,001 ^a
H ₂ O ₂ + 100-60	0,016 ± 0,001 ^a
H ₂ O ₂ + 100-90	0,015 ± 0,001 ^a
H ₂ O ₂	0,018 ± 0,004 ^{ab}
H ₂ O ₂ + Cruda	0,013 ± 0,000 ^b
H ₂ O ₂ + 150-15	0,032 ± 0,002 ^a
H ₂ O ₂ + 150-30	0,013 ± 0,002 ^b
H ₂ O ₂ + 150-60	0,021 ± 0,008 ^{ab}
H ₂ O ₂ + 150-90	0,015 ± 0,000 ^b

Valores medios ± error estándar (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan). Concentración de H₂O₂: 0,5mM.

Como en el caso del hierro (**Tabla 27a y 27b**), no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa por la adición de las mezclas de glucosa-lisina. Ninguna de las muestras calentadas a 100° y a 150°C, así como la muestra cruda, modificaron la actividad de la enzima (**Tabla 29a**).

Tabla 29b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas y adicionadas de H₂O₂ sobre la actividad de la glutatión peroxidasa

		Actividad GPx (U/mg proteína)
tiempo (t)	15	0,022 ^a
	30	0,014 ^a
	60	0,018 ^a
	90	0,015 ^a
Temperatura (T)	100	0,015 ^a
	150	0,020 ^a
Significación estadística	t	NS
	T	NS
	T × t	NS
	EER	1,322 × 10 ⁻³

Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan).
NS (no significativo). EER (error estándar residual).

El análisis de varianza de doble vía indicó que la adición de las mezclas de glucosa-lisina calentadas no introdujo variaciones significativas en la actividad de la glutatión peroxidasa (**Tabla 29b**).

5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA SOBRE LA DISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE HIERRO Y COBRE (Línea celular Caco-2)

5.1. Ensayos de captación y transporte de hierro

El efecto de los PRM sobre la captación y transporte de hierro por las células Caco-2, se muestra en la **Tabla 30a**.

Tras incubar las células con las muestras calentadas a 100° y 150°C individualmente en presencia de hierro, disminuyó significativamente el hierro internalizado, incluso también en presencia de la muestra cruda, respecto al control (Fe 0,1mM).

Los resultados del transporte desde la cámara apical hasta la cámara basolateral mostraron que, a excepción del aumento observado con la muestra 100-15, no se afectó en presencia de ninguna de las mezclas ensayadas ni en cantidad absoluta (μg) ni relativa (%), aunque se observó un ligero aumento (no significativo) en la cantidad transportada con todas las muestras calentadas a 100°C.

El porcentaje de hierro captado descendió bruscamente en presencia de la glucosa y la lisina entre un 90-95%. Sin embargo, la cantidad transportada en presencia de glucosa fue significativamente superior con respecto al hierro solo, mientras que con la lisina no varió.

El análisis de varianza de doble vía mostró que en los efectos observados sobre captación y transporte el tiempo no fue determinante, y la temperatura solo lo fue sobre el transporte (**Tabla 30b**).

Tabla 30a.- Captación y transporte de hierro por las células Caco-2 en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Muestra	Captación		Transporte	
	µg	%	µg	%
Fe	1,88 ± 0,37 ^a	22,48 ± 4,49 ^a	1,91 ± 0,37 ^a	22,79 ± 4,40 ^a
Fe + Cruda	0,19 ± 0,02 ^b	2,29 ± 0,35 ^b	2,22 ± 0,05 ^{ab}	26,62 ± 0,68 ^{ab}
Fe + 100-15	0,47 ± 0,15 ^b	5,72 ± 1,85 ^b	2,77 ± 0,40 ^b	33,18 ± 4,84 ^b
Fe + 100-30	0,36 ± 0,13 ^b	4,40 ± 1,62 ^b	2,61 ± 0,01 ^{ab}	31,19 ± 0,21 ^{ab}
Fe + 100-60	0,57 ± 0,15 ^b	6,91 ± 1,80 ^b	2,52 ± 0,05 ^{ab}	30,13 ± 0,58 ^{ab}
Fe + 100-90	0,40 ± 0,14 ^b	4,88 ± 1,76 ^b	2,50 ± 0,21 ^{ab}	29,95 ± 2,50 ^{ab}
Fe	1,88 ± 0,37 ^a	22,48 ± 4,49 ^a	1,91 ± 0,37 ^a	22,79 ± 4,40 ^a
Fe + Cruda	0,19 ± 0,02 ^b	2,29 ± 0,35 ^b	2,22 ± 0,05 ^a	26,62 ± 0,68 ^a
Fe + 150-15	0,15 ± 0,07 ^b	3,22 ± 0,08 ^b	1,48 ± 0,27 ^a	17,74 ± 3,32 ^a
Fe + 150-30	0,19 ± 0,07 ^b	2,32 ± 0,79 ^b	2,15 ± 0,36 ^a	25,70 ± 4,36 ^a
Fe + 150-60	0,51 ± 0,08 ^b	6,13 ± 0,91 ^b	1,29 ± 0,17 ^a	15,45 ± 2,09 ^a
Fe + 150-90	0,47 ± 0,08 ^b	5,60 ± 0,98 ^b	1,92 ± 0,46 ^a	22,98 ± 5,56 ^a
Fe + Glucosa	0,20 ± 0,05 [*]	2,45 ± 0,60 [*]	3,68 ± 0,57 [*]	43,96 ± 6,90 [*]
Fe + Lisina	0,09 ± 0,03 [*]	1,01 ± 0,31 [*]	2,12 ± 0,38	25,35 ± 4,58

Valores medios ± error estándar. (n = 4). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas (P < 0,05) (test de Duncan). Contenido inicial de Fe: 8,37µg. El * indica diferencias significativas respecto al control (Fe).

Tabla 30b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas sobre el transporte y la captación de Fe

		Captación		Transporte	
		µg	%	µg	%
tiempo (t)	15	0,31 ^{ab}	4,47 ^{ab}	2,13 ^a	25,46 ^a
	30	0,26 ^a	3,36 ^a	2,38 ^a	28,45 ^a
	60	0,54 ^b	6,52 ^b	1,90 ^a	22,79 ^a
	90	0,43 ^{ab}	5,24 ^{ab}	2,21 ^a	26,47 ^a
Temperatura (T)	100	0,45 ^a	5,48 ^a	2,60 ^a	31,12 ^a
	150	0,32 ^a	4,39 ^a	1,76 ^b	20,47 ^b
Significación estadística	t	NS	NS	NS	NS
	T	NS	NS	P < 0,05	P < 0,05
	T × t	NS	NS	NS	NS
	EER	0,04	0,49	0,10	1,27

Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

5.2. Ensayos de captación y transporte de cobre

El efecto de las mezclas de glucosa-lisina sobre la captación y transporte de cobre por las células Caco-2 se muestra en la **Tabla 31a**.

La presencia de la mezclas de glucosa-lisina cruda y calentadas en el medio produjo un descenso significativo de la cantidad de cobre captada por la célula con respecto al control (Cu 60µM) en todos los casos. Sin embargo, el transporte no varió significativamente salvo con las muestras 100-15, 100-30 y 150-30 con las que incrementó.

La captación de cobre por las células disminuyó significativamente con respecto al cobre solo en presencia de glucosa y de lisina, mientras que su transporte no se vió modificado.

Tabla 31a.- Captación y transporte de cobre por las células Caco-2 en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Muestra	Captación		Transporte	
	μg	%	μg	%
Cu	$0,73 \pm 0,09^a$	$12,26 \pm 2,05^a$	$0,43 \pm 0,09^{ab}$	$7,54 \pm 2,33^{ab}$
Cu + Cruda	$0,22 \pm 0,04^b$	$3,78 \pm 0,69^b$	$0,31 \pm 0,05^a$	$5,44 \pm 0,88^a$
Cu + 100-15	$0,18 \pm 0,01^b$	$3,26 \pm 0,26^b$	$1,11 \pm 0,07^d$	$19,42 \pm 1,25^d$
Cu + 100-30	$0,11 \pm 0,01^b$	$1,97 \pm 0,29^b$	$0,80 \pm 0,06^{cd}$	$14,02 \pm 1,18^{cd}$
Cu + 100-60	$0,11 \pm 0,01^b$	$2,05 \pm 0,28^b$	$0,55 \pm 0,14^{abc}$	$9,69 \pm 2,50^{abc}$
Cu + 100-90	$0,12 \pm 0,03^b$	$2,23 \pm 0,62^b$	$0,74 \pm 0,15^{bc}$	$13,02 \pm 2,72^{bc}$
Cu	$0,73 \pm 0,09^a$	$12,26 \pm 2,05^a$	$0,43 \pm 0,09^{ab}$	$7,54 \pm 2,33^{ab}$
Cu + Cruda	$0,22 \pm 0,04^b$	$3,78 \pm 0,69^b$	$0,31 \pm 0,05^{ab}$	$5,44 \pm 0,88^{ab}$
Cu + 150-15	$0,11 \pm 0,01^b$	$1,92 \pm 0,29^b$	$0,62 \pm 0,02^{bc}$	$10,94 \pm 0,42^{bc}$
Cu + 150-30	$0,13 \pm 0,03^b$	$2,21 \pm 0,53^b$	$0,76 \pm 0,15^c$	$13,34 \pm 2,74^c$
Cu + 150-60	$0,08 \pm 0,01^b$	$1,48 \pm 0,28^b$	$0,45 \pm 0,07^{abc}$	$7,85 \pm 1,28^{abc}$
Cu + 150-90	$0,05 \pm 0,00^b$	$0,96 \pm 0,12^b$	$0,22 \pm 0,01^a$	$3,98 \pm 0,28^a$
Cu + Glucosa	$0,25 \pm 0,01^*$	$4,39 \pm 0,24^*$	$0,11 \pm 0,00$	$1,93 \pm 0,02$
Cu + Lisina	$0,15 \pm 0,01^*$	$2,71 \pm 0,17^*$	$0,18 \pm 0,00$	$3,14 \pm 0,15$

Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras, dentro de la misma columna y para cada temperatura, indican diferencias significativas ($P < 0,05$) (test de Duncan). Contenido inicial de Cu: $5,71 \mu\text{g}$. El * indica diferencias significativas respecto al control (Cu).

Tabla 31b.- Efecto del tiempo y de la temperatura de calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina calentadas sobre el transporte y la captación de Cu

		Captación		Transporte	
		µg	%	µg	%
tiempo (t)	15	0,15 ^a	2,74 ^a	0,86 ^a	15,18 ^a
	30	0,09 ^b	1,72 ^b	0,77 ^a	13,54 ^a
	60	0,08 ^b	1,50 ^b	0,47 ^b	8,25 ^b
	90	0,17 ^a	3,01 ^b	0,48 ^b	8,50 ^b
Temperatura (T)	100	0,13 ^a	2,38 ^a	0,80 ^a	14,04 ^a
	150	0,12 ^a	2,11 ^a	0,49 ^b	8,70 ^b
Significación estadística	t	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05
	T	NS	NS	P < 0,05	P < 0,05
	T × t	P < 0,05	P < 0,05	NS	NS
	EER	6,76 × 10 ⁻³	0,14	0,03	0,62

Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de dos vías y test de Duncan). NS (no significativo). EER (error estándar residual).

El análisis de varianza de doble vía manifestó que sólo el tiempo de calentamiento resultó significativo en los efectos del transporte y la captación de cobre, mientras que la temperatura solo lo fue en el transporte. La interacción T×t resultó significativa (**Tabla 31b**).

5.3. Medida de la absorbancia de las muestras tras los ensayos de captación y transporte

La **Tabla 32a** muestra los valores de absorbancia a 280 y 420nm de las soluciones de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C, adicionadas a la cámara apical y recogidas en la cámara basolateral, tras la incubación durante 2 horas en presencia de hierro. Con las mezclas calentadas durante más tiempo (30, 60 y 90 minutos) se obtuvieron valores de absorbancia mayores en comparación con la mezcla 150-15. Para los compuestos avanzados de la reacción (420nm),

los valores de absorbancia obtenidos fueron incrementándose con el tiempo de calentamiento (**Tabla 32a**).

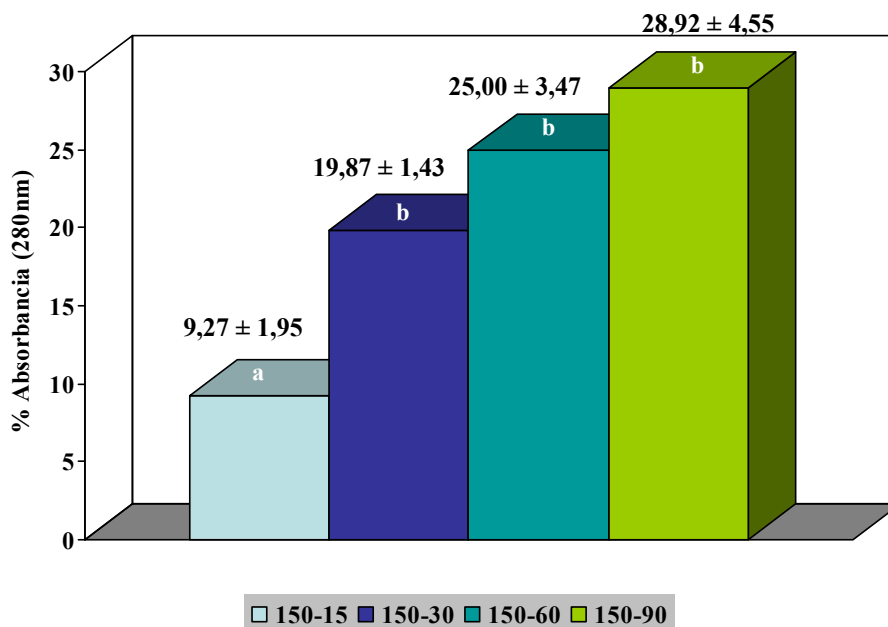
Tabla 32a.- Absorbancia de la mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C adicionadas de Fe 0,1 mM tras 2h de incubación en células Caco-2

Muestra	Cámara Apical	Cámara Basolateral
	Abs inicial	Abs final
$\lambda= 280 \text{ nm}$		
Fe + 150-15	1,63 \pm 0,00 ^a	0,15 \pm 0,03 ^a
Fe + 150-30	4,82 \pm 0,00 ^b	0,96 \pm 0,07 ^b
Fe + 150-60	4,82 \pm 0,00 ^b	1,20 \pm 0,17 ^{bc}
Fe + 150-90	4,82 \pm 0,00 ^b	1,40 \pm 0,22 ^c
$\lambda= 420 \text{ nm}$		
Fe + 150-15	0,15 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a
Fe + 150-30	1,48 \pm 0,00 ^b	0,01 \pm 0,00 ^b
Fe + 150-60	2,73 \pm 0,00 ^c	0,05 \pm 0,01 ^c
Fe + 150-90	3,27 \pm 0,00 ^d	0,05 \pm 0,02 ^c

Valores medios \pm error estándar. (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

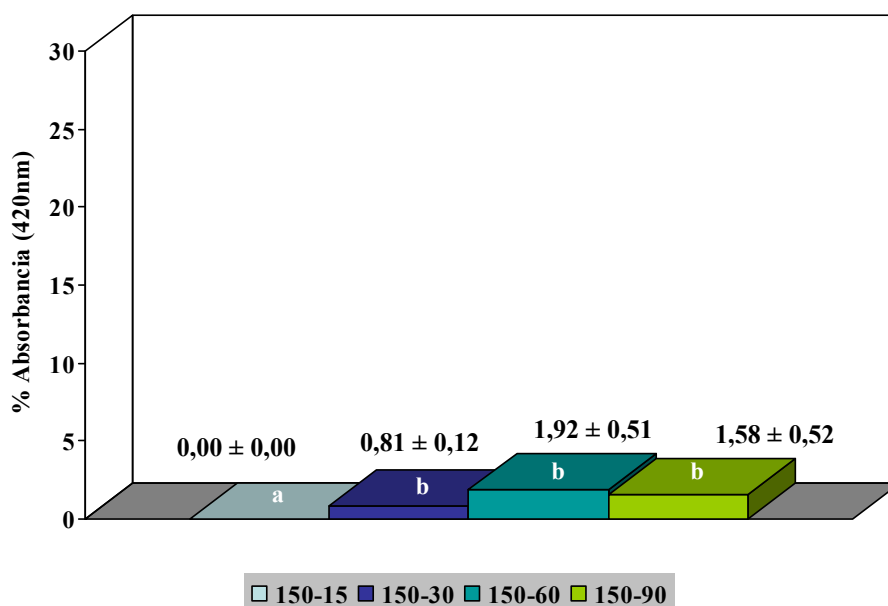
La **Figura 35** muestra los valores de absorbancia medidos a 280nm y expresados como porcentaje de recogida respecto a los valores iniciales, los cuales fueron aumentando progresivamente con el aumento del tiempo de calentamiento a partir de los 15 minutos hasta alcanzar un valor cercano al 30% de recogida. Sin embargo, para los compuestos más avanzados, la absorbancia medida a 420nm fue muy baja en todos los casos (**Fig. 35**).

Figura 35.- Porcentaje de absorbancia a 280 nm de las soluciones recogidas en la cámara basolateral tras 2 horas de incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C y adicionadas de Fe



Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras indican diferencias significativas (P< 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Figura 36.- Porcentaje de absorbancia a 420 nm de las soluciones recogidas en la cámara basolateral tras 2 horas de incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C y adicionadas de Fe



Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras indican diferencias significativas (P< 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Tabla 33a.- Absorbancia de la mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C adicionadas de Cu 60 μ M tras 2h de incubación en células Caco-2

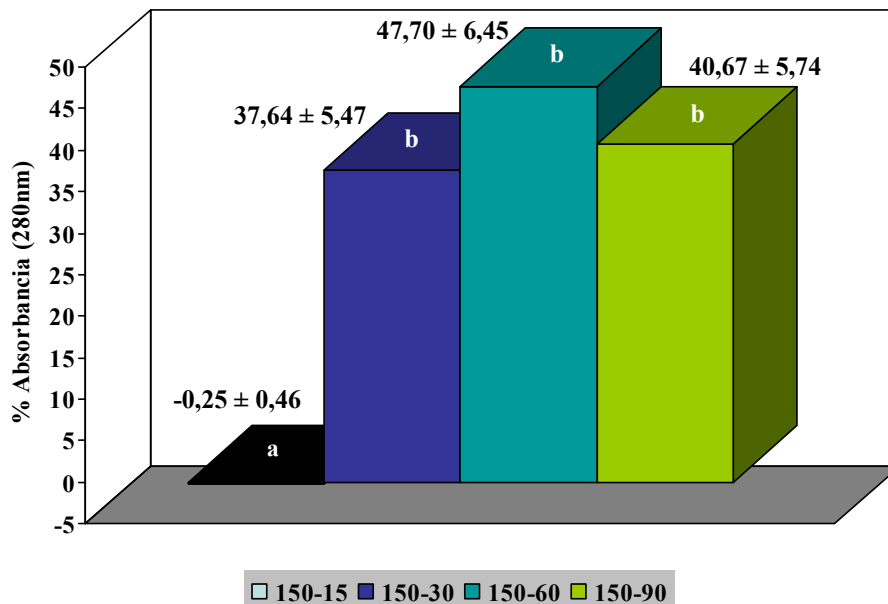
Muestra	Cámara Apical	Cámara Basolateral
	Abs inicial	Abs final
$\lambda= 280$ nm		
Cu + 150-15	1,42 \pm 0,00 ^a	-0,003 \pm 0,01 ^a
Cu + 150-30	4,70 \pm 0,00 ^b	1,77 \pm 0,26 ^b
Cu + 150-60	4,60 \pm 0,00 ^c	2,20 \pm 0,30 ^b
Cu + 150-90	4,60 \pm 0,00 ^b	1,87 \pm 0,26 ^b
$\lambda= 420$ nm		
Cu + 150-15	0,40 \pm 0,00 ^a	0,001 \pm 0,00 ^a
Cu + 150-30	2,04 \pm 0,00 ^b	0,38 \pm 0,05 ^b
Cu + 150-60	3,92 \pm 0,00 ^c	0,50 \pm 0,06 ^b
Cu + 150-90	4,31 \pm 0,00 ^d	0,44 \pm 0,06 ^b

Valores medios \pm error estándar. (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma columna, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

La **Tabla 33a** muestra los valores de absorbancia a 280 y 420nm de las soluciones de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C, adicionadas a la cámara apical y recogidas en la cámara basolateral, tras la incubación durante 2 horas en presencia de cobre. Los valores de absorbancia a 280nm, variaron entre no detectable para la menos calentada y 2,19 para la calentada durante 60 minutos. Esta tendencia también se observó con los compuestos más avanzados de la reacción (420nm), variando entre 0,001 para la muestra 150-15 y 0,497 para la 150-60 (**Tabla 33a**).

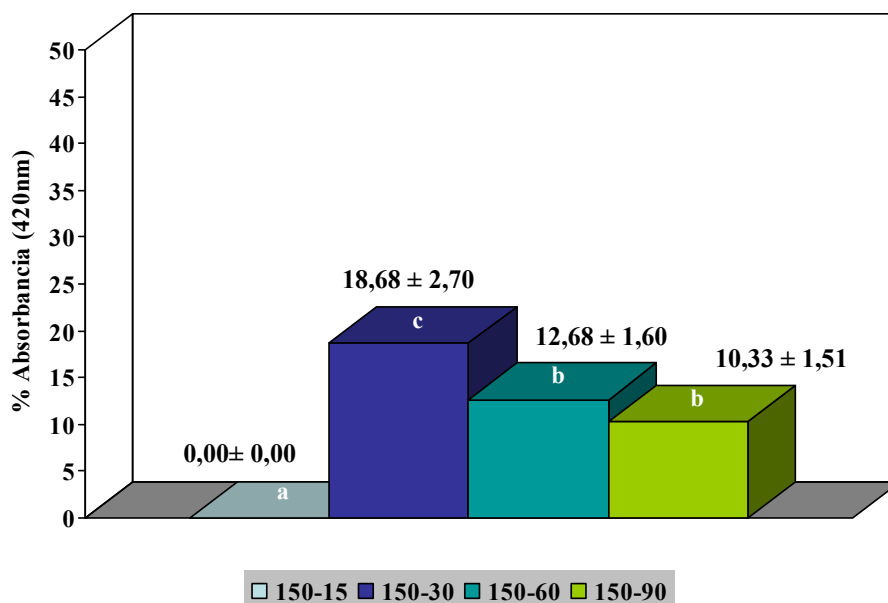
Las **Figuras 37 y 38** muestran los valores de absorbancia medidos a 280 y 420nm expresados como porcentaje de recogida respecto a los valores iniciales. Salvo la muestra calentada durante 15 minutos, el porcentaje de absorbancia de las soluciones recogidas en la cámara basolateral, osciló entre un 37 y un 48% en los compuestos tempranos (280nm), mientras que para los compuestos más avanzados (420nm) fue de un 10 a un 18% (**Fig. 37 y 38**).

Figura 37.- Porcentaje de absorbancia a 280 nm de las soluciones recogidas en la cámara basolateral tras 2 horas de incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C y adicionadas de Cu



Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras indican diferencias significativas (P< 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Figura 38.- Porcentaje de absorbancia a 420 nm de las soluciones recogidas en la cámara basolateral tras 2 horas de incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C y adicionadas de Cu



Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras indican diferencias significativas (P< 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

1.1. Elección de los reactantes y condiciones de la reacción

Como hemos apuntado previamente en la introducción, el desarrollo de la reacción de Maillard está influenciado por multitud de factores. Entre ellos, el pH inicial, el tipo y concentración de los reactantes utilizados, la humedad, la temperatura y el tiempo de calentamiento. En nuestro caso, utilizamos un sistema modelo azúcar-aminoácido (glucosa-lisina) con un 40% de humedad que fue calentado a dos temperaturas, 100°C y 150°C, durante cuatro tiempos (15, 30, 60 y 90 minutos).

Las temperaturas seleccionadas han sido aquellas que favorecen el desarrollo de la reacción y que, a su vez, se alcanzan de forma habitual en el tratamiento térmico de los alimentos, al igual que han hecho otros autores (Rizzi, 1994; O'Brien y Morrissey, 1997; Morales y Jiménez-Pérez, 2004; Rufián-Henares y Morales, 2007). En nuestro caso, las temperaturas de 100° y 150°C son similares a las de procesos culinarios tales como el tostado ($\approx 177^\circ\text{C}$), horneado ($\approx 110\text{-}230^\circ\text{C}$), hervido o cocción (100°C), asado ($\approx 225^\circ\text{C}$) y fritura ($\approx 180^\circ\text{C}$) (Goldberg y col., 2004). Asimismo, los tiempos utilizados en nuestras condiciones experimentales están dentro de los márgenes habituales en los tratamientos citados, como el horneado de pizza (15 minutos), o el asado de carne (90 minutos) (Arguiñano, 1997).

Los productos derivados del calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina han sido previamente utilizados por otros autores para estudiar aspectos importantes de la reacción de Maillard como el desarrollo del pardeamiento, la formación de complejos (Bailey y col., 1996), la digestibilidad de las proteínas (Friedman, 1996), la absorción y metabolismo de minerales como el cobre (Delgado-Andrade y col., 2001a), el hierro (Delgado-Andrade y col., 2004b), el calcio (Delgado-Andrade y col., 2005) y el magnesio (Delgado-Andrade y col., 2008a), y la solubilidad mineral (Delgado-Andrade y col., 2004a). Otros autores

han evaluado los efectos de estos productos sobre el ADN (Yen y col., 1992) y sus propiedades antioxidantes *in vitro* (Wijewickreme y Kitts, 1998; Morales y Jiménez-Pérez, 2001; 2004; Morales y Babbel, 2002; Chen y Kitts, 2008; Ruiz-Roca y col., 2008).

El porcentaje de humedad elegido ha sido del 40% debido a que es un porcentaje medio contenido en muchos alimentos que consumimos en la dieta habitual (Moreiras y col., 2004).

El tipo de azúcar no solo afecta a las características espectroscópicas, como el desarrollo del pardeamiento o color de los productos que se forman en el transcurso de la reacción, sino que también podría estar asociado a las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos productos (Jing y Kitts, 2004a). Algunos autores han mostrado, por ejemplo, que la inclusión de nuevos azúcares como la D-alosa y D-psicosa puede ser considerada en la formación de compuestos con propiedades biológicas y tecnofuncionales, buscadas en la fabricación de determinados productos alimenticios, tales como capacidad antioxidante, propiedades emulsionantes, gelificantes, edulcorantes y generación de olores y sabores agradables (Sun y col., 2004; Sun y col., 2006b; 2006c). A nivel tecnológico, la elección del azúcar puede utilizarse para limitar el desarrollo del color en los alimentos durante su almacenamiento (Kwak y Lim, 2004) o promover la generación de olores (Ames y col., 2001a). Asimismo, el papel de los azúcares es importante en el desarrollo de la reacción *in vivo*, dada su contribución a la glicación de las proteínas corporales y la consiguiente formación de AGE, a los que se les atribuyen ciertos efectos nocivos (Laroque y col., 2008).

En nuestro caso, la elección de la glucosa como azúcar reductor se debe, en primer lugar, a que es un azúcar muy abundante en los alimentos que consumimos diariamente, ya sea en forma libre o combinada (Mataix y Mariné, 2002). Además, aunque existe cierta controversia en cuanto a su reactividad y algunos trabajos apuntan que la fructosa es mucho más reactiva que la glucosa

(Suarez y col., 1995; Hollnagel y col., 1998; Leong y Wedzicha, 2000; Laroque y col., 2008), otros autores afirman lo contrario debido a que consideran que contiene un grupo carbonilo aldehídico más accesible y de naturaleza más reactiva que el grupo carbonilo cetónico de la fructosa, de manera que se favorece la interacción con el grupo amino y la generación de PRM (Wijewickreme y Kitts, 1997; Naranjo y col., 1998; Yeboah y col., 1999; Morales y Jiménez Pérez, 2001; Laroque y col., 2008). Además, el grupo carbonilo de la glucosa tiene un carácter más electrofílico que el de la fructosa, de forma que se facilita su ataque nucleofílico en las primeras etapas de la reacción de Maillard (Bunn y Higgins, 1981; Naranjo y col., 1998; Benjakul y col., 2005). Por otra parte, las cetosas no se activan por ellas mismas, más bien, actúan a través de sus productos de degradación, necesitando, por tanto, pasos preliminares que las hagan reaccionar (Brands y Van Boekel, 2002).

Según algunos autores, la reactividad de los azúcares reductores va disminuyendo de acuerdo con el siguiente orden (Jing y Kitts, 2002; 2004a; Kwak y Lim, 2004):

pentosas > hexosas > disacáridos
aldosas (glucosa) > cetosas (fructosa)

El distinto mecanismo de reacción de aldosas y cetosas da lugar a diferentes productos; así, a partir de la fructosa se generan principalmente productos de Heyns, mientras que la glucosa favorece la formación de los compuestos de Amadori (Hodge, 1953; Kwak y Lim, 2004). La presencia de un grupo α -hidroxi carbonilo reactivo en los compuestos de Amadori puede favorecer que estos sufran una serie de reacciones como la enolización, migración y oxidación del grupo carbonilo y divisiones de tipo retro aldol de los enlaces C-C mucho más rápidas y sencillas que los productos de Heyns, que contienen un grupo aldehído menos reactivo, favoreciéndose en el primer caso el desarrollo de la reacción de

Maillard (Yeboah y col., 1999). Además, los PRM procedentes de sistemas glucosa-lisina tienen diferentes fórmulas empíricas que los obtenidos a partir de la fructosa, en concreto, contienen un átomo de carbono más, pero una relación carbono-nitrógeno inferior, lo cual puede ser consecuencia de la rápida polimerización que sufren los compuestos intermedios obtenidos tras la reacción de la glucosa con el aminoácido o proteína correspondiente (Wijewickreme y col., 1997; Laroque y col., 2008). Sin embargo, otros autores consideran que a partir de la glucosa solo se genera un único compuesto de Amadori y múltiples productos de Heyns a partir de la fructosa, siendo mayor el rendimiento de la reacción (Ajandouz y col., 2001).

La lisina es un aminoácido que, de igual modo, se encuentra en muchos alimentos, siendo uno de los más sensibles al tratamiento térmico y de los más reactivos en la reacción (Ashoor y Zent, 1984; Kane y Labuza, 1989; O'Brien y Morrissey, 1989b). Las constantes de disociación de los dos grupos amino que contiene la lisina favorecen el inicio de la reacción (Bates y col., 1998), y como se ha observado en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Delgado-Andrade y col., 2004a), la formación de compuestos pardos es más rápida a partir de un sistema modelo constituido por lisina que por otros aminoácidos como la metionina. De acuerdo con otros autores, los valores de absorbancia obtenidos a 420nm alcanzados tras cada tiempo de calentamiento (30, 60 y 90 minutos) fueron superiores en las muestras que contenían lisina (Ashoor y Zent, 1984).

La elección de cantidades equimolares de ambos reactantes ha sido utilizada previamente por muchos autores que han utilizado esta proporción entre azúcar y aminoácido, obteniéndose PRM con un alto grado de pardeamiento (Wolfrom y col., 1974a; Hofmann y col., 2001; Delgado-Andrade y col., 2001a; 2004a).

Por todas estas consideraciones se eligieron como reactantes y condiciones más idóneas, las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150° C durante 15, 30, 60 y 90 minutos.

1.2. Determinación del peso

Tras el calentamiento de la muestras se observó una reducción de peso que fue mayor conforme aumentó el tiempo y la temperatura de calentamiento, factores ambos que influyeron de forma significativa (**Tabla 3a**). Esta pérdida de peso puede ser atribuida no sólo a la eliminación de agua, sino, además, a la formación de compuestos volátiles que, como ya ha sido mostrado en diversos estudios, se favorece con el transcurso de la reacción y con el aumento del tiempo y de la temperatura de calentamiento (Chan y Reineccius, 1994; Ames y col., 2001a; 2001b) y ha sido estudiado por numerosos autores (Chuyen, 1998; Parker y col., 2000; Cerny y Dadviek, 2003). Al parecer, en las primeras etapas de la reacción las reducciones en el peso se deben mayoritariamente a la formación de compuestos volátiles, mientras que en etapas más avanzadas se pierde fundamentalmente agua (Delgado-Andrade y col., 2004a).

En un estudio realizado en alimentos como la harina de maíz se ha demostrado que durante su extrusión se generan distintos compuestos volátiles en función de las condiciones de temperatura, humedad y pH utilizadas (Bredie y col., 1998). Los compuestos volátiles mayoritarios derivados de la reacción de Maillard son piracinas, pirroles, furanos y heterociclos azufrados. Según este estudio, a 120°C y 22% de humedad, los compuestos volátiles formados proceden de la degradación de los lípidos del alimento y en menor medida derivan de la reacción de Maillard, en concreto de las etapas iniciales y de la degradación de Strecker. Incrementando la temperatura (150°C) y reduciendo la humedad hasta el 18% se da paso a la formación de piracinas y tiofenonas que se generan tras la reacción entre hidroxifuranonas y sulfuro de hidrógeno, mientras que a la temperatura máxima estudiada (180°C) y el mínimo porcentaje de humedad (14%) se produce un marcado incremento en la cantidad de 2-furfural, 2-furametanol, alquilpiracinas, y heterociclos azufrados, nitrogenados y oxigenados que se forman principalmente en las etapas avanzadas de la reacción (Bredie y col., 1998). La identificación de estos compuestos también ha sido

estudiada en sistemas modelo constituidos por glucosa-glicina y cisteína con glucosa o xilosa sometidos a un proceso de extrusión a distintas temperaturas (120°, 150° y 180°C), humedad del 18% y pH comprendido entre 5 y 8. Los resultados obtenidos confirman el aumento de la cantidad de compuestos volátiles formados durante la reacción de Maillard paralelo al aumento de la temperatura de calentamiento (Ames y col., 2001a; 2001b). Nosotros también observamos que la disminución de peso fue más marcada a partir de los 30 minutos y aumentó de forma progresiva con el tiempo de calentamiento hasta los 90 minutos, de forma mucho más acusada cuando la temperatura fue de 150°C (hasta el 49% del peso inicial) que de 100°C (\approx 20% del peso inicial), hecho que podría ser atribuido, en parte, a la formación de compuestos volátiles.

1.3. Determinación del pH

El desarrollo de la reacción está muy influenciado por el pH inicial y, como se ha comentado previamente en la revisión bibliográfica, la mayoría de los autores considera que valores a partir de 6 y hasta 10 favorecen su inicio y desarrollo (Bates y col., 1998). En nuestras condiciones experimentales el sistema fue no tamponado, es decir, no se controló el valor de pH durante el calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina. El pH de nuestra muestra control (cruda) fue 9,72 debido al uso de lisina monohidratada lo que, probablemente, contribuyó al rápido desarrollo de la reacción, ya que las constantes de disociación de los dos grupos amino de este aminoácido favorecen las etapas iniciales de la reacción así como las rutas más cromogénicas (Bates y col., 1998). Este valor fue disminuyendo al ir aumentando el tiempo de calentamiento para ambas temperaturas, coincidiendo con los datos obtenidos por otros autores tanto en sistemas modelo azúcar-aminoácido (Renn y Sathe, 1997; Monti y col., 1998; Delgado-Andrade y col., 2004a), como azúcar-proteína (Benjakul y col., 2005). Además, se ha observado que en los PRM derivados de la lisina la disminución del pH, asociada al avance de la reacción, es mucho mayor que en los

procedentes de otros aminoácidos (Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Delgado-Andrade y col., 2004a).

En sistemas modelo glucosa-lisina y fructosa-lisina no tamponados, como en nuestro caso, se produce una caída en los valores de pH paralela al desarrollo de la reacción (Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Matmaroh y col., 2006; Chawla y col., 2007). Este hecho ha sido atribuido a la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido acético y ácido fórmico (Berg y Van Boekel, 1994; Van Boekel y Brands, 1998; Martins y Van Boekel, 2005), compuestos de degradación mayoritarios detectados a partir de un sistema modelo que contenga glucosa o fructosa (Martins y Van Boekel, 2003a; 2003b). La desaparición de los grupos amino básicos de la lisina ya en las etapas tempranas (Hill y col., 1996), debido a las reacciones de condensación con el grupo carbonilo de la glucosa, también podría estar implicada, ya que mientras que el ácido fórmico deriva mayoritariamente de la degradación de la glucosa, el ácido acético se forma preferentemente durante la reacción de Maillard (Martins y Van Boekel, 2005). Efectivamente, se observó una correlación entre pH y lisina libre en las muestras estudiadas en el presente ensayo ($p= 0,0000$; $r= 0,7554$), obteniéndose el valor más bajo para la muestra 150-90, tanto en pH (**Tabla 3a**) como en porcentaje de lisina libre (**Fig. 28**). Esta correlación se mantuvo, e incluso fue más estrecha, cuando se estudiaron por separado las muestras calentadas a 100°C ($p = 0,0014$; $r = 0,8103$) y a 150°C ($p= 0,0000$; $r= 0,8923$). Se mostró, además, la influencia notable de la temperatura en el descenso del pH, ya que a temperaturas más suaves (100°C), el pH descendió 2,3 unidades en total, mientras que a 150°C , el declive fue de 4,3 unidades de pH, lo cual confirma, de acuerdo con otros autores, que la caída del pH es más pronunciada a elevadas temperaturas (Ames y col., 2001a).

El descenso del pH inducido por la temperatura también tiene lugar en alimentos como la leche (Berg y Van Boekel, 1994) y el café (Ginz y col., 2000).

Se observó también una correlación inversa entre el pH y la medida de la absorbancia a 280nm ($p= 0,0004$; $r= -0,6750$) y 420nm ($p= 0,0000$; $r= -0,9443$), de manera que podría decirse que conforme avanza la reacción y disminuye el pH, aumenta la formación de productos tempranos y avanzados. Estas correlaciones se mantuvieron cuando se estudiaron las muestras calentadas a 100° y 150°C por separado, obteniéndose los siguientes valores: 100°C a 280nm ($p= 0,0034$, $r= -0,7695$) y 420nm ($p= 0,0000$, $r= -0,9907$); 150°C a 280nm ($p= 0,0050$, $r= -0,7761$) y 420nm ($p= 0,0000$, $r= -0,9906$) (**Tabla 34 y 35**).

1.4. Determinación de la lisina libre

El porcentaje de lisina libre disminuyó significativamente en las mezclas calentadas respecto a la muestra cruda, y más conforme aumentó el tiempo de calentamiento. Como indica el análisis de doble vía (**Tabla 5a**), la disminución de lisina libre fue cuantitativamente más importante en los primeros tiempos de calentamiento (de 15 a 30 minutos) y superior para las mezclas calentadas a 150°C (**Fig. 27 y 28**).

Ya en 1984, Hurrell indicó que en las etapas iniciales de la reacción, la lisina, pero no otros aminoácidos, reacciona con los azúcares reductores para dar derivados deoxicetosil-lisina, que carecen de color. Este bloqueo de la lisina produce una merma del valor nutritivo del alimento, incluso cuando aún no se aprecian cambios en las características organolépticas (O'Brien y Morrissey, 1989b). Por ejemplo, el almacenamiento de leche a 70°C durante dos semanas produce un bloqueo de hasta un 50% de la lisina, aunque el producto todavía conserva su color natural (Hurrell y col., 1983). En el presente ensayo, la existencia de una estrecha correlación negativa entre los valores de lisina libre y los valores de absorbancia a 280nm ($p= 0,0000$, $r= -0,9746$) confirma que, ya en las etapas tempranas de la reacción, el bloqueo de la lisina es significativo. Por estos motivos, la estimación de la pérdida de lisina supone un método directo para monitorizar el desarrollo de la reacción de Maillard en las primeras etapas,

que ha sido utilizado tanto en alimentos (Rufián-Henares y col., 2002), como en sistemas modelo (Jing y Kitts, 2004b).

Con el avance de la reacción, la reducción de la lisina libre continúa, pero, según nuestros resultados, va disminuyendo más lentamente. Así, la primera fase del calentamiento (15 minutos) supuso pérdidas de lisina de más del 40%, mientras que en la segunda (30 minutos) las pérdidas fueron de alrededor del 20%, y disminuyeron aún más en las etapas posteriores, que variaron ligeramente según la temperatura de calentamiento (**Fig. 39 y 40**). Es decir, el bloqueo de la lisina fue mucho más notable en las fases tempranas de la reacción, aunque se extendió, de manera más suave, durante las siguientes fases. De hecho, también existió una correlación negativa entre los valores de lisina libre y la medida de la absorbancia a 420nm, parámetro indicativo del desarrollo del pardeamiento en las etapas finales de la reacción ($p= 0,0000$, $r= -0,8164$). Dicha correlación fue menos marcada que la observada con la absorbancia a 280nm ($p= 0,0000$, $r= -0,9746$). Otros autores también han encontrado reducciones significativas de lisina libre asociadas al avance de la reacción de Maillard y al desarrollo del pardeamiento, tanto en sistemas modelo (Naranjo y col., 1998; Benjakul y col., 2005) como en alimentos (Samaras y col., 2005b).

La fortaleza del vínculo entre aminoácido-azúcar podría, según algunos autores, estar influenciada por la reactividad del azúcar implicado. Por ejemplo, en sistemas constituidos por β -lactoglobulina y azúcares muy reactivos como la ribosa o arabinosa calentados durante 72h a 60°C, la unión entre ambos se produce mediante enlaces covalentes, mientras que en los PRM procedentes de azúcares menos reactivos como la glucosa, galactosa y lactosa, las uniones entre el grupo amino y carbonilo se estabilizan mediante interacciones hidrofóbicas no covalentes y uniones disulfuro covalentes (Chevalier y col., 2001b).

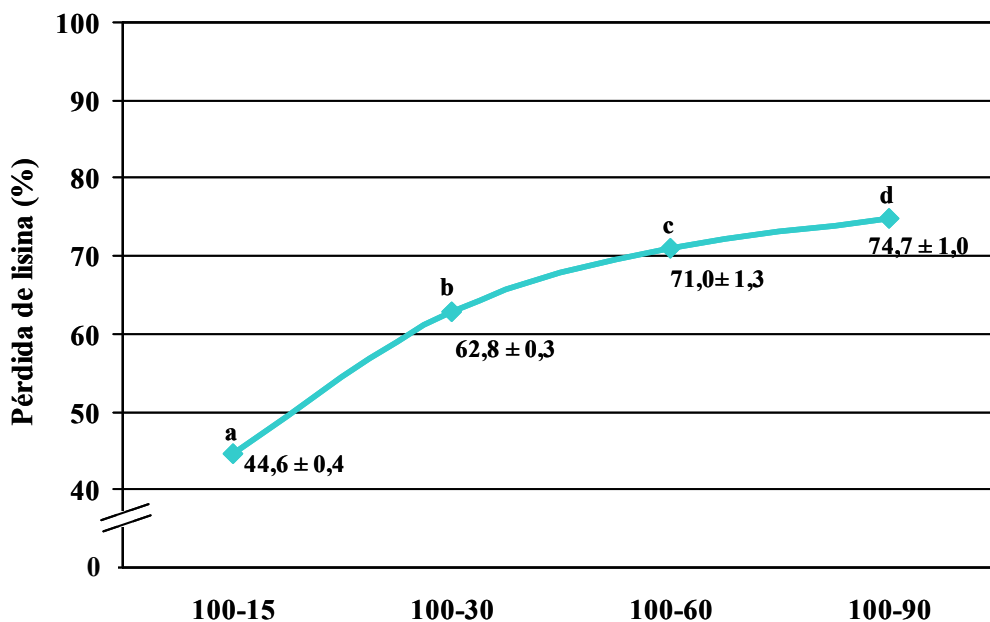


Figura 39. Porcentaje de pérdida de lisina libre tras el calentamiento a 100°C de las mezclas de glucosa-lisina

Anova de una vía y test de Duncan. Contenido inicial de lisina (control): 44,5%

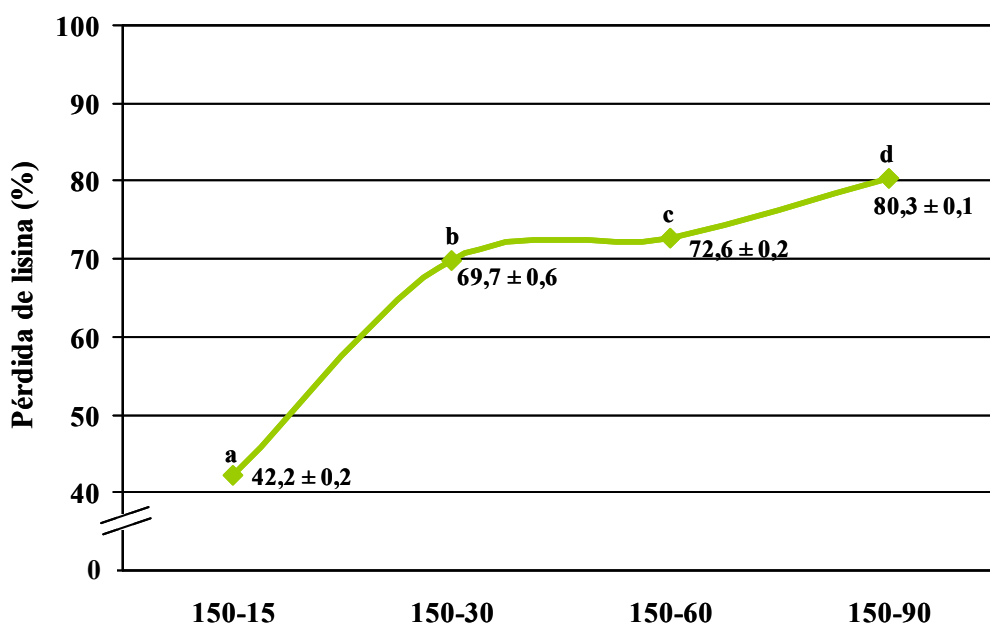


Figura 40. Porcentaje de pérdida de lisina libre tras el calentamiento a 150°C de las mezclas de glucosa-lisina

Anova de una vía y test de Duncan. Contenido inicial de lisina (control): 44,5%

1.5. Determinación de la absorbancia

En una primera etapa de la reacción, el azúcar reacciona con el aminoácido formando un complejo sin color que no absorbería en el espectro visible (400-700nm) (Renn y Sathe, 1997). De acuerdo con esto, la medida de la absorbancia entre un rango de 280 y 294nm se asocia con las etapas tempranas de la reacción y con los PRM de bajo peso molecular (Jing y Kitts, 2004a). Esta determinación ha sido utilizada por diversos autores para confirmar el inicio de la reacción y la existencia de productos tempranos en alimentos como el café tostado (del Castillo y col., 2002) y en sistemas modelo azúcar-proteína (Benjakul y col., 2005). Según nuestros resultados, incluso en la mezcla sin calentar se detectan ciertos valores de absorbancia a 280nm, que aumentan con el avance de la reacción, ya que, tanto la temperatura como el tiempo de calentamiento tuvieron un efecto significativo (**Tabla 4a y 4b**). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, aunque los valores de absorbancia a 280nm van aumentando con el tiempo de calentamiento a ambas temperaturas, se observó un máximo a partir de los 60 minutos en las muestras calentadas a 100°C y a partir de los 30 minutos en las de 150°C, a partir de los cuales los valores se mantuvieron constantes. Esto podría ser atribuido a que, en condiciones más severas, los productos tempranos e intermedios de la reacción, que continúan formándose, son rápidamente transformados en productos avanzados o productos pardos, de los cuales son precursores y que absorben mayoritariamente a 420nm aunque no descartamos que en nuestras condiciones experimentales se produjera una saturación de la muestra. Así, otros autores han observado un incremento continuo de la absorbancia a 294nm de los PRM procedentes de sistemas modelo proteína-azúcar calentados a 100°C durante 5 horas (Benjakul y col., 2005). En extractos de café, los valores de absorbancia a 280nm aumentan de forma significativa si se tuesta ligeramente al compararlo con el crudo, pero si el tostado continúa se observa un descenso progresivo de dichos valores (del Castillo y col., 2002).

El avance de la reacción supone, como se ha comentado, la formación de compuestos pardos de alto peso molecular, siendo el color una característica intrínseca de las melanoidinas, ya que los grupos cromóforos difieren según los reactantes y las condiciones de la reacción (Morales y Jiménez-Pérez, 2004). La medida de la absorbancia a 420nm ha sido utilizada por la mayoría de los autores como indicativo del grado de pardeamiento (Ajandouz y col., 2001; Delgado-Andrade y col., 2004a). A esta longitud de onda, los valores también aumentaron con el tiempo y la temperatura de calentamiento en las muestras del presente ensayo, siendo mayores a la temperatura de 150°C y produciéndose un incremento continuado hasta el tiempo de calentamiento más prolongado (90 minutos). Nuestros resultados coinciden con los de otros investigadores que han determinado el pardeamiento mediante la medida de la absorbancia a 420nm en sistemas modelo azúcar-aminoácido (Morales y Jiménez-Pérez, 2001), azúcar-proteína (Benjakul y col., 2005) y en alimentos como el café (del Castillo y col., 2002) y la malta (Samaras y col., 2005a; 2005b). Sin embargo, en ciertos casos se ha observado, tras un aumento inicial, un descenso de la absorbancia a 420nm en sistemas modelo calentados en condiciones más drásticas (Fogliano y col., 1999; Delgado-Andrade y col., 2004a), lo cual ha sido atribuido a la formación de pigmentos insolubles que, al ser separados tras la centrifugación, provocan un descenso del color en la fracción soluble. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, la aparición de un pequeño precipitado tras la centrifugación en la muestra 150-90, no supuso una disminución de la concentración de pigmentos coloreados solubles, tal y como se deduce del valor de absorbancia medido a 420nm.

El mecanismo de formación del color pardo no está, al parecer, totalmente aclarado en la literatura, y la estructura de las melanoidinas es, en la mayoría de los casos, desconocida. Los productos pardos contienen posiblemente furanos, pirroles, piridinas y pirazinas (Jing y Kitts, 2004a), y algunos autores han propuesto esquemas de hipotéticas estructuras (Martins y Van Boekel, 2005).

Las muestras también se caracterizaron en cuanto al rango de absorción espectrofotométrico de 200 a 700nm, apareciendo dos picos característicos en la mayoría de ellas, uno a 280 y otro a 420nm (**Fig. 24 y 25**), cuyos valores de absorbancia se muestran en la **Tabla 4a**. A partir de los 420nm, la curva va descendiendo progresivamente en todos los casos aunque de manera menos drástica para las muestras calentadas a 150°C, hasta llegar a un mínimo de absorbancia próximo a 0 a $\lambda = 700\text{nm}$. El espectro de absorción UV-visible también ha sido utilizado por otros autores para estudiar el efecto de los reactantes y las condiciones de la reacción en las características de los productos formados (Jing y Kitts, 2004a; Kim y Lee, 2008) y son semejantes a los obtenidos por nosotros. Los primeros comparan la influencia que tiene el tipo de azúcar elegido en la reacción y observan que la intensidad del pardeamiento es distinta según el tipo de azúcar utilizado, de manera que ribosa > glucosa > fructosa. Además, el espectro de absorción es distinto según se trate de los isómeros L- o D- de los diferentes azúcares, siendo la intensidad de la absorción superior para los isómeros D- (Kim y Lee, 2008).

Además de la reacción de Maillard, durante el calentamiento tiene lugar la caramelización de los azúcares, lo cual también podría contribuir al pardeamiento de la mezcla según diversos autores (Ajandouz y col., 2001; Benjakul y col., 2005). Sin embargo, en las mezclas azúcar-aminoácido, el color pardo se debe casi completamente a la reacción de Maillard, sin que la caramelización del azúcar sea apenas significativa (Morales y Jiménez-Pérez, 2001). En nuestros ensayos, el espectro de absorción UV-visible realizado individualmente a la glucosa y la lisina aisladas (**Fig. 26**) confirmó que ninguna de estas muestras, en forma no calentada, contribuye a los valores de absorbancia alcanzados por las mezclas.

La reacción de Maillard no sólo da lugar a la formación de compuestos pardos, sino que también aparecen, según han mostrado algunos autores en mezclas azúcar-aminoácido (concretamente utilizando xilosa y glicina),

pigmentos azules y rojos, que son intermedios en la generación de melanoidinas y que absorben la luz en el espectro UV-visible alcanzando máximos de absorbancia a $\lambda = 626\text{nm}$ (Hayase y col., 2006).

A continuación se muestran las correlaciones obtenidas entre los parámetros utilizados en la caracterización de las muestras:

	pH	Peso (%)	Lisina libre (%)	Abs 280 nm	Abs 420 nm
pH		r= -0,9663 p= 0,0000	r= 0,8103 p= 0,0014	r= -0,7695 p= 0,0034	r= -0,9907 p= 0,0000
Peso (%)	r= -0,9663 p= 0,0000		r= -0,8759 p= 0,0002	r= 0,8693 p= 0,0002	r= 0,9291 p= 0,0000
Lisina libre (%)	r= 0,8103 p= 0,0014	r= -0,8759 p= 0,0002		r= -0,9850 p= 0,0000	r= -0,7268 p= 0,0074
Abs 280 nm	r= -0,7695 p= 0,0034	r= 0,8693 p= 0,0002	r= -0,9850 p= 0,0000		r= 0,6756 p= 0,0159
Abs 420 nm	r= -0,9907 p= 0,0000	r= 0,9291 p= 0,0000	r= -0,7268 p= 0,0074	r= 0,6756 p= 0,0159	

Tabla 34. Correlaciones entre los parámetros utilizados en la caracterización de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C

	pH	Peso (%)	Lisina libre (%)	Abs 280 nm	Abs 420 nm
pH		r= -0,9876 p= 0,0000	r= 0,8923 p= 0,0002	r= -0,7761 p= 0,0050	r= -0,9906 p= 0,0000
Peso (%)	r= -0,9876 p= 0,0000		r= -0,8151 p= 0,0022	r= 0,6685 p= 0,0245	r= 0,9588 p= 0,0000
Lisina libre (%)	r= 0,8923 p= 0,0002	r= -0,8151 p= 0,0022		r= -0,9693 p= 0,0000	r= -0,9283 p= 0,0000
Abs 280 nm	r= -0,7761 p= 0,0050	r= 0,6685 p= 0,0245	r= -0,9693 p= 0,0000		r= 0,8425 p= 0,0011
Abs 420 nm	r= -0,9906 p= 0,0000	r= 0,9588 p= 0,0000	r= -0,9283 p= 0,0000	r= 0,8425 p= 0,0011	

Tabla 35. Correlaciones entre los parámetros utilizados en la caracterización de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C

2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Desde que en la década de los años 50 se publicara uno de los primeros trabajos sobre las propiedades antioxidantes de los PRM (Franzke y Iwainsky, 1954), el interés sobre este aspecto ha sido creciente, especialmente en los últimos años, dadas las importantes repercusiones que dichas propiedades pudieran tener sobre la oxidación y la vida media de los alimentos por un lado, y sobre la salud, por otro. Actualmente, existe una gran variedad de métodos para evaluar la actividad de los PRM como antioxidantes, y en ellos se suelen utilizar diferentes sustratos, distintas condiciones y distintos métodos de análisis, por lo que los datos obtenidos por los diferentes autores son, normalmente, difíciles de comparar y de interpretar. Entre los métodos *in vitro* más utilizados están aquellos que provocan la oxidación de un sustrato lipídico y determinan en qué medida esta se reduce ante la presencia del compuesto objeto de estudio. Otros protocolos evalúan la validez de los antioxidantes para interceptar radicales libres, como el radical DPPH (Frankel y Meyer, 2000). Existen, además, métodos para evaluar la actividad de los antioxidantes en sistemas biológicos, que incluyen el estudio de los efectos sobre las proteínas atrapadoras de hierro (ferritina, albúmina, transferrina y ceruloplasmina), sobre las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutathion peroxidasa), la homeostasis vascular o a la expresión génica.

A todo esto se suma la existencia de algunos trabajos que atribuyen a los PRM cierta actividad prooxidante, dependiendo no sólo de factores como las condiciones de la reacción y la estructura química de los reactantes (Pischetsrieder y col., 1998) sino también del método de evaluación (Wijewickreme y Kitts, 1998), todo lo cual ofrece un panorama complejo que ha sido definido por algunos autores como un “caos” de información (Frankel y Meyer, 2000). Ya que, por el momento, el mecanismo de acción de los PRM no está totalmente aclarado, para obtener una idea global de su actividad

antioxidante se hace necesario el uso conjunto de varios métodos de evaluación, que es lo que se ha pretendido en la presente memoria.

2.1. Determinación de la reducción de la peroxidación lipídica

Unos de los métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante de los PRM, es la determinación de la capacidad de retardar o reducir la formación de compuestos finales de la peroxidación lipídica mediante la medida de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) como el malondialdehído (MDA), lo cual se realiza frecuentemente en una emulsión de ácido linoleico. Utilizando esta técnica se ha mostrado que PRM procedentes de sistemas modelo fructosa-lisina y glucosa-lisina reducen la peroxidación lipídica en mayor o menor grado en función de las condiciones iniciales de la reacción y del tipo de azúcar empleado, siendo mayor para los de glucosa que para los de fructosa, obtenidos en las mismas condiciones (Wijewickreme y Kitts, 1997). Sin embargo, los mismos autores en un estudio posterior en el que analizan la actividad antioxidante, mediante el consumo de oxígeno de las muestras en presencia de cobre, encuentran que algunas de ellas poseen actividad prooxidante (Wijewickreme y Kitts, 1998), mayoritariamente las procedentes de la mezcla fructosa-lisina, pero también, aunque en menor medida, las de glucosa-lisina, hecho que no había sido observado utilizando el método TBARS. Según estos autores, en ausencia de metales de transición, la efectividad de los PRM como antioxidantes en el sistema lipídico estudiado podría explicarse por su capacidad de neutralizar radicales libres, hecho ya observado en otros sistemas (Hayase y col., 1989), ya que durante el desarrollo de la reacción se forman compuestos como enodiolos, que pueden donar un átomo de hidrógeno al radical libre y neutralizarlo (Eichner, 1981). La capacidad de reducir la peroxidación lipídica en una emulsión de ácido linoleico también ha sido mostrada en sistemas modelo procedentes de mezclas glucosa-glicina y xilosa-glicina (Hayase y col., 2006). De acuerdo con los resultados de los autores mencionados, casi todas las

muestras estudiadas en el presente ensayo manifestaron actividad antioxidante según el método TBARS (**Tabla 6a**). Este hecho confirma que la presencia de PRM contribuye a enlentecer la propagación de la peroxidación lipídica (Mastrocola y Munari, 2000), lo cual favorece la estabilidad oxidativa de los alimentos, como ha sido mostrado en cereales (Lerici y Nicoli, 1996), leche (Hansen y Hemphill, 1984) café (Nicoli y col., 1997) y carne (Bedinghaus y Ockerman, 1995), por lo que estos compuestos han sido propuestos como aditivos alimentarios para prevenir la oxidación (Smith y Alfawaz, 1995).

La capacidad de reducir la peroxidación lipídica de los PRM no sólo se ha confirmado en una emulsión de ácido linoleico, sino también en sustratos biológicos como las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Dittrich y col., (2003) han mostrado que mezclas calentadas de glucosa con glicina, lisina o arginina, previenen la oxidación de las LDL *in vitro*, de lo que podrían derivarse importantes repercusiones sobre la salud, dadas las implicaciones que este proceso tiene sobre enfermedades degenerativas como la aterosclerosis.

Los estudios sobre la capacidad de los PRM para reducir la oxidación de los lípidos, realizados *in vivo*, son escasísimos en la bibliografía. Un estudio realizado en ratas muestra que la alimentación con dietas conteniendo PRM aumenta en plasma la actividad antioxidante (medida por la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico) y disminuye los niveles basales de TBARS (Somoza y col., 2005). Sin embargo, según un estudio reciente, el consumo de dietas ricas en PRM no modifica los marcadores del daño oxidativo en adolescentes sanos (TBARS e hidroperóxidos plasmáticos) y únicamente, cuando las muestras biológicas son sometidas a un insulto oxidativo, revelan un grado de protección mayor que cuando se consume una dieta pobre en PRM (Seiquer y col., 2008).

En nuestro estudio, se ha analizado también el efecto de la concentración de la muestra en cuanto a su capacidad para retardar la peroxidación lipídica, comparando distintas dosis de PRM del sistema glucosa-lisina (2, 4 y 6mg).

Cuando la concentración de la muestra aumentó de 2 a 4mg se produjo un aumento de la actividad antioxidante en todos los casos, incluido el control o muestra cruda, excepto en la muestra 150-15, en la que descendió ligeramente. Sin embargo, cuando pasó de 4 a 6mg, prácticamente permaneció constante (**Tabla 6a; Fig. 29 y 30**). Es decir, la capacidad de las muestras para reducir la peroxidación lipídica se mostró dependiente de la dosis, tal y como se desprende del análisis estadístico (**Tabla 6b**), hasta un máximo en el que parece alcanzarse una meseta o *plateau*. En este sentido, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores en extractos de diferentes vegetales, en los que encuentran que la actividad antioxidante aumenta con la concentración de la muestra hasta un máximo, a partir del cual se mantiene constante (Mortelmans y Zeiger, 2000; Chung y col., 2002). Otros autores han demostrado que la capacidad de PRM procedentes de mezclas glucosa-aminoácido para inhibir la oxidación de las LDL *in vitro* es claramente dosis-dependiente a todas las concentraciones ensayadas, considerablemente más bajas que las de nuestro ensayo (Dittrich y col., 2003). En nuestras condiciones experimentales, un exceso en la concentración de la muestra no parece favorecer la actividad antioxidante, lo cual tendría que ser considerado a la hora de establecer unas dosis idóneas de estos productos en la dieta.

Los resultados obtenidos con los antioxidantes ensayados mostraron una elevada capacidad para retardar la peroxidación lipídica, que también fue dosis-dependiente a las mismas concentraciones ensayadas para las mezclas G-L, excepto en el caso del BHT, que manifestó valores cercanos al 100% a todas las concentraciones ensayadas (**Fig. 41**).

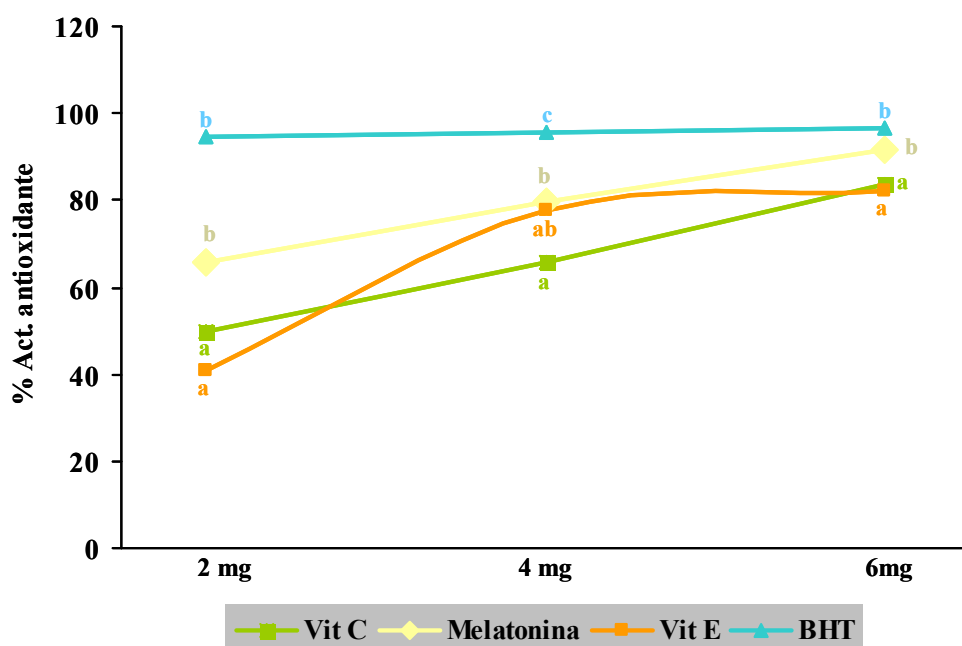


Figura 41. **Porcentaje de actividad antioxidante de los principales antioxidantes comerciales**

Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Los valores máximos alcanzados por las mezclas 150-60 y 150-90 fueron comparables a los de los antioxidantes comerciales (BHT y melatonina). La capacidad antioxidante de la mezcla 100-60 sería equiparable a la de la vitamina C, e inferior las de las calentadas menos tiempo. Además, en un estudio reciente se observa que los PRM procedentes del mismo sistema modelo glucosa-lisina, exhiben una elevada capacidad de reducir la peroxidación lipídica (82-91%) y que ésta es similar a la que poseen otros antioxidantes sintéticos como la terbutilhidroquinona (Jayathilakan y col., 2007), por lo que indican que éstos podrían ser sustituidos por compuestos naturales como los PRM. Estos resultados apoyan el posible uso de los productos de Maillard como antioxidantes alimentarios que, como se ha comentado, ya ha sido propuesto por otros autores (Smith y Alfawaz, 1995).

Por otra parte, nuestros resultados confirman el poder de la melatonina para retrasar la propagación de la peroxidación lipídica (Reiter, 1998b) y ponen de manifiesto, además, que éste es dependiente de la dosis, llegando a valores similares a los alcanzados por el BHT y significativamente superiores respecto a los de las vitaminas C y E (**Fig. 41**). Existe, sin embargo, cierta controversia en este sentido ya que, mientras que algunos autores postulan que la melatonina es un inhibidor de la peroxidación lipídica más potente que la vitamina E (Pieri y col., 1994), otros muestran su perplejidad en este sentido y defienden que la capacidad antioxidante de la melatonina es inferior y que, además, la ejerce mediante un mecanismo de acción diferente (Fowler y col., 2003).

Dentro de cada concentración, tanto la temperatura como el tiempo de calentamiento influyeron en los resultados obtenidos, ya que la capacidad para reducir la peroxidación lipídica aumentó significativamente con ambos factores, esto es, con el desarrollo de la reacción. De hecho, se observó una correlación positiva del porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica (%RPL) con los valores de absorbancia, tanto a 280nm como a 420nm cuando la cantidad de muestra fue de 4mg ($p= 0,0000$, $r= 0,8336$ para 280nm; $p= 0,0000$, $r= 0,8482$ para 420nm) y 6mg ($p= 0,0000$, $r= 0,8567$ para 280 nm; $p= 0,0000$, $r= 0,8283$ para 420nm), siendo menos estrecha cuando se utilizó la concentración de muestra más baja (2mg) ($p= 0,00226$, $r= 0,4946$ para 280nm; $p= 0,0088$, $r= 0,5566$ para 420nm). Estos resultados se confirmaron al observar por separado, que en las muestras calentadas a 100°C existía una correlación positiva entre el %RPL y el valor de absorbancia a 280nm, tanto con 4 como con 6mg de muestra, mientras que a 420nm solo había correlación cuando la cantidad de muestra era de 6mg (**Tabla 36**). En las muestras calentadas a 150°C existió correlación en todos los casos (**Tabla 37**). Esto indicaría que tanto los productos tempranos e intermedios que se forman al inicio de la reacción y, en mayor grado, los más avanzados y coloreados, son capaces de producir una reducción de la peroxidación lipídica. En un estudio reciente, Chen y Kitts (2008), han observado

siguiendo el método ORAC (del inglés oxygen radical absorbance capacity), que tanto las fracciones de bajo como de alto peso molecular, obtenidas a partir de sistemas modelo aminoácido-azúcar, poseen una elevada capacidad antioxidante, de acuerdo con nuestros resultados.

	Abs 280 nm	Abs 420 nm
% RPL (2 mg)	NS	NS
% RPL (4 mg)	r= 0,8608 p= 0,0029	NS
% RPL (6 mg)	r= 0,7940 p= 0,0106	r= 0,8919 p= 0,0012

Tabla 36. Correlaciones entre el porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica y la absorbancia a 280 y 420nm de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C

	Abs 280 nm	Abs 420 nm
% RPL (2 mg)	r= 0,6852 p= 0,0139	r= 0,8255 p= 0,0009
% RPL (4 mg)	r= 0,9216 p= 0,0000	r= 0,9075 p= 0,0000
% RPL (6 mg)	r= 0,9675 p= 0,0000	r= 0,7923 p= 0,0021

Tabla 37. Correlaciones entre el porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica y la absorbancia a 280 y 420nm de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C

Manzocco y col., (2001), intentaron establecer la relación que existía entre los cambios de color que se producen durante el procesado de los alimentos y la formación de compuestos con actividad antioxidante, concluyendo que existe una correlación positiva entre ellos, coincidiendo con nuestros resultados y con los de otros autores que han demostrado, también en sistemas modelo, que la capacidad para reducir la peroxidación lipídica de las melanoidinas aumenta con el grado de pardeamiento de las muestras (Mastrocola y Munari, 2000; Morales y Jiménez-Pérez, 2004). La relación entre el procesado y la actividad antioxidante ha sido descrita por numerosos autores para PRM de sistemas modelo (Lingnert y Eriksson, 1981; Samaras y col., 2005a), alimentos cocinados como el tomate (Anese y col., 1999a), tostados como la soja (Iida y col., 2002) o la malta (Samaras y col., 2005b) y liofilizados como la pasta (Anese y col., 1999b). Estudios realizados en alimentos ricos en PRM, como el café, también han mostrado un aumento en la habilidad para reducir la oxidación en una emulsión de ácido linoleico paralelo al aumento del grado de tostado (Daglia y col., 2004). En contraste, otros autores han encontrado una disminución en la actividad antioxidante (midiendo la oxidación de las LDL) con el incremento del procesado térmico del café, lo cual ha sido atribuido a reducciones en el contenido de polifenoles que, en ciertos casos, no son compensadas por la formación de PRM (Richelle y col., 2001). Por otra parte, ensayos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación muestran que dietas completas con un alto contenido en productos pardos reducen la peroxidación lipídica inducida en mucha mayor medida que si las dietas poseen un bajo grado de pardeamiento (Seiquer y col., 2008). Por tanto, los compuestos formados en las etapas intermedias y avanzadas de la reacción parecen jugar un papel esencial en la prevención de la peroxidación lipídica, en mayor medida que los compuestos formados en las etapas tempranas.

El conocimiento del mecanismo por el que los PRM previenen la oxidación lipídica, es limitado. Morales y Jiménez-Pérez (2004) proponen que los PRM

compiten con el ácido linoleico (LH) por el radical peroxilo (LOO^\bullet) que se forma durante la oxidación y, como resultado, reducen la formación de radicales lipídicos (L) que se forman cuando el ácido linoleico reacciona con el peroxilo. Esta competición por captar al radical libre, reduce la propagación de la oxidación. Los PRM pueden transferir rápidamente un átomo de hidrógeno al radical LOO^\bullet , dando lugar a la formación de compuestos más estables como los hidroperóxidos lipídicos (LOOH), actuando, de esta manera, como rompedores de la cadena de donación de electrones.

Por tanto, una de las siguientes reacciones o ambas podrían ser posibles:



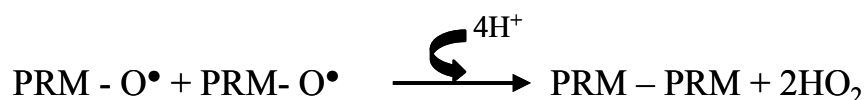
El radical peroxilo podría captar un átomo de hidrógeno de la melanoidina formándose el correspondiente radical de ésta melanoidina y un hidroperóxido.



En este caso, se produce una reacción entre radicales (radical peroxilo y radical de la melanoidina) que produce la formación de un producto no radical.

De esta forma, el mecanismo de acción para las melanoidinas sería similar al propuesto para los compuestos fenólicos (Frankel y Meyer, 2000).

Podría ocurrir también que se produjera una reacción entre dos radicales de dos melanoidinas dando lugar a la formación de un compuesto no radical de las dos melanoidinas y agua.



Algunos autores han sugerido incluso ecuaciones para calcular el número de radicales peroxilo atrapados por cada molécula de compuesto antioxidante (Niki y col., 1986; Liegeois y col., 2000), aunque su aplicación para las melanoidinas

es limitada, ya que requieren el peso molecular del antioxidante en cuestión que es, por el momento, desconocido.

Con respecto a los ensayos realizados con la glucosa y la lisina individualmente, los resultados indicaron que la capacidad del azúcar para reducir la peroxidación lipídica es muy baja, mientras que la del aminoácido, con la dosis más alta ensayada, puede llegar al 30% (**Tabla 6a**). Según algunos autores, a la lisina libre residual podría atribuirse parte de la actividad antioxidante, ya que así ha sido mostrado para otros sistemas modelo derivados de mezclas lípido oxidado-lisina (Ahmad y col., 1996). Sin embargo, en nuestro caso las muestras con mayor actividad antioxidante fueron aquellas de menor contenido en lisina libre, por lo que la contribución de éste aminoácido a las propiedades antioxidantes parece ser minoritaria. El papel del aminoácido en la actividad antioxidante de los compuestos finales de la reacción ha sido postulado por otros autores (Morales y Babbel, 2002; Yilmaz y Toledo, 2005). Las propiedades antioxidantes de la glucosa han sido estudiadas por otros métodos, como el que mide la capacidad de absorber radicales de oxígeno (ORAC), y los datos señalan una ausencia de actividad, coincidiendo con nuestros resultados (Yilmaz y Toledo, 2005).

2.2. Determinación de la actividad neutralizadora del DPPH

Entre los mecanismos propuestos para justificar las propiedades antioxidantes que se atribuyen a los PRM, está su capacidad para neutralizar radicales libres y su habilidad para secuestrar metales de transición que participan precisamente en la generación de dichos radicales (hierro y cobre, fundamentalmente).

Para evaluar la actividad neutralizadora de radicales libres de los PRM obtenidos, estos se hicieron reaccionar con el radical DPPH. El DPPH[•], es un radical libre estable por cuyo electrón desapareado absorbe la luz a 515-520nm. Cuando el radical es neutralizado por un antioxidante, el color pasa de púrpura a amarillo, lo que se traduce en una disminución de la absorción, que es proporcional al número de electrones “capturados” (Prakash y col., 2001) (Fig.42).

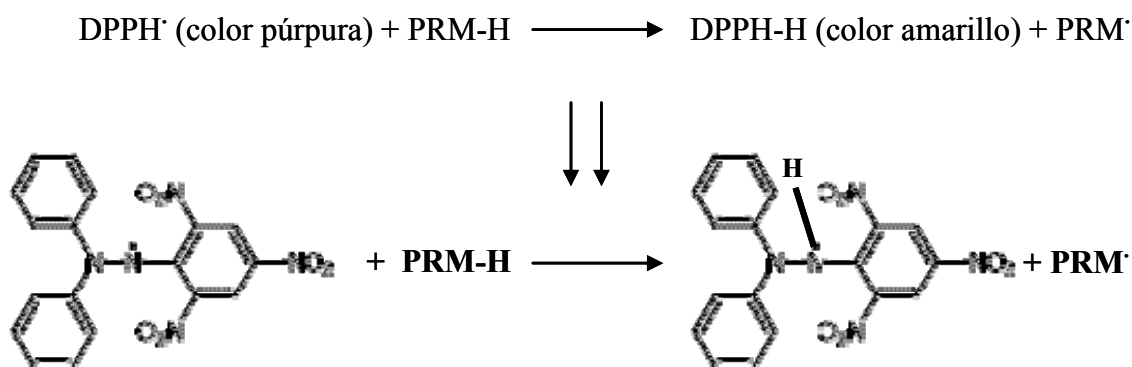


Figura 42. Esquema del posible mecanismo antiradical de los PRM frente al DPPH

Este método no es específico para ningún antioxidante en concreto, sino que evalúa la capacidad antioxidante global de la muestra, por lo que ha sido ampliamente utilizado para determinar la habilidad de neutralizar radicales libres de numerosos compuestos procedentes de los alimentos (Miller y col., 2000; Chung y col., 2002; Sun y col., 2006a; Papetti y col., 2006), de dietas completas (Seiquer y col., 2008), de bebidas como el café (Delgado-Andrade y Morales, 2005) y de sistemas modelo (Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Jing y Kitts, 2002;

2004a; Chawla y col., 2007) y tanto su estequiometría como la forma de reaccionar con algunos antioxidantes, es conocida y está caracterizada (Hogg y col., 1961; Cuvelier y col., 1992; Brand-Williams y col., 1995; Sanchez-Moreno y col., 1998).

En general, las muestras ensayadas mostraron cierta capacidad neutralizadora del radical DPPH, que fue variable en función de la dosis empleada y del tiempo y temperatura de calentamiento. En nuestras condiciones experimentales, los valores máximos alcanzados fueron de un 20 a un 40%, mientras que otros autores han obtenido porcentajes de neutralización del DPPH que oscilaban entre un 40 y un 80% por parte de los PRM procedentes del mismo sistema modelo utilizado por nosotros (Jing y Kitts, 2004a). Contrariamente a lo observado en los ensayos de reducción de la peroxidación lipídica, el aumento en la dosis de la muestra no supuso en la mayoría de los casos un aumento de la actividad antiradical, sino más bien lo contrario: dicha actividad disminuyó hasta valores negativos, tanto más cuanto las muestras eran más procesadas (**Tabla 7a**). Sólo las muestras menos procesadas mostraron ligeros incrementos en la capacidad neutralizadora de RL, a las concentraciones más bajas ensayadas, que descendieron con el posterior aumento de la cantidad de PRM. En contraste con nuestros resultados, otros autores encuentran que la actividad antiradical de diferentes PRM procedentes de sistemas modelo aumenta con la dosis hasta alcanzar un máximo (Jing y Kitts, 2004a; Benjakul y col., 2005). En un estudio en el que se comparó esta actividad en función del azúcar utilizado, se vió que los PRM derivados del sistema modelo ribosa-caseína, neutralizaban al radical libre DPPH a todas las concentraciones ensayadas, mientras que los de glucosa y fructosa-caseína a bajas concentraciones no lo hacían (Jing y Kitts, 2002). Los autores mencionados proponen, por tanto, que las cantidades crecientes de PRM favorecen la donación de hidrógeno a los radicales libres y su consecuente neutralización. Ahora bien, como se ha indicado, la neutralización del DPPH por

parte de los PRM puede suponer la formación de un nuevo radical libre a partir del propio PRM; podría sugerirse que una concentración excesiva de la muestra supondría un aumento en la aparición de esos nuevos radicales libres, que a su vez reaccionarían entre ellos produciendo una reacción en cadena. De acuerdo con esta hipótesis y según nuestros resultados, en las condiciones más severas de tiempo y temperatura de calentamiento en las que los compuestos intermedios y avanzados serían mayoritarios, los PRM no serían antioxidantes sino prooxidantes, lo cual ya ha sido postulado por otros autores para ciertos PRM (Wijewickreme y Kitts, 1997; 1998). Además, este hecho ha sido observado en estudios realizados con compuestos de reconocida actividad neutralizadora de radicales libres como la vitamina C (Kang y col., 1998), β -caroteno (Burton e Ingold, 1984) y flavonoides (Valko y col., 2006) en los que se mostró que una suplementación excesiva o la combinación de varios antioxidantes como la vitamina E con la C y el β -caroteno puede hacer que actúen como prooxidantes en presencia de metales de transición (Greenberg y col., 1994; Dreher y Junod, 1996). Sin embargo, las dosis ensayadas en nuestros experimentos con los antioxidantes comerciales no supusieron descensos en la actividad antioxidante, seguramente porque no eran demasiado excesivas, comparadas con las utilizadas por otros autores. La melatonina se mostró como el neutralizador de RL menos potente de todos los ensayados en el mismo rango de concentraciones ensayadas que las mezclas de G-L. El porcentaje de actividad antiradical del resto de los antioxidantes ensayados fue en general superior a los obtenidos con nuestras mezclas (20-40% %), llegando a alcanzar, en algunos casos, valores cercanos al 95% (**Fig. 43**).

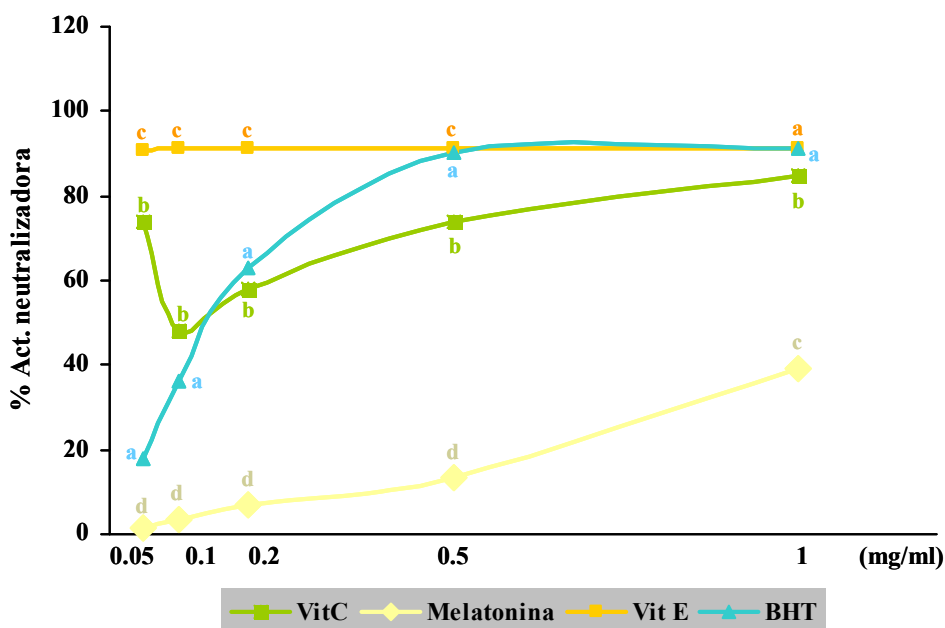


Figura 43. **Porcentaje de actividad neutralizadora del radical libre DPPH de los antioxidantes comerciales**

Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras indican diferencias significativas (P < 0,05). (Anova de una vía y test de Duncan).

Algunos autores han relacionado la capacidad para neutralizar el DPPH con el grado de pardeamiento (Sun y col., 2006a), sin embargo, otros han mostrado que, en muestras calentadas durante largos periodos de tiempo, el aumento del pardeamiento no está directamente relacionado con la capacidad neutralizadora de éste radical libre (Morales y Van Boekel, 1998; Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Morales y Babbel, 2002) y de otros como el radical hidroxilo (Kang y col., 2007a). Según nuestros resultados, dentro de las muestras calentadas a 100°C (**Tabla 7a**) al principio de la reacción (15 minutos de calentamiento) se observó un aumento significativo en el porcentaje de actividad antiradical con respecto al control (muestra cruda), aunque, a partir de ese momento, y excepto a la concentración más baja (0,05mg/ml), comenzó a descender, haciéndose incluso negativo en las muestras altamente procesadas. En las calentadas a 150°C, a una concentración de muestra baja e intermedia, el porcentaje de actividad antiradical aumentó significativamente con respecto al control hasta los 30 minutos de

calentamiento a partir de los cuales disminuyó, mientras que a concentraciones más elevadas (0,5 y 1mg/ml) este descenso fue mucho más brusco y comenzó a los 15 minutos. De hecho, se observó una correlación negativa entre el grado de pardeamiento y la actividad antiradical de las muestras, tanto si se consideraban de forma conjunta (por ej: 1mg/ml, $p= 0,0000$; $r= -0,8515$), como si se evaluaban por separado las muestras calentadas a 100° y a 150°C , aunque en estas últimas hay casos en los que no fue significativo (**Tabla 38 y 39**). Por tanto, según nuestros resultados y de acuerdo con otros autores (Morales y Jiménez-Pérez, 2001), la determinación del grado de pardeamiento no parece ser un índice adecuado para evaluar las propiedades antiradicales de los PRM. En esta línea, estudios de diversos autores sobre la capacidad para neutralizar radicales libres de PRM procedentes de sistemas modelo azúcar-aminoácido, coinciden en señalar que dicha capacidad se localiza fundamentalmente en las etapas tempranas de la reacción (Anese y col., 1999b; Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Morales y Babbel, 2002) y que, por tanto, se atribuye básicamente a los compuestos de bajo peso molecular. Otros investigadores, sin embargo, señalan que la actividad anti-DPPH en ciertos sistemas modelo aumenta linealmente con el pardeamiento y el calentamiento de las muestras (Nicoli y col., 2004; Benjakul y col., 2005) y algunos defienden que la fracción de alto peso molecular es la que posee una mayor actividad antiradical (Jing y Kitts, 2004a).

La relación entre las propiedades antiradicales y el aumento del procesado y del pardeamiento ha sido también estudiada en alimentos, donde otros antioxidantes además de los PRM están presentes, como polifenoles y compuestos fenólicos. Diversos autores han mostrado que el tostado prolongado del café da lugar a una disminución de las propiedades antioxidantes de esta bebida, medidas por la actividad antiradical, a pesar del aumento de color (Nicoli y col., 1997; Daglia y col., 2000; del Castillo y col., 2002; Delgado-Andrade y col., 2005a;), por lo que atribuyen a los compuestos de bajo peso molecular formados en la RM durante el tostado mayor contribución a las propiedades

antioxidantes. Por tanto, según nuestros resultados y los de otros autores, parece ser que compuestos cuya formación se induce bajo condiciones severas de temperatura y/o tiempo de calentamiento pueden contribuir al desarrollo del color pero no a las propiedades antiradicales (Samaras y col., 2005b). Hay quien defiende, sin embargo, que la menor actividad neutralizadora de RL, mostrada por el café negro, se debe en realidad a la degradación de los polifenoles, que no puede ser compensada por los productos de Maillard formados (Sachetti y col. 2008). En otros alimentos, como el pan, se ha observado que las propiedades antioxidantes aumentan con el horneado, y que los PRM avanzados, localizados en la corteza, muestran mejor capacidad para recoger radicales libres que los PRM tempranos de la miga (Michalska y col., 2008). Hay que tener en cuenta que las condiciones durante el horneado son mucho menos drásticas, alcanzándose un color pardo suave, por lo que a lo que ellos llaman *compuestos avanzados* podrían ser *intermedios* comparados con otros tratamientos alimentarios.

Por otra parte, parece ser que el aminoácido tiene una influencia decisiva en la eficacia antiradicalaria de los PRM; así, se ha observado que las melanoidinas formadas a partir de glicina y cisteína, independientemente del tipo de azúcar utilizado como reactante, ejercen una actividad antiradical muy alta, al comparar con otros aminoácidos como el triptófano (Morales y Babbel, 2002). Los compuestos derivados de la lisina poseen una actividad intermedia. Además, nuestros ensayos mostraron la capacidad de la lisina *per se* para neutralizar el DPPH (**Tabla 7a**) por lo que, en cierta medida, la pérdida progresiva de lisina libre paralela al calentamiento de la muestra podría contribuir al descenso de la actividad antiradical de las muestras. De hecho, se observó una correlación positiva entre dicha actividad y el porcentaje de lisina libre de las muestras, excepto a la concentración más baja de las ensayadas para las muestras calentadas a 100°C (**Tabla 38 y 39**).

	Abs 280 nm	Abs 420 nm	Lisina libre (%)
% AA (0,05 mg/ml)	r= 0,7979 p= 0,0019	r= 0,6927 p= 0,0125	r= -0,8324 p= 0,0008
% AA (0,1 mg/ml)	r= -0,6852 p= 0,0139	NS	r= 0,6715 p= 0,0168
% AA (0,2 mg/ml)	r= -0,8902 p= 0,0001	r= -0,8884 p= 0,0001	r= 0,9316 p= 0,0000
% AA (0,5 mg/ml)	r= -0,7745 p= 0,0031	r= -0,9325 p= 0,0000	r= 0,8199 p= 0,0011
% AA (1 mg/ml)	r= -0,7547 p= 0,0046	r= -0,9816 p= 0,0000	r= 0,8082 p= 0,0015

Tabla 38. Correlaciones entre el porcentaje de actividad antirradical del DPPH, la absorbancia a 280 y 420nm y el porcentaje de lisina libre de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100°C

	Abs 280 nm	Abs 420 nm	Lisina libre (%)
% AA (0,05 mg/ml)	r= 0,7199 p= 0,0189	NS	NS
% AA (0,1 mg/ml)	NS	r= -0,8443 p= 0,0021	NS
% AA (0,2 mg/ml)	NS	r= -0,8410 p= 0,0023	NS
% AA (0,5 mg/ml)	NS	r= -0,8553 p= 0,0016	r= 0,7162 p= 0,0198
% AA (1 mg/ml)	NS	r= -0,8485 p= 0,0019	r= 0,7186 p= 0,0192

Tabla 39. Correlaciones entre el porcentaje de actividad antirradical del DPPH, la absorbancia a 280 y 420nm y el porcentaje de lisina libre de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 150°C

3. CAPACIDAD QUELANTE DE HIERRO Y COBRE

El hierro y el cobre son grandes promotores de la generación de radicales libres ya que, al tener varios estados de oxidación (Fe^{2+} o Fe^{3+} y Cu^+ o Cu^{2+}), pueden fácilmente aceptar o ceder electrones (Papas, 1999). Ambos metales promueven la reacción de Fenton, que, como ya se ha comentado, origina radicales hidroxilo (OH^\cdot), extremadamente reactivos y potencialmente muy peligrosos. También participan en la hidrólisis de los hidroperóxidos lipídicos, dando lugar a radicales alcoxi y peroxilo (RO^\cdot y RO_2^\cdot), que son los mayores iniciadores de la peroxidación lipídica (Papas, 1999). Por tanto, los metales de transición pueden actuar como prooxidantes en los alimentos, en el tracto digestivo y, tras la absorción, en los tejidos del organismo, aunque este último caso tiene menos importancia práctica, ya que el hierro y el cobre absorbidos se encuentran casi en su totalidad unidos a proteínas y enzimas. Según algunos autores, aunque el cobre se considera un prooxidante más reactivo que el hierro, su significado práctico es inferior, ya que sus niveles tanto en el organismo como en la dieta son bastante más pequeños.

Por lo tanto, algunos compuestos antioxidantes “preventivos” basan su mecanismo de acción en la quelación de metales de transición, que de esta forma impedirían o retardarían la formación de radicales libres y la peroxidación lipídica (Frankel y Meyer, 2000). Este podría ser el caso de los productos de la reacción de Maillard, que, al comportarse como polímeros aniónicos, son capaces de formar complejos estables con cationes metálicos (Gomyo y Horikoshi, 1976), como el hierro (Homma y Murata, 1994; Morales y col., 2005; Chawla y col., 2007) y el cobre (O’Brien y Morrissey, 1997; Delgado-Andrade y col., 2004a). Hashiba (1986) propone que los grupos hidroxilo o cetona actúan como grupos donantes de protones en las melanoidinas y participan en la quelación de metales.

Nuestros resultados mostraron una elevada capacidad quelante de hierro para todas las mezclas G-L calentadas (82-96%) (**Tabla 8a**), aunque los valores fueron inferiores a los de la mezcla cruda prácticamente en todos los casos. Se

observó además, que la lisina *per se* queló casi la totalidad del hierro presente, confirmando la capacidad de este aminoácido para formar complejos con hierro (Ruiz-Roca y col., 2008) (**Fig. 44 y 45**). Por tanto, el descenso generalizado de actividad quelante de hierro en las mezclas calentadas, comparadas con la cruda, podría ser parcialmente atribuido a la pérdida de lisina libre. Sin embargo, la reducción progresiva de lisina no se vio asociada a descensos similares en la habilidad quelante, por lo que se puede asumir que durante el calentamiento se formaron nuevos compuestos con propiedades quelantes de hierro. Otros autores también han mostrado la habilidad de diferentes PRM, procedentes de sistemas modelo azúcar-aminoácido, para formar complejos con hierro (Yoshimura y col., 1997; Morales y col., 2005), e incluso se han propuesto ecuaciones matemáticas para calcular el efecto de las melanoidinas en la quelación de hierro, teniendo en cuenta las características de las mismas y las concentraciones del metal. La capacidad de las melanoidinas para quelar hierro también se ha estudiado en alimentos, mostrándose que las procedentes del café, cerveza y vino dulce tienen menores propiedades quelantes que las que proceden de sistemas modelo, lo cual ha sido atribuido a que el esqueleto de las melanoidinas alimentarias es mucho más complejo que el de las melanoidinas modelo, ya que incluye grupos como taninos, polisacáridos, péptidos, etc., (Morales y col., 2005).

La glucosa aislada también fué capaz de quelar al hierro, llegando a acomplejar más del 50% del total presente en el medio. La participación del grupo hidroxilo de la glucosa en el poder quelante de metales ha sido demostrada en mezclas de glucosa-glicina, en las que el bloqueo de dicho grupo supuso un descenso drástico en la quelación de hierro (de 93% a 69%) (Yoshimura y col., 1997). Además, las melanoidinas de sistemas modelo formadas a partir de glucosa tienen mayor capacidad para quelar hierro que las procedentes de otros azúcares (Morales y col., 2005).

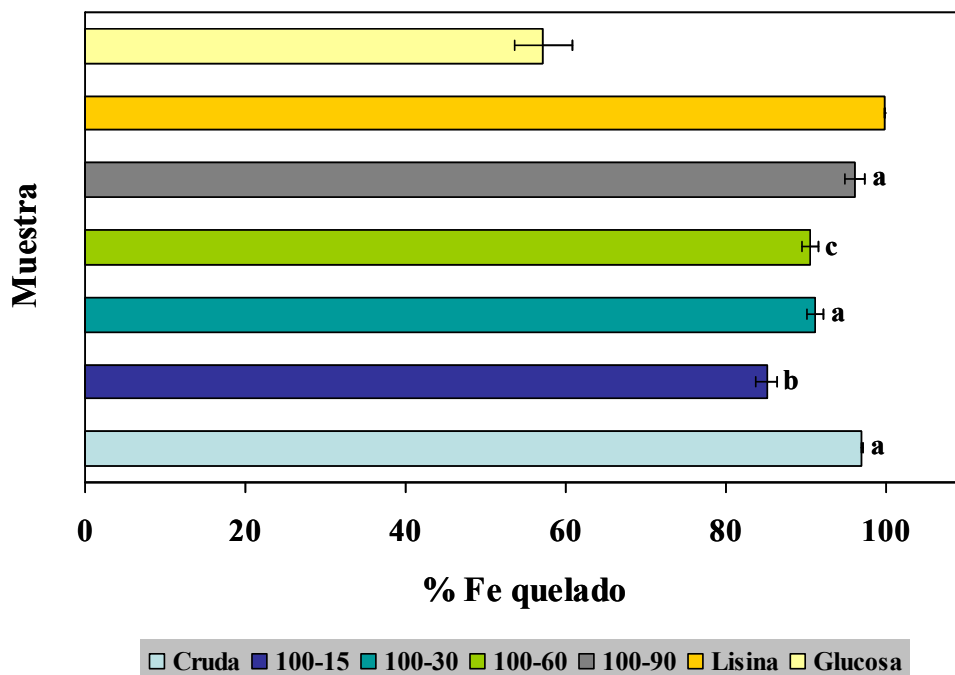


Figura 44. Porcentaje de hierro quelado por las muestras de glucosa-lisina cruda, calentadas a 100°C y la lisina y glucosa individualmente. Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). (Anova de una vía y test de Duncan).

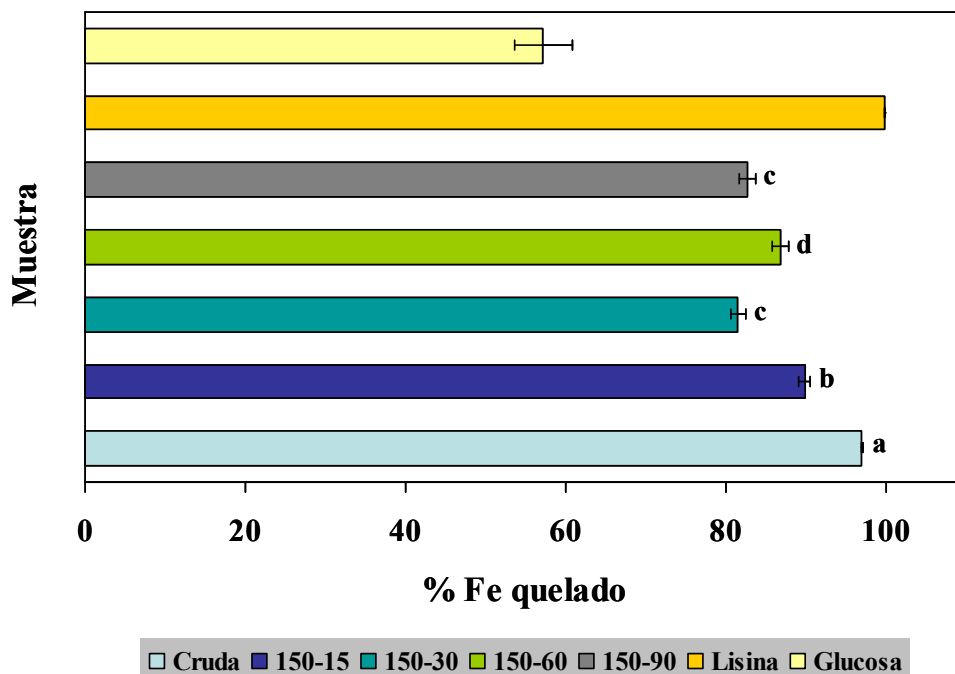


Figura 45. Porcentaje de hierro quelado por las muestras de glucosa-lisina cruda, calentadas a 150°C y la lisina y glucosa individualmente. Valores medios \pm error estándar. (n = 4). Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). (Anova de una vía y test de Duncan).

Según nuestros resultados, el aumento de la temperatura produjo descensos significativos en la actividad quelante, aunque no hubo efecto del tiempo de calentamiento (**Tabla 8b**). Sin embargo, no se observó una correlación entre el pardeamiento, expresado como la absorbancia a 420nm, y la capacidad de unir al hierro de las muestras, lo cual coincide con los ensayos de otros autores en sistemas modelo de varias combinaciones azúcar-aminoácido (Morales y col., 2005). En mezclas glucosa-glicina se ha observado que los compuestos de alto peso molecular poseían una habilidad quelante ligeramente mayor que los de bajo peso molecular (95,1% frente a 91,1%, respectivamente), aunque estos autores no han estudiado la relación con el pardeamiento de las muestras (Yoshimura y col., 1997). Sin embargo en nuestro caso, fueron las mezclas calentadas a menor temperatura las que poseían un poder quelante de hierro significativamente superior.

Estudios realizados en sistemas modelo han propuesto que las propiedades antioxidantes de los PRM están relacionadas con la habilidad quelante de hierro (Yoshimura y col., 1997; Painter, 1998; Jing y Kitts, 2004a). Sin embargo, en los presentes ensayos no se observó relación estadística entre la quelación de hierro y la actividad antioxidante de las muestras, ya sea medida por la capacidad de reducir la peroxidación lipídica o por la capacidad para neutralizar radicales libres. Este hecho no implica que la quelación de hierro no esté involucrada en las acciones antioxidantes de las muestras, ya que es conocido que el bloqueo de metales de transición supone una protección frente al daño oxidativo. La escasa variación en los valores de actividad quelante de hierro de las muestras podría justificar la falta de correlación observada entre dicha variable y la actividad antioxidante, tanto si se estudian las muestras en conjunto como separadas por temperaturas. En otros compuestos procedentes de alimentos, como los hidrolizados de proteína de patata, también se ha observado que la capacidad para reducir la peroxidación lipídica (TBARS) no está relacionada con la actividad quelante de hierro (Wang y Xiong, 2005), por lo que los autores

atribuyen las propiedades antioxidantes a otros mecanismos, como la neutralización de radicales libres o el secuestro de cobre.

Es conocido que los PRM poseen una afinidad especial para formar complejos con cobre (O'Brien y Morrissey, 1997). En nuestros ensayos, el empleo de concentraciones crecientes de PRM fue paralelo al aumento de la capacidad quelante de cobre, excepto en las muestras más calentadas, de acuerdo con otros autores (Matmaroh y col., 2006). Estudios realizados con mezclas de glucosa o fructosa con lisina sometidas a diferentes condiciones de temperatura, tiempo de calentamiento, pH, y actividad de agua, muestran que poseen distinta capacidad de unirse al cobre (Wijewickreme y col., 1997). La intensidad de la formación de estos complejos depende, de nuevo, de las condiciones de la reacción y de los reactantes utilizados, observándose que la mayor capacidad quelante de cobre se ha obtenido utilizando PRM procedentes de mezclas de glucosa-lisina (Painter, 1998). La especial relación de los PRM derivados de lisina con el cobre ha sido descrita por Seifert y col., (2004) al mostrar que compuestos como la N- ϵ -fructosil-lisina y N- ϵ -carboximetil-lisina forman complejos moderadamente estables con cobre y no con otros metales como el zinc, concluyendo que en la glicación de las proteínas aparecen nuevos sitios de unión al cobre. La estructura química de la N- ϵ -carboximetil-lisina, semejante a la del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), parece ser decisiva para la capacidad quelante de cobre (Saxena y col., 1999; Saxena y col., 2000). Además, en condiciones intestinales se ha observado que los productos formados tras el calentamiento de mezclas de glucosa-lisina, forman complejos insolubles con el cobre (Delgado-Andrade y col., 2004a).

El diferente comportamiento de las muestras en cuanto a la quelación de hierro y cobre podría implicar que el mecanismo de unión de los PRM es distinto según el metal del que se trate y las condiciones experimentales elegidas. En esta línea, otros autores también han encontrado propiedades quelantes variables para el hierro y para el cobre (Wang y Xiong, 2005; Stadman y Levine, 2000), y los

efectos derivados de la presencia de mezclas G-L sobre la solubilidad del hierro y cobre son, asimismo, diferentes (Delgado-Andrade y col., 2004a).

En nuestras condiciones experimentales, la capacidad quelante de cobre mostró un aumento inicial en la primeras fases del tratamiento térmico, aunque posteriormente, tanto la subida del tiempo de calentamiento como de la temperatura de las muestras produjeron descensos en dicha variable (**Tabla 9a y Fig. 46**).

De hecho, el análisis estadístico mostró un efecto significativo de la temperatura y del tiempo de calentamiento (**Tabla 9b**) y se observó, además una correlación negativa entre el pardeamiento, medido por los valores de absorbancia a 420nm, y la formación de complejos con cobre para todas las concentraciones ensayadas (por ejemplo, para 400µg de PRM, $p= 0,0000$; $r= -0,8764$). Es decir, el avance del proceso no favoreció la quelación de cobre, sino que podrían ser los productos tempranos o intermedios, los que poseen mayor capacidad quelante.

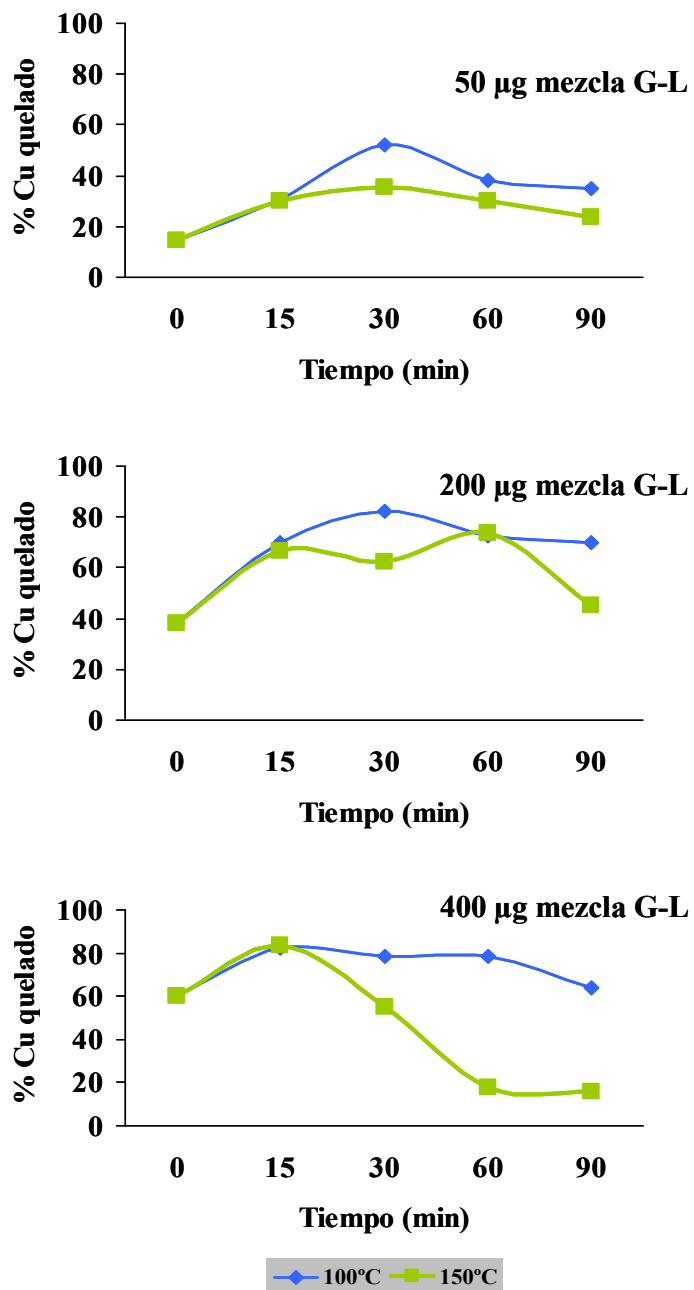


Figura 46. Comportamiento de las mezclas de glucosa-lisina con respecto a la quelación de cobre en función de la temperatura de calentamiento (cantidad de mezcla glucosa-lisina: 50, 200 y 400 µg)

Según algunos autores, la capacidad de formar complejos es mayor a elevados valores de pH, debido posiblemente a que se originan cambios en la configuración de los ligandos de las melanoidinas e, incluso, a la formación de nuevos lugares de unión al cobre (Buffle, 1988; Plavsic y Cosovic, 1994; Plavsic y col., 2006). En nuestro caso se observó una correlación positiva entre el pH y el porcentaje de cobre quelado, tanto a bajas concentraciones de muestra (50 μ g) ($p=0,0052$; $r=0,5629$), como, y más aún, a altas concentraciones (400 μ g) ($p=0,0000$; $r=0,9540$), lo que confirma el importante papel del pH en la actividad quelante de cobre. Además, la desaparición progresiva de la lisina, que forma complejos solubles con cobre (Berthon y col., 1986), podría perjudicar la quelación del metal por parte de las muestras. Sin embargo, la pérdida de lisina producida en las primeras fases del calentamiento, debe haber sido compensada por el poder quelante de los nuevos productos formados en estas etapas. Por el contrario, la glucosa no fue capaz de formar complejos con el cobre a ninguna de las concentraciones ensayadas, de acuerdo con otros autores (Plavsic y col., 2006), que señalan la importancia de la presencia de átomos de nitrógeno necesarios en la formación de estos complejos. El cobre (II) forma complejos orgánicos muy estables con ligandos que contengan preferentemente azufre, oxígeno o nitrógeno, como es el caso de nuestros PRM. La formación de estos complejos entre el cobre y las melanoidinas se produciría a través de enlaces covalentes, aunque la atracción electrostática entre ambos no se excluye dado el gran número de grupos cargados que existen en estos compuestos (PRM) (Plavsic y col., 2006). Los complejos Cu-lisina han sido utilizados en nutrición animal para mejorar la biodisponibilidad del cobre de las dietas, en aquellos casos en los que es conveniente una suplementación (Guo y col., 2001).

La quelación de cobre ha sido asociada a la actividad antioxidante, no sólo en PRM procedentes de sistemas modelo (Wijewickreme y Kitts, 1997), sino en compuestos obtenidos de alimentos (Wang y Xiong, 2005). Wijewickreme y Kitts (1997) muestran que los PRM derivados de glucosa-lisina poseen mayores propiedades antioxidantes que los derivados de fructosa-lisina, lo que atribuyen a la existencia de un mayor número de sitios de unión al cobre en los primeros. La capacidad antioxidante de otros sistemas modelo también ha sido asociada a la habilidad para bloquear el cobre en ensayos realizados en cultivos celulares (Jing y Kitts, 2004c). Según nuestros resultados, la habilidad para quelar cobre está directamente relacionada con la capacidad para neutralizar radicales libres de las muestras, aunque no lo está con la capacidad de reducir la peroxidación lipídica. A continuación se muestra a modo de ejemplo la correlación obtenida entre el porcentaje de cobre quelado cuando la cantidad de muestra era de 400µg y el porcentaje de actividad antiradical del DPPH (%AA) (**Fig. 47**).

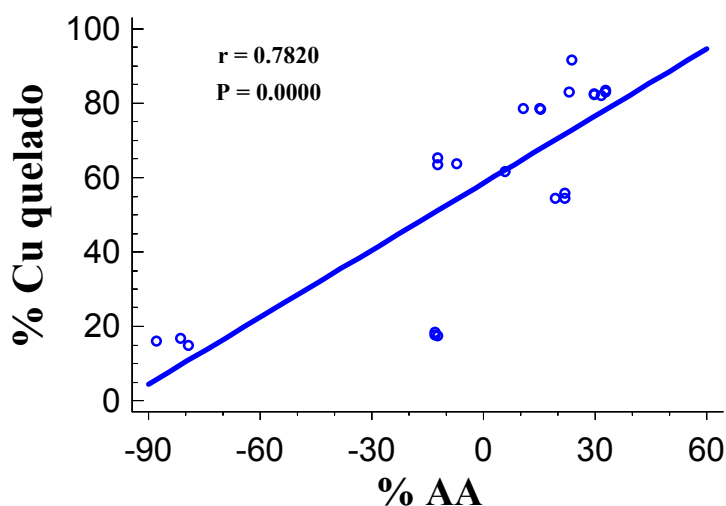


Figura 47. Correlación entre el porcentaje de cobre quelado (400ug PRM) y la actividad antiradical del DPPH (%AA, 0,5mg/ml PRM)

Tal como se comentaba para las propiedades neutralizadoras de radicales libres, los compuestos formados en las etapas tempranas de la reacción también mostraron mayor capacidad para quelar el cobre que los formados en las etapas más avanzadas. El desarrollo de la reacción, por tanto, parece dar lugar a la desaparición progresiva de los sitios de unión al cobre, a lo que contribuye el descenso en el pH y/o la desaparición de la lisina libre residual, lo cual produce una disminución gradual en la actividad antiradical de los compuestos obtenidos.

Estudios realizados con otros antioxidantes como los flavonoides, indican que la capacidad quelante de hierro y cobre depende en gran parte de su estructura química, la cual favorece la quelación de estos metales y, por tanto influye en su capacidad antioxidante, exponiendo que la formación de complejos está relacionada con la estructura de estos compuestos, fundamentalmente con la presencia de grupos hidroxilo (Brown y col., 1998; Fernández y col., 2002).

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN CULTIVOS CELULARES

La mucosa intestinal supone la interfase entre el organismo y su entorno luminal, y está continuamente expuesta a la presencia, no sólo de nutrientes, sino también de otras sustancias entre las que se incluyen agentes oxidantes derivados de la dieta y, además, especies reactivas del oxígeno generadas de forma endógena (Aw, 1999). Entre los compuestos prooxidantes están los metales de transición, como el hierro y el cobre, que llegan periódicamente al tracto gastrointestinal a través de los alimentos y del agua (Lönnerdal, 1998; Au y Reddy, 2000). Los agentes reductores del jugo gástrico reducen el hierro (III) presente en los alimentos a hierro (II) para facilitar su absorción, con lo que el intestino es la primera diana expuesta al daño de los radicales hidroxilo generados en la reacción de Fenton (Wanasundara y col., 1994). Además, el daño celular producido por los radicales libres está implicado en diversas patologías a nivel digestivo, como los cambios en la permeabilidad de la membrana, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (Grisham, 1994). Estos datos indican que la mucosa intestinal es un lugar preferente para el estudio del estrés oxidativo y de la respuesta celular ante la presencia de compuestos pro- y antioxidantes. Por otra parte, muchos de los alimentos que se consumen de forma habitual en la dieta contienen cantidades significativas de PRM (Delgado-Andrade y col., 2007), con lo que una gran cantidad de estos productos llegan diariamente al intestino (Ames y col., 1999). En los presentes ensayos se han utilizado células Caco-2, que se diferencian en cultivo en enterocitos maduros, y cuya eficacia para este tipo de estudios ya ha sido validada (Wijeratne y col., 2005). Sin embargo, el papel protector de los PRM ante un daño oxidativo inducido a nivel de la mucosa intestinal está escasamente estudiado.

4.1. Ensayos de viabilidad celular

4.1.1. Viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Según ciertos autores, algunos productos de la reacción de Maillard derivados de sistemas modelo aminoácido-azúcar pueden tener efectos citotóxicos (O'Brien y Morrissey, 1989b). Inhibiciones del crecimiento celular se han observado en ensayos realizados en células de ratón (glioma C6) que se incubaron con PRM obtenidos tras el calentamiento a 121°C durante 1 hora de mezclas de glucosa-lisina y fructosa-lisina (Wang y col., 1987). Vagnarelli y col., (1991) mostraron que PRM derivados del sistema ribosa-lisina presentan actividad citotóxica y clastogénica en linfocitos humanos. Por tanto, antes de estudiar el posible comportamiento antioxidante o el efecto protector de determinados PRM, es necesario asegurar que no causan daño celular a las dosis y en las condiciones que van a ser utilizadas. En nuestro caso, los PRM ensayados no llegaron a afectar negativamente la viabilidad de las células Caco-2 a ninguna de las concentraciones ensayadas (**Tabla 10a**), de acuerdo con estudios realizados por otros autores utilizando PRM obtenidos de mezclas de distintos azúcares con lisina (Jing y Kitts, 2000), o con caseína (Jing y Kitts, 2002; 2004b). Los distintos tipos de células parecen responder de manera diferente ante la presencia de los PRM. De hecho, se ha mostrado que la viabilidad de células intestinales de origen embrionario (las Int-407) se afecta de manera significativa ante la presencia de productos de glicación azúcar-proteína, mientras que no ocurre lo mismo en las células Caco-2 (Jing y Kitts, 2004b). Las Caco-2, por tanto, son consideradas por algunos como más resistentes que otras células a las modificaciones oxidativas, probablemente debido a sus especiales mecanismos de compensación metabólica y a sus sistemas enzimáticos detoxificadores más activos (Hofmann y col., 2001). Ensayos realizados con las melanoidinas del café muestran que la presencia de los digeridos procedentes de estos compuestos no produce efectos citotóxicos en células HepG2 (línea celular de origen hepático) a

ninguna de las concentraciones ensayadas por los autores y tras periodos de incubación hasta de 24h (Goya y col., 2007).

Según el análisis estadístico, la concentración de la muestra en nuestras condiciones experimentales modificó la viabilidad celular, aunque el valor global en la concentración más alta fue superior al 90%, lo cual se considera más que aceptable (**Tabla 10b**). La comparación de los datos individuales mostró que la viabilidad descendió por debajo del 90% en presencia de las muestras más procesadas (100-90, 150-15, 150-30, 150-60, 150-90) sólo a la concentración más alta (2mg/ml); no obstante, las diferencias observadas no fueron significativas en ningún caso. Estudios con PRM derivados del mismo sistema modelo utilizado por nosotros (glucosa-lisina) muestran un efecto citotóxico en las Caco-2 cuando las células se incuban durante 24h con las correspondientes fracciones de elevado peso molecular, y a concentraciones de muestra superiores a 1mg/ml (Jing y Kitts, 2000). Estos autores sugieren que la presencia de polímeros de alto peso molecular tiene un potencial citotóxico mayor que la de los de bajo peso molecular, a pesar de sus aparentes propiedades antioxidantes. En esta línea, la viabilidad inferior en nuestro ensayo se observó tras la incubación con la muestra más procesada (150-90).

Aunque hay un intervalo de tiempo para el desarrollo de esta toxicidad, el mecanismo por el que los PRM la inducen no está totalmente claro, sugiriéndose que podrían causar cambios en la morfología celular, inhibir la síntesis de ARN, provocar mutaciones, conversión de genes y aberraciones cromosómicas debido a su actividad mutagénica o genotóxica, como se ha comentado previamente en la revisión bibliográfica (Rosin y col., 1982; Wang y col., 1987).

El tipo de azúcar podría afectar el potencial citotóxico de los PRM. En este sentido, se ha observado que mientras que los compuestos obtenidos a partir de glucosa y fructosa con caseína producen un descenso de la viabilidad en células Int-407, los obtenidos a partir de ribosa no reducen este parámetro (Jing y Kitts, 2004b).

4.1.2. Viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de hierro o cobre

Como se ha comentado, el tracto gastrointestinal está expuesto continuamente a metales de transición como hierro y cobre, contenidos en los alimentos que forman parte de nuestra dieta habitual (Courtois y col., 2002; Casanueva y Viteri, 2003). La presencia de estos metales puede favorecer la generación de radicales libres que atacan fundamentalmente a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana, produciendo un daño funcional y estructural a las células de la mucosa intestinal (Yoshimura y col., 1997; Srigiridhar y col., 2001). Efectivamente, la incubación de las células Caco-2 con hierro 1,5mM ó con cobre 50µM durante 3 horas produjo un efecto negativo sobre la viabilidad (**Tablas 11a y 12a**), lo cual era, en este caso, un prerequisite para estudiar el posible efecto protector de los PRM ante los efectos nocivos de los metales de transición.

Según nuestros resultados, todas las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C tuvieron un efecto protector frente a la citotoxicidad inducida con hierro y cobre, a excepción de las más procesadas (a partir de los 60 o 90 minutos de calentamiento). Estos resultados sugieren que los PRM presentes en el lumen intestinal podrían favorecer y participar en los mecanismos de defensa que actúan protegiendo a las células intestinales del daño oxidativo. Además, el mecanismo por el que los PRM impiden que tanto el hierro como el cobre produzcan este daño parece estar relacionado, al menos en parte, con su capacidad para quelarlos (Hayase, 1996; Wijewickreme y Kitts, 1997; Bersuder y col., 1998). La relación entre las propiedades antioxidantes de los PRM y la capacidad quelante de metales podría deducirse al observar que la capacidad de los PRM para proteger la funcionalidad de la célula estaba, en algunos casos, estadísticamente relacionada con su habilidad para secuestrar los metales. De hecho, existió una correlación positiva entre el porcentaje de viabilidad de las células Caco-2 en

presencia de hierro y el porcentaje de hierro quelado tanto con las muestras del grupo 100 ($p= 0,0000$; $r= 0,6108$), como del 150 ($p= 0,0351$; $r= 0,4148$), aunque dicha correlación desapareció si las muestras se estudiaban en conjunto. Con respecto al cobre, sí se observó esta correlación para todas las muestras juntas ($p= 0,0171$; $r= 0,4551$, con $400\mu\text{g}$ de Cu) y, de forma mucho más estrecha, en las muestras calentadas a 100°C ($p= 0,0024$; $r= 0,7210$). Es decir, el efecto protector ante la citotoxicidad del cobre fue mayor por parte de las muestras calentadas durante menos tiempo (15 y 30 minutos) y a menor temperatura (100°C) (**Tabla 12b**), lo cual recuerda bastante a los resultados obtenidos para la actividad quelante de cobre (**Tabla 9b**). En otras palabras, los compuestos obtenidos en las primeras fases del calentamiento exhibieron una mayor capacidad para quelar cobre y, en consecuencia, un mayor efecto protector ante los efectos nocivos debidos a la presencia de dicho metal. Las mezclas más procesadas, por el contrario, no fueron capaces de evitar el daño oxidativo provocado por ambos metales.

A pesar de que muchos investigadores han sugerido la participación de la quelación de metales en la actividad antioxidante de los PRM (Yoshimura y col., 1997; Morales y col., 2005), los estudios referentes al papel protector de estos compuestos ante la toxicidad producida por metales de transición son escasísimos en la bibliografía, y más aún los realizados en células de origen intestinal. Casi como único referente tenemos los trabajos llevados a cabo por Jing y Kitts, en los que encuentran que mezclas calentadas de diversos azúcares (glucosa, fructosa y ribosa) con caseína (Jing y Kitts, 2004b) o con lisina (Jing y Kitts, 2004a) protegen a las células Caco-2 de la citotoxicidad debida al hierro ($0,5\text{-}2\text{mM}$) y al cobre ($8\text{-}32\mu\text{M}$). Estos autores atribuyen dichos efectos a la capacidad quelante de metales de los compuestos ensayados y muestran que son los compuestos de alto peso molecular (> 3500 Da) los principales responsables del efecto protector de los PRM frente a la toxicidad inducida por metales (Jing y

Kitts, 2004a) ya que, según ellos, éstos poseen una mayor capacidad quelante (Wijewickreme y Kitts, 1997).

4.1.3. Viabilidad celular en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de peróxido de hidrógeno

Como hemos comentado en el apartado anterior, aparte de la presencia de metales, el epitelio intestinal está expuesto continuamente a especies reactivas del oxígeno (ERO) que se generan a partir del metabolismo celular en condiciones fisiológicas (Skaper y col., 1997) y/o procedentes de distintos compuestos como pueden ser los xenobióticos, toxinas, bacterias catalasa-negativas, células mucosales procedentes de la descamación del epitelio y alimentos (Engler y col., 1999). Estas especies reactivas y radicales libres inducen alteraciones moleculares en los componentes celulares llegando, como ya se ha dicho, a alterar la morfología y hasta la viabilidad de las células.

Al contrario de lo mencionado respecto al uso de metales para provocar un daño celular en cultivos celulares, el peróxido de hidrógeno ha sido ampliamente utilizado como inductor del estrés oxidativo *in vitro*, bien para estudiar la respuesta celular ante un insulto oxidativo o bien para examinar el comportamiento antioxidante de diversos compuestos (Riso y col., 1999; O'Brien y col., 2000; Youdim y col., 2000; Cilla y col., 2008). El peróxido de hidrógeno es una ERO no-radical que se genera de forma natural en las células vivas como resultado de su metabolismo. Como tal, puede dañar el ADN y los lípidos de membrana produciendo un daño oxidativo a la célula. Además, en presencia de metales de transición genera radicales hidroxilo, extremadamente reactivos y potencialmente muy dañinos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno induce un daño celular con resultado de pérdida de viabilidad, además de una activación de los mecanismos de defensa antioxidantes en células de origen hepático, las HepG2 (Alía y col., 2005), e intestinal, las

Caco-2 (Wijeratne y col., 2005). La incubación de la Caco-2 con concentraciones de peróxido de hidrógeno hasta de 0,25mM durante 30min produjo daños en la funcionalidad de la membrana y en el ADN, aunque no se detectaron alteraciones de la viabilidad mediante la técnica de tinción con azul tripán (Wijeratne y col., 2005). El uso de peróxido de hidrógeno 0,5mM durante 1h de incubación indujo una situación de estrés oxidativo en las Caco-2 mediante el aumento en la generación de ERO y la alteración de la funcionalidad mitocondrial, sin llegar a alterar la viabilidad (Cilla y col., 2008). Sin embargo, periodos de incubación más prolongados (3h) sí dieron lugar a efectos citotóxicos, tanto a concentraciones relativamente bajas (0,25mM) (Jing y Kitts, 2004a) como a concentraciones mayores de peróxido de hidrógeno (10mM) (Manna y col., 1997), lo cual indica que el daño oxidativo producido por el peróxido es dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Cambios en la permeabilidad alteran la integridad de la membrana, pudiendo favorecer la entrada de toxinas a la célula que, a largo plazo, podría ocasionar la muerte celular; estos cambios se han observado en células Caco-2, expuestas a peróxido de hidrógeno, y se han atribuido a la perturbación de complejos de unión paracelulares debido a la fosforilación de la tirosina de las proteínas de membrana (Rao y col., 1997; 1999).

En nuestro ensayo se estudió el efecto que tenía la adición de una solución de peróxido de hidrógeno 0,5mM durante 3h, sobre la viabilidad de las células Caco-2. De acuerdo con otros autores utilizando 0,25mM de peróxido de hidrógeno y 3h de incubación, (Jing y Kitts, 2004a), se observó una drástica reducción de la viabilidad celular hasta valores inferiores al 50% (**Tabla 13a**). El uso de dosis agresivas para la célula era en este caso necesario para establecer una situación de estrés oxidativo. La incorporación de las mezclas de glucosilisina calentadas a 100° y 150°C no fue capaz de recuperar la viabilidad celular, ya que sólo en presencia de la mezcla 150-15 y 150-90 mejoró ligeramente. Sin embargo, en el estudio citado anteriormente, si se observó un efecto protector

de los PRM, procedentes del sistema modelo glucosa-lisina, incluso con concentraciones de PRM inferiores a las utilizadas por nosotros (0,2mg/ml frente a 1mg/ml), efecto que fue atribuido, en su mayor parte, a los compuestos de alto peso molecular.

La protección de los PRM frente a la citotoxicidad inducida por peróxidos ha sido atribuida a la capacidad para neutralizar radicales libres. Aunque los compuestos ensayados exhibieron una cierta capacidad antiradical en las primeras etapas de la reacción, que fue disminuyendo con el procesado de las muestras, esta capacidad no estuvo estadísticamente relacionada con la protección frente a la toxicidad producida por el peróxido de hidrógeno. No obstante, se observaron mejoras en la viabilidad celular en presencia de algunas muestras, que nunca llegaron a alcanzar valores aceptables. Por lo tanto, la capacidad para neutralizar radicales libres de las muestras no fue suficiente, al menos en nuestro caso, para compensar los efectos nocivos del peróxido. Las diferencias encontradas con los datos de otros autores pueden deberse a que la concentración de peróxido de hidrógeno fue más elevada en nuestros ensayos (0,5mM frente a 0,25mM) o bien a que la habilidad antiradical de los compuestos fue inferior. Hay que tener en cuenta que la actividad antiradical de las muestras ensayadas fue relativamente baja (hasta un 48%), comparada con las cifras obtenidas por otros autores (un 95%, Jing y Kitts, 2004a) y, además, disminuyó hasta valores negativos con las muestras más procesadas. La capacidad para proteger a las células Caco-2 de la citotoxicidad inducida por el peróxido de hidrógeno ha sido estudiada con éxito en otros compuestos antioxidantes, como los polifenoles del aceite de oliva (Manna y col., 1997) y en bebidas como las fracciones bioaccesibles de zumos de frutas (Cilla y col., 2008). Sin embargo, otros compuestos como el β -caroteno no son capaces de proteger a las células Caco-2 de las alteraciones en la viabilidad producidas por el peróxido de hidrógeno (Bestwick y Milne, 1999), lo cual está más en línea con nuestros resultados. Por otra parte, otros peróxidos, como el terbutilhidroperóxido

(t-BOOH) han sido utilizados para provocar un insulto oxidativo *in vitro* y estudiar el comportamiento antioxidante de diversos compuestos (Alía y col., 2006b; Martín y col., 2008). En este sentido, se ha observado que las melanoidinas aisladas del café son capaces de prevenir ciertos aspectos del daño oxidativo debido al t-BOOH, pero no el aumento de la generación de ERO (Goya y col., 2007).

4.2. Efectos sobre la peroxidación lipídica

4.2.1. Modificaciones en la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina

Tal y como se ha comentado en la introducción, la peroxidación lipídica es una reacción frecuente a nivel celular que favorece la formación de compuestos tóxicos que pueden afectar negativamente la mayoría de las reacciones que se dan a nivel biológico. Entre estos compuestos destacan los hidroperóxidos lipídicos, compuestos asociados al desarrollo de numerosas enfermedades degenerativas, como el cáncer y la aterosclerosis (Blair, 2001; Sies y col., 2005). Los ácidos grasos poliinsaturados, presentes en las membranas celulares y en las grasas contenidas en la dieta, son enormemente sensibles a la formación de peróxidos lipídicos (Girotti, 1998; Aw, 1998). Una excesiva concentración de los mismos a nivel intestinal puede contribuir al deterioro de los mecanismos de detoxificación de la mucosa y producir disfunción de los enterocitos (Imai y Nakagawa, 2003), dando lugar a la aparición de daños en el intestino como inflamación y hasta cáncer de colon (Addis, 1986; Sawa y col., 1998; Udilova y col., 2003). Los hidroperóxidos lipídicos activan enzimas, como la lipooxigenasa y ciclooxigenasa, implicadas en los procesos de peroxidación lipídica celular y en la biosíntesis de prostaglandinas, respectivamente, y pueden actuar como señales indicativas de la apoptosis o muerte celular (Imai y Nakagawa, 2003).

La peroxidación lipídica ha sido evaluada en células Caco-2 por un escaso número de investigadores (Wijeratne y col., 2005; Wijeratne y Cuppett, 2006; 2007a; 2007b), que han utilizado, como es nuestro caso, la determinación de dienos conjugados en los lisados de las células. Estos autores han mostrado que la incubación de las células Caco-2 durante 24 horas con diversos compuestos de reconocida actividad antioxidante, como ciertos diterpenos fenólicos del romero (ácido carnósico y carnosol) o las isoflavonas de soja (genisteína y daidzeína) no modifica los niveles de lípidos peroxidados respecto a los niveles basales (Wijeratne y Cuppett, 2007a; 2007b). Sin embargo, en nuestros ensayos se comprobó la capacidad de las mezclas de glucosa-lisina cruda y calentadas a 100° y a 150°C, para reducir la peroxidación lipídica, medida por la formación de dienos conjugados, con respecto a los niveles basales en las células Caco-2. Según el análisis estadístico, hubo un efecto significativo del tiempo de calentamiento y de la temperatura, y fueron las muestras procesadas durante más tiempo (60 y 90min) y a temperatura más elevada (150°C) las que dieron lugar a cifras menores de peróxidos lipídicos en las células (**Tabla 14b**). De acuerdo con estos resultados, el avance de la reacción favoreció la capacidad de las muestras para reducir la oxidación de los lípidos, lo cual concuerda con los datos obtenidos al determinar la inhibición de la peroxidación lipídica en una emulsión de ácido linoléico (TBARS) (**Tabla 6b**). Es decir, los compuestos formados en las etapas avanzadas de la reacción son los que mostraron una mayor capacidad para reducir la peroxidación lipídica, tanto en el ensayo *in vitro* como en el de cultivos celulares. Al examinar los datos individuales para cada temperatura, se observó que la reducción de la peroxidación lipídica fué más patente entre las muestras calentadas a 150° que entre las de 100°C (**Fig. 48**). Además a la temperatura de 100°C se observó una estrecha correlación negativa entre la habilidad de reducir la peroxidación lipídica *in vitro* y los niveles de lípidos peroxidados en cultivos celulares ($p= 0,0074$; $r= -0,9291$).

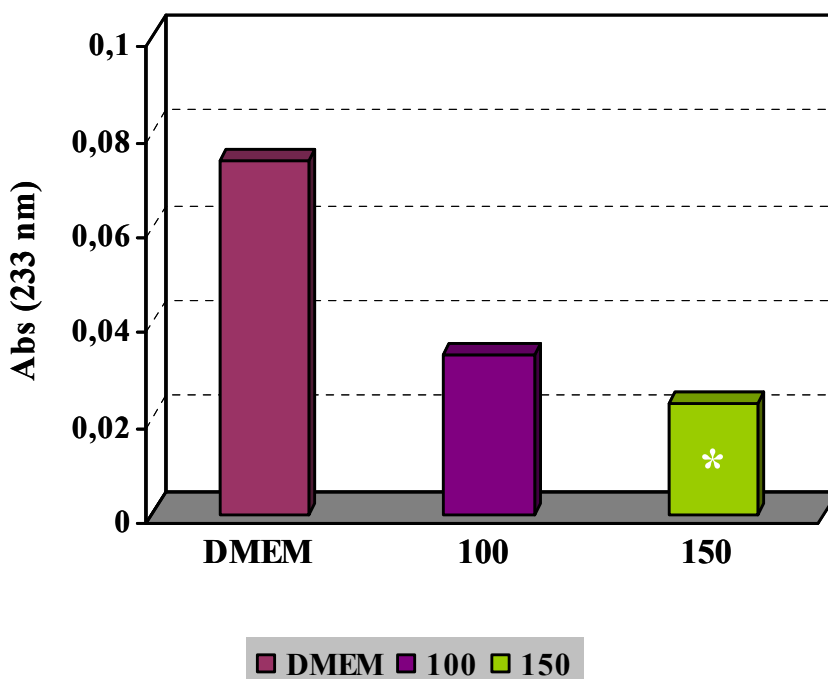


Figura 48. Nivel de dienos conjugados en las células Caco-2 tras su incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C

El * indica diferencias significativas entre ambas temperaturas ($P < 0,05$). (Anova de dos vías y test de Duncan).

No hemos encontrado en la bibliografía ninguna referencia relativa a los efectos de los PRM en los niveles de lípidos peroxidados en células Caco-2, por lo que, al parecer, nuestros datos son los primeros de los que se dispone en este sentido. En otra línea celular, las HepG2, se ha estudiado la influencia de las melanoidinas del café sobre los niveles de lípidos oxidados, medidos mediante la determinación de MDA. Los autores muestran que tras periodos prolongados de incubación las melanoidinas ensayadas reducen de forma significativa la peroxidación lipídica respecto a los niveles basales, de acuerdo con nuestros resultados (Goya y col., 2007).

El mecanismo por el cual los PRM reducen la peroxidación lipídica no está, como ya se ha comentado, totalmente aclarado. El efecto puede ser parcialmente atribuido a la presencia de grupos hidroxilo en la estructura de estos compuestos, que actúan como donadores de hidrógeno capaces de neutralizar los radicales

libres formados durante la peroxidación lipídica (Morales y Babbel, 2002; Morales y Jiménez-Perez, 2004).

4.2.2. Modificaciones en la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de hierro o cobre

El papel prooxidante por parte de los metales de transición ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$) es hoy día aceptado por numerosos autores (Papas, 1999). Ambos metales han sido utilizados *in vitro* como promotores de la peroxidación lipídica; por ejemplo, el hierro se ha utilizado para inducir la lipoperoxidación en membranas de eritrocito (Ochoa y col., 2003) y el cobre para oxidar los lípidos de las LDL (Madhujith y Shahidi, 2007). Sin embargo, los niveles de hierro y cobre utilizados en nuestros ensayos no produjeron un aumento significativo en los niveles de lípidos peroxidados en las células Caco-2, respecto a los valores basales. Estos niveles, al parecer insuficientes para promover la oxidación de las grasas, fueron seleccionados con la condición de que no afectaran la viabilidad de las células, con el fin de que las posibles modificaciones obtenidas en presencia de las muestras no fueran resultado de alteraciones en la funcionalidad celular, criterio que también han seguido otros autores (Di Pietro y col., 2008). El hecho de que no hayamos encontrado en la bibliografía ningún trabajo que estudie la inducción de la peroxidación lipídica en Caco-2 con hierro o cobre, puede ser debido precisamente a que los niveles de estos metales necesarios para producir tal efecto perjudicarían la viabilidad celular. La falta de respuesta en la inducción de la peroxidación lipídica con concentraciones de hierro semejantes a las utilizadas en nuestros ensayos, también ha sido mostrada en una línea celular de origen alveolar, las células A549 (Di Pietro y col., 2008). Estos autores atribuyen la falta de efectos a la presencia en el citoplasma de proteínas atraparoras de hierro, como la ferritina, que disminuirían el hierro disponible para catalizar la reacción de Fenton, y por tanto el daño oxidativo. De todas

formas, no era nuestro objetivo estudiar la respuesta celular ante la presencia de agentes promotores del estrés oxidativo, sino analizar las posibles modificaciones que pudieran derivarse de la presencia adicional de las mezclas de glucosa-lisina.

En presencia de hierro 0,5mM, las muestras calentadas a 100°C, por lo general, no fueron capaces de reducir la peroxidación lipídica, mientras que las más procesadas si lo consiguieron (150-30, 150-60, 150-90), produciéndose una reducción significativa respecto a los valores obtenidos tras la incubación con el metal solo (**Tabla 15a**). Además, del análisis estadístico se deriva un efecto significativo de la temperatura, siendo las muestras calentadas a 150°C las que mostraron valores globales inferiores en los niveles de lípidos peroxidados (**Tabla 15b y Fig. 49**).

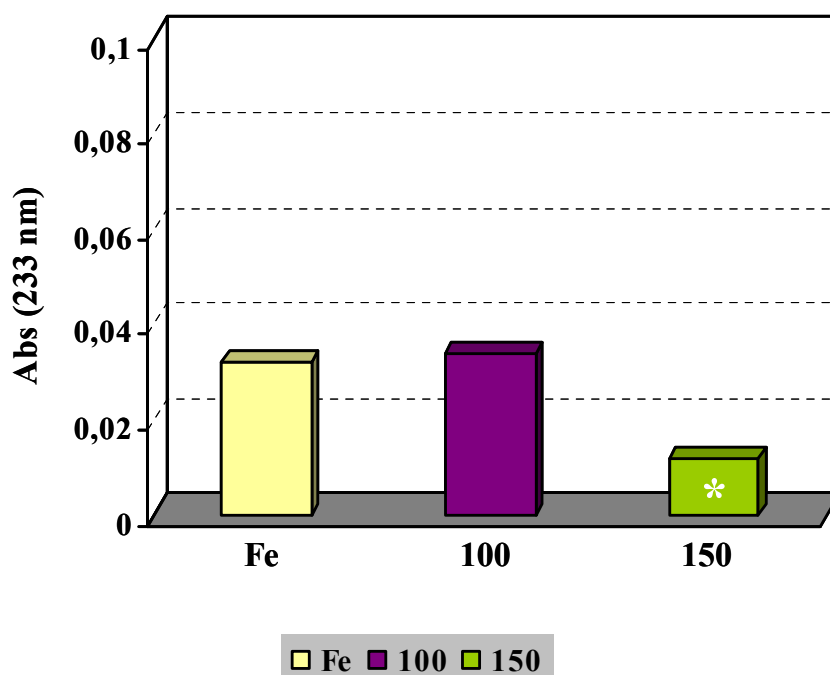


Figura 49. Nivel de dienos conjugados en las células Caco-2 tras su incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C en presencia de hierro

El * indica diferencias significativas entre ambas temperaturas ($P < 0,05$). (Anova de dos vías y test de Duncan).

Sin embargo, cuando utilizamos como agente oxidante cobre 10 μ M, casi ninguna de las mezclas de glucosa-lisina (grupo 100, grupo 150) fue capaz de reducir significativamente el nivel de dienos conjugados (**Tabla 16a**). De hecho, ninguna de las variables ensayadas (tiempo o temperatura de calentamiento) afectó los resultados en presencia de cobre (**Fig. 50**). La presencia de la muestra cruda sí dio lugar a reducciones en las cifras de peroxidación lipídica respecto a los valores observados en presencia de hierro o cobre.

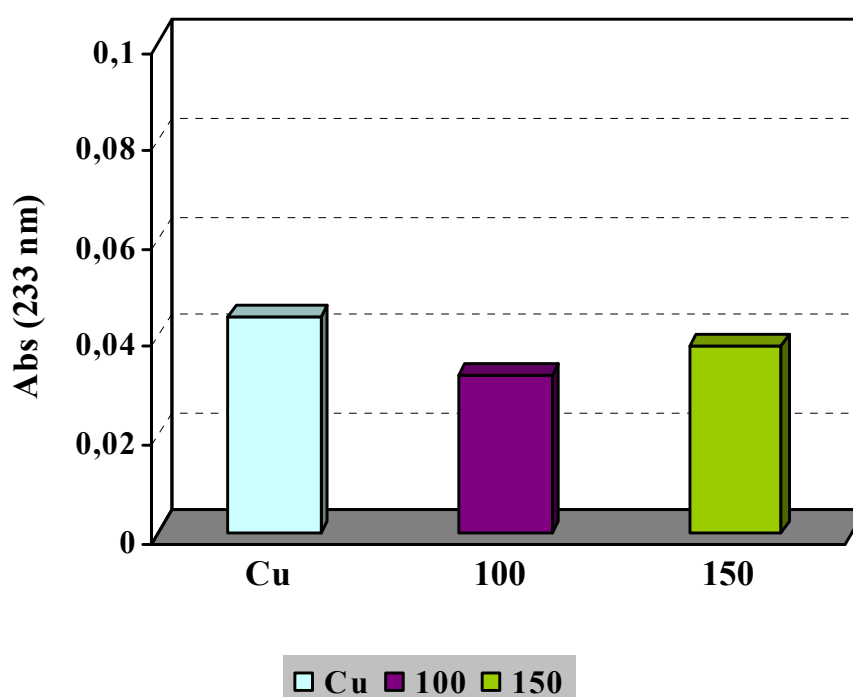


Figura 50. Nivel de dienos conjugados en las células Caco-2 tras su incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C en presencia de cobre
El * indica diferencias significativas entre ambas temperaturas ($P < 0,05$). (Anova de dos vías y test de Duncan).

Las propiedades antioxidantes de los PRM han sido atribuidas por algunos autores a la capacidad quelante de metales (Yosimura y col., 1997; Wijevickreme y Kitts, 1998), como ya se ha expuesto a lo largo de esta memoria. Resultados de nuestros experimentos (apartado 3, Discusión) han mostrado que las muestras ensayadas poseen capacidad para quelar hierro y cobre. Sin embargo, esta

capacidad no parece modificar, al menos en nuestras condiciones experimentales, las cifras de peroxidación lipídica a las que da lugar la incubación de las células con ambos metales, excepto en el caso de las muestras más procesadas (150°C) en presencia de hierro. De hecho, no se observó la existencia de correlación alguna entre la habilidad quelante y los valores de dienos conjugados en las células Caco-2, ni en el caso del hierro ni del cobre, a ninguna de las temperaturas ensayadas. De acuerdo con estos datos, recordemos que tampoco existió correlación entre la actividad quelante y la capacidad para reducir la peroxidación lipídica *in vitro*.

No se han encontrado en la bibliografía datos referentes a los efectos de los PRM en los niveles de peroxidación lipídica en células Caco-2 en presencia de metales de transición, por lo que no hemos podido establecer comparación alguna con nuestros resultados. De los datos obtenidos se deduce que las condiciones experimentales de nuestros ensayos, es decir, la incubación de las células Caco-2 con niveles moderados de hierro y cobre, no permiten relacionar la actividad quelante de las muestras adicionadas con las propiedades antioxidantes atribuidas a dichas muestras.

4.2.3. Modificaciones en la peroxidación lipídica en presencia de las mezclas de glucosa-lisina adicionadas de peróxido de hidrógeno

Cuando el oxidante utilizado fue el peróxido de hidrógeno, la práctica totalidad de las muestras ensayadas redujeron la peroxidación lipídica de forma significativa, hasta valores prácticamente no detectables, respecto a los valores obtenidos tras la incubación con la solución adicionada solamente con el peróxido, sin que ni la temperatura ni el tiempo de calentamiento incidieran significativamente en los resultados (**Fig. 51**).

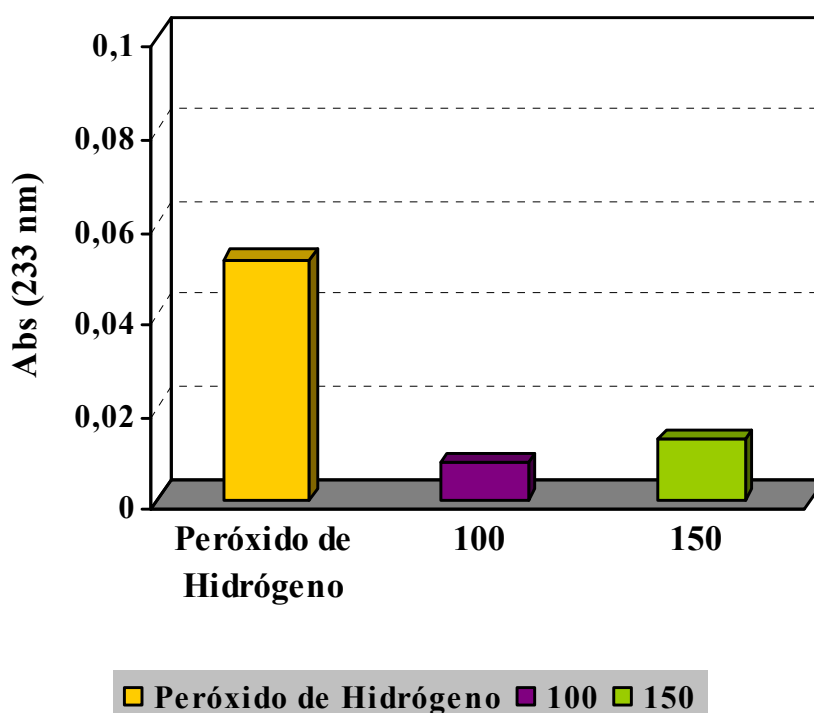


Figura 51. Nivel de dienos conjugados en las células Caco-2 tras su incubación con las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C en presencia de peróxido de hidrógeno

El * indica diferencias significativas entre ambas temperaturas ($P < 0,05$). (Anova de dos vías y test de Duncan).

La protección que los PRM ejercen está en línea con estudios previos realizados por otros autores en cultivos celulares. Así, se ha observado que PRM procedentes de mezclas de glucosa-glicina reducen la peroxidación lipídica inducida por adriamicina en cultivos primarios de hepatocitos (Valls-Bellés y col., 2004), y que las melanoidinas del café reducen los niveles de MDA inducidos por terbutilhidroperóxido en células HepG2 (Goya y col., 2007). Resultados similares se han mostrado para otros compuestos con actividad antioxidante reconocida como las catequinas del té (Chen y col., 2002; Murakami y col., 2002), el β -caroteno, la luteína (Chen y col., 2002) y la quercetina (Alía y col., 2006b).

Utilizando la determinación de los dienos conjugados en células Caco-2, se ha comprobado que compuestos como los polifenoles del romero o las

isoflavonas de soja son capaces de reducir significativamente la peroxidación lipídica inducida por los hidroperóxidos del ácido oleico (Wijeratne y Cuppet, 2007a; 2007b).

Al igual que en los estudios *in vitro* (apartado 2.1., Resultados), los resultados obtenidos en las células Caco-2 manifiestan la capacidad de las muestras para reducir la peroxidación lipídica inducida. Con la diferencia de que en las células no se observó el efecto positivo de la temperatura y tiempo de calentamiento puesto de manifiesto en el ensayo TBARS, ya que, *ex vivo* casi todas las mezclas mostraron un comportamiento similar. El efecto beneficioso del procesado en la capacidad para reducir la peroxidación lipídica inducida *ex vivo* ha sido mostrado en alimentos como el café (Daglia y col., 2000) y la cebada (Papetti y col., 2006); el tostado de estos alimentos produce un aumento significativo en la habilidad para reducir la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos, medida por el método TBARS. Según estos autores, son los compuestos de mayor peso molecular los que protegen en mayor medida a los lípidos microsomales de la peroxidación (Papetti y col., 2006). Estos datos confirmarían los resultados obtenidos por nosotros *in vitro* en los que el mayor porcentaje de reducción de la peroxidación lipídica se producía con las mezclas procesadas a más temperatura y durante más tiempo, pero no coinciden con los obtenidos *ex vivo*. Otros autores también han observado discordancias entre la actividad antioxidante de algunos compuestos, según se determine *in vitro* o *ex vivo* (Daglia y col., 2000; Zeyuan y col., 1998). Recordemos que el mecanismo por el cual los PRM ejercen la acción antioxidante parece ser debido, en parte, a la presencia de al menos un grupo hidroxilo en estos compuestos, que al donar un átomo de hidrógeno confiere capacidad para neutralizar radicales libres (Hashiba, 1986; Yoshimura y col., 1997; Benjakul y col., 2005). Estudios realizados con PRM, contenidos en los alimentos (Daglia y col., 2004; Kang y col., 2007a; 2007b) y procedentes del sistema modelo glucosa-lisina, han observado la capacidad de estos compuestos para neutralizar radicales hidroxilo (Wijewickreme y col., 1999; Jing y Kitts,

2004b; Chawla y col., 2007; Kang y col., 2007a) y otros implicados en la propagación en cadena de la oxidación como el radical superóxido (Yoshimura y col., 1997; Mastrocola y Munari, 2000, Chawla y col., 2007).

En nuestro caso, la reducción de la peroxidación lipídica, inducida por las muestras en presencia de peróxido de hidrógeno, sólo supuso pequeñas mejoras en la viabilidad de las células Caco-2, sin que existiera una correlación significativa entre ambos parámetros. Este hecho viene a confirmar que la viabilidad celular depende de otras muchas variables, además de la peroxidación lipídica. Con otros compuestos, sin embargo, sí se ha observado que la reducción de lípidos oxidados a nivel celular va asociada con mejoras significativas en la viabilidad (Alía, 2006b; Wijeratne y Cuppett, 2007a; 2007b), coincidiendo con los resultados obtenidos tras el tratamiento de células HepG2 con las melanoidinas del café (Goya y col., 2007).

4.3. Efectos sobre la actividad enzimática

Como se ha comentado en la revisión bibliográfica, las células cuentan con una serie de enzimas antioxidantes encargadas de protegerlas del daño oxidativo provocado por el exceso de radicales libres, y los cambios que se produzcan en su actividad deben considerarse como biomarcadores de la respuesta antioxidante celular (Alía y col., 2005).

El sistema de defensa enzimático incluye principalmente la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GP_x). Básicamente, CAT y GP_x convierten el peróxido de hidrógeno en agua, y la SOD cataliza la dismutación del anión superóxido (**Fig. 3**). Prácticamente todos los tejidos poseen estas enzimas, aunque su actividad varía mucho de unos a otros, ya que está determinada por características inherentes de las propias células, su especialización metabólica y factores ambientales a los que están expuestas como el nivel de oxigenación y la presencia de metabolitos (Marklund y col., 1982). Por ejemplo, el hígado posee y mantiene una maquinaria antioxidante masiva, debido a que en él se lleva a cabo el metabolismo oxidativo de multitud de sustratos, mientras que el intestino, al no participar tan extensamente en dicho proceso, posee niveles inferiores de enzimas antioxidantes (Grisham y col., 1990). Sin embargo, el epitelio gastrointestinal puede verse, como se ha comentado, superado por un exceso de agentes oxidantes y de ERO, por lo que el estudio de los mecanismos de respuesta enzimática antioxidante a este nivel es de gran importancia.

Las células Caco-2 también cuentan con estas enzimas, cuya actividad suele ser pequeña pero significativa; se ha observado que la actividad de la SOD y de la CAT en estas células es dos y cuatro veces inferior a la de las células epiteliales del colon, respectivamente, mientras que la actividad GP_x es similar en ambas (Grisham y col., 1990). En general, la actividad de estas enzimas suele incrementarse conforme lo hace el tiempo de cultivo (Baker y Baker, 1992), por lo que en estudios cuyo objetivo sea comparar los cambios que se producen en la

actividad enzimática en función del daño oxidativo o de la presencia de antioxidantes, es importante mantener constantes las condiciones de cultivo y utilizar células bien diferenciadas tras alcanzar la confluencia (Wijeratne y col., 2005).

Diversos autores han estudiado la actividad basal de las enzimas antioxidantes en las células Caco-2 (Grisham y col., 1990; Zödl y col., 2004; Jing y Kitts, 2004; Wijeratne y col., 2005; 2006) y, aunque las técnicas utilizadas son muy semejantes, los resultados son ciertamente dispares, debido, en parte, a que los distintos autores los expresan de manera diferente. Los resultados basales encontrados por nosotros se sitúan en los niveles intermedios para la CAT, y entre los más elevados para la SOD de todos los descritos en la bibliografía. La actividad de la GP_x es inferior a los resultados encontrados por los demás autores, mostrando niveles realmente muy bajos en nuestros ensayos.

4.3.1. Efectos de las mezclas de glucosa-lisina sobre la actividad catalasa, superóxido-dismutasa y glutatión peroxidasa

Además de la capacidad para neutralizar radicales libres o para quelar los metales de transición, un aspecto importante a considerar a la hora de estudiar las propiedades antioxidantes de los PRM es su posible efecto sobre las defensas antioxidantes a nivel celular que son, básicamente, las enzimas mencionadas. Los antioxidantes pueden actuar aumentando la defensa endógena, lo que supone una mayor protección para la célula en una situación de estrés oxidativo (Murthy y col., 2005); ante una inactivación de las enzimas antioxidantes, sin embargo, el daño producido en un insulto oxidativo se vería exacerbado (Kim y col., 2001).

Apenas existen estudios sobre el efecto que ejercen los productos de la reacción de Maillard sobre la actividad basal de catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Jing y Kitts (2004b) han evaluado el efecto de los PRM derivados de distintos sistemas modelo constituidos por glucosa, fructosa o

ribosa con caseína (2mg/ml, 3h) sobre la actividad de estas enzimas en la línea celular Caco-2 y en la Int-407, células intestinales de origen embrionario. Estos autores observan que en las células Int-407 los PRM del sistema glucosa-caseína y fructosa-caseína disminuyen significativamente la actividad de todas las enzimas, excepto la catalasa, lo que confirma que los PRM son selectivos a la hora de actuar sobre las distintas enzimas detoxificadoras (Kitts y col., 1993; Hofmann y col., 2001). Los autores relacionan el descenso de actividad enzimática con la disminución de la viabilidad en estas células, lo cual es lógico, ya que un efecto citotóxico supone una alteración en la funcionalidad celular y una reducción de sus constantes vitales. Por otra parte, ninguno de los PRM ensayados por ellos tiene un impacto significativo ni en la viabilidad ni en la actividad enzimática de las células Caco-2, coincidiendo con los resultados de otros autores al estudiar los efectos de compuestos con supuesta acción antioxidante, como el β -caroteno, en esta línea celular (Bestwick y Milne, 1999). Sin embargo, en nuestro caso, la incubación de las células con las mezclas de glucosa-lisina (1mg/ml, 3h), produjo un aumento significativo, prácticamente generalizado, de la actividad de las enzimas ensayadas (**Tablas 18, 22 y 26 a y b**). El efecto de la temperatura, según el análisis estadístico, fue significativo en todos los casos, mostrándose inferiores los valores correspondientes a la temperatura de 150°C respecto a los de 100°C (**Fig. 52**).

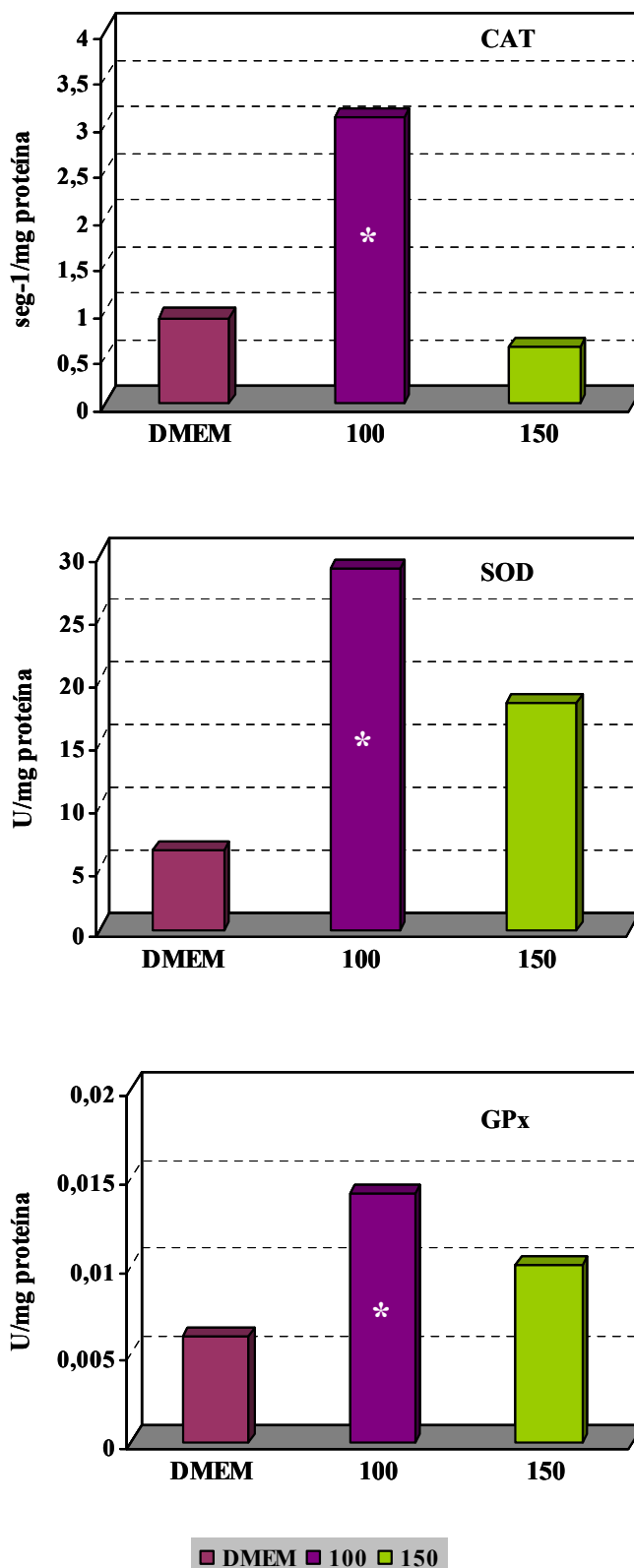


Figura 52. Niveles de actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C El * indica diferencias significativas entre temperaturas. Anova de dos vías y test de Duncan ($P < 0,05$).

Por tanto, según nuestros resultados, los PRM procedentes del sistema modelo glucosa-lisina produjeron un efecto beneficioso en el sistema de defensa enzimático de las células Caco-2, hecho que no había sido mostrado hasta ahora, y que confirma las propiedades antioxidantes de estos compuestos. Por otra parte, los compuestos formados a menor temperatura (100°C) fueron los más favorables para potenciar la actividad de las enzimas antioxidantes, al igual que ocurría con el efecto neutralizador del DPPH y con la actividad quelante de cobre, ya descritos en anteriores capítulos.

De acuerdo con nuestros resultados, otros autores han mostrado los efectos antioxidantes de melanoidinas aisladas de alimentos, estudiando también las modificaciones en la actividad de distintas enzimas en las células Caco-2. Así, se ha observado que la pronil-lisina, melanoidina aislada de la corteza del pan, induce una elevación en la actividad de la enzima detoxificante glutation S-transferasa (GST), lo cual es interpretado como un efecto antioxidante del compuesto ensayado (Lindenmeier y col., 2002). Además, las fracciones de menor peso molecular, aisladas de la malta tostada, dan lugar a las mayores elevaciones de la GST respecto al resto de las fracciones, que incluso disminuyen la actividad de la enzima (Faist y col., 2002a). Según estos autores, “los compuestos pardos de bajo peso molecular son claramente más prometedores en cuanto a sus propiedades beneficiosas sobre la salud”.

Un aumento en las defensas antioxidantes celulares proporciona una mayor protección frente a un daño oxidativo y, por tanto, sería de esperar que produjera una reducción en la oxidación de los lípidos. Efectivamente, en nuestros ensayos encontramos una correlación negativa entre los niveles de lípidos peroxidados en las Caco-2 y la actividad de las enzimas SOD ($p= 0,0179$; $r= -0,5826$) y GP_x ($p= 0,0420$; $r= -0,5133$), que se hizo mucho más estrecha en las muestras calentadas a 100°C ($p= 0,0069$; $r= -0,8543$ y $p= 0,0134$, $r= -0,8167$, para la SOD y la GP_x , respectivamente), aunque no se observó en las muestras de 150°C. No existió correlación entre la actividad de la CAT y la peroxidación lipídica celular, ya

que, según algunos autores, la GP_x es responsable de la retirada de los hidroperóxidos lipídicos en los sistemas biológicos en mucha mayor medida que la catalasa (Aw, 1998). La SOD es responsable de neutralizar los radicales superóxido, pero, al parecer, la GP_x, se ve afectada por los niveles de antioxidantes de la dieta en mayor medida que la SOD y la CAT (Andersen y col., 1997). Se ha mostrado que compuestos de supuesta actividad antioxidante, como los polifenoles de romero, inducen aumentos de la GP_x y la SOD en las Caco-2, aunque dependiendo de la dosis, pero no incrementan la actividad de la CAT (Wijeratne y Cuppett, 2007a). Sin embargo otros, como las isoflavonas de soja, aumentan la actividad de la CAT, reducen la de la SOD y no afectan significativamente a la GP_x en la misma línea celular (Wijeratne y Cuppett, 2007b). En células derivadas de hepatoma, estos mismos compuestos aumentan la CAT y, más débilmente, la GP_x, mientras que la SOD no se ve modificada (Röhrdanz y col., 2002). Las muestras ensayadas por nosotros, sin embargo, produjeron un aumento generalizado del sistema de defensa enzimático que, además, estuvo asociado a una reducción significativa de la oxidación de los lípidos a nivel celular.

Estudios realizados *in vivo* muestran que el consumo de compuestos de supuesta acción antioxidante, como las isoflavonas de soja, inducen aumentos en la actividad de la CAT, SOD y GP_x en el intestino delgado de ratones (Cai y Wei, 1996), disminuyen dicha actividad en los eritrocitos de rata, y no modifican los niveles de actividad en hígado (Breinholt y col., 1999). Es decir, los efectos de los compuestos antioxidantes, además de depender de la dosis, parecen ser específicos para cada tejido.

Los estudios *in vivo* referentes al efecto de la ingesta de PRM sobre el sistema antioxidante enzimático son escasísimos en la bibliografía. Somoza y col., (2005), tras alimentar a ratas con dietas conteniendo corteza de pan, malta tostada y pronil-lisina, no encuentran cambios significativos en las enzimas detoxificantes (GST) en hígado, y solo observan aumentos en riñón con la

ingesta de corteza de pan. Los autores concluyen que, aunque se produce una mejora significativa del estatus antioxidante en general, a nivel de las defensas enzimáticas no se repiten los datos que obtenían en las células Caco-2, debido probablemente a transformaciones intestinales resultado de la degradación microbiana de estos compuestos. Según ensayos recientes de nuestro grupo de investigación, realizados en adolescentes sanos, la ingesta de dietas ricas en PRM no modifica la actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos, y sólo se observa un aumento (no significativo) de la GP_x (Seiquer y col., 2008).

El hecho de que algunas de las mezclas de glucosa-lisina sean capaces de aumentar la actividad de estas enzimas detoxificadoras cuando las células no están en una situación de estrés oxidativo, podría suponer que también son capaces de proteger a las células frente a un daño oxidativo inducido. Para comprobarlo, y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.5.2., (Material y Métodos), se midió la actividad CAT, SOD y GP_x de las células, tras su incubación con las mezclas de glucosa-lisina (1mg/ml, 3 horas) adicionadas de hierro 0,5 mM, cobre 10µM ó peróxido de hidrógeno 0,5mM.

4.3.2. Efectos de las mezclas de glucosa-lisina sobre la actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa en presencia de hierro o cobre

Es conocido que los metales de transición son inductores de la generación de radicales libres y pueden producir un daño oxidativo. Así, el daño oxidativo provocado por el hierro ha sido mostrado en las células Caco-2 (Nuñez y col., 2001), aunque tras periodos de incubación muy prolongados (5 días). Sin embargo, la respuesta celular de las defensas enzimáticas ante la presencia de hierro o cobre en la línea celular Caco-2 está escasamente estudiada. Algunos autores indican que el incremento de la concentración de radicales libres en una situación de estrés oxidativo puede causar una disminución de la actividad

enzimática (Escobar y col., 1996). Ciertamente, ensayos realizados en ratones muestran que dosis altas de hierro, administradas intraperitonealmente, producen descensos significativos en la actividad eritrocitaria de las principales enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GP_x (Koyu y col., 2005). Sin embargo, según los ensayos de Zödl y col., (2004), la actividad de la CAT y, en mayor medida, la de la GP_x, aumenta considerablemente en células Caco-2 tratadas con concentraciones crecientes de hierro (0-3mM, 24h), mientras que la de la SOD no se afecta (Zödl y col., 2004). Los ensayos realizados para estudiar el efecto del cobre sobre la actividad de las enzimas antioxidantes ofrecen resultados contradictorios. Algunos de ellos describen aumentos en la acción de dichas enzimas tras la exposición al cobre (Singh y col., 2007a; Kovacik y Backor, 2008), mientras que otros muestran descensos (Ji y col., 2007). Parece haber, además, una cierta selectividad del cobre según el tipo de tejido, ya que en ratas que ingirieron elevadas dosis de cobre la actividad de la SOD aumentó en hígado y en plasma pero descendió en cerebro (Ozcelik y Uzun, 2008). Ninguno de estos ensayos ha sido realizado en células Caco-2.

La respuesta de las enzimas de defensa antioxidante va a depender, por tanto, del modelo experimental y de las condiciones específicas utilizadas en cada estudio.

La incubación de las células Caco-2 con las concentraciones de hierro y cobre utilizadas en nuestros ensayos produjo una reacción, significativa en la mayoría de los casos, de las defensas enzimáticas, respecto a los valores basales. Así, la actividad de la CAT disminuyó (de forma mucho más patente en presencia de cobre), la de la GP_x no cambió y, la de la SOD aumentó drásticamente (**Tabla 40**).

	DMEM	Fe	Cu
CAT (seg⁻¹/mg proteína)	0,918 ± 0,170 ^a	0,697 ± 0,066 ^a	0,067 ± 0,031 ^b
SOD (U/mg proteína)	6,32 ± 0,46 ^a	29,24 ± 4,09 ^b	21,48 ± 1,28 ^b
GPx (U/mg proteína)	0,006 ± 0,001 ^a	0,011 ± 0,007 ^a	0,009 ± 0,003 ^a

Tabla 40. **Actividad enzimática catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa en presencia de DMEM, hierro y cobre**

Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma fila, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Se ha descrito que un aumento en la producción de radicales libres frecuentemente provoca, como mecanismo de defensa por parte de la célula, un aumento en los niveles de enzimas antioxidantes (Sies, 1993; Alía y col., 2005). Dicho aumento ante un insulto oxidativo, particularmente de la GP_x y la CAT, ha sido mostrado en cultivos celulares, como cultivos primarios de hepatocitos (Andres y Cascales, 2002) y en la línea celular HepG2 (Yoo y col., 1999), en la que la presencia de peróxidos lipídicos provoca un aumento generalizado y significativo de todas las enzimas antioxidantes (Alía y col., 2005). Ahora bien, también se han descrito descensos de las defensas enzimáticas antioxidantes en presencia de radicales libres, tanto *in vitro* (Kim y col., 2001) como en animales (Koyu y col., 2005). Parece ser que ante un flujo elevado y continuado de radicales en la célula, el estímulo inicial da paso a una inactivación de la enzima (o quizás a un agotamiento), que conduce a un proceso de daño oxidativo (Escobar y col., 1996). Según esta teoría, el aumento en la actividad SOD y GP_x, observado en nuestros experimentos en presencia de hierro y cobre, correspondería a un mecanismo de defensa de la célula ante la generación de radicales libres provocada por los metales de transición. La inactivación de la CAT, sobre todo en presencia de cobre, podría ser debida a que esta enzima “ya se ha consumido”. En apoyo de esta hipótesis existen datos que muestran que,

ante concentraciones crecientes de cobre, la actividad de la CAT primero aumenta pero luego disminuye (Ji y col., 2007).

La presencia de las mezclas de glucosa-lisina junto con los agentes oxidantes supuso cambios dispares en la actividad de las enzimas estudiadas. La incubación de las muestras de manera conjunta con el hierro indujo descensos en la acción de la CAT y la SOD, sin modificar la GP_x, respecto a los resultados obtenidos en presencia sólo del hierro. Al comparar con el cobre, sin embargo, las muestras restauraron la actividad de la CAT y aumentaron de manera drástica los niveles de SOD y de GP_x (**Fig. 53**).

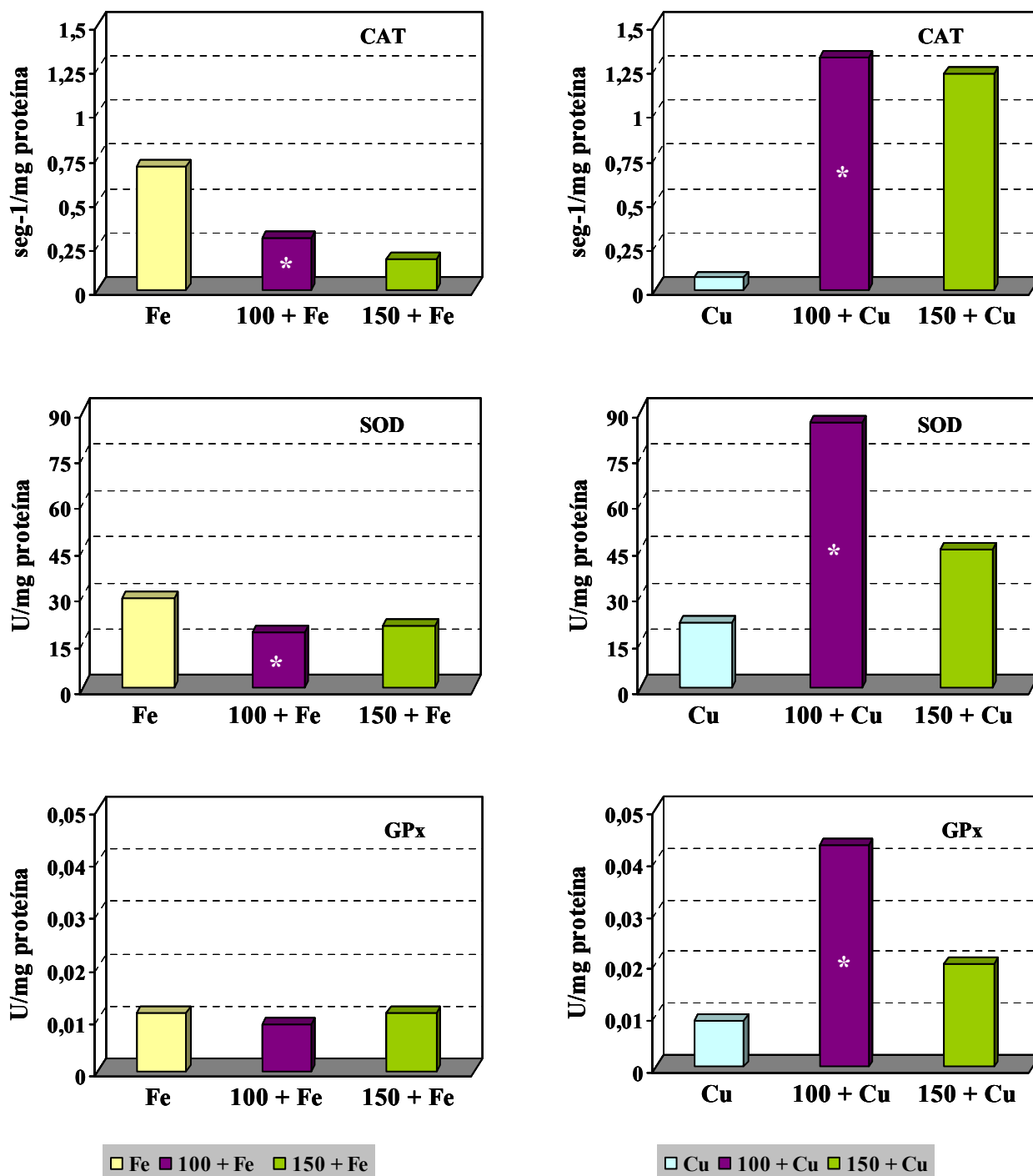


Figura 53. Niveles de actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C adicionadas de hierro o cobre

El * indica diferencias significativas entre temperaturas. Anova de dos vías y test de Duncan (P< 0,05).

4.3.3. Efectos de las mezclas de glucosa-lisina sobre la actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno

Diversos autores han utilizado peróxido de hidrógeno, u otros peróxidos, para estudiar *in vitro* la respuesta celular del sistema de defensa antioxidante en una situación de estrés oxidativo inducida. Algunos de estos trabajos han sido realizados en líneas celulares de origen hepático, las HepG2 (Alía y col., 2005) o intestinal, las Caco-2 (Bestwick y Milne, 1999; Wijeratne y col., 2005; Cilla y col., 2008). La incubación de las HepG2 con peróxido de hidrógeno 0,5mM (3h) no produjo cambios significativos en la actividad de la CAT ni de la SOD, y sólo se observaron ligeros aumentos en la GP_x (Alía y col., 2005), mientras que la presencia de t-BOOH indujo aumentos drásticos en todas las enzimas antioxidantes. Según estos autores, estas células son poco sensibles al efecto estresante del peróxido de hidrógeno al ser un producto que se genera de forma natural en ellas, y tienen un sistema muy eficaz para neutralizarlo. Los resultados obtenidos en las Caco-2 por otros autores muestran que la incubación con peróxido de hidrógeno 0,25mM (30min) induce aumentos en la CAT y la GP_x, y descensos en la actividad de la SOD (Wijeratne y col., 2005), mientras que otros han observado un incremento de ésta última tras la incubación con una concentración superior de peróxido de hidrógeno (5mM, 1h) (Cilla y col., 2008). Según nuestros resultados, las Caco-2 reaccionan ante la presencia de peróxido de hidrógeno 0,5mM (3h) aumentando la actividad SOD y GP_x, mientras que la CAT disminuye (no significativamente) respecto a los niveles basales (**Tabla 41**).

	DMEM	H ₂ O ₂
CAT (seg⁻¹/mg proteína)	0,918 ± 0,170 ^a	0,524 ± 0,067 ^a
SOD (U/mg proteína)	6,32 ± 0,46 ^a	26,53 ± 0,10 ^b
GPx (U/mg proteína)	0,006 ± 0,001 ^a	0,018 ± 0,004 ^b

Tabla 41. **Actividad enzimática catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa en presencia de DMEM y peróxido de hidrógeno**

Valores medios ± error estándar. (n = 3). Distintas letras, dentro de la misma fila, indican diferencias significativas (P < 0,05) (Anova de una vía y test de Duncan).

Una hipótesis para este comportamiento, puede ser, como se ha comentado para la presencia de hierro y cobre, que la CAT es la primera enzima que se gasta y que nuestras condiciones experimentales fueran de mayor concentración de peróxido de hidrógeno y más tiempo de incubación. Además, trabajos de otros autores han mostrado que la actividad de la CAT en las células Caco-2 es muy escasa, siendo significativamente inferior a la de la mucosa del colon y, por supuesto, a la de eritrocitos (Grisham y col., 1990), lo cual no ocurre con las otras enzimas. La inhibición de la actividad de la SOD en presencia de peróxido de hidrógeno descrita por algunos autores parece ser dependiente de la dosis y del tiempo de incubación (Symonyan y Nalbandyan, 1972; Bray y col., 1974); estudios en sistemas no celulares muestran un incremento de su actividad ante concentraciones de peróxido de hidrógeno comprendidas entre 250-1000 μM durante 15 minutos, mientras que un aumento del tiempo de exposición reduce dramáticamente su actividad (Jhonson y McDonald, 2004).

Es conocido que las enzimas antioxidantes interaccionan de forma sinérgica con el objetivo de protegerse entre ellas del ataque de los radicales libres (Bray y col., 1974; Sinet y Garber, 1981; Blum y Fridovich, 1985; Wang y col., 2008). La SOD protege a la CAT y a la GP_x, evitando su inactivación por los radicales superóxido (Blum y Fridovich, 1985), y a la vez, estas dos enzimas impiden la

inactivación de la SOD por la acción de los hidroperóxidos (Bray y col., 1974; Sinet y Garber, 1981). La actividad de cada enzima en un sistema biológico puede ser la suma de todos los efectos antagónicos y sinérgicos de otras enzimas y compuestos presentes en la célula (Wijeratne y col., 2005); por ejemplo, los hidroperóxidos lipídicos pueden descomponerse en presencia de otros radicales libres como el anión superóxido o de iones metálicos, formándose nuevos radicales peroxilo, hidroxilo y alcoxilo y la combinación de sus efectos puede determinar la actividad de las enzimas antioxidantes (Shaich, 1980). Las concentraciones de éstas enzimas están sujetas a regulación génica, de forma que aumentan rápidamente en respuesta a factores de transcripción que detectan cambios en el nivel de estrés oxidativo (Harris, 1992), ya que su función es la de disminuir la velocidad de inicio de las reacciones de los radicales libres para hacer que decrezcan sus concentraciones (Martínez-Cayuela, 2005). Por tanto, un descenso de su actividad hace a la célula más susceptible de ser atacada por los radicales libres (Wijeratne y Cuppett, 2007a).

El efecto de los PRM sobre las modificaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes en presencia de peróxidos está escasamente estudiado. Nuestros ensayos ofrecieron resultados muy dispares, ya que, en función de la muestra, la actividad de las tres enzimas aumentó, disminuyó o permaneció constante. En general, las muestras calentadas a 100°C indujeron aumentos en la CAT y descensos en la SOD, es decir, recuperaron parcialmente el efecto provocado por el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la presencia de las muestras calentadas a 150°C potenció las modificaciones observadas con el peróxido de hidrógeno, es decir, se observaron reducciones de la CAT y aumentos en la SOD. La actividad global de la GP_x no se afectó significativamente (**Fig. 54**).

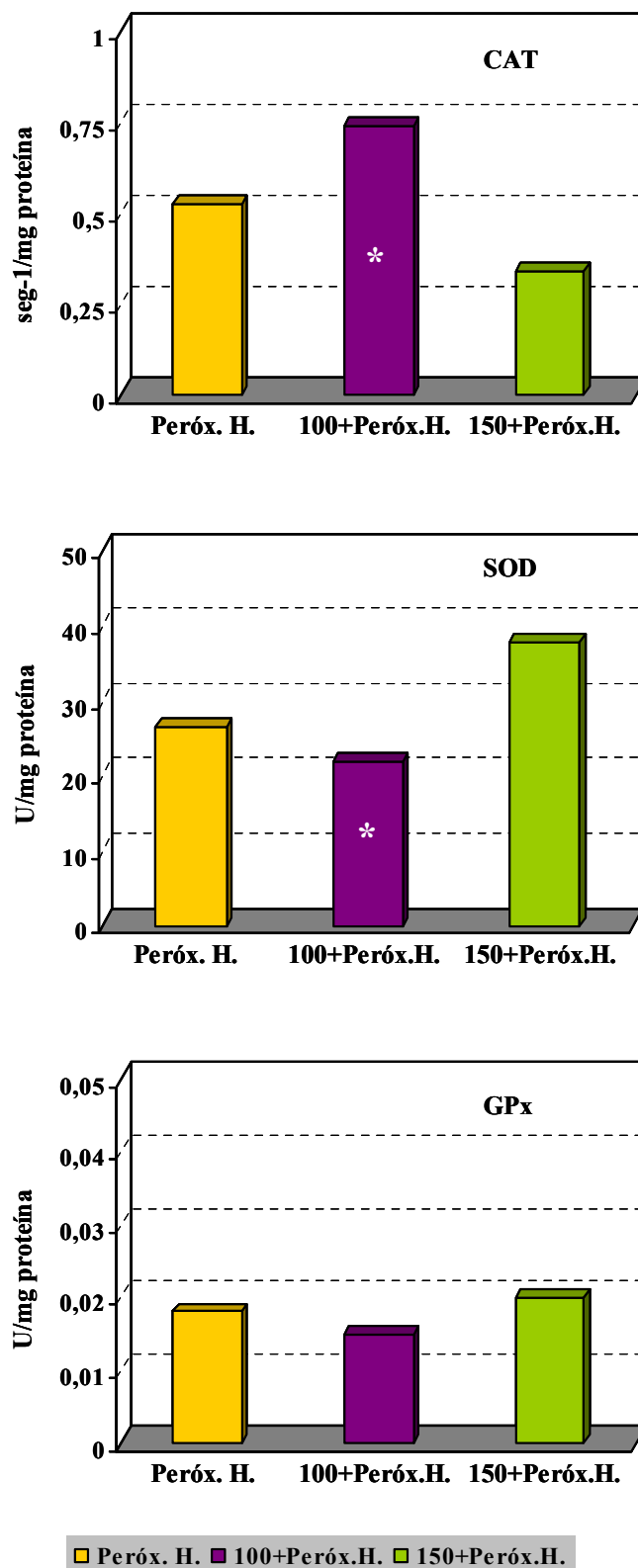


Figura 54. Niveles de actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C adicionadas con peróxido de hidrógeno

El * indica diferencias significativas entre temperaturas. Anova de dos vías y test de Duncan (P< 0,05).

Es de sobra conocido el efecto potenciador del peróxido de hidrógeno sobre el estrés oxidativo; así los compuestos capaces de contrarrestar sus efectos podrían ser considerados como potenciales antioxidantes, ya que reestablecen el equilibrio oxidativo y disminuyen el posible daño celular. Según esto y, como ya se ha apuntado varias veces a lo largo de esta memoria, los compuestos formados en las primeras etapas del proceso, es decir, los calentados a 100°C, se muestran potencialmente más beneficiosos de cara a la prevención del estrés oxidativo que los formados en las etapas más avanzadas.

No hay, que sepamos, estudios en Caco-2 referentes al efecto de PRM ante los cambios enzimáticos inducidos por peróxidos. Algunos autores han mostrado, en células HepG2, que las melanoidinas del café son capaces de contrarrestar el aumento en la actividad de la GP_x y la glutatión reductasa (GR) provocado por el t-BOOH (Goya y col., 2007), de forma similar a como lo hacen otros antioxidantes, como el flavonoide quercetina (Alía y col., 2006a), los polifenoles del aceite de oliva (Goya y col., 2007) o los del cacao (Martín y col., 2008). Dichos autores concluyen, por tanto, que las melanoidinas ensayadas protegen a las células frente a un insulto oxidativo mediante, entre otros factores, la modulación de la actividad de las enzimas antioxidantes. Los mecanismos moleculares por los que se produce esta protección no están actualmente establecidos.

5. INFLUENCIA DE LAS MEZCLAS DE GLUCOSA-LISINA EN LA ABSORCIÓN DE HIERRO Y COBRE

5.1. Ensayos de captación y transporte de hierro y cobre

Como ya se ha comentado, la habilidad de los PRM para quelar al hierro y al cobre puede tener un aspecto positivo en cuanto a que pueden retardar el inicio de muchas reacciones, catalizadas por estos metales, en las que se generan radicales libres y especies reactivas, pero, por otro lado, también podría afectar su biodisponibilidad. Para evaluar este efecto, se llevaron a cabo ensayos de captación y transporte en cultivos de células Caco-2, sistema que ha sido utilizado y validado para estudiar el metabolismo del hierro (García-Casal y col., 2000) y del cobre (Klomp y col., 2002) tanto de forma aislada como formando parte de algunos alimentos, como fórmulas infantiles (Jovani y col., 2001; 2004), carne y digeridos de caseína (Glahn y col., 1996), algunas algas (Puyfoulhoux y col., 2001), legumbres (Viadel y col., 2006), comidas completas (Au y Ready, 2000) e incluso dietas completas (Mesías, 2007).

Estas células, en cultivo, se diferencian en enterocitos maduros, desarrollando características morfológicas y funcionales similares a las del epitelio intestinal, como la polarización y formación del borde en cepillo de sus membranas y la presencia de enzimas implicadas en el proceso absortivo (Pinto y col., 1983; Hidalgo y col., 1989).

La validez de las células Caco-2 en los estudios de metabolismo del hierro ha sido demostrada en diversas publicaciones desde 1980. Estas células, sembradas en placas bicamerales, transportan hierro desde la cámara apical a la basolateral en un proceso que es dependiente de la valencia del hierro, la concentración y el estatus férrico de la propia célula (Álvarez-Hernández y col., 1991; Halleux y Scheider, 1994; Han y col., 1995), poseen proteínas como la transferrina y la ferritina (Halleux y Scheider, 1989) y expresan transportadores de hierro como el DMT-1 (Etcheverry y col., 2004). La captación del hierro en las Caco-2 se ve

afectada por componentes de la dieta que inhiben o mejoran su absorción en el epitelio intestinal, tales como fitatos, ácido ascórbico, carne, ácidos orgánicos y vitaminas (Han y col., 1995; García y col., 1996; García-Casal, 2000; Salovaara y col., 2002). Diversos estudios han demostrado que este modelo responde de forma muy parecida al epitelio intestinal humano, en cuanto a cambios en el pH del medio, en la concentración de hierro presente en el lumen intestinal y en la forma fisicoquímica en la que se encuentre el mineral (Álvarez-Hernández y col., 1991; Ekmekcioglu y col., 1996; Gangloff y col., 1996; García y col., 1996). Se ha demostrado, además, que existe una estrecha correlación entre los resultados obtenidos en estudios sobre la absorción de hierro *in vivo* en humanos y *ex vivo* en células Caco-2 (Au y Reddy, 2000).

Diversos trabajos, aunque no tantos como en el caso del hierro, avalan la validez de las Caco-2 para estudiar la absorción y metabolismo del cobre. Se ha mostrado que estas células, además de transportar cobre utilizando el DMT-1, poseen el transportador CTR-1, específico para el cobre (I), y expresan la metalotioneína (Tennant y col., 2002; Bauerly y col., 2004). Además, las Caco-2 son capaces de regular la homeostasis, controlando la absorción de cobre ante concentraciones variables del metal, siendo el transporte más sensible que la captación (Zerounian y col., 2003).

El estudio de la captación y transporte de hierro y cobre se realizó en placas bicamerales en las que tras 21 días de la siembra, las células se diferencian de manera que el polo o membrana apical se dirige hacia la cámara superior (cámara apical), y el polo basolateral, en contacto con la membrana porosa, hacia la cámara basolateral (García y col., 1996) (**Fig. 55**).

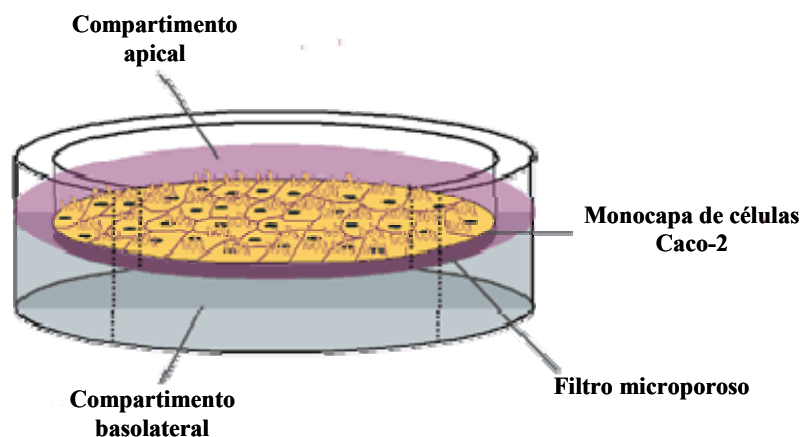


Figura 55. Representación de la monocapa de células Caco-2 desarrollada en los pocillos de las placas bicamerales Transwell (<http://www.cacoready.com>)

La existencia de fuertes uniones celulares que demuestran la integridad y la confluencia de la monocapa, se comprobó mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y el transporte del rojo fenol, como ya se ha indicado, obteniéndose valores para ambos parámetros que convertían a estas células en un modelo excelente para el estudio de la captación y transporte de hierro y cobre.

5.1.1. Hierro

La captación de hierro en las células Caco-2 se redujo drástica y significativamente en presencia de las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C con respecto al control (FeSO_4) (**Tabla 30a**). Este hecho podría atribuirse a la formación de complejos con el hierro, demostrada previamente en esta memoria (>80%) (**Tabla 8a**), a pesar de que no se observó una correlación estadística entre ambas variables, debido posiblemente a la ausencia de variación en el porcentaje de hierro quelado y captado por la célula entre las mezclas de glucosa-lisina calentadas a distintos tiempos.

Diversos compuestos de la dieta como el inositol hexafosfato, los polifenoles, los fitatos, los oxalatos y los taninos, conocidos como factores antinutritivos, forman directamente compuestos insolubles con el hierro convirtiéndolo, por tanto, en hierro no absorbible (Brune y col., 1989; 1992; Tutawiroon y col., 1991); sin embargo, cuando forman parte de alimentos y éstos son cocinados, los factores antinutritivos se destruyen parcialmente produciéndose un aumento de la biodisponibilidad mineral (Viadel y col., 2006). Por otra parte, el hierro puede formar complejos solubles con compuestos como la mucina, los ácidos orgánicos, ciertos aminoácidos y el EDTA, que impiden que precipite (Hazell y Johnson, 1987; Conrad y Umbreit., 1991; MacPhail y col., 1994; Perez-Llamas y col., 1997; Salovaara y col., 2002). Ahora bien, aunque es cierto que el hierro debe estar soluble para ser absorbido, solubilidad y absorción de hierro en el lumen intestinal no son necesariamente equivalentes, ya que la solubilidad no es el único factor implicado (Miller y Berner, 1989; Seiquer y col., 2002; Delgado-Andrade y col., 2004b). La afinidad de las proteínas transportadoras para unir al hierro, así como la tendencia del quelante para ceder el hierro, son también factores determinantes, sin olvidar que factores biológicos como el estatus férrico de la célula o del organismo pueden modificar la captación de hierro en respuesta a las demandas (Salovaara y col., 2002). Ciertos quelantes pueden acomplejar al hierro fuertemente y no permitir su liberación en los enterocitos, limitando por tanto, su absorción. Estudios *in vitro* han mostrado que el ácido cítrico y el EDTA tienen una elevada afinidad por el hierro férrico por lo que son donadores débiles del mineral, afectando negativamente su absorción (Narasinga-Rao y Subba-Rao, 1992), aunque *in vivo* se ha observado que ciertas dosis de EDTA mejoran la absorción de hierro (MacPhail y col., 1994). Estudios realizados en células Caco-2 muestran que, de diversos ácidos orgánicos ensayados, algunos (málico, tartárico) favorecen la captación de hierro por la célula, mientras que otros (cítrico, oxálico) la inhiben (Salovaara y col., 2002). Según estos autores, la estructura de los compuestos es decisiva para la liberación del hierro a la célula

del complejo soluble formado, siendo la presencia de grupos hidroxilo y carboxilo positiva respecto a la captación de hierro, ya que estos grupos se comportan como efectivos donadores del mineral a los enterocitos. Sin embargo, en nuestro caso, los PRM procedentes de las mezclas de glucosa-lisina se comportaron, al parecer, como quelantes de hierro tan potentes que el mineral no estaba disponible para su captación por las proteínas de membrana de las células Caco-2, lo que perjudicaría su entrega al transportador DMT-1 de la membrana apical de la célula y disminuiría, por tanto, su entrada en el enterocito. En ensayos realizados en células Caco-2, Glahn y col., (1996) mostraron que la captación de hierro en presencia de digeridos de caseína se reduce, a pesar de que su solubilidad es mayor, al comparar con otras fuentes de proteína como carne y pescado. Otros investigadores han sugerido que la capacidad de unir hierro de los productos de digestión de la caseína juega un papel importante en la reducción de la captación por el enterocito (Hurrell y col., 1989). Ya que la caseína es una proteína rica en lisina, este aminoácido podría ser en parte responsable de la formación de fuertes complejos con el hierro y de dificultar su cesión al enterocito. De hecho, nuestros datos mostraron una elevada capacidad de la lisina para quelar hierro (**Tabla 8a**) y, de forma paralela, una reducción de la captación celular del mineral en presencia de la lisina (**Tabla 30a**). Además, el calentamiento de las mezclas supuso, como ya se ha expuesto, reducciones en la lisina libre y, de forma paralela, ligeros aumentos del hierro captado, lo cual coincide con resultados previos (Delgado-Andrade y col., 2004b). Si el análisis estadístico se aplica sólo a las mezclas, sin considerar el control de FeSO₄, dicho aumento fue significativo para las muestras calentadas a 150°C, que eran las que contenían menos lisina libre residual (Ruiz-Roca y col., 2008). A pesar de ello, la cantidad de hierro captada puede no ser totalmente disponible para su utilización, ya que la mucosa intestinal se descama y renueva casi diariamente (Andrews y Schmidt, 2007).

El impacto de los compuestos quelantes en la captación de hierro está, por tanto, influenciado por multitud de variables como: el nivel y el tipo de los complejos formados, la solubilidad de los mismos, la fuerza del enlace entre el complejo y el metal, el estado de oxidación del mineral, la afinidad del complejo por el sistema de captación celular y la tendencia que tenga a donar el hierro o cobre a las proteínas transportadoras de membrana. Del mismo modo, el estado fisiológico de las células puede afectar la expresión de determinadas proteínas implicadas en la captación que, a la vez, puede estar modulada por señales internas de la propia célula y otras externas como los distintos componentes presentes en los alimentos de la dieta (Salovaara y col., 2002).

A pesar de la disminución de la cantidad de hierro captada por las células en presencia de las mezclas de glucosa-lisina, el transporte del mineral a través de la monocapa celular fue considerable y no varió significativamente con respecto a los valores obtenidos con el hierro solo a excepción de la muestra 100-15 con la que incrementó. Resultados similares se han obtenido en células Caco-2, en las que el transporte de hierro no se ve modificado tras la administración de dietas completas ricas y pobres en PRM (Mesías, 2007). En nuestro caso, lo más probable es que la mayor parte del hierro transportado a la cámara basolateral fuera hierro libre, no quelado por los PRM, que se habría movilizado transcelularmente. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que parte del hierro presente en la cámara basolateral, se hubiera transportado por vía paracelular como un quelato intacto constituido por hierro-PRM, de una forma similar a la propuesta para los complejos de hierro-EDTA (South y Miller, 1998; Kibangou y col., 2008), ya que se admite que cerca de un 10-15% del hierro total que se absorbe en condiciones fisiológicas, se realiza por esta vía (Cox y Peters, 1979; Peres y col., 1999). De hecho, mediante la medida de la absorbancia de las soluciones recogidas en la cámara basolateral, realizada para las mezclas de 150°C, pudimos confirmar que los compuestos tempranos e intermedios de la reacción fueron ciertamente absorbidos, ya que la absorbancia a 280nm aumentó

progresivamente con el tiempo de calentamiento de las muestras hasta alcanzar valores cercanos al 30% de recogida (**Fig. 35**). Sin embargo, la falta de correlación observada entre el porcentaje de absorbancia a 280nm y el transporte de hierro, sugiere que el transporte de los quelatos de Fe-PRM no fue la principal ruta de absorción de éste mineral. Los valores de absorbancia a 420nm fueron, por el contrario, muy bajos o indetectables en las soluciones recogidas (**Fig. 36**), lo que significaría un flujo insignificante de los productos avanzados de la reacción de acuerdo con otros autores que han encontrado en células Caco-2 valores de transporte de otros productos como la carboximetil-lisina, extremadamente bajos (Grundwald y col., 2006). Por otra parte, estos resultados concuerdan con estudios sobre el tránsito metabólico de los PRM realizados en ratas, que muestran que los compuestos de bajo peso molecular se absorben hasta en un 30%, mientras que los de alto peso molecular lo hacen en mucha menor medida (Finot y Magneat, 1981).

Se observó un efecto positivo de la glucosa sobre el transporte de hierro a través de la monocapa de células Caco-2 (**Tabla 30a**). En la misma línea, algunos investigadores han encontrado cifras aumentadas de absorción de hierro en ratas tras el consumo de dietas conteniendo glucosa, en las que la fuente de hierro era FeSO₄ (Brouwer y col., 1993).

Por tanto, a pesar de la elevada actividad quelante de hierro de las muestras, nuestros resultados no nos permiten establecer una correlación entre dicha actividad y sus propiedades antioxidantes, claramente demostradas a través de los diversos ensayos realizados, excepto para el efecto protector que ejercen a nivel celular ante la citotoxicidad inducida por hierro. Por otra parte, tampoco hemos encontrado significación estadística entre la quelación de hierro y las modificaciones observadas en la captación y transporte celular en presencia de las muestras. Sin embargo, sugerimos que la formación de complejos con hierro podría estar implicada en la reducción de la captación por el enterocito, lo cual

podría tener consecuencias negativas sobre la disponibilidad del hierro, especialmente ante un aumento de sus necesidades.

5.1.2. Cobre

Aunque, como se ha comentado, la línea celular Caco-2 es un modelo útil para el estudio del metabolismo del cobre (Klomp y col., 2002), contamos con poca información en relación al efecto que ejercen los productos de la reacción de Maillard sobre la absorción de éste mineral en cultivos celulares.

Nuestros resultados mostraron que la captación de cobre en presencia de todas las mezclas de glucosa-lisina calentadas a 100° y 150°C e incluso de la mezcla sin calentar, se redujo significativamente en comparación con el cobre solo (CuSO₄). Es conocido que ciertos compuestos de la dieta, como fitatos, fibra o ciertos taninos, son ligandos potenciales para el cobre y pueden, por tanto, afectar su biodisponibilidad (Jondreville y col., 2002). Poco se sabe, sin embargo, de los mecanismos que regulan la absorción de cobre a nivel intestinal y de la medida en que esta puede verse afectada por la formación de complejos solubles con otros compuestos presentes en la dieta. Se podría sugerir que, de forma parecida a lo descrito para el hierro, la reducción drástica en la captación celular de cobre puede ser atribuida, al menos en parte, a la formación de quelatos Cu-PRM, que cederían difícilmente el cobre a los transportadores del borde en cepillo de la células intestinales. Algunos autores han descrito que la presencia de compuestos como el ácido ascórbico reduce la captación de cobre en células Caco-2, efecto que atribuyen a la capacidad de este compuesto para reducir el cobre (II) a cobre (I), cuya absorción es minoritaria (Ferruzza y col., 2000). Ya que diversos trabajos han mostrado el poder reductor de los PRM, (Yoshimura y col., 1997; Delgado-Andrade y col., 2005a; Rufián-Henares y Morales, 2007) esta habilidad podría afectar negativamente a la captación de cobre, de forma parecida a lo mencionado para otros compuestos. A pesar de ésta reducción observada en la captación, el transporte de cobre mejoró durante la

incubación con las mezclas calentadas durante 15 y 30 minutos, que precisamente fueron las que quelaban mayor proporción de cobre, y disminuyó posteriormente conforme avanzaba el tiempo de calentamiento (Tabla 31a y Fig. 56).

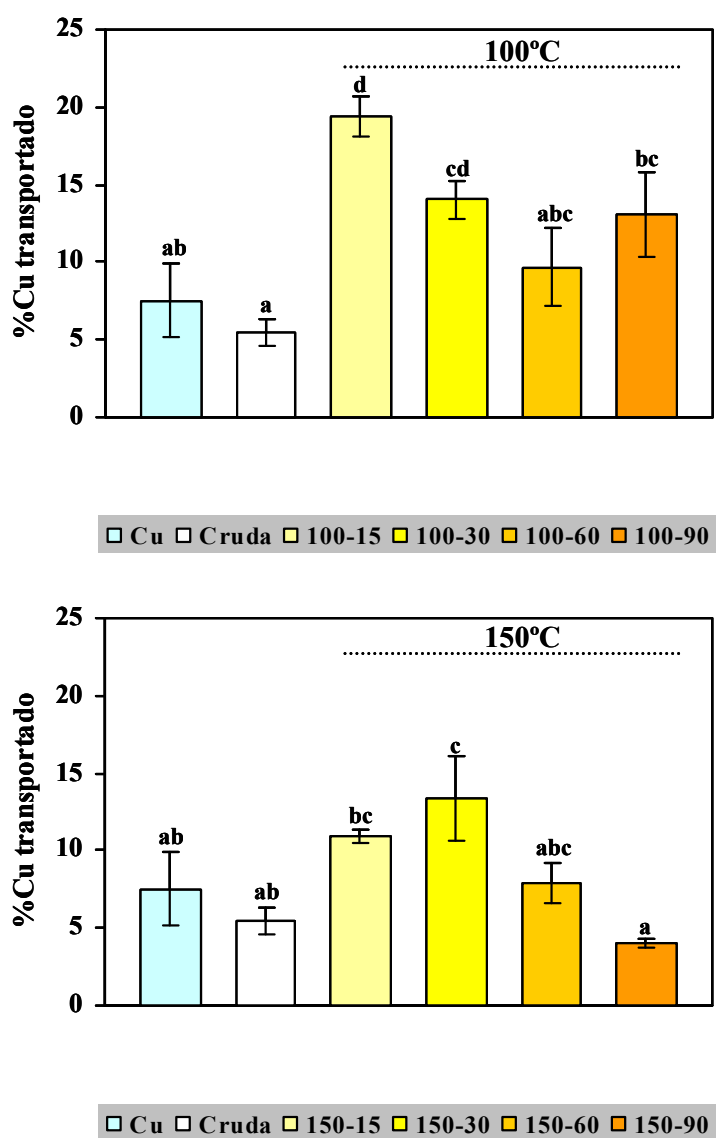


Figura 56. Porcentaje de cobre transportado a la cámara basolateral en presencia de las mezclas de glucosa-lisina cruda y calentadas a 100° y 150°C

Valores medios ± error estándar (n=4). Distintas letras indican diferencias significativas. Anova de una vía y test de Duncan (P < 0,05).

En nuestras condiciones experimentales y, a pesar de que la lisina también quelaba cierto porcentaje de cobre, su presencia no indujo aumentos en la absorción del elemento a través de la monocapa de células, a pesar de que los complejos Cu-lisina han sido utilizados en nutrición animal para mejorar la absorción de cobre, ya que se les atribuye una biodisponibilidad del 120% comparada con el CuSO_4 (Aoyagi y Baker, 1994; Guo y col., 2001). Otros autores, sin embargo, no encuentran diferencias en la absorción o retención de cobre a partir de CuSO_4 o de Cu-lisina (Apgar y Kornegay, 1996).

De forma similar a lo descrito para el hierro, dentro del grupo de las mezclas calentadas a mayor temperatura, los valores del porcentaje de absorbancia medida a 280nm de las soluciones recogidas en la cámara basolateral indican que proporciones considerables de los complejos tempranos e intermedios (37-48%) han atravesado la monocapa de células, excepto en la mezcla 150-15 (**Fig. 37**). Parte del cobre absorbido podría ir, por tanto, ligado a estos complejos, e incluso a los de alto peso molecular, que en el caso de la muestra 150-30 se absorben en mayor medida (18,68%) que el resto de mezclas (**Fig. 38**), coincidiendo con las cifras de absorción de cobre significativamente superiores encontradas en presencia de esta muestra (**Tabla 31a**). De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito que ciertos ácidos orgánicos, como el cítrico, mejoran la biodisponibilidad del cobre mediante la formación de complejos solubles altamente absorbibles (Wapnir, 1998). De hecho, en nuestros ensayos existió una correlación positiva entre la capacidad quelante de cobre y el mineral transportado a la cámara basolateral ($p= 0,0041$; $r= 0,5642$). Parece ser, por tanto, que la presencia de las mezclas calentadas durante tiempos moderados favoreció la absorción de cobre a través de las células intestinales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en ensayos realizados en ratas, en los que se mostró que el consumo de dietas adicionadas con PRM procedentes de mezclas de glucosa-lisina y glucosa-metionina daba lugar a aumentos en la cantidad de

cobre absorbido y a su acumulación en diversos órganos (Delgado-Andrade y col., 2001a).

En resumen, la capacidad para quelar cobre está, según nuestros datos, estrechamente involucrada en las propiedades antioxidantes de las muestras, concretamente en la capacidad para neutralizar radicales libres y en la prevención del daño citotóxico inducido. Dicha habilidad da lugar, además, a modificaciones en la absorción de cobre a través del enterocito. Ahora bien, las consecuencias fisiológicas del incremento de la absorción de cobre, atribuido a la presencia de PRM, merecen ser objeto de estudio, ya que, aunque su quelación puede ser beneficiosa a nivel del estrés oxidativo, un exceso del mineral en el organismo podría resultar tóxico (Linder y Hazegh-Azam, 1996).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los productos de la reacción de Maillard (PRM) o de pardeamiento no enzimático son ampliamente consumidos en la dieta habitual ya que, en la mayoría de los casos, proporcionan características organolépticas agradables para el consumidor. Además, pueden tener repercusiones nutricionales, como sus efectos sobre la utilización de la proteína o de los minerales de la dieta. Uno de los aspectos positivos más interesantes de los PRM es la actividad antioxidante, ya que el estrés oxidativo está implicado en multitud de patologías y en procesos como el envejecimiento. Los mecanismos de acción por los que actúan de esta forma todavía son desconocidos pero, el hecho de que se comporten como polímeros aniónicos capaces de quelar metales como el hierro y el cobre, implicados en reacciones de oxidación, podría estar involucrado. Se han propuesto, además, otras vías de actuación como la neutralización de radicales libres o la modulación de la actividad de ciertas enzimas antioxidantes implicadas en procesos de detoxificación. Ahora bien, la quelación de metales implicados en la generación de radicales libres por parte de los PRM, además de los efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo, podría suponer ciertas modificaciones de la absorción mineral, alterándose la biodisponibilidad y el metabolismo de ciertos nutrientes minerales en el organismo.

El objeto del presente trabajo fue evaluar *in vitro* y *ex vivo* la capacidad antioxidante de compuestos de la reacción de Maillard procedentes de un sistema modelo aminoácido-azúcar y, estudiar además, si ésta capacidad estaba relacionada con su habilidad quelante de hierro y cobre y si afectaba de algún modo la captación y el transporte intestinal de dichos minerales. Se analizó el efecto de las condiciones de la reacción (temperatura y tiempo) sobre los resultados obtenidos. Para estudiar la respuesta a nivel celular de las modificaciones sobre el estrés oxidativo y sobre la absorción mineral, se utilizó la línea celular Caco-2.

Los datos obtenidos nos permiten formular las siguientes conclusiones:

- 1^a. Los productos obtenidos tras el calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina son capaces de prevenir, en gran medida, la peroxidación lipídica *in vitro*, de forma comparable a la vitamina C y E. Esta capacidad se ve favorecida por la duración e intensidad del tratamiento térmico y aumenta con la dosis hasta alcanzar un máximo. Por tanto, podría sugerirse el uso de estos derivados como antioxidantes alimentarios teniendo en cuenta la adecuación de la dosis.
- 2^a. La capacidad de las mezclas de glucosa-lisina para neutralizar radicales libres disminuye con la intensidad del tratamiento térmico y con el aumento de la concentración, de forma que calentamientos drásticos de las muestras ó concentraciones elevadas podrían dar lugar a efectos prooxidantes.
- 3^a. Todas las mezclas ensayadas son capaces de quelar hierro y también, aunque en menor medida, cobre. La formación de complejos con cobre muestra una correlación estadística con la capacidad para neutralizar radicales libres, por lo que estaría implicada en el poder antioxidante de estos productos.
- 4^a. Las mezclas calentadas durante menos tiempo son capaces de prevenir el efecto citotóxico inducido por hierro y cobre, pero no el generado por el peróxido de hidrógeno. De esto se deduce que la capacidad quelante de metales, especialmente la del cobre, está nuevamente implicada en las propiedades antioxidantes de las muestras.
- 5^a. Al igual que se observa *in vitro*, las mezclas de glucosa-lisina reducen la peroxidación lipídica a nivel celular, en condiciones basales y tras un daño oxidativo inducido. Este efecto parece estar relacionado con la modulación que ejercen los productos de la reacción de Maillard en la

actividad de las enzimas antioxidantes, especialmente de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa.

- 6^a. La presencia de las mezclas de glucosa-lisina reduce la captación de hierro y cobre por el enterocito, probablemente por su capacidad quelante. Sin embargo, el transporte de hierro a través de la célula apenas no se modifica, y el del cobre incluso aumenta en presencia de las muestras menos procesadas. Dichos cambios podrían alterar la disponibilidad de ambos minerales.

CONCLUSIÓN GENERAL

Las mezclas de glucosa-lisina ensayadas muestran claras propiedades antioxidantes en todos los ensayos realizados, tanto *in vitro* como a nivel celular. El modo por el cual ejercen su acción parece ser una combinación de varios mecanismos, ya que están implicadas las propiedades quelantes de metales (especialmente de cobre), la neutralización de radicales libres y la promoción de la actividad de enzimas antioxidantes. Por otra parte, la presencia de dichas muestras supone cambios que podrían afectar la biodisponibilidad mineral. El procesado en condiciones suaves y las dosis moderadas de PRM se muestran más beneficiosos para la prevención del estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abboud S, Haile DJ (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 257, 19906-19912.
- Absi E, Ayala A, Machada A, Parrado J (2000). Protective effect of melatonin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced inhibition of Complex I of the mitochondrial respiratory chain. *J. Pineal Res.* 29, 40-47.
- Abu-Dweih BM, Tukan SK, Takruri HR (2000). The effect of browning intensity on the protein quality of qurshallah. *Inter. J. Food Sci. Nutr.* 6, 483-488.
- Addis PB (1986). Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem. Toxicol.* 24, 1021-1030.
- Adikari HR, Tappel AL (1973). Fluorescent products in a glucose-glycine browning reaction. *J. Food Sci.* 38, 486-492.
- Adrian J (1974). Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. *World Rev. Nutr. Diet.* 9, 71-122.
- Adrian J (1982). The Maillard Reaction. In: *Handbook of Nutritive Value of processed Food*. Rechcigl M Jr., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, I, 529-608.
- Andrieux C, Saquet F (1984). Effects of Maillard's reaction products on apparent mineral absorption in different parts of the digestive tract. The role of microflora. *Reprod. Nutr. Dev.* 23, 379-386.
- Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Aguiló A, Tauler P, Pilar Guix M, Villa G, Córdova A, Tur JA, Pons A (2003). Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J. Nutr. Biochem.* 14, 6, 319-325.
- Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A, Pons A (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol. Behav.* 84, 1, 1-7.

Ahmad I, Alaiz M, Zamora R, Hidalgo FJ (1996). Antioxidative activity of lysine/13-hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadienoic acid reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3946-3949.

Ajandouz EH, Puigserver A (1999). Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1786-1793.

Ajandouz EH, Tchiakpe LS, Dalle-Ore F, Benajiba A, Puigserver A (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model system. *J Food Sci.* 66, 926-931.

Alais C, Linden G (1990). *Manual de Bioquímica de los Alimentos*. Masson. Barcelona.

Alía M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L (2005). Response of the antioxidant defense system to t-Butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 119-128.

Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L (2006a). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur. J. Nutr.* 45, 19-28.

Alía M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L (2006b). Quercetin protects human hepatoma cell line (HepG2) against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharm.* 212, 110-118.

Alkanhal Ha, Al-Othman AA, Hewedi FM (2001). Changes in protein nutritional quality in fresh and recombined ultra high temperature treated milk during storage. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 52, 509-514.

Alleman MA, Koster JF, Wilson JHP, Edixhoven-Bosdijk A, Slee RG, Kross MJ, Eijk HG (1985). The involvement of iron and lipid peroxidation in the pathogenesis of HCB-induced porphyria. *Biochem. Pharmacol.* 34, 161-166.

Allen LH, Ahluwalia N (1997). Improving iron status through diet: the application of knowledge concerning dietary iron bioavailability in human populations. USA. The USAID Micronutrient Program (MOST). Junio, 1997.

Álvarez-Hernández X, Nichols G, Glass J (1991). Caco-2 cell line: a system for studying iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 110, 205-208.

Amadori M (1925). Products of condensation between glucose and p-phenetidine. *Atti de lla Accademia Nazionale dei Lincei* 2, 337-345.

Ames JM (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends Food Sci. Technol.* 1, 150-154.

Ames JM, Wynne A, Hofmann A, Plos S, Gibson G (1999). The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 82, 489-495.

Ames JM, Guy RCE, Kipping GJ (2001a). Effect of pH and temperature on the formation of volatile compounds in cysteine/reducing sugar/starch mixtures during extrusion cooking. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1885-1894.

Ames JM, Guy RCE, Kipping GJ (2001b). Effect of pH and temperature, and moisture on the formation of volatile compounds in glycine/glucose model systems. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4315-4323.

Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P (1997). Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 43, 562-568.

Anderson Y, Hedlund B (1990). Extruded wheat flour: correlation between processing and product quality parameters. *Food Qual. Prefer.* 2, 201-216.

Anderson GJ, Frazer DM (2005). Recent advances in intestinal iron transport. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 7, 365-372.

Andres D, Cascales M (2002). Novel mechanism of vitamin E protection against cyclosporine A cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 64, 267-276.

Andrews NC, Bridge KR (1998). Disorders of iron metabolism and sideroblastic anemia. En: Nathan and Oski's *Hematology of infancy and childhood*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 423-461.

Andrews NC (1999). Disorders of iron metabolism. *New Engl. J. Med.* 341, 1986-1995.

Andrews NC, Schmidt PJ. (2007). Iron homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 69-85.

Andriot I, Quéré JL, Guichard E (2004). Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chem.* 85, 289-294.

Anese M, Manzoco L, Nicoli MC, Lericci CL (1999a). Effects of drying processing on the Maillard reaction in pasta. *J. Sci. Food Agr.* 79, 750-754.

Anese M, Nicoli MC, Massini R, Lericci CL (1999b). Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *Food Res. Int.* 32, 193-199.

Anese M, Manzocco L, Nicoli MC, Lericci CR (1999c). Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *J. Sci. Food Agr.* 79, 750-754.

Anet EFL (1959). Chemistry of non-enzymic browning. VII. Crystalline Di-D-fructose glycine and some related compounds. *Aust. J. Chem.* 12, 280-287.

Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Venushkin GM, Vinogradova IA (2006). Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757, 573-589.

Aniya Y, Nieto A (1993). Oxidative stress induced activation of microsomal glutathione 5-transferase in isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 45, 1, 37-42.

- Antunes F, Barclay LR, Ingold KU, King M, Norris JQ, Scaiano JC, Xi F (1999). On the antioxidant activity of melatonin. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 117-128.
- Aogayi S, Baker DH (1994). Copper-amino acid complexes are partially protected against inhibitory effects of L-cysteine and L-ascorbic acid on copper absorption in chicks. *J. Nutr.* 124, 388-395.
- Apgar GA, Kornegay ET (1996). Mineral balance of finishing pigs fed copper sulfate or a copper-lysine complex at growth-stimulating levels. *J. Anim. Sci.* 74, 1594-1600.
- Apriyantono A, Ames JM (1993). Xylose-lysine model system. The effect of pH on the volatile reaction products. *J. Sci. Food Agr.* 61, 477-484.
- Arendt J (1995). *Melatonin and the mammalian pineal gland.* Chapman & Hall, London.
- Arguiñano K (1997). 1069 recetas. Asegarce S.A. y Ed. Debate S.A.
- Arredondo M, Muñoz P, Mura C, Núñez MT (2003). DMT1, a physiologically relevant apical Cu^{+1} transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol.* 284, C1525-C1530.
- Arredondo M, Núñez MT (2005). Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* 26, 313-327.
- Arredondo M, Martínez R, Núñez MT, Ruz M, Olivares M (2006). Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol. Res.* 39, 95-102.
- Aruoma OI, Murcia A, Butler J, Halliwell B (1993). Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1880-1885.
- Ashoor SH, Zent JB (1984) The Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.* 49, 1206-1207.

Au AP, Reddy MB (2000). Caco-2 cells can be used to assess human iron bioavailability from a semipurified meal. *J. Nutr.* 130, 1329-1334.

Aust SD, Svingen BA (1982). The role of iron in enzymatic lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* 5, 1-28.

Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1, 1, 3-25.

Aust SD (1989). Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Dieta.* 43, 266-277.

Austad, SN (1997). *Why we age*; John Wiley & Sons: New York, pp. 256.

Aw TY (1998). Determinants of intestinal detoxication of lipid hydroperoxides. *Free Rad. Res.* 28, 637-646.

Aw TY (1999). Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 557-565.

Babiker EFE, Matsudome N, Kato A (1998). Masking of antigen structure of soybean protein by conjugation with polysaccharide and cross-linkage with microbial transglutaminase. *Nahrung.* 42, 158-159.

Babior BM (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73, 599-601.

Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS, Kristensen L, Purslow PP, Skibsted LH, Sandstrom B (2003). Nonheme iron absorption from a phytate rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 173-179.

Bailey JR, Ames JM, Monti SM (1996). An analysis of the non-volatile reaction products of aqueous Maillard model system at pH 5, using reversed-phase HPLC with diode-array detection. *J. Sci. Food Agric.* 72, 97-103.

Baisier WM, Labuza TP (1992). Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J. Agric. Food Chem.* 40, 707-713.

Baker DH, Czarnecki-Maulden GL (1987). Pharmacologic role of cysteine in ameliorating or exacerbating mineral toxicities. *J. Nutr.* 117, 1003-1010.

Baker SS, Baker RD (1992). Antioxidant enzymes in differentiated Caco-2 cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28, 643-647.

Baltes W (1982). Chemical changes in food by the Maillard reaction. *Food Chem.* 9, 59-73.

Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Eurochem. Int.* 26, 497-502.

Barrow L, Tanner MS (1988). Copper distribution among serum proteins in paediatric liver disorder and malignancies. *Eur. J. Clin. Invest.* 18, 555-560.

Basu TK, Dickerson JWT (1996). *Vitamins in human health and disease*. CABI Publs. London.

Bates L, Ames JM, MacDougall D, Taylor PC (1998). Laboratory reaction cell to model Maillard color development in a starch-glucose-lysine system. *J. Food Sci.* 63, 991-996.

Bauerly KA, Kelleher AL, Lönnnerdaol B (2004). Functional and molecular responses of suckling rat pups and human intestinal Caco-2 cells to copper treatment. *J. Nutr. Biochem.* 15, 155-162.

Baxter JH (1995). Free amino acid stability in reducing sugar system. *J. Food Sci.* 60, 405-408.

Baynes JW, Monnier VM (1989). *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*. A. R. Liss, New York. pp. 123-139.

Bedinghaus AJ, Ockerman HW (1995). Antioxidative Maillard reaction products from reducing sugar and free amino acids in cooked ground pork patties. *J. Food Sci.* 60, 992-995.

Behall KM, Sholfield DJ, Lee J, Powell AS, Moser PB (1987). Mineral balance in adult men: effect of four refined fibers. *Am. J. Clin. Nutr.* 46, 307-314.

Benjakul S, Lertittikul W, Bauer F (2005). Antioxidant activity of Maillard reactions products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Food Chem.* 93, 189-196.

Benzing-Purdie LM, Ripmeester JA, Ratcliffe CI (1985). Effects of temperature on Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 33, 31-33.

Berg HE, Van Boekel MAJS (1994). Degradation of lactose during heating of milk. Reactions pathways. *Neth. Milk Dairy J.* 48, 157-175.

Bergmann R, Helling R, Heichert C, Scheunemann M, Mading P, Wittrisch H, Johannsen B, Henle T (2001). Radio fluorination and positron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N-epsilon-carboxymethyllysine (CML) and N-epsilon-carboxyethyllysine (CEL). *Nahrung/Food.* 45, 182-188.

Bersuder P, Hole M, Smith G (1998). Antioxidants from a heated histidine and histidine-glucose model system. I. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 181-187.

Bersuder P, Hole M, Smith G (2001). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. Investigation of the copper (II) binding ability. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 11, 1079-1082.

Berthon G, Hatch B, Blais MJ, May PM (1986). Copper-histidine ternary complex equilibrium with glutamine asparagine and serine. The implications for computer-

simulated distributions of copper (II) in blood plasma. *Inorg. Chim. Acta.* 125, 219-227.

Bestwick CS, Milne L (1999). Effects of beta-carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 6, 1474, 1, 47-55.

Betahhi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo A, Guerrero JM (1996). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase activity in the rat hypothalamus. *J. Pineal Res.* 20, 205-210.

Biemel KM, Lederer MO (2003). Site-specific quantitative evaluation of the protein glycation product N⁶-(2, 3-dihydroxy-5,6-dioxohexyl)-L-lisinate by LC-(ESI)-MS peptide mapping. Evidence for its key role in AGE formation. *Bioconjugate Chem.* 14, 619-628.

Björck I, Noguchi A, Asp NG, Cheftel JC, Dahlqvist A (1983). Protein nutritional value of a biscuit processed by extrusion cooking: effects on available lysine. *J. Agric. Food Chem.* 31, 488-492.

Blair IA (2001). Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Exp. Gerontol.* 36, 1473-1481.

Blake DR, Rallen RE, Lunec J (1987). Free radicals in biological systems: a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.* 45, 371-385.

Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C (2000). Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxyxynitrite. *J. Pineal Res.* 29, 184-192.

Bleumik E, Young E (1968). Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 34, 6, 521-543.

Blum D, Fridovich I (1985). Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 500-508.

- Blum D, Torch S, Nissou MF, Banabib AL, Verna JM (2000). Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 283, 193-196.
- Bogen KT (1994). Cancer potencies of heterocyclic amines found in cooked foods. *Food Chemical. Toxicol.* 32, 505-515.
- Boobis AR, Lynch AM, Murray S, de la Torre R, Solans A, Farré M, Segura J, Gooderham NJ, Davies DS (1994). CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res.* 54, 89-94.
- Borevis A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707-716.
- Borevis A, Cadena E (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. *FEBS Letters.* 54, 311-314.
- Borrelli RC, Fogliano V, Monti SM, Ames JM (2002). Characterization of melanoidins from a glucose-glycine model system. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 210-215.
- Borrelli RC, Esposito F, Napolitano A, Ritieni A, Fogliano V (2004). Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1338-1343.
- Borrelli RC, Fogliano V (2005). Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 673-678.
- Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, Finch CA (1979). Iron metabolism in man. London: Blackwell Scientific. pp. 255-256.
- Bracci R (1992). Calcium involvement in free radical effects (editorial). *Calcif. Tissue Int.* 51, 401-405.

Brands CMJ, Alink GM, Van Boekel MAJS, Jongen WMF (2000). Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2271-2275.

Brands CMJ, Van Boekel MAJS (2002). Kinetic modelling of reactions in heated monosaccharide-casein systems. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6725-6739.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wis U-Technol.* 28, 25-30.

Bray RC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G, Calabrese L (1974). Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 139, 43-48.

Bray TM y Bettger WJ (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free. Radic. Biol. Med.* 8, 281-291.

Bredie WLP, Mottram DS, Guy RCE (1998). Aroma volatiles generated during extrusión cooking of maize flour. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1479-1487.

Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO (1999). Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica.* 29, 1227-1240.

Bressa F, Tesson N, Rosa MD, Sensidoni A, Tubaro F (1996). Antioxidant effect of Maillard reaction products: application to a butter cookie of a competition kinetics analysis. *J. Agric. Food Chem.* 44, 692-695.

Brewer GJ, Dick RD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Tankanow R, Young AB, Kluin KJ (1991). Initial therapy of patients with Wilson's disease with tetrathiomolybdate. *Arch. Neurol.* 48, 42-47.

Brezova V, Valko M, Breza M, Morris H, Telser J, Dvoranova D, Kaseirova K, Varecka L, Mazur M, Leibfritz DJ (2003). Role of radicals and singlet oxygen in

photoactivated DNA cleavage by the anticancer drug camptothecin: an electron paramagnetic resonance study. *J. Phys Chem. B.* 107, 2415-2425.

Bristow M, Isaacs NS (1999). The effect of high pressure on the formation of volatile products in a model Maillard reaction. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2213-2218.

Brouwer IA, Lemmens AG, Beyne AC (1993). Dietary fructose v. glucose lowers ferrous-iron absorption in rats. *Br. J. Nutr.* 70, 171-178.

Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 330, 1173-1178.

Brune M, Rossander L, Hallberg L (1989). Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43, 547-557.

Brune M, Rossander-Hultén L, Hallberg L, Gleerup A, Sandberg AS (1992). Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.* 122, 442-449.

Bucala R, Makita E, Koschinsky T, Cerami A, Vassara H (1994). Advanced glycosylation of LDL: role in oxidative modification and diabetic complications. In: T.P. Labuza, G.A. Reineccius, V. Monnier, J. O'Brien, J. Baynes (Eds.). *Maillard reactions in chemistry, food and health*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park.

Buege J, Aust SD (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 305-310.

Buetler T, Baumeyer A, Hegel J, Latado H, Delatour T (2008). Bioavailability of four different AGEs in the rat. *Cost 927- Thermally Processed Foods: Possible health implications*. Working Groups Meeting, Granada, Spain. pp. 35-36.

- Buffle J (1998). Complexation reactions in aquatic systems. Chichester: Ellis Horwood. pp. 642-648.
- Bull PC, Cox DW (1994). Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.* 10, 246-252.
- Bunn HF, Higgins PJ (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science.* 213, 222-224.
- Burkitt MJ (2001). A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 117-135.
- Burton GW, Ingold KU (1984). Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* 224, 569-573.
- Burton H (1984). Reviews of the progress of dairy science: the bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150° C. *J. Dairy. Res.* 51, 341-363.
- Burton G, Traber MG (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Ann. Rev. Nutr.* 10, 357-382.
- Byers T (1993). Vitamin E supplements and coronary heart disease. *Nutr. Rev.* 51, 333-345.
- Cadenas E (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 79-110.
- Cai Q, Wei H (1996). Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr. Cancer.* 25, 1-7.
- Calligaris S, Manzocco L, Anese M, Nicoli MC (2004). Effect of heat-treatment on the antioxidant activity of milk. *Int. Dairy J.* 14, 421-427.

Cammerer B, Kroh LW (1995). Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidin. *Food Chem.* 53, 55-59.

Cardoso N, Galleano M. *Physical Chemistry. Metales y estrés oxidativo*. PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. <http://www.antioxidantes.com>.

Carlin JT (1983). *French fry flavour project*. New Brunswick, NJ: Rutgers University.

Carpenter C, Mahoney A (1992). Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31, 333-367.

Casanueva E, Viteri FE (2003). Iron and oxidative stress in pregnancy. *J. Nutr.* 133, 1700S-1708S.

Castrillón AM, Navarro MP, García-Arias MT (1996). Tuna protein nutritional quality changes after canning. *J. Food. Sci.* 61, 1250-1253.

Ceraulo L, Ferrugia M, Tesoriere L, Segreto A, Livrea MA, Liveri TV (1999). Interactions of melatonin with membrane models: partitioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles. *J. Pineal Res.* 26, 108-112.

Cerny C, Dadivek T (2003). Formation of aroma from ribose and cysteine during the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2714-2721.

Cerny C (2008). The aroma side of the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1126, 66-71.

Cerutti PA (1985). Prooxidant states and tumor promotions. *Science.* 227, 375-381.

Chan RIM, Stich HF, Rosin MP, Powrie WD (1979). Antimutagenic activity of browning reaction products. *Cancer Lett.* 15, 27-33.

Chan PC, Peller OG, Kesner L (1982). Copper (II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membrane. *Lipids.* 17, 331-337.

Chan F, Reineccius A (1994). The reaction kinetics for the formation of isovaleraldehyde, 2-acetyl-1-pyrrolone, di(H)di(OH)-6-methylpyranone, phenylacetaldehyde, 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal and 2-acetylfuran in model systems. In: TP Labuza, GA Reineccius, V Monnier, J O'Brien and J Baynes (Eds.). *Maillard reactions on chemistry, food and health*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. pp. 131-139.

Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 577-605.

Chanock SJ, El BJ, Smith RM, Babior BM (1994). The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 24519-24522.

Chawla SP, Chander R, Sharma A (2007). Antioxidant formation by γ -irradiation of glucose-amino acid model system. *Food Chem.* 103, 1297-1304.

Cheeseman KH (1993). Lipid peroxidation and cancer. In: *DNA and Free Radicals*. Halliwell B y Aruoma OI (Eds). Ellis Horwood. New York. pp. 109-144.

Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Brit. Med. Bull.* 49, 3, 481-493.

Chelly J, Tümer Z, Tønnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, Monaco AP. (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat. Genet.* 3, 14-19.

Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B (2002). Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicol. Sci.* 69, 149-156.

Chen XM, Kitts DD (2008). Antioxidant activity and chemical properties of crude and fractionated Maillard reaction products derivated from four sugar-amino acid Maillard reaction model systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1126, 220-224.

Cherukuri S, Potla R, Sarkar J, Nurko S, Harris ZL, Fox PL (2005). Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell Metab.* 2, 309-319.

Chevalier F, Chobert JM, Genot C, Haertle T (2001a). Scavenging of free radicals, antimicrobial and cytotoxic activities of the maillard reaction products of beta-lactoglobulin glycosylated with several sugars. *J. Agric. Food Chem.* 49, 10, 5031-5038.

Chevalier F, Chobert JM, Mollé D, Haertlé T (2001b). Maillard glycation of β -lactoglobulin with several sugars: Comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Le Lait.* 91, 651-666.

Chiu DTY, Stults FH, Tappel AL (1976). Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 558-566.

Chowrimootoo GFE, Seymour CA (1999). The role of ceruloplasmin in copper excretion. *Biochem Soc. Trans.* 22, 190S.

Chung SY, Champagne ET (1999). Increase of IgE binding to peanut calcium-binding proteins in the presence of calcium. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 1, S102, 388.

Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chou ST (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem.* 50, 2454-2458.

Chuyen NV, Utsunomiya N, Kato H (1991). Nutritional and physiological effects of casein modified by glucose under various conditions on growing adults rats. *Agric. Biol. Chem.* 55, 659-664.

Chuyen NV (1998). Maillard reaction and food processing. Application aspects. In: *Processed-induced chemical changes in food* (Shahidi F, Ho CT, Chuyen N, Eds.). pp. 213-235.

Chyan YJ, Poeggeler B, Omar RA, Chain DG, Frangione J, Gisho J, Pappolla MA (1999). Potent neuroprotective properties against the Alzheimer β -amyloid by an

endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 21937-21942.

Cilla A, Laparra JM, Alegría A, Barberá R, Farré R (2008). Antioxidant effects derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chem.* 106, 1180-1187.

Clapp-Lilly KL, Smith MA, Perry G, Harris PL, Zhu X, Duffy LK (2001). Melatonin acts as antioxidant and pro-oxidant in an organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. *NeuroReport.* 12, 1277-1280.

Cohen NL, Illowsky B, Linder MC (1979). Altered copper absorption in tumor-bearing and estrogen-treated rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. Gastrointest. Physiol.* 236, 309-315.

Cohen G (1982). Non-invasive method for the assessment of lipid-peroxidation in vivo. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie.* 311, 4, 345-345.

Cohen SA, Meys M y Tarvin TL (1989). The Pico-Tag method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. Bedford, MA: Millipore Corporation.

Conrad ME, Umbreit JN (1991). A role for mucin in the absorption of inorganic iron and other metal cations. A study in rats. *Gastroenterology.* 100, 129-136.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skawarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni GJM (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* 28, 193-202.

Cook JD, Monsen ER (1976). Food iron absorption in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 859-67.

Coombs GF Jr (1999). Chemopreventive mechanisms of selenium. *Med. Klin.* 94, 18-24.

Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT (1995). Solubility of pure bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.* 19, 123-126.

Costa EJX, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS, Lamy-Freund MT (1997). How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett.* 416, 103-106.

Courtois F, Delvin E, Ledoux M, Seidman E, Lavoie JC, Levy E (2002). The antioxidant BHT normalizes some oxidative effects of iron + ascorbate on lipid metabolism in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 132, 1289-1292.

Cox TM, Peters TJ (1979). The kinetics of iron uptake in vitro by human duodenal mucosa: studies in normal subjects. *J. Physiol.* 289, 469-478.

Crampton RF, Matthews DM, Poisner R (1965). Observations on the mechanism of absorption of copper by the small intestine. *J. Physiol.* 178, 111-126.

Crapo JD, Oury TD, Rabouille C, Clot JW, Chang LY (1992). Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10405-10409.

Cremer DR, Eichner K (2000). The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and plant powders. *Food Chem.* 71, 1, 37-43.

Cuvelier MR, Richard H, Berset C (1992). Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 324-325.

Cuzzocrea S, Tan DX, Constantino G, Mazzon E, Caputi AP, Reiter RJ (1999). The protective role of endogenous melatonin in carageenan-induced pleurisy in the rat. *FASEB J.* 13, 1930-1938.

Cuzzocrea S, Thienermann C, Salvemini D (2004). Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 11, 1147-1162.

Czerny M, Grosch W (2000). Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *J. Agric. Food Chem.* 48, 868-872.

Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Bertè F, Gazzani G (2000). In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1449-1454.

Daglia M, Racchi M, Papetti A, Lanni C, Govoni S, Gazzani G (2004). In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1700-1704.

Dall-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G et al (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 24, 55-99.

Dallman PR (1991). Hierro. En: *Conocimientos actuales sobre Nutrición*, 6^a ed. Washington DC: OPS, ILSI, 277-288.

Davies KJA, Wiese AG, Sevanian A, Kim EH (1990). Repair systems in oxidative stress. In: *Molecular Biology of aging*. Finch CE, Johnson TA (Eds). New York, Wiley-Liss.

Davies CGA, Netto FM, Glassenap N, Gallaher CM, Labuza TP, Gallaher DD (1998). Indication of the Maillard reaction during storage of protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2485-2489.

de Kok PMT, Rosing EAE (1994). Reactivity of peptides in the Maillard reaction. In: T.H. Parliament, M.J. Morello, R.J. MacGorrin (Eds.). *Thermally generated flavors, Maillard, microwave and extrusion processes*. ACS symposium series 543. Washington, D.C.: American Chemical Society.

de Lara RC, Gilliland SE (1985). Growth inhibition of microorganisms in refrigerated milk by added Maillard reaction products. *J. Food Protect.* 48, 138-141.

de Maeyer E (1989). Preventing and controlling iron deficiency anemia through primary health care. Geneva: World Health Organization.

del Castillo MD, Corzo N, Polo MC, Pueyo E, Olano A (1998). Changes in the amino acid composition of dehydrated orange juice during accelerated nonenzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* 46, 277- 280.

del Castillo MD, Amens JM, Gordon MH (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem.* 50, 3698-3703.

del Río LA, Sandalio L, Palma J, Bueno P, Corpas FJ (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 557-580.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP (2001a). Copper metabolism in rats fed diets containing Maillard reaction products. *Food Chem. Toxicol.* 67, 2, 855-860.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP (2001b). Cambios en la solubilidad del Fe y el Zn debidos a la presencia de mezclas de glucosa-lisina calentadas. *Nutrición Hospitalaria XVI*, 203.

Delgado-Andrade C (2002). Reacción de Maillard. Influencia sobre la biodisponibilidad mineral. Tesis doctoral. Granada, España.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Nieto R, Navarro MP (2004a). Effects of heated glucose-lysine and glucose-methionine model-systems on mineral solubility. *Food Chem.* 87, 329-337.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP (2004b). Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model food system: assays in rats and in Caco-2 cells. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1507-1513.

Delgado-Andrade C y Morales FJ (2005). Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1403-1407.

Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Morales FJ (2005a). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7832-7836.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP (2005b). Comparative effects of glucose-lysine versus glucose-methionine Maillard reaction products consumption: *in vitro* and *in vivo* calcium availability. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 7, 679-684.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP (2006). Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products: *in vitro* and *in vivo* assays. *J. Sci. Food Agric.* 86, 271-278.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, MP, Morales FJ (2007). Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 341-351.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP (2008a). Maillard reaction products consumption: Magnesium bioavailability and bone mineralization in rats. *Food Chem.* 107, 631-639.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP, Morales FJ (2008b). Estimation of hydroxymethylfurfural availability in breakfast cereals. Studies in Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1600-1607.

Dell'Aquila C (2003). Microbial degradation of heated gluten-glucose systems. Implications for gut health. In: Vegarud G, Morales F (Eds.). *Melanoidins in food and health*, EC Directorate for Research, Vol 4, EUR 20722, 181-183.

Demple B, Linn S (1982). 5,6-saturated thymine lesions in DNA: Production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.* 10, 3781-3789.

Di Giulio RT (1991). Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination. *Aquatic toxicology and risk assessment*, Vol. 14, ASTM STP 1124. MA Mayes and MG Barron, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 15-31.

Di Mattia C, Sacchetti G, Seghetti L, Piva A, Mastrocola D (2007). "Vino cotto" composition and antioxidant activity as affected by non enzymatic browning. *Italian J. Food Sci.* 19, 4, 413-424.

Di Pietro A, Visalli G, Munaò F, Baluce B, La Maestra S, Primerano P, Corigliano F, De Flora S (2008). Oxidative damage in human epithelial alveolar cells exposed in vitro to oil fly ash transition metals. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* Article in press.

Di Silvestro RA, Harris ED (1981). A postabsorption effect of L-ascorbic acid on copper metabolism in chicks. *J. Nutr.* 111, 1964-1968.

Díaz J, Sánchez MJ, Navarro A (1998). Peroxidación lipídica en neonatología. *Pediátrika.* 9, 6, 221-232.

Dittrich R, El-Massry F, Rinaldi F, Peich CC, Beckmann MW, Pischetsrieder M (2003). Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3900-3904.

Djordjevic VB (2004). Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytology.* 237, 57-89.

Dreher D, Junod AF. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer.* 32A, 30-38.

Drews LM, Kies C, Fox HM (1979). Effect of dietary fiber on copper, zinc, and magnesium utilization by adolescent boys. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 1893-1897.

Duran N, Farias-Furtado ST, Faljoni-Alario A, Campa A, Brunet JE, Freer J (1984). Singlet oxygen generation from the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of an activated CH₂ substrate. *J. Photochem.* 25, 285-289.

Dworschak E (1980). Nonenzyme browning and its effect on protein nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 1-40.

Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, Lalljie SP, Muller DJ, Olin S, Petersen BJ, Schlatter J, Scholz G, Scimeca JA, Slimani N, Tornqvist M, Tuijelaars

S, Verger P (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.* 43, 365-410.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308:1635-1638.

Egli MD, Selvaraj A, Yepiskopoyosan H, Zhang B, Hafen E, Georgiev O, Schaffner W (2003). Knockout of “metal-responsive transcription factor” MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. *EMBO J.* 22, 100-108.

Eichner K, Karel M (1972). The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model system under various conditions. *J. Agric. Food Chem.* 20, 2, 218-223.

Eichner K (1981). Antioxidants effect of Maillard reaction intermediates. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 441-451.

Einarsson H, Eklund T, Nes IF (1988). Inhibitory mechanisms of Maillard reaction products. *Microbios.* 53, 27-36.

Ekmekcioglu C, Feuertag J, Marktl W (1996). A ferric reductase activity is found in brush border membrane vesicles isolated from Caco-2 cells. *J. Nutr.* 126, 2209-2217.

Engelmann MD, Bobier RT, Hiatt T, Cheng IF (2003). Variability of the Fenton reaction characteristics of the EDTA, DTPA, and citrate complexes of iron. *Biomaterials.* 6, 519-527.

Engler JA, Gupta A, Li L, Rao RK (1999). Inhibition of DNA synthesis in Caco-2 cells by oxidative stress. Amelioration by epidermal growth factor. *Dig. Dis. Sci.* 44, 1902-1909.

Erbersdobler HF, Gunsser I, Weber G (1970). Degradation of fructoselysine by the intestinal flora. *Zentralbl Veterinarmed A*. 17, 573-575.

Erbersdobler HF (1989). Protein reactions during food processing and storage: their relevance to human nutrition. *Bibliotheca Nutrition et Dieta*. 43, 140-155.

Erbersdobler HF, Buhl K, Klusman U (1990). Balance studies with glycosilated proteins on human volunteers. In: P.A. Finot, H.V. Aeshbacher, K.F. Hurell, K. Liardon (Ed.). *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.

Erbersdobler H, Hupe A (1991). Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Z. Ernährungswiss.* 30, 46-49.

Erbersdobler HF, Faist V (2001). Metabolic transit of Amadori products. *Nahrung*. 45, 177-181.

Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA (1996). SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 3, 285-290.

Esposito F, Morisco F, Verde V, Ritieni A, Alezio A, Caporaso N, Fogliano V (2003). Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Aliment. Pharm. Therap.* 17, 595-601.

Estrebauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13, 341-390.

Etcheverry P, Wallingford JC, Miller DD, Glahn RP (2004). Calcium, zinc, and iron bioavailabilities from a commercial human milk fortifier: A comparison study. *J. Dairy Sci.* 87, 3629-3637.

Evers WJ, Heinsohn HH Jr, Mayers BJ, Sanderson A (1976). Furans substituted at the three positions with sulphur. In: *Phenolic, sulfur and nitrogen compounds in*

food flavors; Charalambous G, Katz I, Eds.; American Chemical Society: Washington DC. pp. 184-193.

Faist V, Lindenmeier M, Geisler C, Erbersdobler HF, Hofmann T (2002a). Influence on molecular weight fractions isolated from roasted malt on the activity of NADPH cytochrome c reductase and glutathione-S-transferase in Caco-2 cells. *J Agric. Food Chem.* 50, 602-606.

Faist V, Hofmann T, Zill H, Baynes JW, Thorpe SR, Sebekova K, Schinzel R, Heidland A, Wenzel E, Erbersdobler HF (2002b). Effects of dietary Nepsilon-Carboxymethyllysine on expression of the biotransformation enzyme, Glutathione S-transferase, in the rat. In: *The Maillard reaction in food chemistry and medical science: Update to the postgenomic era*; Horiuchi S, Taniguchi N, Hayase F, Kurata T, Osawa T., Eds.; ICS Elsevier Press. pp. 313-320.

Fallico B, Ames JM (1999). Effect of hexanal and iron on color development in a glucose/phenylalanine model system. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2255-2261.

Ferenci P (1998). Wilson's disease. *Clin. Liver Dis.* 2, 1, 31-49.

Fernández MT, Mira ML, Florêncio MH, Jennings KR (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Biochem.* 92, 105-111.

Ferruzza S, Sambuy Y, Ciriolo MR, De Martino A, Santaroni P, Rotilio G, Scarino ML (2000). Copper uptake and intracellular distribution in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biomaterials.* 13, 179-185.

Fields M, Ferretti RJ, Reiser S, Smith JC Jr (1984). The severity of copper deficiency in rats is determined by the type of dietary carbohydrate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175, 530-537.

Finot PA, Mangenat E (1981). Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog. Food. Nutr. Sci.* 5, 193-207.

Finot PA, Furniss DE (1989). Metabolic transit and toxicity of Maillard Reaction Products. In: JW Baynes, VM Monnier, R Alan (Eds.). *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*, New York: Liss, Inc.

Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF, Liardon R (1990). Metabolism and physiological effects of Maillard reaction products (MRP). En P.A. Finot, H.V. Aeschbacher, R.F. Hurrell, R. Liardon (Eds.). *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Birkhäuser Verlag, Basel, Suiza.

Finot PA (1993). Toxicology of nonenzymatic browning. In: R Macrae, RK Robinson, MJ Sadler (Eds.). *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. London, UK: Academic Press.

Fisher PWF, Goroux A, L'Abbé MR (1981). The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 1670-1675.

Flanagan PR (1989). Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 361, 21-30.

Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC (1997). Microcyt anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* 16, 383-386.

Flitter WD (1993). Free radical and myocardial reperfusion injury. *Brit. Med. Bull.* 49, 3, 545-555.

Flohé L, Günzler WA (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Method. Enzimol.* 105, 114-121.

Foerster A, Henle T (2003). Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrraline. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 6, 1383-1385.

Fogliano V, Monti SM, Musella T, Randazzo G, Ritieni A (1999). Formation of coloured Maillard reaction products in a gluten-glucose model system. *Food Chem.* 66, 293-299.

Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC (2003). Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 254-258.

Ford JE, Hurrell RF, Finot PA (1983). Storage of milk powders under adverse conditions. 2. Influence on the content of water-soluble vitamins. *Br. J. Nutr.* 49, 355-364.

Förster A, Kühne Y, Henle T (2005). Studies on absorption and elimination of dietary Maillard reaction products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 474-481.

Fowler G, Daroszewska M, Ingold KU (2003). Melatonin does not “directly scavenge hydrogen peroxide”: demise of another myth. *Free Rad. Biol. Med.* 34, 1, 77-83.

Frankel EN, Meyer AS (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1925-1941.

Franzke C, Iwainsky H (1954). The antioxidant activity of melanoidins. *Dutch J. Food Chem.* 50, 251-254.

Freeman BA, Grapo JD (1982). Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426.

Frei B (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1113S-1118S.

Frei B (2002). Pro-and antioxidant effects of vitamin C in vitro and in vivo. *Free Radicals Res.* 36, S1, 35-36.

Fridovich I (1975). Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 147-159.

- Fridovich I (1976). Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In: Free radicals in biology. Ed. Pryor. Academic Press, New York. Vol. I, pp. 239-277.
- Fridovich I (1998). Oxygen toxicity: A radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203-1209.
- Friedman M (1996). Food browning and its prevention: An overview. *J. Agric. Food Chem.* 44, 631-653.
- Furniss DE, Vuochoud J, Finot PA, Hurrell RF (1989). The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *Br. J. Nutr.* 62, 739-749.
- Gangloff M, Lai C, Van Campem D, Miller D, Norvell W, Glahn R (1996). Ferrous iron uptake but not transfer is down-regulated in Caco-2 cells grown in high iron serum-free medium. *J. Nutr.* 126, 3118-3127.
- García M, Flowers C, Cook J (1996). The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. *J. Nutr.* 126, 251-258.
- García-Baños JL, del Castillo MD, Sanz ML, Olano A, Corzo N (2005). Maillard reaction during storage of powder enteral formulas. *Food Chem.* 89, 555-560.
- García-Casal MN, Leets I, Layrisse M (2000). Beta-carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J. Nutr.* 130, 5-9.
- García-Villanova B, Guerra-Hernández E, Martínez Gómez E, Montilla J (1993). Liquid chromatography for the determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2872-2878.
- Gardner HW, Weisleder D, Kleiman R (1978). Formation of trans-12,13-epoxy-9-hydroperoxy-trans-10-octadecenoic acid from 13-L-hydroperoxy-cis-9,trans-11-octadecadienoic acid-catalyzed by either a soybean extract or cysteine-FeCl₃. *Lipids.* 13, 4, 246-252.

Garrick MD, Garrick LM (2004). Divalent metal transporter DMT1 (SLC11A2). In: Membrane Transporter Diseases, edited by Bröer S and Wagner CA. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. pp. 107-122.

Gasser U, Grosch W (1988). Identification of volatile flavour compounds with high aroma values from cooked beef. *Z. Lebensm. Unters, Forsch.* 186, 489-494.

Gasser U, Grosch W (1990). Primodorants of chicken broth. A comparative study with meat broths from cow and ox. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 190, 3-8.

Gebicki S, Gebicki JM (1993). Formation of peroxides in aminoacids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.*, 289, 743-749.

Gerrard JA, Newberry MP, Ross M, Wilson AJ, Fayle SE, Kavale S. (2000). Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.* 65, 2, 312-314.

Gerrard JA, Fayle SE, Brown PK, Sutton KH, Simmons L, Rasiah I (2001). Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. *J. Food Sci.* 66, 6, 782-786.

Gerrard JA, Brown PK, Fayle SE (2002a). Maillard crosslinking of food protein II: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehydes with ribonucleasa. *Food Chem.* 79, 343-349.

Gerrard JA, Brown PK, Fayle SE (2002b). Maillard crosslinking of food protein III: the effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyderaldehydes upon bread and croissants. *Food Chem.* 80, 45-50.

Gershman R (1964). Biological effects of oxygen. En: Oxygen in the animal organism. Dickens F, Neil E (Eds). New York, McMillan & Co.

Gibbs PNB y Jordan PM (1981). Aminolevulinatase: zinc-65 binding and exchange with the enzyme from human erythrocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 9, 232-233.

Ginz M, Balzer HH, Bradbury AGW, Maier HG (2000). Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 404-410.

Girotti AW (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Lipid Res.* 39, 1529-1542.

Glahn RP, Wien EM, Van Campen DR, Miller DD (1996). Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels *in vivo* studies: use of a novel *in vitro* method for rapid estimation of iron bioavailability. *J. Nutr.* 126, 332-339.

Gleerup A, Rossander-Hulthen L, Gramatkovski E, Hallberg L (1995). Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 97-104.

Goldberg T, Cai W, Peppia M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 1287-1291.

Gollan JL, Deller DJ (1973). Studies in the nature and excretion of biliary copper in man. *Clin. Sci. Mol. Med.* 44, 9-15.

Gollan JL (1975). Studies on the nature of complexes formed by copper with human alimentary secretions and their influence on copper absorption. *Clin. Sci. Mol. Med.* 49, 237-245.

Gomyo T, Horikoshi M (1976). On the interaction of melanoidin with metallic ions. *Agric. Biol. Chem.* 40, 33-40.

Gomyo T, Miura M (1986). Effect of melanoidin on the digestion and absorption of disaccharides in the small intestine of rats. In: M Fujimaki, M Namiki, H Kato (Eds.). *Amino-Carbonyl reactions in food and biological systems*. Amsterdam: Elsevier.

Goya L, Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Bravo L, Morales FJ (2007). Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 536-545.

Greenberg ER, Baron JA, Tosteson TD, Freeman DH, Beck GJ, Bond JH (1994). Clinical-trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. *N. Engl. J. Med.* 331, 141-147.

Greenwald RW, Moy WW (1980). Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Eur. J. Respir. Dis.* 23, 455-463.

Greger JL, Snedeker SM (1980). Effect of dietary protein and phosphorus levels on the utilization of zinc, copper and manganese by adult males. *J. Nutr.* 110, 11, 2243-2253.

Grisham MB, Macdermott RP, Deitch EA (1990). Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation.* 14, 669-680.

Grisham MB (1994). Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 344, 859-861.

Grosch W, Zeiler-Hilgart G, Cerny C, Guth H (1993). Studies on the formation of odorants contributing to meat flavours. In: Schreier P, Winterhalter P., (Eds.). *Progress in flavor precursors studies.* Allured Publishing: Carol Stream, IL. pp. 329-342.

Gruber P, Vieths S, Wanrgorsch A, Nerkamp J, Hofmann T (2004). Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J. Agric. Food Chem.* 52, 4002-4007.

Grundwald S, Krause R, Bruch M, Henle T, Brandsch M (2006). Transepithelial flux of early and advanced glycation compounds across Caco-2 cell monolayers and their interaction with intestinal amino acid and peptide transport systems. *Br. J. Nutr.* 95, 1221-1228.

Guentert M, Bertram HJ, Hopp R, Silberazahn W, sommer H, Werkhoff P (1993). Thermal generation of flavour compounds from thiamine and various amino acids. In: Recent developments in flavor and fragrance chemistry; Hopp R, Mori K Eds.; VCH: Weinheim, Germany. pp. 215-240.

Guerra-Hernández E, Corzo N, García-Villanova B (1999). Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *J. Cereal Sci.* 29, 171-176.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997). Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal-ion transporter. *Nature.* 388, 482-488.

Guo R, Henry PR, Holwerda RA, Cao J, Littell RC, Miles RD, Ammerman CB (2001). Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic copper sources for poultry. *J. Anim. Sci.* 79, 1132-1141.

Gutteridge JMC, Rowley DA, Halliwell B (1982). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid-peroxidation in the presence of iron salts - detection of catalytic iron and antioxidants activity in extracellular fluids. *Biochem. J.* 206, 3, 605-609.

Gutteridge JMC, Halliwell B, Treffry A, Harrison PM, Blake D (1983). Effect of ferritin-containing fractions with different iron loading on lipid-peroxidation. *Biochem. J.* 209, 2, 557-560.

Guyton KZ, Kensler TW (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.* 49, 3, 523-544.

Gyurcsik B, Gajda T, Nagy L, Burger K (1993). Proton, copper (II) and nickel (II) complexes of some Amadori rearrangement products of D-glucose and amino acids. *Inorg. Chim. Acta.* 214, 57-66.

- Haidari M, Javadi E, Kadkhodae M, Sanati A (2001). Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. *Clin. Chem.* 47, 7, 1234-1240
- Hall AC, Young BW, Bremmer I (1979). Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. *J. Inorg. Biochem.* 11, 57-66.
- Hallberg L (1998). Does calcium interfere with iron absorption? *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 3-4.
- Hallberg L, Hulthen L (2002). Perspectives of iron absorption. *Blood Cell Mol. Dis.* 29, 562-573.
- Halleux C, Scheider Y (1989). Development of a model in vitro to study iron absorption by human intestinal epithelial cells. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 97, 2, B34.
- Halleux C, Scheider Y. (1994) Iron absorption by Caco-2 cells cultivated in serum-free medium as an in vitro model of the human intestinal epithelial barrier. *J. Cel. Physiol.* 158, 17-28.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochem. J.* 219, 1-4.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1988). Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum. Toxicol.* 7, 1, 7-13.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989). In: *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE (1992). Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119, 6, 598-620.

Halliwell B, Chirico S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715S-724S, discussion 724S-725S.

Halliwell B (1999). Vitamin C: Poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem. Sci.* 24, 255-259.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). In: *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. Oxford, New York, Oxford University Press.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2000). In: *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed.; Clarendon: Oxford, UK.

Hamberg M (1975). Decomposition of unsaturated fatty-acid hydroperoxides by hemoglobin-structures of major products of 13L-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid. *Lipids.* 10, 2, 87-92.

Han O, Failla M, Hill D, Morris E, Smith C (1995) Reduction of Fe(III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J. Nutr.* 125, 1291-1299

Hansen AP, Hemphill PL (1984). Utilization of heat to increase shelf life of blended acid whey and buttermilk powder for frozen desserts. *J. Dairy Sci.* 67, 54-56.

Harman D (1992). Role of free radicals in aging and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 673, 126-141.

Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6, 2675-2683.

Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RTA, Gitlin JD (1995). Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2539-2543.

Harris E (1997). Copper. In: *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. Edited by: O'Dell B, Sunde RA. University of Missouri, Columbia, Missouri, Cap. 8. pp. 231-274.

Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD (1999). Targeted gene disruption reveals an essential role of ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10812-10817.

Harrison MD, Jones CE, Dameron CT (1999). Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 145-153.

Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT (2000). Dameron, Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 25, 29-32.

Harvey PW, Hunsaker HA, Allen KGD (1981). Dietary L-histidine induced hypercholesterolemia and hypocupremia in the rat. *J. Nutr.* 111, 639-647.

Hashiba H (1986). Oxidative browning of Amadori compounds. Color formation by iron with Maillard reaction products. In: M. Fujimaki, H. Kato & M. Namiki (Eds.). *Amino-carbonyl reactions in food and biological systems*. Amsterdam, Elsevier, 155-164.

Hayase H, Hirashima S, Okamoto G, Kato H (1989). Scavenging of active oxygen by melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* 53, 3383-3385.

Hayase F (1996). The Maillard reaction: consequences for the chemical and life sciences. In: P. Ikan (Ed.), Wiley, England, 89-104.

Hayase F, Usui T, Nishiyama K, Sasaki S, Yoshinobu S, Tsuchita N, Numata N, Watanabe H (2005). Chemistry and biological effects of melanoidins and glyceraldehyde-derived pyridinium as advanced glycation end products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 104-110.

Hayase F, Usui T, Watanabe H (2006). Chemistry and some biological effects of model melanoidins and pigments as Maillard intermediates. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 12, 1171-1179.

Hayashi T, Mase D (1986). Formation of three-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amines or amino acid. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1959-1964.

Hayashi T, Namiki M (1986). Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with aminoacid. *Agric. Biol. Chem.* 50, 8, 1965-1970.

Hazell T, Johnson IT (1987). Effects of food processing and fruit juices on in vitro estimated iron availability from cereals, vegetables and fruits. *J. Sci. Food Agric.* 38, 73-82.

He ZY, Ao ZH, Wu J, Li GQ, Tao WY (2004). Determination and generant mechanism of tetramethylpyrazine in Zhenjiang vinegar. *China Condiment.* 300, 2, 36-39.

Heiss R (1968). *Haltbarkeit und Sorptionsverhalten wasserarmer. Lebensmittel;* Springer-Verlag: New York, 163.

Henle T, Schwenger V, Ritz E (2000). Preliminary studies on the renal handling of lactuloselysine from milk products. *Czech J. Food Sci.* 18, 101-102.

Henle T (2003). AGEs in foods: do they play a role in uremia? *Kidney Int. Suppl.* 84, 145-147.

Hernández-García M (1993). Anemia ferropénica. *Medicine.* 10, 545-554.

Hidalgo I, Raub T, Borchardt R (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 96, 736-749.

Higuchi Y, Linn S (1995). Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells. *J. Biol. Chem.* 270, 790-795.

Hill VM, Ledward DA, Ames JM (1996). Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of Maillard browning in a glucose-lysine system. *J. Agric. Food Chem.* 44, 594-598.

Hill S, Easa AM (1998). In: J O'Brien, MJC Crabbe, JM Ames (Eds.), Maillard reaction in foods and medicine, vol. 223. The Royal Society of Chemistry, special publication, Cambridge. pp. 133-138.

Hill VM, Isaacs NS, Ledward DA, Ames JM (1999). Effect of high hydrostatic pressure on the volatile components of a glucose-lysine model system. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3675-3681.

Hilton M, Spenser DC, Ross P, Ramsety A, McArdle HJ (1995). Characterization of the copper uptake mechanism and isolation of the ceruloplasmin receptor/copper transporter in human placental vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1245, 153-160.

Hiramoto S, Itoh K, Shizuuchi S, Kawachi Y, Morishita Y, Nagase M, Suzuki Y, Nobuta Y, Sudou Y, Nakamura O, Kagaya I, Goshima H, Kodama Y, Icatro FC, Koizumi W, Saigenji K, Miura S, Sugiyama T, Kimura N (2004). Melanoidin, a food protein-derived advanced maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter.* 9, 5, 429-435.

Ho CT (1996). Thermal generation of Maillard aromas. In: Ikan P (Ed.). The Maillard reaction: Consequences for the chemical and life science. John Wiley & Sons LTD, Chichester. pp. 89-104.

Hochstein P (1981). Nucleotide-iron complexes and lipid-peroxidation mechanisms and biological significance. *Isr. J. Chem.* 21, 1, 52-53.

Hodge JE (1953). Chemistry and browning reactions in model system. *J. Agric. Food Chem.* 1, 928-943.

Hodgson EK, Fridovich I (1975). The interaction of bovine erythrocyte super-oxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochem.* 14, 5294-5299.

Hofmann T (1998). 4-alkylidene-2-imino-5-(4-alkylidene-5-oxo-1,3-imidazol-2-ynyl)azam ethylidene-1,3-omidazolidine. A novel colored substructure in melanoidins formed by Maillard reactions of bound arginine with glyoxal and furan-2-carboxaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3896-3901.

Hofmann T, Ames J, Krome K, Faist V (2001). Determination of the molecular weight distribution of non-enzymatic browning products formed by roasting of glucose and glycine and studies on their effects on NADPH-cytochrome c-reductase and glutathion-S-transferase in caco-2 cells. *Nahrung/Food.* 45, 189-194.

Hofmann T, Lindenmeier M, Somoza V (2005). Pronyl-lysine-a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *A. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 887-887.

Hogg JS, Lohmann DH, Russell KE (1961). The kinetics of reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with phenols. *Can J Chem.* 39, 1588-1594.

Hollnagel A, Kroh LW, Lebensm Z (1998). Formation of α -dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelisation and Maillard reaction conditions. *Unters. Forsch.* 207, 50-54.

Homma S, Fujimaki M (1981). Growth response of rats fed a diet containing nondialyzable melanoidin. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 209-216.

Homma S, Aida K, Fujimaki M (1986). Chelation of melanoidins from pigments in coffee. In: M. Fujimaki, H. Kato & M. Numiki (Eds.). *Amino carbonyl reactions in food and biological systems.* Amsterdam, Elsevier. pp. 165-172.

Homma S, Murata M (1994). Characterization of metal chelating compounds in soluble coffee. In: Labuza TP, Reineccius G, Monnier V, O'Brien J and Baynes J (Eds.), *Maillard reactions in chemistry, food and health.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry. pp. 413.

Homma S, Murata M (2001). Metal chelating compounds in instant coffee. *A. Nutr. Metab.* 45 S, 394-402.

Honallgel A, Kroh LW (1998). Formation of alpha-dicarbonyl fragments from mono and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 207, 50-54.

Horikoshi M, Ohmura M, Gomyo T, Kuwabara Y, Ueda S (1981). Effects of browning products on the intestinal microflora of the rat. In: *Maillard reactions in food*. C Eriksson, (Ed). Oxford: Pergamon Press. pp. 223-228.

Hrdlicka J (1976). Changes during thermal and hydrothermal reactions XX. The effect of heavy metals on the course of nonenzymatic browning. *Sb. Vys. Sk. Chem-Technol. Praze, Potraviny*, 65, E48.

Huebers A, Huebers E, Csiba E, Rummel W, Finch CA (1983). The significance of transferring for intestinal iron absorption. *Blood*. 61, 283-288.

Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A (1992). Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci*. 51, 945-953.

Hultsch C, Hellwing M, Pawelke B, Bergmann R, Rode K, Pietzsch J, Krause R, Henle T (2006). Biodistribution and catabolism of ¹⁸F-labeled N-ε-fructoselysine as a model of Amadori products. *Nuclear Med. Biol*. 33, 965-973.

Hunt JR (2003). Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *Am. J. Clin. Nutr*. 78, 633-639.

Hurrell RF, Carpenter KJ (1977). Mechanism of heat damage in proteins. The role of sucrose in the susceptibility of protein foods to heat damage. *Brit. J. Nutr*. 28, 285-289.

Hurrell RF, Finot PA, Ford JE (1983). Storage of milk powders under adverse conditions.1. Losses of lysine and other essential amino acids. *Br. J. Nutr*. 49, 343-354.

Hurrell RF (1984). Reactions of food proteins during processing and storage and their nutritional consequences. In: Hudson BJB, (Ed). *Developments in food proteins*. London, United Kingdom: Applied Science. pp. 213-244.

Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD (1989). Iron absorption as influenced by bovine milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 546-522.

Hurrell RF, Juillerat M, Reddy M, Lynch S, Dassenko S, Cook J (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 56, 573-578.

Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat M, Cook JD (2006). Meat protein fractions enhance nonheme iron absorption in humans. *J. Nutr.* 136, 2808-2812.

Iida T, Yoshiki Y, Akiyama Y, Okubo K (2002). Photon emission properties of roasted soybean as related to reactive oxygen scavenging activities. *Food Chem.* 77, 471-477.

Imai H, Nakagawa Y (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx) in mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.* 34, 145-169.

Iqbal M, Okazaki Y, Okada S (2003). In vitro curcumin modulates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced peroxidation of microsomal membrane lipids and DNA damage. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 151-160.

Irving HM, Williams RJ (1953). The stability of transition-metal complexes. *J. Chem. Soc.* 3192-3210.

Isaacs NS, Coulson M (1996). Effect of pressure on processes modelling the Maillard reaction. *J. Phys. Org. Chem.* 9, 639-644.

Ishikawa SI, Tamaki S, Arihara K, Itoh M (2007). Egg yolk protein and egg yolk phosphovitin inhibit calcium, magnesium, and iron absorptions in rats. *J. Food Sci.* 72, 6, 412-419.

Itoh T, Suzuki T, Nishikawa A, Furukawa F, Takahashi M, Xue W, Sofuni T, Hayashi M (2000). In vivo genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline in lacI transgenic (Big Blue) mice. *Mutat. Res.* 468, 19-25.

Iturri S, Nuñez MT (1998). Effect of copper, cadmium, mercury, manganese and lead on Fe²⁺ and Fe³⁺ absorption in perfused mouse intestine. *Digestión.* 59, 6, 671-675.

Jayathilakan K, Sharma GK, Radhakrishna K, Bawa AS (2007). Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-oved-flavour species of meat. *Food Chem.* 105, 908-916.

Jemmali M (1969). Influence of the Maillard reaction products on some bacteria of the intestinal flora. *J. Appl. Bacteriol.* 32, 151-155.

Jhonson MA, Macdonald TL (2004). Accelerated Cu-Zn-SOD-mediated oxidation and reduction in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 446-450.

Ji WD, Shi GX, Yang HY, Xu QS, Xu Y, Zhang H (2007). Effects of Cu²⁺ stress on leaf physiological indice and ultrastructure of *Potamogeton malaianus*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 18, 12, 2727-2732.

Jiaan DB, Seftel AD, Fogarty J, Hampel N, Cruz W, Pomerantz J, Zuik M, Monnier VM (1995). Age-related increase in an advanced glycation end product in penile tissue. *World J. Urol.* 13, 369-375.

Jing H, Kitts DD (2000). Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction products. *Food Res. Int.* 33, 509-516.

Jing H, Kitts DD (2002). Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1007-1015.

Jing H, Kitts DD (2004a). Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 429, 154-163.

Jing H, Kitts DD (2004b). Redox-Related cytotoxic responses to different casein glycation products in Caco-2 and Int-407 cells. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3577-3582.

Jing H, Kitts DD (2004c). Chemical characterization of different sugar-casein Maillard reaction products and protective effects on chemical-induced cytotoxicity of Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1833-1844.

Johansson MAE, Jagerstad M (1994). Occurrence of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in meat and fish products, including pan residues, prepared under domestic conditions. *Carcinogenesis.* 15, 1511-1518.

Johnson PE, Lykken G, Mahalko J, Milne D, Inman L, Sandstead HH, García WJ, Inglett GE (1983). The effect of browned and unbrowned corn products on absorption of zinc, iron and copper in humans. In: *The Maillard reaction in foods and nutrition*, (Eds.). GR Waller & MS Feather. American Chemical Society, Washington DC. pp. 349-360.

Johnson PW, Lee DY (1988). Copper absorption and excretion measured by two methods in rats fed varying concentration of dietary copper. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 1, 129-141.

Jondreville C, Revy PS, Jaffrezic A, Dourmad JY (2002). Le cuivre dans l'alimentation du porc: oligoélément essentiel, facteur de croissance et risque potentiel pour l'Homme et l'environnement. *INRA Prod. Anim.* 15, 4, 247-265.

Jones NR (1954). Browning reactions in freeze-dried extractives from the skeletal muscle of codling (*Gadus callarias*). *Nature.* 25, 174, 605-606.

Jones NR (1956). Discoloration of muscle preparations from codling (*gadus callarius*) by degradation products of 1-methylhistidine. *Nature.* 21, 177, 748-749.

Jovani M, Barberá R, Farré R, Martín de Aguilera B (2001). Calcium, iron and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3480-3485.

Jovani M, Viadel B, Laparra M, Barberá R, Farré R (2004). Improvement of analytical conditions of mineral Caco-2 cell uptake assays. *Food Sci. Tech. Int.* 10, 197-201.

Kägi JHR (1991). Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 613-626.

Kaminogawa S, Kumagai Y, Yamauchi K, Iwasaki E, Mukoyama T, Baba M (1984). Allergic skin reactivity and chemical properties of allergens in two grades of lactose. *J. Food Sci.* 49, 529-535.

Kane A, Millar D (1984). In vitro estimation of the effects of selected proteins on iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 393-401.

Kane A, Labuza TP (1989). The Maillard Reaction in Foods. In: J.W. Baynes, V.M. Monnier (Eds.). In: *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*. New York: Alan R. Liss, Inc.

Kang SA, Jang YJ, Park H (1998). In vivo dual effects of Vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Rad. Res.* 28, 93-107.

Kang KS, Kim HY, Baek SH, Yoo HH, Park JH, Yokozawa T (2007a). Study on the hydroxyl radical scavenging activity changes of ginseng and ginsenoside-Rb₂ by heat processing. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 4, 724-728.

Kang KS, Yamabe N, Kim HY, Okamoto T, Sei Y, Yokozawa T (2007b). Increase in the free radical scavenging activities of American ginseng by heat processing and its safety evaluation. *J. Ethnopharmacol.* 113, 225-232.

Karagül-Yüceer Y, Drake MA, Cadwallader KR (2001). Aroma-active components of nonfat dry milk. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2948-2953.

Karagül-Yüceer Y, Cadwallader KR, Drake M (2002). Volatile flavor components of stored nonfat dry milk. *J. Agric. Food Chem.* 50, 305-312.

Karel M (1960). Some effects of water and oxygen on rates of reactions of foods components. Thesis, Institute of technology, Massachusetts.

Kasparova S, Brezova M, Valko J, Horecky V, Mlynarik T, Liptaj O, Vancova O, Ulicna D, Dobrota D (2005). Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem. Int.* 46, 601-611.

Kataoka M, Tavassoli M (1985). Identification of ceruloplasmin receptors on the surface of human blood monocytes, granulocytes, and lymphocytes. *Exp. Hematol.* 13, 806-810.

Kato H, Noguchi G, Fujimaki M (1968). Reductone contents of nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* 32, 916-919

Kato H, Tsuchida H (1981). Estimation of melanoidin structure by pyrolysis and oxidation. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 147-156.

Kato H, Watanabe K, Sato Y (1981). Effect of some metals on the Maillard reaction of ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.* 29, 540-543.

Kato H, Kim SB, Hayase F, Chuyen NV (1985). Desmutagenicity of melanoidins against mutagenic pyrolysis. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3093-3095.

Kato H, Matsuda T, Kato N, Watanabe K, Nakamura R (1986). Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses. *J. Agric. Food Chem.* 34, 351-355.

Kato H, Matsuda T, Kato N, Nakamura R (1989). Maillard Reaction of disaccharides with protein: suppressive effect of non reducing and pyranoside groups on browning and protein polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1077-1081.

Kennedy JF, Rivera ZS, Lloyd LL, Warner FP, Jumel K (1990). Studies on nonenzymatic browning in orange juice using a model system based on freshly squeezed orange juice. *J. Sci. Food Agric.* 52, 85-95.

Kerscher R, Grosch W (1998). Quantification of 2-methyl-3-furanthiol, 2-furfurylthiol, 3-mercapto-2-pentanone, and 2-mercapto-3-pentanone in heated meat. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1954-1958.

Kerscher R, Grosch W (2000). Comparison of the aromas of cooked beef, pork, and chicken. In: *Frontiers of flavour science*. Schieberle P & KH Engel, (Eds). Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie. Garching. pp. 17-20.

Kibangou IB, Bureau F, Allouche S, Arhan P, Bouglé D (2008). Interactions between ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and iron absorption pathways, in the Caco-2 model. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3414-3416.

Kies C, Chuang JH, Fox HM (1989). Copper utilization in humans as affected by amino acids supplements, *FASEB J.* 3, A360.

Killeit U (1994). Vitamin retention in extrusion cooking. *Food Chem.* 49, 149-155.

Kim SB, Hayase F, Kato H (1986). Desmutagenic effect of melanoidins against amino acid and protein pyrolysates. *Dev. Food Sci.* 13, 383-392.

Kim SY, Known OJ, Park JW (2001). Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. *Biochimie.* 83, 437-444.

Kim JS, Lee YS (2008). Enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino-acid enantiomers and the formation of melanoidins as a result of the Maillard reaction. *Amino Acids. The Forum for Amino Acid and Protein Research.* Artículo periodístico. May 22.

Kirsch M, de Groot H (2001). NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J.* 15, 1569-1574.

Kitts DD, Wu CH, Stich HF, Powrie WD (1993). Effect of glucose-lysine Maillard reaction products on bacterial and mammalian cell mutagenesis. *J. Agric. Food. Chem.* 41, 2353-2358.

Kitts DD, Hu C (2005). Biological and chemical assesment of antioxidant activity of sugar-lysine model Maillard reaction products. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 501-512.

Klomp AE, Tops BB, Van Denberg IE, Berger R, Klomp LW (2002). Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem. J.* 364, 497-505.

Koh ET (1990). Comparison of copper status in rat when fructose is replaced by either cornstarch or glucose. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194, 108-113.

Kojo S (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11, 1041-1064.

Korkushko OV, Khavinson VKh, Shatilo VB, Magdich LV, Labunets IF (2004). Circadian rhythms of melatonin production in pineal gland of healthy elderly people. *Adv. Georontol.* 15, 70-75.

Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H (1997). Orally absorbed reactive advanced glycation end products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6474-6479.

Kováčik J, Backor M (2008). Oxidative status of *Matricaria chamomilla* plants related to cadmium and copper uptake. *Ecotoxicology.* 17, 6, 471-479.

Koyu A, Ozguner F, Caliskan S, Karaca H (2005). Preventive effect of vitamin E on iron-induced oxidative damage in rabbit. *Toxicol. Ind. Health.* 21, 239-242.

Krause R, Schlegel K, Schwarzer E, Henle T (2008). Formation of peptide-bounds Heyns compounds. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2522-2527.

Kroh LW (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.* 51, 373-379.

Kukreja RC, Konotos HA, Hess ML, Ellis FF (1986). PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.* 59, 612-619.

Kwak EJ, Lim SI (2004). The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids.* 27, 85-90.

Labuza TP, Tannenbaum SR, Karel M (1970). Water content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. *Food Technol.* 24, 543-548.

Labuza TP, Saltmarch M (1981). The nonenzymatic browning reaction as affected by water in foods. In: Rockland LB, Stewart GF (Eds). *Water activity. Influences on food quality.* Academic Press: New York. pp. 605-650.

Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien J, Baynes JW (1994). *Maillard reactions in chemistry, food and health.* Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.

Laroque D, Inisan C, Berger C, Vouland E, Dufossé L, Guérard F (2008). Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chem.* 111, 1032-1042.

Larysse M, Martinez-Torres C, Leets I, Taylor P, Ramirez J (1984). Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *J. Nutr.* 114, 217-223.

Larysse M, García-Casal M, Solano L, Barón MA, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets IY, Tropper E (2000). New property of vitamin A and B-carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption. *Arch. Latinoam. Nutr.* 50, 3.

Lea CH, Hannan RS (1949). Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. I. The effects of activity of water, of pH, and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochim. Biophys. Acta.* 3, 313-325.

- Lea CH, Hannan RS (1951). Reaction between glucose and the terminal amino group of lysine. *Nature*. 168, 744-745.
- Ledl F (1990). Chemical pathways of the Maillard reaction. In: Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF, Liardon R, (Eds.). *The Maillard reaction. Advances in the life sciences*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag. pp. 19-42.
- Lee GR, Nacht S, Lukens JN, Cartwright, GE (1968). Iron metabolism in copper-deficient swine. *J. Clin. Invest.* 47, 2058-2069.
- Lee CM, Chichester CO, Lee TC (1977a). Effect of Maillard reaction products on disaccharidase activities in the rat. *J. Agric. Food. Chem.* 25, 4, 775-778.
- Lee CM, Chichester CO, Lee TC (1977b). Physiological consequences of browned food products. *Proc. Int. Congr. Food Sci. Technol.* 1, 587-603.
- Lee CM, Sherr B, Koh YN (1984). Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 32, 379-382.
- Leong LP, Wedzicha BL (2000). A critical appraisal of the kinetic model for the Maillard browning of glucose with glycine. *Food Chem.* 68, 21-28.
- Lerici CR, Nicoli MC (1996). Chemical and physio-chemical properties affecting the quality and stability of bakery products. *Adv. Food Sci.* 18, 229-233.
- Li W, Zhang S, Gao QH, Hou JW, Wei TT (2004). Different effects of ferulic acid and tetramethylpyrazine on the production of superoxide anion and nitric oxide in murine macrophages. *Res. Chem. Intermediates.* 30, 6. 605-613.
- Liegeois C, Lermusieau G, Collin S (2000). Measuring antioxidant efficiency of wort, malt and hops against the 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1129-1134.
- Lindenmeier M, Faist V, Hofmann T (2002). Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust

melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II-enzyme modulating activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6997-7006.

Lindenmeier M, Hofmann T (2004). Influence of baking conditions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-L-lysine in bakery products. *J. Agric. Food Chem.* 28, 52, 2, 350-354.

Linder MC (1991). *Biochemistry of copper*. New York: Plenum Press.

Linder MC, Hazegh-Azam M (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797S-811S.

Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N (1998). Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 965S-971S.

Linder MC, Lomeli NA, Donley S, Mehrbod F, Cerveza P, Cotton S, Wooten L (1999). Copper transport in mammals. In: Leone A, Mercer JFB, editors. *Copper transport and its disorders*. New York: Kluwer Academic/Plenum., 1-6.

Lindsay DG, Astley SB (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants (Eurofreda). *Mol. Asp. Med.* 23, 1-38.

Ling AR, Malting JJ (1908). *J. I. Brewing.* 14, 494-521.

Lingnert H, Eriksoon CE (1981). In: Eriksoon C (Ed.). *Progress in food nutrition and science*, 5. Pergammon, Oxford, UK, pp. 453-466.

Lingnert H, Eriksson CE, Waller GR (1983). Stability of antioxidants formed from histidine and glucose by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 31, 27-30.

Lingnert H (1990). Development of the Maillard reaction during food processing. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF, Liardon R, (Eds). Birkhauser Verlag: Basel. pp. 89-91.

Lombardi V, Valko L, Stolc S, Valko M, Ondrejickova O, Horakova L, Placek J, Trocone A (1998). Free radicals in rabbit spinal cord ischemia: Electron spin resonance spectroscopy and correlation with SOD activity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18, 399-412.

Loncin M, Jacqmain D, Tutundjian-Provost AM, Lengès JP, Bimbenet JJ (1965). Influence of water on Maillard's reactions. *C.R. Hebd. Seances. Acad. Sci.* 15, 260, 3208-3211.

Lönnerdal B (1998). Copper nutrition during infancy and childhood. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1046S–1053S.

Lovejoy DB, Richardson DR (2003). Iron chelators as anti-neoplastic agents: Current developments and promise of the PIH class of chelators. *Curr. Med. Chem.* 10, 1035-1049.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193, 265-275.

Lowry KR, Fly AD, Izquierdo OA, Baker DH (1989). Effect of heat processing and storage on protein quality and lysine bioavailability of a commercial enteral product. *J. Parenteral Enteral Nutr.* 14, 68-73.

Lukaski HC, Klevay LM, Bolonchuk WW (1983). Influence of dietary lipids on iron, zinc and copper retention in trained athletes. *Fed. Proc.* 41, 275.

Lynch SM, Frei B (1993). Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 34, 1745-1753.

Lynch SR, Dassenko S, Cook J, Jullerat M, Hrrell R (1994). Inhibitory effect of a soybeanprotein-related moiety on iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 567-572.

MacPhail AP, Patel RC, Bothwell TH, Lamparelli RD (1994). EDTA and the absorption of iron from food. *Am. J. Clin. Nutr.* 59, 644-648.

Madhujith T, Shahidi F (2007). Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5018-5024.

Maillard LC (1912a). Action des acides amines sur les sucres: formation des melanodines par voie methodique. *Comptes rendus de l'Académie des sciences.* 154, 66-68.

Maillard LC (1912b). Formation d'humus et de combustibles minéraux sans intervention de l'oxygene atmospherique, des microorganismes, des hautes temperatures, ou des fortes pressions. *Comptes rendus de l'Académie des sciences.* 155, 1554-1558.

Maillard LC (1916). Synthèse des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. *Ann. Chim.* 5, 258-317.

Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 763-768.

Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V (1997). The protective effect of olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl) ethanol counteracts reactive oxygen metabolite induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 127, 286-292.

Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lericci CR (2001). Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 340-346.

Marklund SL, Westman G, Lundgren E, Roos G (1982). Copper and zinc-containing superoxide dismutase, manganese containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42, 1955-1961.

Martin M, Macias M, Escames J, Leon J, Acuña-Castroviejo D (2000a). Melatonin but not vitamins C and E maintain glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14, 1677-1679.

Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D (2000b). Melatonin induced increased activity of respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J. Pineal Res.* 28, 242-248.

Martin MA, Ramos R, Mateos R, Granado-Serrano AB, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, Goya L (2008). Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7765-7772.

Martínez C, Ros G, Periago MJ, López G (1999). Biodisponibilidad del hierro en los alimentos. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49, 2, 106-113.

Martínez-Cayuela M (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica.* 39, 5-18.

Martínez-Cayuela M (2005). En *Tratado de Nutrición. Tomo I: "Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición"*. Cap. 1.19. "Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante". Ed. Acción médica.

Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Martínez-Losa E, Prado-Santamaría M, Brugarolas-Bufrau C, Serrano-Martínez M (2002). Role of fibre and fruit in the Mediterranean diet to Project against myocardial infarction: a case-control study in Spain. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 715-722.

Martinez-Torres C, Romano E, Layrisse M (1981). Effect of cysteine on iron absorption in man. *Am. J Clin Nutr.* 34, 322-327.

Martins SIFS, Van Boekel MAJS (2003a). Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructose 1-yl)-glycine degradation pathways. Part II-Kinetic analysis. *Carb. Res.* 338, 1665-1678.

Martins SIFS, Van Boekel MAJS (2003b). Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chem.* 83, 135-142.

Martins SIFS, Van Boekel MAJS (2005). A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chem.* 90, 257-269.

Masayo M, Toshiharu G (1982). *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 56, 417.

Masouka J, Hegenauer J, Van Dyke BR, Saltman P (1993). Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of Zn (II) and copper (II) to the high affinity site of serum albumin. *J. Biol. Chem.* 268, 21533-21537.

Masouka J, Saltman P (1994). Zinc (II) and copper (II) binding to serum albumin. A comparative study of dog, bovine, and human albumin. *J. Biol. Chem.* 25557-25561.

Mastrocola D, Munari M (2000). Progress of the Maillard reaction and antioxidant action of Maillard reaction products in preheated model systems during storage. *J. Agric. Food Chem.* 48, 8, 3555-3559.

Mataix Verdú J, Battino M (2002). En: *Nutrición y alimentación humana*. Vol. II, cap. 43: "Estrés oxidativo" Ed. Ergon.

Mataix Verdú J, Llopis González J (2002). En: *Nutrición y alimentación humana*. Vol. I, cap. 9: "Minerales" Ed. Ergon.

Mataix Verdú J, Mariné Font A (2002). En: *Nutrición y alimentación humana*. Vol. I, cap. 11: "Cereales y derivados y otros alimentos hidrocarbonados" Ed. Ergon.

Mates JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603.

Matmaroh K, Benjakul S, Tanaka M (2006). Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose-glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase. *Food Chem.* 98, 1-8.

- Matsuse T, Ohga E, Teramoto M, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y (1998). Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J. Clin. Pathol.* 51, 515-519.
- Mauron J (1981). The Maillard reaction in food: a critical review from de nutritional standpoint. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 5-35.
- Mauron J (1982). In: *Handbook of Nutrition Value of Processed Food*. Rechcigl M Jr, CRC Press: Boca Raton, FL, I. pp. 429-471.
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 22, 6049-6055.
- McCord JM (1979). In: *Reviews in biochemical toxicology*. Eds. Hodgson, E.; Berd, JR y Philpot, R.M. Elsevier, New York. Vol. I. pp. 190.
- Mckenzie B, Hediger MA (2004). SLC11 family of H⁺-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflügers Arch.* 447, 571-579.
- Mckenzie B, Garrick MD (2005). Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G981-G986.
- Mckie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali A, Hediger MA (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 291, 1755-1759.
- Mena MA, Casajeros MJ, Carazo A, Paino CL, García de Yébenes J (1997). Glia protects midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. *J. Neural Trasm.* 104, 317-328.
- Menendez-Pelaez M, Reiter RJ (1993). Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of cytosolic versus nuclear localization. *J. Pineal Res.* 15, 59-69.

Mesías M (2007). Importancia de la dieta en la digestibilidad y metabolismo de hierro y calcio en la adolescencia. Influencia del consumo de productos de la reacción de Maillard. Tesis Doctoral. Granada, España.

Methven L, Tsoukka M, Oruna-Concha MJ, Parker JK, Mottram D (2007). Influence of sulfur amino acids on the volatile and nonvolatile components of cooked salmon (*Salmo salar*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 1427-1436.

Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL (2001). Copper transport and metabolism are normal in Aceruloplasminemic mice. *J. Biol. Chem.* 276, 36857-36861.

Michalska A, Amigo-Benavent M, Zielinski H, del Castillo MD (2008). Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *J. Cereal Sci.* 48, 1, 123-132.

Migo VP, del Rosario EJ, Matsumura M (1997). Flocculation of melanoidins induced by inorganic ions. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 387-291.

Miller R, Olsson K, Pernemalm P, Theander O (1980). Studies of the Maillard reaction. Mechanism of saccharide polymerization and depolymerization. Marshall JJ (Ed). Academic Press: New York. pp. 421.

Miller R, Olsson K, Pernemalm P (1984). Formation of aromatic compounds from carbohydrates. IX. Reaction of D-glucose and L-lysine in slightly acidic aqueous solution. *Acta Chem. Scand B.* 38, 689-694.

Miller DD, Berner LA (1989). Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? *Biol. Trace Elem. Res.* 19, 11-24.

Miller H E, Rigelhof F, Marquart L, Prakash A, Kanter M (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 3, 312S-319S.

Min C Kang E, YU SH, Shinn SH, Kim YS (1999). Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 46, 197-202.

Minotti G, Aust SD (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44, 191-207.

Mlotkiewicz JA (1998). The role of the Maillard reaction in the food industry. In O'Brien J, Nursten HE, Crabbe MJC, Ames JM (Eds.). In: *The Maillard reaction in Food and Medicine*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 19-27.

Monnier VM, Sell DR (1994). The advanced Maillard reaction in aging and age-related-diseases probed with pentosidine In: *Maillard reactions in chemistry, food and health*. T.P. Labuza, G.A. Reineccius, V. Monnier, J. O'Brien, J. Baynes (Eds.). Cambridge: Science Park.

Monti SM, Bailey RG, Ames JM (1998). The influence of pH on the non-volatile reaction in a glucose-glycine solution. *Food Res. Int.* 62, 369-375.

Monti SM, Ritieni A, Graziani G, Randazzo G, Mannina L, Segre AL, Fogliano V (1999). LC/MS analysis and antioxidative efficiency of Maillard reaction products from a lactose-lysine model system. *J. Agric Food Chem.* 47, 1506-1513.

Montilla P, Tunez I, Muñoz MC, Soria JV, Lopez A (1997). Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by adryamycin. *Rev. Esp. Fisiol.* 53, 301-305.

Moon A, Murata M, Homma S (1994). Cu (II) chelating activity of glucose-lysine model melanoidin. In: *Maillard reaction in chemistry, food and health*. Labuza, TP; Reineccius GA, Monnier V, O'Brien J, Baynes J (Eds). The Royal Society of Chemistry. pp. 417.

Moore T, Constable BJ, Day KC, Impey SG, Symonds KR (1964). Copper deficiency in rats fed upon raw meat. *Br. J. Nutr.* 18, 135-146.

- Morales FJ, Romero C, Jiménez-Pérez S (1996). Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk resembling systems. *Food Chem.* 57, 423-428.
- Morales FJ, Romero C, Jiménez-Pérez S (1997). Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1570-1573.
- Morales FJ, Van Boekel MAJS (1998). A study of advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescent accumulation. *Int. Dairy J.* 7, 675-683.
- Morales FJ, Jiménez-Pérez S (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.* 72, 119-125.
- Morales FJ, Babbal MB (2002). Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2788-2792.
- Morales FJ, Jiménez-Pérez S (2004). Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 515-520.
- Morales FJ, Fernández-Fraguas C, Jiménez-Pérez S (2005). Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chem.* 90, 821-827.
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2004). *Tablas de composición de alimentos*, 8ª ed. Ed. Pirámide.
- Moreno FJ, Villamiel M, Olano A (2003). Effects of high pressure on isomerization and degradation of lactose in alkaline media. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1894-1896.
- Moreno J, Peinado J, Peinado RA (2007). Antioxidant activity of musts from Pedro Ximénez grapes subjected to off-wine drying process. *Food Chem.* 104, 224-228.
- Mortelmans K, Zeiger E (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.

Mossine VV, Mawhinney TP (2007). N α -(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-L-histidine (“D-fructose-L-histidine”): a potent copper chelator from tomato powder. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10373-10381.

Motai H, Ioune S (1974). Conversion of colour components of melanoidin products from the glycine-xylose system. *Agric. Biol. Chem.* 28, 2, 233-239.

Moughan PJ, Gall MPJ, Rutherford SM (1996). Absorption of lysine and deoxyketosyllisine in an early-Maillard browned casein in growing pig. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1520-1525.

Muir A, Hopfer U (1985). Regional specificity of iron uptake by small intestinal brush-border membranes from normal and iron deficient mice. *Gastroint. Liver Pathol.* 11, 6376-6383.

Mukhopadhyay CK, Fox PL (1998). Ceruloplasmin copper induces oxidant damage by a redox process utilizing cell-derived superoxide as reductant. *Biochem.* 37, 14222-14229.

Mukoyama T, Baba M, Morita H, Miyamoto T, Kaminogawa S, Yamauchi K (1977). Allergenicity of β -lactoglobulin in milk allergic children. *Clin. Immunol.* 8, 227-230.

Munch G, Gasic-Milenkovic J, Arendt T (2003). Effect of advanced glycation endproducts on cell cycle and their relevance for Alzheimer’s disease. *J. Neural Trans.* 65, 63-71.

Muñoz Hoyos A, Molina Carballo A (2005). Hierro. En *Tratado de Nutrición*, Tomo I, cap. 1.28. Ed. Acción médica.

Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y, Yoshida H (2002). Effects of epigallocatechin 3-O-gallate on cellular antioxidative system in HepG2 cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48, 89-94.

Murata M, Terasawa N, Homma S (1992). Screening of microorganisms to decolorize a model melanoidin and the chemical properties of a microbially treated melanoidin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1182-1187.

Muriel P (1997). Peroxidation in liver and lipid damage. In: *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Baskim y Salem (Eds.). Taylor & Francis, New York. Vol. 14, pp. 237-257.

Murthy Chidambara KN, Vanitha A, Rajesha J, Mahadeva Swamy M, Sowmya PE, Ravishankar GA (2005). In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*- a green microalga. *Life Sci.* 76, 1381-1390.

Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K (1974). Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 358, 251-261.

Nakamura-Takada Y, Shata H, Miano M, Ogawa H, Sekuguchi N, Murata M, Homma S (1994). Isolation of a zinc-chelating compound from instant coffee by the tetramethylmurexide method. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie.* 27, 115-118.

Nakamura A, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H (2005). Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7559-7564.

Nakamura A, Sasaki F, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH, Saeki H (2006). Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *J. Agric. Food. Chem.* 54, 9529-9534.

Namiki M (1988). Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.* 32, 115-184.

Naranjo GB, Malec LS y Vigo MS (1998). Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chem.* 62, 309-313.

Narasinga-Rao BS, Subba-Rao K (1992). Studies on the role of iron binding ligands and the intestinal brush border receptors in iron absorption. *Indian J. Biochem. Biophys.* 29, 214-218.

National Toxicology Program (1979). Bioassay of butylated hydroxytoluene (BHT) for possible carcinogenicity. *Natl. Cancer Inst. Carcinog. Tech. Rep. Ser.* 150, 1-131.

Navarro MP, Aspe T, Seiquer I (2000). Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3589-3596.

Navarro MP (2003). Impact of Maillard reaction products on mineral bioavailability. In: M.P. Vaquero, T. García-Arias, A. Carbajal, F.J. Sánchez-Muniz (Eds.). *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. Metabolic and technological aspect.* Kerala, India: Research Signpost.

Nevado, A (2000). Valoración del papel antioxidante de la melatonina frente a la intoxicación por adriamicina. Estudio a nivel de hepatocito y eritrocito en ratas Wistar. Tesis doctoral. Granada, España.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8780-8785.

Nicoli MC, Anese M, Manzocco L, Lericri CR (1997). Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *Lebensm.-Wiss- Technol.* 30, 292-297.

Nicoli MC, Toniolo R, Anese M (2004). Relationship between redox potential and chain-breaking activity of model systems and foods. *Food Chem.* 88, 79-83.

Nienaber U, Eichner K (1995). Die antioxidative Wirkung von Produkten der Maillard-Reaktion in Modellsystemen und gerösteten Haselnüssen. *Fett. Wiss. Tech.* 97, 435-444.

Nieto N (1993). Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Granada, España.

Nijssen LM, Visscher CA, Maarse H, Willemsens LC (1996). Volatile compounds in food, qualitative and quantitative data, 7th ed.; Central Institute for Nutrition and Food Research, TNO: Zeist, The Netherlands.

Niki E, Saito M, Yoshikawa Y, Yamamoto Y, Kamiya Y (1986). Oxidation of lipids. XII. Inhibition of oxidation of soybean phosphatidylcholine and methyl linoleate in aqueous dispersions by uric acid. *B. Chem. Soc. Jpn.* 59, 471-477.

Niki E (1991). Vitamin C as an antioxidant. *World Rev. Nutr. Diet.* 64, 1-30.

Niki E (1995). α -tocopherol. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer L y Cadenas E (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York, 3-25.

Nuñez MT, Tapia V, Toyokuni S, Okada S (2001). Iron-induced oxidative damage in colon carcinoma (Caco-2) cells. *Free Rad. Res.* 34, 57-68.

O'Brien J, Morrissey PA (1989a). The Maillard reaction in milk products. *Bull. Int. Dairy Fed.* 238, 53-61.

O'Brien J, Morrissey PA (1989b). Nutritional and toxicological aspects of Maillard browning reactioning foods. *Crit. Rev. Food. Sci.* 28, 211-278.

O'Brien J, Morrissey PA, Flynn A (1994). Alterations of Maillard metabolism and secondary pathology in rats fed Maillard reaction products. In: *Maillard reaction in Chemistry, Food and Health*. Labuza TP, Reineccius GA, Monnier V, O'Brien J y Baynes J. (Ed). pp. 397-401.

O'Brien J, Morrissey PA (1997). Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. *Food Chem.* 58, 17-27.

O'Brien J, Nursten HE, Crabbe MJC, Ames JM (1998). In: *The Maillard reaction in foods and medicine*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

O'Brien NM, Woods JA, Aherne SA, O'Callaghan YC (2000). Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture model: Modulatory effects of phytochemicals. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 22-26.

O'Halloran TV, Culotta VC (2000). Metallochaperones, an intracellular copper shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275, 25057-25060.

Ochoa JJ, Vílchez MJ, Palacios MA, García JJ, Reiter RJ, Muñoz-Hoyos A (2003). Melatonin protects against lipid peroxidation and membrane rigidity in erythrocytes from patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *J. Pineal Res.* 35, 2, 104-108.

Oestreicher P, Cousins RJ (1985). Copper and zinc absorption in the rat: mechanism of mutual antagonism. *J. Nutr.* 115, 159-166.

Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood.* 108, 1388-1394.

Okamoto H (1985). Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells of islets of Langerhans. *Bioassays.* 2, 15-21.

Öste R, Sjödin P (1984). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies on rats. *J. Nutr.* 114, 2228-2234.

Öste R, Sjödin P, Jägerstad M, Björck I, Dahlqvist A (1984). Effect of Maillard reaction products on carbohydrate utilization-studies *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem.* 16, 37-47.

Öste R, Dahlqvist A, Sjötröm H, Norén O, Miller R (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. *J. Agric. Food Chem.* 34, 355-358.

Oury TD, Day BJ, Crapo JD (1996a). Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 957-965.

Oury TD, Day BJ, Crapo JD (1996b). Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.* 75, 617-636.

Ozcelik D, Uzun H (2008). Copper intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Biol. Trace Elem. Res.* Artículo periódico.

Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E (1998). Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in the brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 32, 69-75.

Painter TJ (1998). Carbohydrate polymers in food preservation: an integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs. *Carb. Polym.* 36, 335-347.

Palmiter RD (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8428-8430.

Pan YJ, Loo G (2000). Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T- lymphocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 28, 824-830.

Papas AM (1999). Diet and antioxidant status *Food Chem. Toxicol.* 37, 999-1007.

Papetti A, Daglia M, Aceti C, Quaglia M, Gregotti C, Gazzani G (2006). Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from roasted barley. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4, 1209-1216.

Paraidathathu T, de Groot H, Kehrer JP (1992). Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Rad. Biol. Med.* 13, 289-298.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 276, 7806-7810.

Parker JK, Hassell GME, Mottram DS, Guy RCE (2000). Sensory and instrumental analyses of volatiles generated during the extrusion cooking of oat flours. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3497-3506.

Parks DA, Granger DN (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.* 548, 87-99.

Pekelharing HLM, Lemmens AG, Beynen AC (1994). Iron, copper and zinc status in rats fed on diets containing various concentrations of tin. *Br. J. Nutr.* 71, 103-109.

Peres JM, Bouhallab S, Bureau F, Maubois JL, Arhan P, Bouglé D (1999). Reduction of iron/zinc interactions using metal bound to the caseinphosphopeptide 1-25 of β -casein. *Nutr. Res.* 9, 1655-1663.

Perez-Llamas F, Diepenmaat-Wolters MGE, Zamora S (1997). Influence of different types of protein on in vitro availability of intrinsic and extrinsic iron and zinc. *J. Sci. Food Agric.* 75, 303-311.

Pergolizzi R, Lifshitz F, Teichberg S, Wapnir RA (1977). Interaction between dietary carbohydrates and intestinal disaccharidases in experimental diarrhea. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 482-489.

Perkins EG, Baker DH, Johnson GH, Makowski E (1981). The metabolism of fructose-phenylalanine in the rat. *Progr. Food Nutr. Sci.* 5, 229-242.

Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 55, PL271-PL276.

Pieri C, Moroni M, Marcheselli F, Recchioni R (1995). Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch. Gerontol. Geriat.* 20, 159-165.

Pigeon C, Ilyn G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* 276, 7811-7819.

Pilcova L, Pokorny J, Davidek J (1990). Browning reactions of Heyns rearrangement products. *Nahrung.* 34, 759-761.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay M, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47, 323-330.

Pischetsrieder M, Rinaldi F, Gross U, Severin T (1998). Assessment of the antioxidative and prooxidative activities of two aminoreductones formed during the Maillard reaction: effects on the oxidation of β -carotene, N^{α} -acetylhistidine and cis-alkenes. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2945-2950.

Plavsic M, Cosovic B (1994). Influence of surface active of substances on the redox processes of metal ions: a contribution to the speciation analysis of metals in aquatic systems. *Anal. Chim. Acta.* 284, 539-545.

Plavsic M, Cosovic B, Lee C (2006). Copper complexing properties of melanoidins and marine humic material. *Sci. Total Environment.* 366, 310-319.

Powrie WD, Wu CH, Rosin MP, Stich HF (1981). Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems. *J. Food Sci.* 46, 1433-1438.

Prakash A, Rigelhof F, Miller E (2001). Antioxidant activity. Medallion Laboratories. *Analytical Progress.* 19, 2, 1-6. (www.medlabs.com).

Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR. (1994). Acclimation, hydrogen peroxide and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maite seedlings. *Plant Physiol.* 105, 2, 619-627.

Priestley J (1775). Experiments and observations on different kinds of air. Vol II. Sections III-V. In: Priestly J. The discovery of oxygen. Part I. Edinburgh: The Alembic Club, 1923, 29-103.

Proctor PH, Reynolds ES (1984). Free radicals and disease in man. *Physiol. Chem. Phys.* 16, 175-195.

Prohaska JR (1990). Biochemical changes in copper deficiency: possible mechanism of action. *J. Nutr. Biochem.* 1, 452-461.

Prohaska JR, Gybina AA (2004). Intracellular copper transport in mammals. *J. Nutr.* 134, 5, 1003-1006.

Pryor WA (1986). Oxy-radicals and related species: Their formation, life-times, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 657-667.

Pryor WA (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad. Biol. Med.* 28, 141-164.

Pucheu S, Coudray C, Tresallet N, Favier A, de Leiris J (1993). Effect of iron overload in the isolated ischemic and reperfused rat-heart. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 7, 4, 701-711.

Puig S, Thiele DJ (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 171-180.

Puyfoulhoux G, Rouanet JM, Besancon P, Baroux B, Baccou JC, Capociccio B (2001). Iron bioavailability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1625-1629.

Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Siu AW, García JJ (2001). Increased level of oxidatively damaged DNA induced by chromium (III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. *J. Pineal Res.* 29, 54-61.

Ramírez-Jimenez AJ (1998). Indicadores de las reacciones de pardeamiento químico en productos canarios. Memory of pharmacy degree of licenciante. The University of Granada, Spain.

Ramírez R, Cava R (2007). Volatile profiles of dry-cured meat products from three different Iberian X duroc genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1923-1931.

Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M (1997). Oxidant-induced disruption on intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 273, G812-G823.

Rao RK, Baker RD, Baker SS (1999). Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidemial growth factor. *Biochem. Pharmacol.* 5, 685-695.

Raveh O, Pinchuk I, Schnitzer E, Fainaru M, Schaffer Z, Lichtenberg D (2000). Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of HDL, autoaccelerated and tocopherol-mediated peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 131-146.

Reineccius GA (1990). The influence of Maillard reactions on the sensory properties of foods. In: P.A. Finot, H.U. Aeschbacher, F. Hurrell, R. Liardon (Eds.). *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology.* Birkhauser: Basel.

Reiser S, Ferreti RF, Fields M, Smith JC Jr (1983). Role of dietary fructose in the enhancement of mortality and biochemical changes associated with the copper deficiency in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 38, 214-222.

Reiser S, Smith JC Jr, Mertz W, Holbrook JT, Scholfield DJ, Powell AS, Canfield WK, Canary JJ (1985). Indices of copper status in humans consuming a typical American diet containing either fructose or starch. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 242-251.

Reiter RJ (1991). Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol. Sci.* 6, 223-227.

- Reiter RJ (1997). Antioxidant actions of melatonin. *Adv. Pharmacol.* 38, 103-117.
- Reiter RJ, Guerrero JM, García JJ, Acuna-Castroviejo D (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage and aging: relation to melatonin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 854, 410-424.
- Reiter RJ (1998a). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 56, 359-384.
- Reiter RJ (1998b). Cytoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. *Nutr.* 14, 9, 691-696.
- Reiter RJ (1999). Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. *Neuroendocrinol. Lett.* 10, 145-150.
- Reiter RJ (2000). Melatonin: lowering the high price of free radicals. *New Physiol. Sci.* 15, 246-250.
- Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR (2000). Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol. Signals Recept.* 9, 160-171.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem. Biophys.* 34, 2, 237-256.
- Rendleman JA (1987). Complexation of calcium by the melanoidin and its role in determining bioavailability. *J. Food Sci.* 52, 1699-1705.
- Rendleman JA, Inglett GE (1990). The influence of Cu (II) in the Maillard reaction. *Carbohydr. Res.* 201, 311-326.
- Renn PT, Sathe SK (1997). Effects of pH, temperature, and reactant molar ratio on L-leucine and D-glucose Maillard browning reaction on an aqueous system. *J. Agric. Food Chem.*, 45 3782-3787.

- Rerat A, Calmes R, Vaissade P, Finot PA (2002). Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *Eur. J. Nutr.* 41, 1-11.
- Resmini P, Pellegrino L, Pagani MA, De Noni I (1993). Formation of 2-acetyl-3-D-glucopyranosylfuran (glucosylisomaltol) from nonenzymatic browning in pasta drying. *Ital. J. Food Sci.* 4, 341-353.
- Resmini P, Pellegrino L (1994). Occurrence of protein-bound lysilpyrrolaldehyde in dried pasta. *Cereal Chem.* 71, 254-262.
- Retsky KL, Chen J, Zeind J, Frei B (1999). Inhibition of copper-induced LDL oxidation by Vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 90-98.
- Rewicki D, Kersten E, Helak B, Nittka C, Tressel C (1994). Mechanistic studies on the formation of Maillard products from [1-¹³C]-D-fructose. In: *Maillard reactions and chemistry. Proceedings of the 5th International Symposium on the Maillard Reaction.* The Royal Society of Chemistry: London. pp. 61-74.
- Reynolds TM (1963). Chemistry of nonenzymatic browning. *Adv. Food Res.* 12, 1-52.
- Richelle M, Tavazzi I, Offord E (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa and tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3438-3442.
- Rincker MJ, Hill GM, Link JE, Meyer AM, Rowntree JE (2005). Effects of dietary zinc and iron supplementation on mineral excretion, body composition, and mineral status of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 83, 2762-2774.
- Riso P, Santangelo A, Porrini M (1999). The COMET assay for the evaluation of cell resistance to oxidative stress. *Nutr. Res.* 19, 325-333.

Rizzi GP (1994). The Maillard reaction in foods. In: TP Labuza, GA Reineccius, V Monnier, J O'Brien, J Baynes (Eds.). Maillard reaction in chemistry, food and health. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

Robert F, Vuataz G, Pollien P, Saucy F, Alonso MI, Bauwens I, Blank I (2005). Acrylamide formation from asparagine under low moisture Maillard reaction conditions. 2. Crystalline vs Amorphous model systems. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4628-4632.

Röhrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R (2002). The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE Cells. *Am. Soc. Nutr. Sci. J. Nutr.* 132, 370-375.

Roig MG, Bello JF, Rivera ZS, Kennedy JF (1999). Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Res. Int.* 32, 609-619.

Rosen L, Johnson KC, Pigman W (1953). Reactions of carbohydrates with nitrogenous substances. II. Factors affecting the darkening of N-D-glucosylaniline. *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 3460-3464.

Rosin MP, Stich HF, Powrie WD, Wu HC (1982). Induction of mitotic gene conversion by browning reaction products and its modulation by naturally occurring agents. *Mutat. Res.* 101, 189-197.

Rossander-Hulthen L, Brune M, Sandstrom B, Lonnerdal B, Hallberg L (1991). Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 152-156.

Rotilio G, Calibrese L, Bossa F, Barza D, Agrò AF, Mondovi B (1972). Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzyme activity of bovine superoxide dismutase. *Biochem.* 11, 2182-2187.

Roy RS, McCord JM (1983). Superoxide and ischemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: Oxy radicals and their scavenger systems Vol. II. Greenwald y Cohen (Eds.). Elsier Science Publishing. pp. 145-153.

Rufián-Henares JA, García-Villanova B, Guerra-Hernández E (2002). Furosine content, loss of o-phthalaldehyde reactivity, fluorescence and colour in stored enteral formulas. *Int. J. Dairy Technol.* 55, 121-126.

Rufián-Henares JA, Morales FJ (2007). Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Res. Int.* 40, 995-1002.

Ruiz-Roca B, Navarro MP, Seiquer I (2008). Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures. Relationships with mineral absorption across caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* 56, 19, 9056-9063.

Ryan TP, Aust SD (1992). The role of iron oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 119-141.

Sacchetti G, Di Mattia C, Pittia P, Mastrocola D (2008). Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J. Food Eng.* 90, 74-80.

Salovaara S, Sandberg AS, Andlid T (2002). Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6233-6238.

Samaras TS, Gordon MH, Ames JM (2005a). Antioxidant properties of malt model systems. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4938-4945.

Samaras TS, Camburn PA, Chandra SX, Gordon MH, Ames JM (2005b). Antioxidant properties of kilned and roasted malts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8068-8074.

Samman S, Sandstrom B, Toft MB, Bukhare K, Jensen M, Sorensen SS, Hansen M (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 607-612.

Sanchez-Moreno C, Larraure JA, Saura-Calixto F (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270-276.

Sarriá B, López-Fandino R, Vaquero MP (2001). Does processing of a powder or in bottle sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutr.* 17, 326-331.

Sarriá B, Vaquero MP (2004). Iron bioavailability from powdered and in-bottle-sterilized infant formulas in suckling and weaning rats. *Nutr.* 20, 788-793.

Sarriá B, Vaquero MP (2006). Heat processing in infant formulas induces changes in copper tissue levels in suckling and weaning rats. *Ann. Nutr. Metab.* 50, 1, 25-30.

Sawa T, Akaike T, Kida K, Fukushima Y, Tagaki K, Maeda H (1998). Lipid peroxy radicals from oxidized oils and heme iron: implications of a high-fat diet in colon carcinogenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 1007-1012.

Saxena AK, Saxena P, Wu X, Obrenovich M, Weiss MF, Monnier VM (1999). Protein aging by carboxymethylation of lysines generates redox active and divalent metal binding sites: relevance to diseases of glycoxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 332-338.

Saxena P, Saxena AK, Cui XL, Obrenovich M, Gudipaty K, Monnier VM (2000). Transition metal-catalyzed oxidation of ascorbate in human cataract extracts: possible role of advanced glycation end products. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 6, 1473-1481.

Scarino ML, Poverini R, Di Lullo G, Bises G (1991). Metallothionein gene expression in the intestinal cell: modulation of mRNA and protein synthesis by copper and zinc. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 283S.

Scheele CW (1777). *Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer*. Uppsala and Leipzig. Section 2. En: Scheele CW. *The collected papers of Carl Wilhelm Scheele*. Bell and Sons. London 1931 y Kraus Reprint Co., New York, 1971, 85-178.

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D (1999). Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ. Res.* 84, 489-497.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2001). The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 108, 949-955.

Schumacher D, Kroh LW (1996). Zum Einflub von Maillard Reaktionproducten auf Enzymreaktionen. *Z. Ernaehrungswiss.* 35, 213-225.

Schwarzenbolz U, Klostermeyer H, Henle T (2000). Maillard-type reactions under high hydrostatic pressure: formation of pentosidine. *Eur. Food. Res. Technol.* 211, 208-210.

Scout KC, Turnlund JR (1994). Compartment model of copper metabolism in adult men. *J. Nutr. Biochem.* 5, 342-350.

Seftel AD, Vaziri ND, Ni D, Razmjouei K, Fogarty J, Hampel N, Polar J, Wang RZ, Ferguson K, Block C, Haas C (1997). Advanced glycation end products in human penis: elevation in diabetic tissue, site of deposition, and posible effect through iNOS or eNOS. *Urology.* 50, 1016-1026.

Seifert ST, Krause R, Gloe K, Henle T (2004). Metal complexation by peptide-bound Maillard reaction products N^ε-Fructoselysine and N^ε-Carboxymethyllysine. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2347-2350.

Seiquer I, Delgado-Andrade C, Navarro P (2000). Effects of the heat treatment of casein on Zn transport and uptake by Caco-2 cells. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 134-139.

Seiquer I, Aspe T, Vaquero P, Navarro MP (2001). Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium biavailability: in vitro and in vivo assays. *J. Agr. Food Chem.* 49, 2, 1049-1055.

Seiquer I, Aspe T, Pérez-Granados AM, Navarro MP (2002). Consumption of raw and fried sardine (*Clupea pilchardus*) as protein source of diets: effects on iron metabolism in rats. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1497-1503.

Seiquer I, Díaz-Alguacil J, Delgado-Andrade C, López-Frías M, Muñoz Hoyos A, Galdó G, Navarro MP (2006). Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1082-1088.

Seiquer I, Ruiz-Roca B, Mesías M, Muñoz-Hoyos A, Galdó G, Ochoa JJ, Navarro MP (2008). The antioxidant effect of a diet rich in Maillard reaction products is attenuated after consumption by healthy male adolescents. *In vitro* and *in vivo* comparative study. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1245-1252.

Semmerlroch P, Laskawy G, Blank I, Grosch W (1995). Determination of potent odourants in roasted coffee by stable isotope dilution assays. *Flavour Fragr. J.* 10, 1-7.

Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L, Hochstein P (1990). Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase and cytochrome P₄₅₀. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 145-152.

Shaich KM (1980). Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing radiation and ultra violet radiations and lipid oxidation-part III: free radical transfer from oxidized lipids. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 189-244.

Shaich KM (1992). Metals lipid oxidation: Contemporary issues. *Lipids.* 27, 209-218.

Shaidi F, Wanasundara PKJPD (1992). Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32, 67-103.

Shallenberger RS, Birch CG (1975). *Sugar Chemistry*. The Avi Publishing Company, Inc.: Westport, CT, 169-193.

- Shan BG (1981). Chelating agents and bioavailability of minerals. *Nutr. Res.* 1, 617-622.
- Sharma KK (2003). Improving bioavailability of iron in Indian diets through food-based approaches for the control of iron deficiency anemia. *Revista Alimentación, Nutrición y Agricultura.* 32, 51-61.
- Sharp PA (2003). Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 288-291.
- Shayeghi M, Latunde-Dada Go, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 122, 789-801.
- Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund MT (1994). High melatonin solubility in aqueous media. *J. Pineal Res.* 16, 198-201.
- Shinohara K, Wu RT, Jahan N, Tanaka M, Morinaga N, Murakami H, Omura H (1980). Mutagenicity of the browning mixture by amino-carbonyl reactions on *Salmonella typhimurium* TA 100. *Agric. Biol. Chem.* 44, 671-672.
- Shinohara J, Jahan N, Yamamoto K, Wu RT, Murakami H, Omura H (1983). Formation of mutagens by aminocarbonyl reactions. *Mutat. Res.* 122, 279-286.
- Sies H (1985). Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H (ed). *Oxidative Stress.* London: Academic Press. pp. 1-8.
- Sies H (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219.
- Sies H, Stahl W, Sevanian A (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J. Nutr.* 135, 969-972.
- Simonato B, Pasini G, Giorato M, Spettoli P, Curioni A (2002). Effetto della cottura sulla digeribilità in vitro delle proteine dell'impasto per pane. (Effect of cooking on in vitro protein digestibility of bread dough.). *Tecnica-Molitoria,* 53, 1118-1126.

Sinet PM, Garber P (1981). Inactivation of the human copper-zinc superoxide dismutase during exposure to the superoxide radical and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 212, 411-416.

Singh D, Nath K, Sharma YK (2007a). Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *J. Environ. Biol.* 28, 409-414.

Singh S, Gamlath S, Wakeling L (2007b). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 916-929.

Skaper SD, Fabris M, Ferrari V, Dalle CM, Leon A (1997). Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 669-678.

Skikne B, Lynch S, Cook J (1981). Role of gastric acid in food iron absorption. *Gastroenterol.* 81, 1068-1071.

Skog K, Johansson M, Jägerstad M (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *J. Food Chem. Toxicol.* 36, 879-896.

Slade R, Crissman K, Norwood J, Hatch G (1993). Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs and rats. *Exp. Lung. Res.* 19, 469-484.

Slaga TJ (1995). The inhibition of skin tumor initiation, promotion, and progression by antioxidants and related compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 51-57.

Smith S, Alfawaz M (1995). Antioxidative activity of Maillard reaction products in cooked ground beef, sensory and TBA values. *J. Food Sci.* 60, 234-240.

Soares DG, Andreazza AC, Salvador M (2003). Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS,

DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4, 1007-1080.

Solyakov A, Skog K, Jägerstad M (2002). Binding of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines to MRPs under stimulated gastrointestinal conditions. In: Fogliano V, Henle T. (Eds.). *Melanoidins in food and health*, EC Directorate for Research, Vol 3, pp.195-197.

Somoza V (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 663-672.

Somoza V, Wenzel E, Lindenmeier M, Grothe D, Erbersdobler HF, Hofmann T (2005). Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 53, 21, 8176-8182.

South PK, Miller DD (1998). Iron binding by tannic acid: Effects of selected ligands. *Food Chem.* 63, 167-172.

Southorn PA, Powis G (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proc.* 63, 381-389.

Spalholz JE, Boylan LM (1991). Glutathione peroxidase: The two selenium enzymes. In: *Peroxidases on chemistry and biology*. Everse J, Evers KE, Grisham MB (Eds). Boca Raton, CRC Press.

Srigiridhar K, Nair KM, Subramanian R, Singotamu L (2001). Oral repletion of iron induces free radical mediated alterations in the gastrointestinal tract of rat. *Mol. Cell Biochem.* 219, 91-98.

Stadtman ER (1991). Ascorbic acid and oxidative inactivation of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1125S-1128S.

Stadtman ER (1992). Protein oxidation and aging. *Science.* 257, 1220-1224.

- Stadman ER, Levine RL (2000). Protein oxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899, 191-208.
- Starvic B, Matula TI, Klassen R, Downie RH (1995). Evaluation of hamburgers and hot dogs for the presence of mutagens. *Food Chem. Toxicol.* 33, 815-820.
- Stegink LD, Freeman JB, Den Besten L, Filer LJ (1981). Maillard reaction products in parenteral nutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 265-278.
- Stevens MD, Di Silvestro RA, Harris ED (1984). Specific receptors for ceruloplasmin in membrane fragments from aortic and heart tissues. *Biochem.* 23, 261-266.
- Stitt AW, Bucala R, Vlassara H (1997). Atherogenesis and advanced glycation: promotion, progression and prevention. *A. N.Y. Acad. Sci.* 811, 115-127.
- Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME (2002). Advanced glycation end products and diabetic complications. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 11, 1205-1223.
- Stitt AW, Hughes SJ, Canning P, Lynch O, Cox O, Frizzell N, Thorpe SR, Cotter TG, Curtis TM, Gardiner TA (2004). Substrates modified by advanced glycation endproducts cause dysfunction and death in retinal pericytes by reducing survival signals mediated by platelet-derived growth factor. *Diabetologia.* 47, 1735-1746.
- Stitt AW (2005). The Maillard reaction in eye diseases. *A. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 582-597.
- Stocs SJ, Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 2, 321-336.
- Suarez G, Etlinger JD, Maturana J, Weitman D (1995). Fructated protein is more resistant to ATP-dependent proteolysis than glucated protein possibly as a result of higher content of Maillard fluorophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 209-213.

- Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* 95, 290-299.
- Summa C, Cordeiro-Raposo F, McCourt J, Lo Scalzo R, Wagner KH, Elmadfa I, Anklan E (2006). Effect of roasting on the radical scavenging activity of cocoa beans. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 368-375.
- Summa C, McCourt J, Cämmerer B, Fiala A, Probst M, Kun S, Anklam E, Wagner KH (2008). Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of Cocoa bean Maillard Reaction products with degree of roasting. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 342-351.
- Sun Y, Hayakawa S, Izumori K (2004). Antioxidative activity and gelling rheological properties of dried egg White glycated with a rare keto-hexose through the Maillard reaction. *J. Food Sci.* 69, 6, 427-434.
- Sun Y, Hayakawa S, Jiang H, Ogawa M, Izumori K (2006a). Rheological characteristics of heat induced custard pudding gels with high antioxidative activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2859-2867.
- Sun Y, Hayakawa S, Chuamanochan M, Fujimoto M, Innun A, Izumori K (2006b). Antioxidants effects of Maillard reaction products obtained from ovoalbúmina and different D-aldohexoses. *Biosci. Biotech. Biochem.* 70, 3, 598-605.
- Sun Y, Hayakawa S, Puangmanee S, Izumori K (2006c). Chemical properties and antioxidative activity of glycated α -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction. *Food Chem.* 95, 509-517.
- Svingen BA, Buege JA, Oneal FO, Aust SD (1979). Mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation-propagation of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 254, 13, 5892-5899.
- Symonyan MA, Nalbandyan RM (1972). Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes. *FEBS Letts.* 28, 22-24.

Tai Ch-Y, Ho Ch-T (1998). Influence of glutathione oxidation and pH on thermal formation of Maillard-type volatile compounds. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2260-2265.

Tailleux A, Torprier G, Bonnefont-Rousselot D, Lestavel S, Lemdani M, Caudeville B, Furman C, Foricher R, Gardes-Albert M, Lesieur D, Rolando C, Teissier E, Fruchart JC, Clavey V, Fievet C, Duriez P (2002). Daily melatonin supplementation in mice increases atherosclerosis in proximal aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1114-1123.

Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC (1982). Determination and analysis of the 2A structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 160, 181-217.

Tamaoka T, Itoh N, Hayashi R (1991). High-pressure effect on Maillard Reaction. *Agric. Biol. Chem.* 55, 2071-2074.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993). Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1, 57-60.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC (1999). Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472, 206-214.

Tarassuk NP, Simonson HD (1950). The browning and fluorescence of evaporated milk. *Food Technol.* 4, 88-92.

Tavassoli M, Kishimoto T, Kataoka M (1986). Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *J. Cell Biol.* 102, 1298-1303.

Taylor P, Martinez-Torres C, Romano E, Layrisse M (1986). Effect of cysteine-containing peptides related during metal digestion on iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 43, 68-71.

Tennant J, Stansfield M, Yamaji S, Srari SK, Sharp P (2002). Effects of copper on the expression of metal transporters in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters*. 527, 239-244.

Terasawa N, Murata M, Homma S (1991). Separation of model melanoidin into components with copper chelating Sepharose 6B column chromatography and comparison of chelating activity. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1507-1514.

Terasawa N, Murata M, Homma S (1996). Comparison of brown pigments in foods by microbial decolorization. *J. Food Sci.* 61, 669-672.

Tewari G, Jayas DS, Holley RA (1999). High-pressure processing of foods: an overview. *Sci. Aliments*. 19, 619-661.

Thomsen MK, Lauridsen L, Skibsted LH, Risbo J (2005). Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7082-7090.

Thornalley PJ (1998). Glutathione-dependent detoxification of α -oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem. Biol. Interact.* 111, 137-151.

Thorvaldsson K, Skjöldebrand C (1998). Water diffusion in bread during baking. *Lebensm-Wiss. Technol.* 31, 658-663.

Tijmes M, Pedraza R, Valladares L (1996). Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*. 61, 65-68.

Tonkovic M, Jakas A, Horvat S (1996). Preparation and properties of and Fe (III)-complex with an Amadori compound derived from L-tyrosine. *BioMetals*. 9, 55-59.

Touitou Y (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp. Gerontol.* 36, 1083-1100.

Toyokuni S (1996). Iron-induced carcinogenesis: The role of redox regulation. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 553-566.

Tressl R, Wondrak GT, Krüger RP, Rewicki D (1998). New melanoidin-like Maillard polymers from 2-Deoxypentoses. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1, 104-110.

Tressl R, Rewicki D (1999). Heat generated flavours and precursors. In: R Teranishi, I Hornstein, EL Wick (Eds.). *Flavor chemistry: Thirty years of progress.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 305-325.

Tuntawiroon M, Sritongkul N, Brune M, Rossander-Hultén L, Pleehachinda R, Suwanik R, Hallberg L (1991). Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in food on nonheme iron absorption in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 554-557.

Turjanski AG, Leonik F, Estrin DA, Rosenstein RE, Doctorovich F (2000). Scavenging of NO by melatonin. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10468-10469.

Turkmen N, Sari F, Poyrazoglu ES, Velioglu YS (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.* 95, 653-657.

Turnlund JR, King JC, Gong B, Keyes WR, Michel MS (1985). A stable isotope study of copper absorption in young men: effect of phytate and α -cellulose. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 18-23.

Turnlund JR, Keyes WR, Erson HL, Acord LL (1989). Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper using the stable isotope ^{65}Cu . *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 870-878.

Turnlund JR, Keyes WR, Peiffet GL, Scott KC (1998). Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope ^{65}Cu . *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1219S-1225S.

Uauy R, Olivares M, Gonzalez M (1998). Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 952S-959S.

- Uchida T, Akitsuki T, Kimura H, Tanaka T, Matsuda S, Kariyone S (1983). Relationship among plasma iron, plasma iron turnover, and reticuloendothelial iron release. *Blood*. 61, 799-802.
- Udilova N, Jurek D, Marian B, Gille L, Schulte-Hermann R, Nohl H (2003). Induction of lipid peroxidation in biomembranes by dietary oil components. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1481-1489.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation. *Biochim. Biophys Acta.* 710, 197-211.
- Ursini F, Maiorino M, Hochstein P, Ernster L (1989). Microsomal lipid peroxidation: mechanism of initiation. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 31-36.
- Uzel C, Conrad ME (1998). Absorption of heme iron. *Semin. Hematol.* 35, 27-34.
- Vagnarelli P, Sario AD, Cuzzoni MT, Mazza P, Carli, LD (1991). Cytotoxicity and clastogenic activity of ribose-lysine browning model system. *J. Agric. Food Chem.* 39, 2237-2239.
- Valenzuela A, Videla LA (1989). Formas activas del oxígeno, estrés oxidativo y su proyección patológica. *Rev. Med. Chile.* 117, 60-67.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interactions.* 160, 1-40.
- Valle-Riestra J, Barnes R (1969). Digestion of heat-damaged egg albumen by the rat. *J. Nutr.* 100, 873-882.
- Valls-Bellés V, Torres MC, Muñiz P, Boix L, Gonzalez-Sanjose ML, Codoner-Franch P (2004). The protective effect of melanoidins in adriamycin-induced oxidative stress in rat isolated hepatocytes. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1701-1707.

Van Boekel MAJS, Brands C (1998). Heating of sugar-casein solutions: Isomerization and Maillard reactions. In: The Maillard reaction in foods and medicine. O'Brien J, Nursten HB, Crabbe MJC, Ames JM. (Eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 154-158.

Van Boekel MAJS (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol. Adv.* 24, 230-233.

Van Campen DR, Mitchell EA (1965). Absorption of Cu⁶⁴, Zn⁶⁵, Mo⁹⁹, and Fe⁵⁹ from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 86, 120-124.

Van Campen DR, Scaife PV (1967). Zinc interference with copper absorption in rats. *J. Nutr.* 91, 473-476.

Van Campen DR, Gross E (1968). Influence of ascorbic acid on the absorption of copper by rats. *J. Nutr.* 95, 617-622.

Van Loon WAM, Linssen JPH, Legger A, Posthumus MA, Voragen AGJ (2005). Identification and olfactometry of French fries flavour extracted at mouth conditions. *Food Chem.* 90, 417-425.

Van-Reterghem R, De Block J (1996). Furosine in consumption milk and milk powders. *Int. Dairy J.* 6, 371-382.

Vernin G (1980). *Parfums. Cosmet. Aromes.* 32, 77.

Vía del Crespo MB (2002). Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos in vitro con cultivos celulares. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Dpto. Medicina Preventiva y Salud Pública, España.

Viadel B, Barberá R, Farré R (2006). Calcium, iron and zinc uptakes by Caco-2 cells from white beans and effect of cooking. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 57, 190-197.

Vieths S, Hoffmann A, Holzhauser T, Müller U, Reindl J, Hausteiner D (1998). Factors influencing the quality of foods extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy.* 53, S46, 65-71.

- Villamiel M, Corzo N (2000). Changes in furosine, free monosaccharides and beta-lactoglobulin during storage of dried milk products. *Milchwissenschaft*. 55, 2, 90-92.
- Viña J (2001). Deporte de alta competición y daño oxidativo. Papel de los nutrientes antioxidantes. *Nutr. Clin*. 21, 190-201.
- Viswanathan L, Sarma PS (1957). A growth inhibitor of *L.bulgaricus* 09. *Nature*. 180, 1370-1371.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. (1989). Macrophage receptor-mediated processing and regulation of advanced glycosylation endproduct (AGE)-modified proteins: role in diabetes and aging. In: Baynes JW, Monnier VM (Eds.). *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*, AR Liss, New York. pp. 205-218.
- Vulevic J, McCartney AL, Gee JM, Johnson IT, Gibson GR (2004). Microbial species involved in production of 1,2-sn-diacylglycerol and effects of phosphatidylcholine on human fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol*. 70, 5659-5666.
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet*. 21, 195-199.
- Wagner R, Grosch W (1998). Key odorants of French fries. *J. Am. C. S.* 75, 1385-1392.
- Walker WR (1982). The results of a copper bracelet clinical trial and subsequent studies. In: Sorenson Jr J, editors. *Inflammatory diseases and copper*. Totowa (NJ): Humana, 469-478.
- Wanasundara U, Amarowicz R, Shahidi F (1994). Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *J. Agric. Food Chem*. 42, 1285-1290.

Wang CJ, Tseng TH, Yen GC, Shioh SJ, Lin JK (1987). Cytotoxic effect of nonenzymatic products from heated lysine and monosaccharides on rat c6 glioma cell. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* 25, 204-212.

Wang LL, Xiong YL (2005). Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9186-9192.

Wang YM, Wang HJ, Peng SQ (2008). Lipid peroxidation and antioxidant defense impairment in the hearts of chick embryos induced by in ovo exposure to Fusarium mycotoxin butenolide. *Toxicon*, 1, 52, 7, 781-786.

Wapnir RA, Balkman C (1991). Inhibition of copper absorption by zinc. Effect of histidine. *Biol. Trace Elem. Res.* 29, 193-201.

Wapnir RA, Devas G, Solans CV (1993). Inhibition of intestinal copper absorption by divalent cations and low-molecular-weight ligands in the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 36, 291-305.

Wapnir RA, Devas G (1995). Copper deficiency: interaction with high-fructose and high fats diets in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 105-111.

Wapnir RA, Sia MC (1996). Copper intestinal absorption in the rat: effect of free fatty acids and triglycerides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 381-386.

Wapnir RA (1998). Copper absorption and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1054S-1060S.

Warholm M, Cuthenberg C, Von Barh C, Mannervick B (1985). Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.* 113, 499-504.

Warmbier HC, Schnickels RA, Labuza TP (1976). Nonenzymatic browning kinetics in an intermediate moisture model system: effect of glucose to lysine ratio. *J. Food Sci.* 41, 981-983.

Wautier JL, Guillausseau PJ (1998). Diabetes, advanced glycation end products and vascular disease. *Vasc. Med.* 3, 131-137.

Weenen H (1998). Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* 62, 393-401.

Weenen H, Tjan SB (1994). 3-Desoxyhexonose as flavour precursor. In: Maarse H, Van der Heij, DG, Eds., *Trends in Flavour Research*; Elsevier: New York. pp. 303-327.

Whitelaw ML, Weaver ML (1998). Maillard browning effects on in vivo availability of zinc. *J. Food Sci.* 53, 508-510.

Wick M, Pinggera W, Lehmann P (1996). *Iron metabolism, diagnosis and therapy of anemias*. 3th Ed. New York: Springer.

Wijeratne SSK, Cuppett VS, Schlegel V (2005). Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8768-8774.

Wijeratne SSK, Cuppett SL (2006). Lipid hydroperoxide induced oxidative stress damage and antioxidant response in Caco-2 human colon cells. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4476-4481.

Wijeratne SSK, Cuppett SL (2007a). Potential of Rosemary (*Rosemarinus officinalis L.*) diterpenes in preventing lipid hydroperoxide-mediated oxidative stress in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1193-1199.

Wijeratne SSK, Cuppett (2007b). Soy isoflavones protect the intestine from lipid hydroperoxide mediated oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9811-9816.

Wijewickreme AN, Kitts DD (1997). Influence of reactions on the oxidative behaviour of model Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4571-4576.

Wijewickreme AN, Kitts DD, Durance TD (1997). Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialyzable model Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4577-4583.

Wijewickreme AN, Kitts DD (1998). Metal chelating and antioxidant activity of model Maillard reaction products. *Adv. Exp. Med. Biol.* 36, 7, 543-553.

Wijewickreme AN, Krejpcio Z, Kitts DD (1999). Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose and ribose-lysine model Maillard products. *J. Food Sci.* 64, 457-461.

Wilkinson J, Clapper ML (1997). Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216, 192-200.

Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR (1993). Free radical in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Brit. Med. Bull.* 49, 3, 507-522.

Wirth PL, Linder MS (1985). Distribution of copper among multiple components of human serum. *J. Natl. Cancer. Inst.* 75, 277-284.

Wise A, Gilbert DJ (1982). In vitro competition between calcium phytate and the soluble fraction of rat small intestine contents for cadmium, copper and zinc. *Toxicol. Lett.* 11, 49-54.

Wolf SP, Dean RT (1986). Fragmentation of protein by free radicals and its effects on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.* 234, 399-403.

Wolf SP, Gamer A, Dean RT (1986). Free radicals, lipids and protein degeneration. *Trends. Bioch. Sci.* 11, 27-31.

Wolf SP (1996). Free radicals and glycation theory. In: Ikan RI, (Ed). *The Maillard reaction. Consequences for chemical and life sciencer*; Wiley: Chichester, UK. pp. 72-88.

Wolfler A, Caluba HC, Abuja PM, Dohr G, Schauenstain K, Liebmann PM (2001). Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells, FEBS Lett. 502, 127-131.

Wolfrom ML, Kashimura N, Horton D (1974a). Detection of Maillard browning reaction products as trimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 22, 791-795.

Wolfrom ML, Kashimura N, Horton D (1974b). Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids. Nonenzymic browning of dehydrated orange juice. J. Agric Food Chem. 22, 796-800.

Wollenberg R, Rummel W (1987). Dependence of intestinal iron absorption on the valency state of iron. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 336, 578-582.

Wolters MGE, Schreuder HAW, Van de Heuvel G, Van Lonkhuijzen HJ, Hermus RJJ, Voragen AGJ (1993). A continuous in vitro method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in food: application to breads varying in phytic acid content. Br. J. Nutr. 69, 849-861.

Woolfolk CA, Downard JS (1977). Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity types among bacteria. J. Bacteriol. 130, 1175-1191.

Worwood M (1995). Regulación del metabolismo del hierro. An. Nestlé. 53, 1-11.

Xu QP, Tao WY, Ao ZH (2005). Bioactivity of ethanol supernate of vinegar. J. Food Sci. Biotechnol. 24, 4, 76-80.

Xu QP, Tao WY, Ao ZH (2007). Antioxidant activity of vinegar melanoidins. Food Chem. 102, 841-849.

Yamaguchi N, Fujimaki M (1974). Studies on the reaction products from reducing sugars and amino acids. Part XIV. Antioxidant activities of purified melanoidins and their comparison with those of legal antioxidants. J. Food Sci. Technol. Japan. 21, 6-12.

Yamaguchi T, Iki M (1986). Inhibitory effect of coffee extracts against some mutagens. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2983-2988.

Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, Perry G, Yen SH, Stern D (1994). Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7787-7791.

Yaylayan VA (1997). Classification of the Maillard reaction: a conceptual approach. *Trends Food Sci. Tech.* 7, 13-18.

Yaylayan VA (2003). Recent advances in the chemistry of Strecker degradation and Amadori rearrangement: Implications to aroma and color formation. *Food Sci. Technol. Res.* 9, 1-6.

Yeboah FK, Alli I, Yaylayan VA (1999). Reactivities of D-glucose and D-fructose during glycation of bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3164-3172.

Yen GC, Tsai LC, Lii JD (1992). Antimutagenic effect of Maillard reactions products obtained from amino acids and sugars. *Food Chem. Toxicol.* 30, 127-132.

Yen GC, Tsai LC (1993). Antimutagenicity of partially fractionated Maillard reaction products. *Food Chem.* 47, 11-15.

Yilmaz Y, Toledo R (2005). Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chem.* 93, 273-278.

Yoo HY, Chang MS, Rho HM (1999). Xenobiotic-responsive element for the transcriptional activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 133-137.

Yoshimura Y, Iijima T, Watanabe T, Nakazawa H (1997). Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4106-4109.

Yoshioka T, Homma T, Meyrick B, Takeda M, Moore-Jarrett, Kan V, Ichikawa I (1994). Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney Int.* 46, 405-413.

Youdim KA, Martin A, Joseph JA (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 51-60.

Yu S, West CE, Bynen AC (1994). Increasing intakes of iron reduces status, absorption by divalent cations and low-molecular-weight ligands in the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 36, 291-305.

Zago MP y Oteiza OI (2001). The antioxidants properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 266-274.

Zerounian NR, Redekosky C, Malpe R, Linder MC (2003). Regulation of copper absorption by copper availability in the Caco-2 cell intestinal model. *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, 739-747.

Zeyuan D, Bingying T, Xiaolin L, Jinming H, Yifeng C (1998). Effect of green tea and black tea on the metabolisms of mineral elements in old rats. *Biol Trace Elem Res.* 65, 1, 75-86.

Zhou B, Gitschier J (1997). hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7481-7486.

Zill H, Bek S, Fofmann T, Huber J, Frank O, Lindenmeier M, Weigle B, Erbersdobler HF, Scheidler S, Busch AE, Faist V (2003). RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 300, 311-315.

Zödl B, Sargazi M, Zeiner M, Roberts NB, Steffan I, Marktl W, Ekmekcioglu C (2004). Toxicological effects of iron on intestinal cells. *Cell. Biochem. Funct.* 22, 143-147.

