

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**INFLUENCIA DE LA DIETA DE ESCOLARES
GRANADINOS SOBRE LA INGESTA DE
COMPUESTOS FENÓLICOS E
HIDROXIMETILFURFURAL**

TESIS DOCTORAL

JUANA ÁLVAREZ GÓMEZ

2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Juana Álvarez Gómez
ISBN: 978-84-9163-539-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48330>



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de
Nutrición y Bromatología

La doctoranda, Juana Álvarez Gómez, y los directores de tesis, Silvia Pastoriza de la Cueva y José Ángel Rufián Henares, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral titulada “Influencia de la dieta de escolares granadinos sobre la ingesta de compuestos fenólicos e hidroximetilfurfural”, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 24 de mayo de 2017.

Silvia
Pastoriza de la Cueva

Directores de la Tesis

José Ángel
Rufián Henares

Juana
Álvarez Gómez

Doctoranda

***“Hay una fuerza motriz más poderosa
que el vapor, la electricidad y
la energía atómica: la voluntad”
— Albert Einstein***

A la memoria de mi padre

*“Gracias por inculcarme
el amor por los libros”*

Gracias

A mi madre

“Por estar ahí siempre”

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A José Ángel Rufián Henares y a Silvia Pastoriza de la Cueva, mis directores, por confiar en mí para este proyecto, por ayudarme en todo lo que necesité, apoyarme desde el principio, darme ánimos y fuerza para llevar a término este proyecto.

A mi padre y a mi madre, por darme la posibilidad de estudiar y animarme en cada paso que daba en mi carrera y por su apoyo incondicional, sin el que nunca hubiese llegado hasta aquí. En definitiva, por ayudarme a cumplir mis sueños.

A mi hermano, por estar ahí siempre que lo necesito. Fue maravilloso crecer con alguien como tú.

A David Cáceres, por apoyo y comprensión, además porque sin su ayuda no podría haber solucionado los problemillas informáticos, que aparecieron a lo largo del desarrollo del proyecto y por el tiempo que he dejado de dedicarle para llevar a cabo este proyecto.

Y, por último, y no por ello menos importante, a todos los niños y sus padres que formaron parte del estudio, y a todos los que me han ayudado durante la realización de esta tesis, ya que, sin ellos, no hubiese sido posible.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	10
2.1. DIETA MEDITERRÁNEA	11
2.1.2. PREDIMED Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	12
2.2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES	14
2.2.1. ESTRÉS OXIDATIVO	14
2.2.2. RADICALES LIBRES	15
2.2.3. ANTIOXIDANTES	16
2.2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES	18
2.3. COMPUESTOS FÉNICOS: POLIFENOLES	20
2.3.1. COMPOSICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES	21
2.3.1.1. FLAVONOIDES	22
2.3.1.2. NO FLAVONOIDES	27
2.3.2. INGESTA DE POLIFENOLES	29
2.3.3. BIODISPONIBILIDAD	30
2.3.4. POLIFENOLES Y ENFERMEDADES HUMANAS	31
2.3.5. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	34
2.3.5.1. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU	34
2.3.5.2. ENSAYO DEL REACTIVO FAST BLUE BB (FBBB)	35
2.3.5.3. FOLIN MODIFICADO	35
2.3.6 BASES DE DATOS SOBRE POLIFENOLES	36
2.3.6.1. BASE DE DATOS DE LA USDA	36
2.3.6.2. BASE DE DATOS PHENOL-EXPLORER	36
2.3.6.3. OTRAS	37
2.4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LOS ALIMENTOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA	38
2.4.1. PARDEAMIENTO QUÍMICO	38
2.4.1.1. DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO	39
2.4.1.2. CAMELIZACIÓN	39
2.4.1.3. REACCIÓN DE MAILLARD	40
2.4.1.3.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA REACCIÓN DE MAILLARD	43
2.4.1.3.2. CONSECUENCIAS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD	47

2.3.1.3.2.1. MODIFICACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS ALIMENTOS	47
2.3.1.3.2.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	47
2.3.1.3.2.3. REDUCCIÓN DEL VALOR NUTRITIVO	48
2.3.1.3.2.4. ACTIVIDAD MUTAGÉNICA Y ANTIMUTAGÉNICA	49
2.3.1.3.2.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	50
2.3.1.3.2.6. ACTIVIDAD ALERGÉNICA Y ANTIALERGÉNICA	50
2.5. HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	52
2.5.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	52
2.5.2. SÍNTESIS DEL HMF	53
2.5.3. REACTIVIDAD DEL HMF	55
2.5.4. METABOLISMO	56
2.5.5. TOXICOLOGÍA	58
2.5.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL HMF	60
2.5.7. CONCENTRACIÓN E INGESTA DE HMF	60
2.5.7.1. CONCENTRACIÓN DE HMF EN ALIMENTOS	60
2.5.7.2. INGESTA DE HMF	61
III. OBJETIVOS	64
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	68
4.1. POLIFENOLES	70
4.1.1. DETERMINACIÓN DE INGESTA DE POLIFENOLES	70
4.1.1.1. SUJETOS	70
4.1.1.2. DISEÑO DE ESTUDIO	70
4.1.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	72
4.1.2.1. PRODUCTOS QUÍMICOS	72
4.1.2.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ZUMOS	72
4.1.2.2.1. MUESTRA	72
4.1.2.2.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	73
4.1.2.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ORINA	73
4.1.2.3.1. SUJETOS	73
4.1.2.3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	73
4.1.2.4. DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA	75
4.1.2.4.1. SUJETOS	75
4.1.2.4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	75

4.2. HIDROXIMETILFURFURAL	76
4.2.1. DETERMINACIÓN DE HMF, SMF Y ADUCTOS DE ADN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	76
4.2.2. DETERMINACIÓN DE INGESTA DE HMF EN HUMANOS	77
4.2.2.1. SUJETOS	77
4.2.2.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	78
4.2.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	79
4.2.3.1. REACTIVOS	79
4.2.3.2. SÍNTESIS DE SMF Y ADUCTOS DE ADN	80
4.2.3.2.1. SÍNTESIS DE SMF	80
4.2.3.2.2. SÍNTESIS DE N ⁶ -FFM-dAdo, N ² -FFMdG _{uo} , [15N ⁵]N ⁶ -FFM- dAdo Y [13C ¹⁰ ,15N ⁵]N ² -FFM-dG _{uo}	80
4.2.3.3. DETERMINACIÓN DE HMF EN ALIMENTOS MEDIANTE HPLC	81
4.2.3.3.1. MUESTRAS	81
4.2.3.3.2. ALIMENTOS SÓLIDOS	82
4.2.3.3.3. ALIMENTOS LÍQUIDOS	82
4.2.3.4. ANÁLISIS MEDIANTE LC-MS/MS DE HMF, HMFA, SMF, N ⁶ -FFM-dAdo Y N ² -FFM-dG _{uo} EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	83
4.2.3.4.1. ANÁLISIS DE HMF	83
4.2.3.4.2. ANÁLISIS DE HMFA	84
4.2.3.4.3. ANÁLISIS DE SMF	84
4.2.3.5. ANÁLISIS DE N ⁶ -FFM-dAdo Y N ² -FFM-dG _{uo}	85
4.2.3.5.1. EXTRACCIÓN/DIGESTIÓN DE ADN	85
4.2.3.5.2. ANÁLISIS MS/MS	86
4.2.3.6. ANÁLISIS DE IMÁGENES MEDIANTE MALDI ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-MSI)	87
4.2.3.6.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	87
4.2.3.6.2. ANÁLISIS DE IMAGEN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	88
4.3. ESTADÍSTICA	88
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
5.1. POLIFENOLES	92
5.1.1. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	92
5.1.1.1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS	92
5.1.1.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ORINA	94
5.1.2. DETERMINACIÓN DE INGESTA DE POLIFENOLES EN ESCOLARES	99

5.1.3. EFECTO DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA INGESTA DE POIFENOLES EN ESCOLARES	109
5.2. HIDROXIMETILFURFURAL	115
5.2.1. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	115
5.2.1.1. DETERMINACIÓN DE HMF EN ALIMENTOS	115
5.2.1.2. DETERMINACIÓN DE HMF Y SMF EN ANIMALES DE	122
5.2.1.2.1. ENSAYO DE INGESTA AGUDA DE HMF	122
5.2.1.2.2. ENSAYO DE INGESTA CRÓNICA DE HMF	129
5.2.1.3. DETERMINACIÓN DE HMF Y SMF EN SERES HUMANOS	132
5.2.1.3.1. DETERMINACIÓN DE INGESTA DE HMF	132
5.2.1.3.2. EXPOSICIÓN DIETÉTICA A HMF	142
5.2.1.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HMFA EN ORINA Y PLASMA	142
5.2.1.3.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SMF EN PLASMA	144
5.2.1.3.5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ADUCTOS DE SMF EN ADN	145
VI. CONCLUSIONES	146
VII. BIBLIOGRAFÍA	152
VIII. ANEXO	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pirámide alimentaria.	12
Figura 2. Clasificación de antioxidantes y su mecanismo de acción.	18
Figura 3. Compuestos antioxidantes.	19
Figura 4. Efectos polifenoles sobre la salud humana.	21
Figura 5. Estructura química básica de un flavonoide.	22
Figura 6. Estructura de los principales flavonoles.	23
Figura 7. Estructura de las principales flavonas.	23
Figura 8. Estructura de las principales flavanonas.	24
Figura 9. Estructura de los principales flavanoles.	25
Figura 10. Estructura de las principales isoflavonas.	25
Figura 11. Estructura de una chalcona.	26
Figura 12. Estructuras de las principales antocianinas.	26
Figura 13. Estructura de los principales lignanos.	27
Figura 14. Estructura de algunos ácidos fenólicos.	28
Figura 15. Estructura química del resveratrol.	28
Figura 16. Estructuras químicas del tirosol e hidroxitirosol.	29
Figura 17. Degradación del ácido ascórbico.	39
Figura 18. Esquema de la reacción de Maillard.	42
Figura 19. Estructura del HMF.	52
Figura 20. Principales rutas de formación del HMF.	54
Figura 21. Metabolismo del HMF.	58
Figura 22. Determinación de creatinina por el método colorimétrico.	75
Figura 23. Proporción de la ingesta total de polifenoles por toma.	100
Figura 24. Ingesta semanal de polifenoles.	101
Figura 25. Proporción de la ingesta semanal de polifenoles por toma.	101
Figura 26. Proporción de la ingesta de fin de semana de polifenoles por toma.	102
Figura 27. Polifenoles por grupo de alimentos a partir del recordatorio de 24h.	103
Figura 28. Promedio de polifenoles por grupo de alimentos a partir de la frecuencia de consumo.	104
Figura 29. Total de polifenoles aportados según alimento y grupo de alimentos.	105
Figura 30. Ingesta de polifenoles por género.	106
Figura 31. Ingesta de compuestos fenólicos diferenciada por tomas y género a lo largo de la semana.	107
Figura 32. Ingesta por sexo y grupo de alimentos.	108
Figura 33. Efecto de la educación nutricional en el grupo intervención.	110
Figura 34. Evolución temporal sin intervención.	111
Figura 35. Efecto de la educación nutricional sobre la excreción de compuestos Fenólicos.	112
Figura 36. Correlación entre ingesta y excreción de polifenoles pre-intervención.	113

Figura 37. Correlación entre ingesta y excreción de polifenoles post-intervención.	114
Figura 38. Análisis mediante LC-MS/MS del contenido de HMF y SMF en plasma(A), hígado (B) y riñón (C) de ratones tratados con HMF oral.	124
Figura 39. Detección de HMF en modo de iones positivos en la placa MALDI (A y B) y en la sección de tejido hepático (C y D).	126
Figura 40. Detección de SMF en modo de iones negativos en la placa MALDI (A y B) y en la sección de tejido hepático (C y D).	127
Figura 41. (A) Distribución de un ión seleccionado (m/z 124,999) en el hígado de los ratones que estaba uniformemente distribuido sobre la sección de tejido, mientras que el ión precursor de HMF no se detectó (m/z 126,055). B) Detección del precursor de HMF por Orbitrap en análisis de masa exacta tras deposición manual de 0,5 µl en la superficie del tejido y en el vidrio fuera de la sección (parte inferior). (C) Detección del precursor de HMF por trampa de iones en modo MS/MS en las mismas condiciones que en (B). (D) Detección de los iones fragmentos principales de HMF (m/z 98,1 y 81,1) en análisis MS/MS mostrando localizaciones perfectamente emparejadas con el precursor de HMF en tejido hepático.	128
Figura 42. (A) Distribución del ión precursor SMF (m/z 204) mediante Orbitrap en análisis de masa exacta tras deposición manual de 0,5 µl en la superficie del tejido y en el vidrio fuera de la sección (parte inferior) después de que el compuesto no fue detectado en las secciones de tejido. (B) Detección del precursor de SMF mediante trampa de iones en modo MS/MS en las mismas condiciones que en (A). (C) Detección de los iones fragmentos principales de SMF (m/z 125,07, 95,9 y 80,9) en análisis MS/MS, mostrando localizaciones perfectamente emparejadas con el precursor de SMF en tejido hepático.	129
Figura 43. HMF (nM) y SMF (nM) en plasma y <i>N</i> ⁶ -FFM-dAdo y <i>N</i> ² -FFM-dGuo (moléculas por cada 10 ⁸ nucleósidos de ADN) en leucocitos de ratones tratados con HMF.	131
Figura 44. Distribución semanal de la ingesta de HMF.	134
Figura 45. Proporción de la ingesta total de HMF por comida.	135
Figura 46. Distribución de la ingesta de HMF en las cinco comidas diarias a lo largo de los días laborables.	136
Figura 47. Distribución de la ingesta de HMF en las cinco comidas diarias a lo largo del fin de semana.	136
Figura 48. Distribución de la ingesta de HMF por grupos de alimentos a partir de los recordatorios de 24h.	138
Figura 49. Distribución de la ingesta de HMF por grupos de alimentos a partir de los cuestionarios de frecuencia de consumo.	138
Figura 50. Ingesta de HMF diferenciada por género.	139

Figura 51. Ingesta de HMF diferenciada por comidas y género. 140

Figura 52. Ingesta de HMF diferenciada por sexo, grupo de alimentos y días de la semana. 141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procesos asociados al daño oxidativo.	15
Tabla 2. Sistemas de defensa antioxidante del organismo.	17
Tabla 3. Clasificación general de los polifenoles.	21
Tabla 4. Propiedades físico-químicas del HMF.	53
Tabla 5. Contenido de polifenoles (mg ácido gálico/l) de zumos cítricos comerciales	93
Tabla 6. Contenido de polifenoles (mg ácido gálico/l) de zumos cítricos recién exprimidos.	94
Tabla 7. Comparación efecto Folin-Ciocalteu vs. FBBB.	95
Tabla 8. Recuperación del método FBBB en orina.	97
Tabla 9. Precisión intra-día.	98
Tabla 10. Precisión inter-día.	99
Tabla 11. Evolución de la ingesta de polifenoles en el grupo intervención.	110
Tabla 12. Concentración de HMF en los principales alimentos consumidos por la población escolar.	115
Tabla 13. Contenido de HMF y furfural (mg/l) de zumos cítricos comerciales.	120
Tabla 14. Análisis estadístico de los diferentes zumos de naranja comerciales agrupados por condiciones de almacenamiento y tipo de zumo	121
Tabla 15. Ingesta de HMF, niveles de HMFA urinario, HMFA y SMF plasmáticos y N ⁶ -FFM-dAdo y N ² -FFM-dGuo en leucocitos de la población escolar bajo patrón dietético regular.	133
Tabla 16. Correlación lineal de Pearson (r) entre HMF, HMFA, SMF, N ⁶ -FFM-dAdo y N ² -FFM-dGuo.	143

I. RESUMEN

La Dieta Mediterránea, se considera el modelo de alimentación más saludable, ya que tiene un papel importante en el mantenimiento de la salud. Ésta, se caracteriza por el uso de aceite de oliva virgen como grasa principal y de alimentos vegetales y frescos como son verduras, hortalizas, legumbres, frutas, cereales, frutos secos, todos ellos con un alto contenido en polifenoles. Existen numerosos estudios que han avalado los efectos beneficiosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud. Aunque en los últimos años, se está dando lugar a un abandono de los buenos hábitos y costumbres alimentarias por otras menos saludables como puede ser el consumo elevado de alimentos procesados, refrescos carbonatados, ricos no sólo en azúcares sino en compuestos perjudiciales para la salud como pueden ser el hidroximetilfurfural (HMF).

Por todo ello, el objetivo general de la presente tesis doctoral es evaluar la ingesta de compuestos potencialmente beneficiosos (polifenoles) o perjudiciales (HMF) en niños de 10-12 años de edad de la provincia de Granada, determinando si la educación nutricional puede modificar sus hábitos alimentarios e incrementar su ingesta de polifenoles.

Los resultados obtenidos demuestran que tanto la ingesta de polifenoles como de HMF han sido muy similares a los obtenidos en otros estudios realizados por otros investigadores en diversas poblaciones. En el caso de los polifenoles se ha demostrado que una intervención nutricional puede modificar el patrón alimentario de los niños, incrementando la ingesta de compuestos fenólicos en un 20,5%. En el caso del HMF se ha demostrado por primera vez, en esta tesis doctoral, que dicho compuesto se metaboliza eficazmente hasta SMF (metabolito potencialmente carcinogénico del HMF) en niños expuestos a niveles elevados, pero habituales, de HMF dietético. La exposición a SMF da lugar a la formación de aductos de ADN que podrían tener consecuencias negativas en la salud de los niños a lo largo de la vida.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. DIETA MEDITERRÁNEA

Se conoce como “Dieta Mediterránea” al patrón dietético tradicional que ha sido transmitido de generación en generación desde hace muchos siglos y está íntimamente vinculada al estilo de vida de los pueblos mediterráneos a lo largo de su historia. Ha ido evolucionando, acogiendo e incorporando nuevos alimentos y técnicas fruto de la posición geográfica estratégica y de la capacidad de mestizaje e intercambio de los pueblos mediterráneos.

La Dieta Mediterránea ha sido declarada Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad (UNESCO, 2010). Actualmente, se considera el modelo de alimentación más saludable, ya que se ha visto a lo largo de los años que los hábitos alimentarios tienen un papel importante en el mantenimiento de la salud, tanto a nivel individual como poblacional (Hu, 2002). Los resultados de dos amplios estudios europeos, EPIC (Trichopoulou et al., 2003) y el estudio HALE (Knoops et al., 2004; Mitrou et al., 2007) sugieren que una mayor adherencia a la Dieta Mediterránea tradicional se traduce en una menor mortalidad por enfermedades cardiovasculares. En los países del sur de Europa que han seguido esta dieta desde hace muchos años, no se han observado efectos perjudiciales y, además, su esperanza de vida es la más elevada del mundo (Willett et al., 1995).

La Dieta Mediterránea se caracteriza por el uso como principal grasa el aceite de oliva virgen y la abundancia de alimentos vegetales, como verduras, hortalizas, legumbres, frutas, cereales, frutos secos y un consumo alto de pescado y marisco. Por el contrario, se consumen pequeñas cantidades de carnes rojas, prefiriendo la carne de ave. Otra característica es el consumo diario de vino tinto, siendo preferible tomarlo durante las comidas por su alto contenido en polifenoles (Trichopoulou et al., 1995).

Las propiedades saludables que se atribuyen a la Dieta Mediterránea, sobre todo, a nivel cardiovascular, se deben a su bajo contenido en ácidos grasos saturados y alto en ácidos grasos monoinsaturados, carbohidratos complejos, fibra y sustancias antioxidantes como los polifenoles presentes en alimentos de origen vegetal (Figura 1).

Figura 1. Pirámide alimentaria.



2.1.2. PREDIMED Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. En los últimos años muchos son los estudios que han demostrado que la ingesta de polifenoles presenta efectos beneficiosos sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular (Quiñones et al., 2012). Así, se ha llevado a cabo un ensayo clínico aleatorizado conocido como PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) que pretende determinar si la Dieta Mediterránea evita la aparición de complicaciones

cardiovasculares en sujetos de alto riesgo vascular (Tresserra-Rimbau et al., 2013). El estudio se realizó a un total de 7.447 participantes, con edades entre 55 y 80 años y a los que se les hizo un seguimiento durante 5 años. Se dividieron en 3 grupos, un grupo con una dieta suplementada con aceite de oliva virgen extra (1l/semana), otro suplementado con frutos secos (30 g/día) y el último fue el grupo control, con una dieta baja en grasa. Para determinar el consumo de alimentos se utilizaron cuestionarios de frecuencia de consumo, ya que para los recordatorios de 24 horas se necesita mucho tiempo para analizarlos. Así mismo, la adhesión a la dieta mediterránea se realizó por medio de un cuestionario de 14 preguntas (Martínez-González, 2012). Los resultados fueron sorprendentes, ya que en aquellos grupos donde hubo intervención nutricional con aceite de oliva o frutos secos, la incidencia de complicaciones cardiovasculares se redujo en un 30%. Este estudio aporta una evidencia científica de primer orden a favor de la eficacia de la Dieta Mediterránea tradicional en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular (Zamora-Ros et al., 2013).

Los resultados del estudio PREDIMED han sido atribuidos por algunos investigadores a la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos. En este sentido, los efectos de los polifenoles se deberían principalmente a sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores y antitrombóticos (Schroeter et al., 2006; Ruf 1999), poseen efectos antilipémicos y antiaterogénicos (Wilcox et al., 2001; Pal et al., 2003). Así mismo presentan claros efectos antiinflamatorios (Badia et al., 2004; Fan et al., 2008), a la vez que modulan los procesos de apoptosis en el endotelio vascular (Pan et al., 2000)

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

2.2.1. ESTRÉS OXIDATIVO

Durante el metabolismo celular aeróbico se generan especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, proceso que normalmente está controlado por los sistemas de defensa antioxidante endógenos, que mantienen el equilibrio redox (Valko et al., 2007). Este equilibrio puede verse alterado, bien sea por condiciones ambientales (contaminación, exposición a tóxicos en el trabajo...), estilo de vida (hábito tabáquico, deporte de competición...) o incluso procesos patológicos, dando lugar a una situación conocida como estrés oxidativo.

El estrés oxidativo aparece cuando se rompe el equilibrio entre los factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes, bien por un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno o por un déficit en los mecanismos antioxidantes. Éste está asociado a numerosas enfermedades (carcinogénesis, enfermedad cardiovascular, hipertensión, diabetes, enfermedades neurodegenerativas...) y al proceso normal de envejecimiento (Valko et al., 2007) tal y como se muestra en la Tabla 1. En este punto, la dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal, los cuales presentan efectos sinérgicos o aditivos (Liu et al., 2004) que pueden mejorar la defensa antioxidante directa o indirectamente activando y potenciando los sistemas de detoxificación y antioxidantes endógenos (Masella et al., 2005).

Tabla 1. Procesos asociados al daño oxidativo.

ENFERMEDAD	CAUSA
Envejecimiento	Peroxidación de los lípidos y proteínas de la membrana celular y daño del ADN: Imposible la regeneración y reproducción celular.
Envejecimiento de la piel	Daño del colágeno
Aterosclerosis	Peroxidación de lípidos en las partículas de LDL con daño de otros de sus componentes
Cáncer	Daño del ADN
Cataratas	Modificaciones irreversibles en las proteínas
Cuadros inflamatorios	Activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria

2.2.2. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son aquellas especies químicas, cargadas o no, que poseen un electrón desapareado muy reactivo, ya que tienden a captar otro electrón a partir de moléculas cercanas, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Venereo et al., 2002). Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita, la molécula que lo capta pasa a ser a su vez un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que destruye nuestras células. Un radical libre tiene una vida media de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todas las moléculas que estén a su alrededor (Cheesman and Slater, 1998).

Desde el punto de vista molecular los radicales libres son pequeñas moléculas que se pueden formar en las células de nuestro organismo de forma endógena, como puede ser: en la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones, las reacciones de oxidación, etc. Estos procesos que deben ser controlados normalmente con una adecuada protección antioxidante. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, los que producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo (Avello and Suwalsky, 2006). Aun así, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo, pueden

participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno, activar enzimas de la membrana celular, disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modificar la biomembrana y favorecer la quimiotaxis (Venereo et al., 2002).

Los agentes oxidantes son un término genérico que incluye a moléculas radicales libres y no radicalarias. Estos compuestos oxidantes, como por ejemplo HClO, HBrO, O₃, ¹O₂ o H₂O₂, se convierten en radicales con mucha facilidad, dando lugar a las conocidas Especies Reactivas del Oxígeno (EROS) (Naqui et al., 1996; Beckman and Koppenal, 1996). Algunas de las especies reactivas de oxígeno de mayor significado biológico son: anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}), peroxinitrito (ONOO^-), radicales peroxilo (ROO^{\cdot}), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Las especies reactivas anteriores tienen origen endógeno (mitocondria, peroxisomas, lipooxigenasas, NADPH oxidasa y citocromo P450) y dentro de las de origen exógeno encontramos radiaciones ultravioletas, radiaciones ionizantes, medicamentos, humo del tabaco, toxinas... (Finkel et al., 2000).

Actualmente se sabe que las concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno pueden dar lugar a efectos perjudiciales para el organismo derivados del estrés oxidativo, tales como daño en lípidos, proteínas y ADN (Aruoma, 1998). Sin embargo, cuando se encuentran a bajas concentraciones pueden tener efectos beneficiosos, ya que dichos compuestos actúan en algunas rutas de señalización celular o en la defensa frente a agentes infeccioso (Seifreid et al., 2007).

2.2.3. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los cuales son captados por los radicales libres. De acuerdo con Halliwell (1990) los antioxidantes biológicos se definen como “aquellas moléculas que cuando están presentes en bajas concentraciones respecto a las biomoléculas que protegen, pueden prevenir o reducir la destrucción oxidativa de las biomoléculas” (Halliwell, 1990; Huang et al., 2005).

Para neutralizar el efecto del daño oxidativo, nuestro organismo posee sistemas fisiológicos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, pero el estilo de vida actual está inclinando la balanza hacia un aumento del estrés oxidativo, por lo que es recomendable el aporte de antioxidantes exógenos bien a través de la dieta, suplementos de vitaminas y/o minerales. Estos antioxidantes exógenos se corresponden con estructuras y compuestos muy variados: vitaminas (A, C y E), minerales (Se y Zn), ácidos carboxílicos (ácido cítrico), aminoácidos (cisteína y carnosina) y metabolitos secundarios de vegetales (fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, antocianos, esteroides y carotenoides) (Tabla 2).

Los campos de aplicación de los antioxidantes son muy variados. Además de terapias farmacológicas, también tienen interés como suplementos nutricionales, ingredientes cosméticos para evitar el envejecimiento cutáneo, alimentos funcionales y como conservantes alimentarios (Yanishlieva et al., 2005).

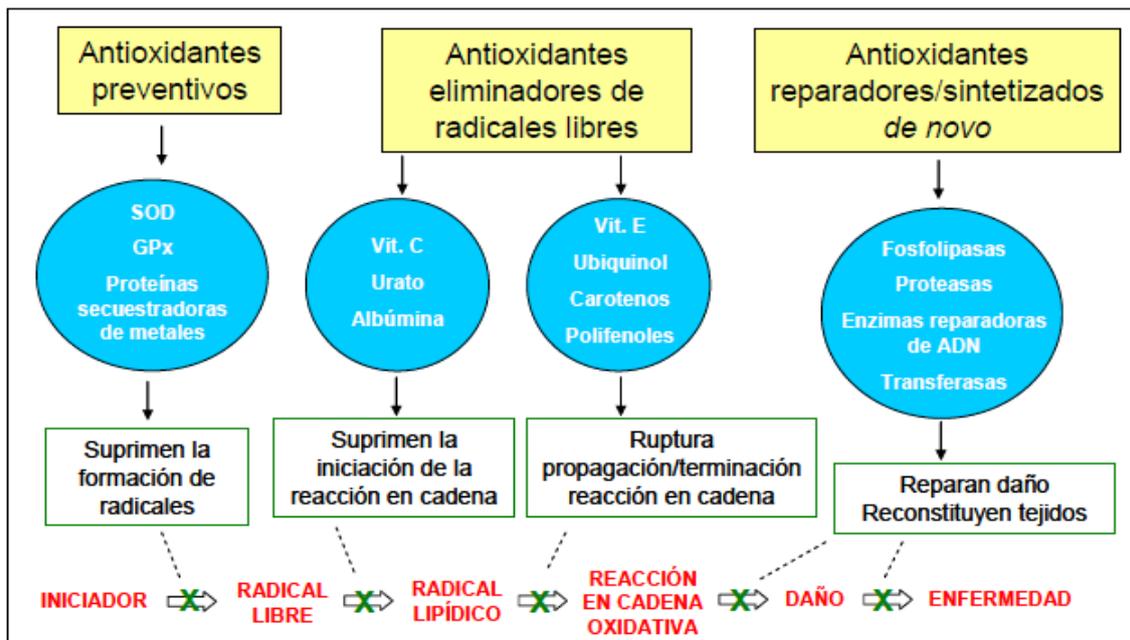
Tabla 2. Sistemas de defensa antioxidante del organismo.

ENDÓGENOS		EXÓGENOS	
<u>Enzimáticos</u>	<u>No Enzimáticos</u>	<u>Nutrientes</u>	<u>No Nutrientes</u>
Superóxido dismutasa (SOD)	Ácido úrico	Vitamina C	Polifenoles
Catalasa (CAT)	Albúmina	Vitamina E	
Glutation peroxidasa (GPx)	Bilirrubina	Carotenos	
Glutation reductasa (GSH-Rd)	Glutation reducido (GSH)	Minerales relacionados con enzimas antioxidantes (Se, Zn, Cu, Mn)	
Glutation-s-transferasa (GST)	Ubiquinol (coenzima Q)		
Sistema de reparación del ADN			
Proteasas			
Fosfolipasas			

2.2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

La defensa del organismo frente al daño oxidativo tiene lugar por distintas vías según se desarrolla la reacción en cadena de oxidación (Figura 2). Primero actúan los antioxidantes preventivos o primarios (evitan la formación de radicales libres), seguido de los antioxidantes eliminadores de radicales libres o secundarios (estabilizan a dichos radicales, estos actúan cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados) y por último los enzimas sintetizados *de novo* o de reparación (reparan el daño producido en las biomoléculas) (Halliwell and Gutteridge, 1990; Davies, 1987; Pacifi and Davies, 1991; Wilcox et al., 2004).

Figura 2. Clasificación de antioxidantes y su mecanismo de acción.



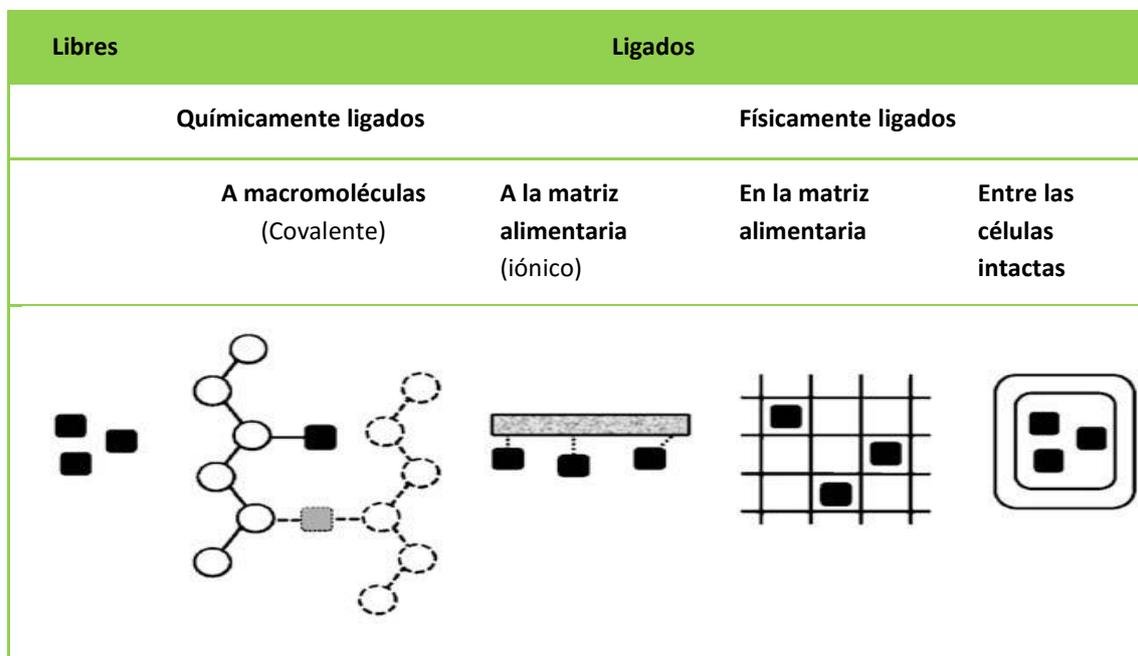
Los compuestos antioxidantes deben ser sustituidos cuando se agotan. Si son de origen endógeno serán reemplazadas mediante sus síntesis, pero si son de origen exógeno, deben ser suministrados a través de la dieta (Laguerre et al., 2007). Estos últimos son conocidos como “antioxidantes dietarios” y son fundamentales para la prevención de enfermedades, ya que son fácilmente modificables. Según el Consejo de Nutrición del Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos en 1998, un antioxidante dietario “es una sustancia presente en los alimentos, que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de

oxígeno, especies reactivas de nitrógeno o ambas, sobre las funciones fisiológicas normales en humanos”.

Dentro de los alimentos nos encontramos nutrientes y compuestos no nutrientes con capacidad antioxidante, como las vitaminas C, E o β -carotenos, polifenoles, terpenoides, compuestos de Maillard y minerales traza (Wang et al., 1996; Pérez-Jiménez et al., 2008).

Los compuestos antioxidantes están presentes en diversas formas dentro de los alimentos (Naczki et al., 2006). De ahí que los antioxidantes alimentarios fuesen clasificados en las siguientes categorías (Figura 3): compuestos de bajo peso molecular (vitamina C, flavonoides glicosilados...), compuestos físicamente en diferentes estructuras celulares (flavonoides atrapados en las redes de pectinas de las cascarras), compuestos de bajo peso molecular química o físicamente unidos a otras macromoléculas (ácido ferúlico, cafeico...) y material antioxidante insoluble, como las melanoidinas (Gökmen et al., 2009).

Figura 3. Compuestos antioxidantes.

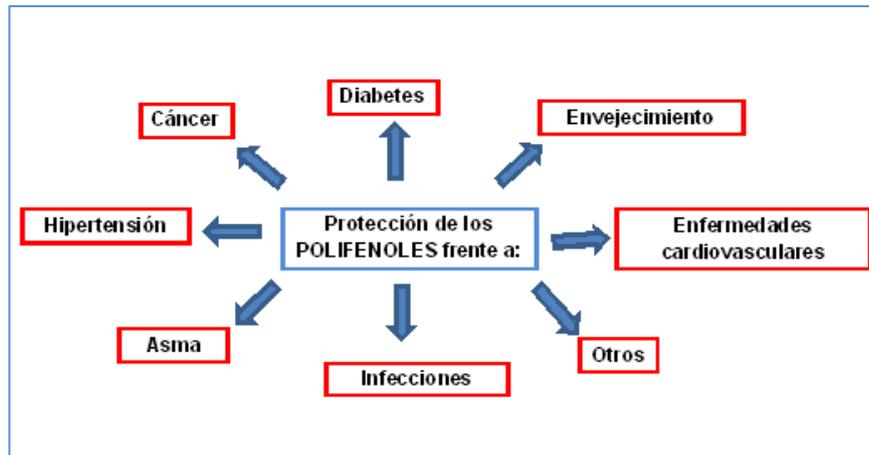


2.3. COMPUESTOS FÉNOLICOS: POLIFENOLES

Los compuestos fenólicos o polifenoles son productos del metabolismo secundario de los vegetales, considerados como los principales componentes antioxidantes en los alimentos (Manach et al., 2004). Son compuestos de suma importancia para las plantas, ya que les otorgan protección frente a diferentes tipos de estrés como excesos de luz, temperaturas extremas, radiación UV, infección por agentes patógenos, herbívoros, ozono... (Beckman, 2000). Estos compuestos los podemos encontrar en cualquier órgano de las plantas: hojas, frutas, semillas, raíces y tubérculos (Coulter, 1998). Así, los podemos encontrar mayoritariamente en alimentos como las hortalizas, verduras, legumbres, frutas, frutos secos, cereales, té, vino, cerveza, café... (Scalbert et al., 2005; Spencer et al., 2008; Dai and Mumper, 2010).

Los polifenoles influyen en múltiples propiedades sensoriales de los alimentos, tales como el aroma, color y sabor de numerosos productos alimenticios de origen vegetal. Así mismo, los polifenoles son capaces de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos y protozoos (Puupponen-Pimiä et al., 2005; Lee et al., 2006; Medina et al., 2009), por lo que, desde hace algún tiempo, están adquiriendo gran relevancia en la industria alimentaria (Lule et al., 2005).

También existen estudios donde presentan efectos sobre la salud humana (Figura 4), dichos efectos dependen de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad (Pandey and Rizvi, 2009). Así, los polifenoles contribuyen a la prevención de diferentes enfermedades, dentro de las que encontramos la enfermedad coronaria (Gendron et al., 2010) y estadios iniciales de ciertos tipos de cáncer (Cook and Samman, 1996; Grace, 2005). Además, los polifenoles presentan actividad antiaterogénica y evitan la agregación plaquetaria al prevenir la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (Arts and Hollman, 2005). Finalmente, también se han descrito propiedades neuroprotectoras (Zhao, 2009).

Figura 4. Efectos polifenoles sobre la salud humana.

2.3.1. COMPOSICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES

En la naturaleza, los compuestos fenólicos se encuentran generalmente conjugados con azúcares y ácidos orgánicos y pueden clasificarse en dos tipos principales: flavonoides y no flavonoides. Todo flavonoide comparte una estructura básica que consta de dos bencenos unidos a través de un anillo de pirona C heterocíclico. En contraste, los no flavonoides son un grupo más heterogéneo de compuestos (Tabla 3).

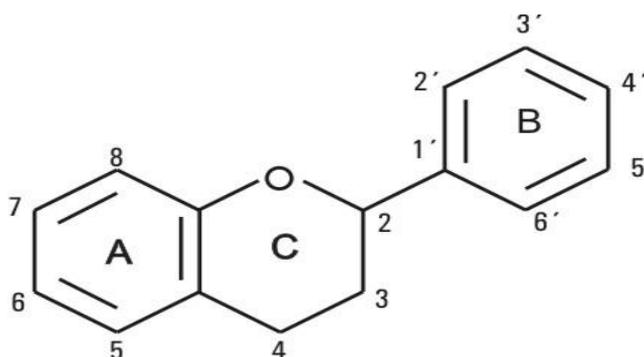
Tabla 3. Clasificación general de los polifenoles.

FLAVONOIDES	Antocianidinas	Flavonas
	Chalconas	Flavonoles
	Flavanonas	Isoflavonas
NO FLAVONOIDES	Lignanós	Ácidos fenólicos
	Estilbenos	Otros

2.3.1.1. FLAVONOIDES

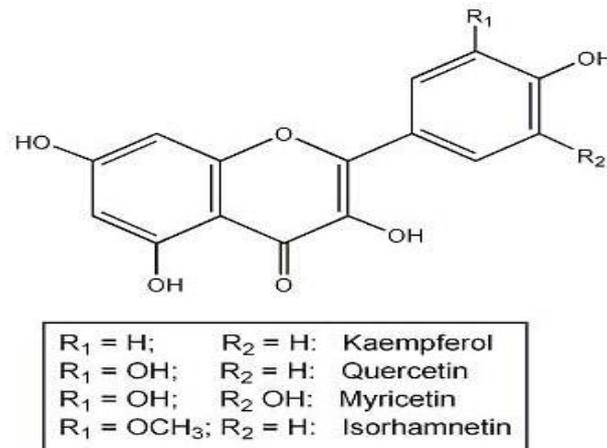
Es el grupo de polifenoles más abundante en el reino vegetal. Su nombre que deriva del latín “flavus” (amarillo). El primer flavonoide fue identificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Szent-Györgyi (Rusznayak and Gyorgyi, 1936). Este grupo tiene una estructura básica común que consiste en dos anillos aromáticos (anillo A y B) unidos por tres átomos de carbono que forman un heterocíclico oxigenado (anillo C) (Figura 5). Existen varios subgrupos de flavonoides, cuya clasificación se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico y de la posición del anillo B. Dentro del grupo de los flavonoides, los subgrupos son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, chalconas y antocianidinas (Manach et al., 2004).

Figura 5. Estructura química básica de un flavonoide.



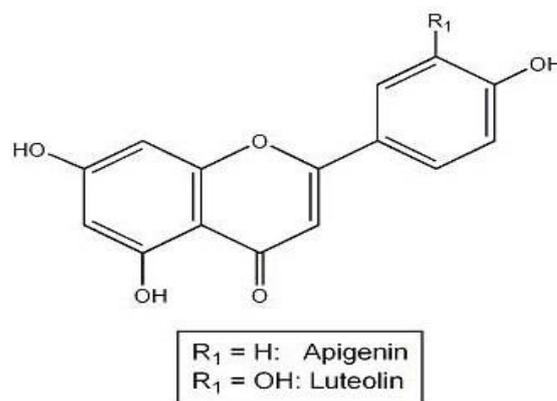
- **Flavonoles**

En su estructura presentan un doble enlace entre el carbono C2 y C3, con un grupo hidroxilo en la posición C3, además de un grupo ceto en el carbono C4 (Figura 6). La mayoría se encuentran en la naturaleza glicosilados y/o acilados en la posición 3 del anillo C, pero también pueden aparecer en la posición 5, 7, 4', 3' y 5' (Pandey and Rizvi, 2009). Los más representativos del grupo son quercetina, kaempferol y miricetina. Los flavonoles están presentes en baja concentración en los alimentos (Hollman and Arts, 2000). Las principales fuentes son la cebolla, la col, el brócoli, los arándanos, el vino tinto y el té. La distribución y la concentración de los flavonoles pueden ser distinta incluso en frutas procedentes de la misma planta debido a la exposición solar (Quiñones et al., 2012)

Figura 6. Estructura de los principales flavonoles.

- **Flavonas**

Presentan una estructura similar a los flavonoles, salvo que carecen del grupo hidroxilo en posición C3 de ese anillo (Figura 7). La mayoría de las flavonas están glicosiladas en posición 7 (Pandey and Rizvi, 2009). Las flavonas son los flavonoides más hidrófobos. La fuente más importante en los alimentos la encontramos en el perejil y el apio. Además, también las podemos encontrar en la piel de los cítricos (Shahidi and Naczki, 1995).

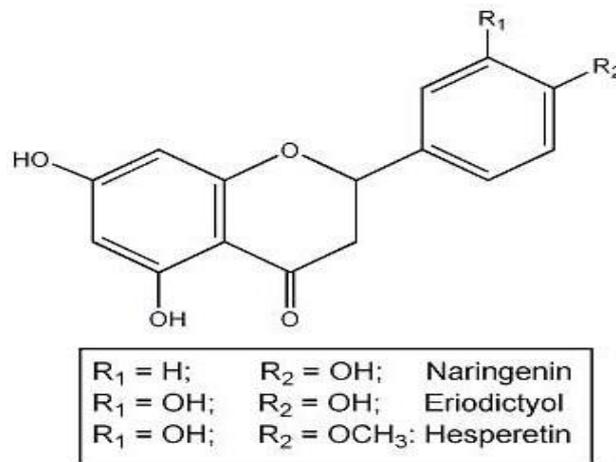
Figura 7. Estructura de las principales flavonas.

- **Flavanonas**

Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado y su estructura no es plana (Figura 8). Constituyen un grupo minoritario en los alimentos. Las flavanonas aparecen

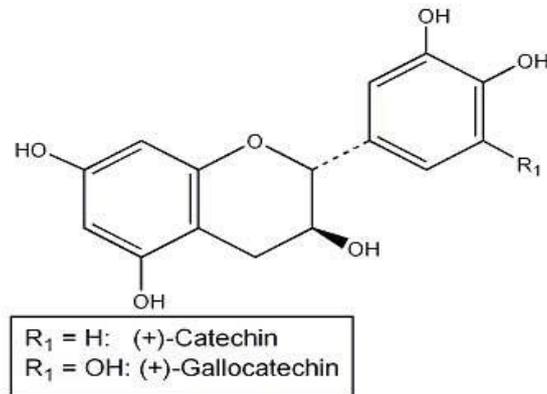
a altas concentraciones en cítricos, también las podemos encontrar en tomates, menta. Las flavanonas se localizan mayoritariamente en las partes solidas de la fruta, en particular en el albedo (parte esponjosa blanca) y en las membranas que separan los segmentos de las frutas. Por lo cual, en la fruta su concentración es hasta cinco veces mayor que en los zumos (Manach et al., 2004; D'Archivio et al., 2007; Pandey and Rizvi, 2009).

Figura 8. Estructura de las principales flavanonas.



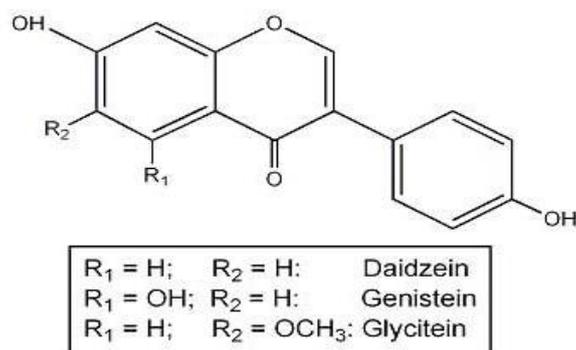
- **Flavanoles**

Poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C3 (Figura 9). Los flavanoles más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol. Los flavanoles existen en la naturaleza como monómeros, conocidos como catequinas o formando polímeros llamados proantocianidinas o taninos condensados. Éstos pueden dar lugar a antocianidinas por calentamiento. Los flavanoles los podemos encontrar en la fruta (albaricoques, cerezas, uvas) y como fuentes mayoritarias los encontramos en el vino tinto, chocolate y sobre todo en el té verde. (Lakenbrink et al., 2000; Manach et al., 2004; D'Archivio et al., 2007).

Figura 9. Estructura de los principales flavanoles.

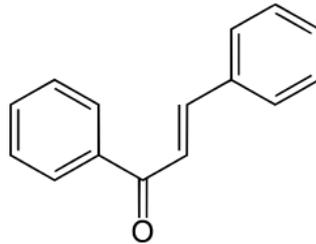
- **Isoflavonas**

Presentan en su estructura un anillo bencénico lateral en posición C3 y también grupos hidroxilos en los carbonos C7 y C4' (Figura 10). Por su estructura muy similar a los estrógenos, se pueden unir al mismo tipo de receptores que éstos, de ahí que se conozcan como fitoestrogenos (D'Archivio et al., 2007). Dentro del grupo de isoflavonas los principales representantes son genisteína, daidzeína y gliciteína. A las isoflavonas las encontramos casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados su principal fuente (Klejdus et al., 2007).

Figura 10. Estructura de las principales isoflavonas.

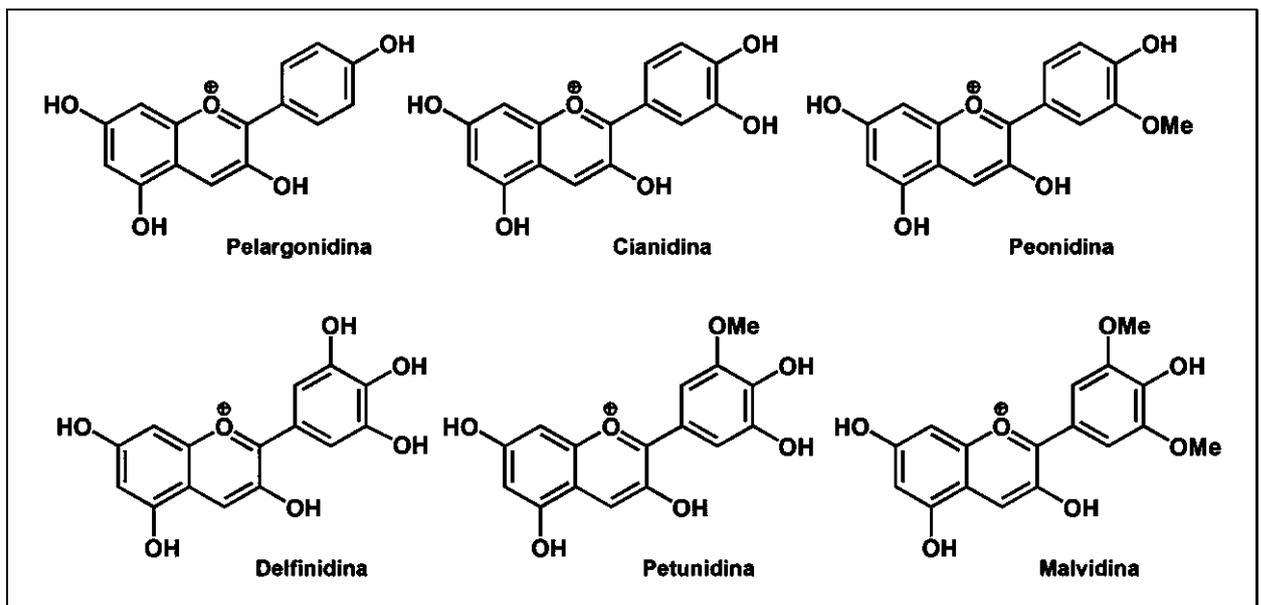
- **Chalconas**

Las chalconas son el grupo más limitado dentro de los flavonoides. Son cetonas aromáticas α,β -insaturadas, su estructura es también del tipo C6-C3-C6, pero sin el anillo heterocíclico central (Figura 11).

Figura11. Estructura de una chalcona.

- **Antocianinas**

Son compuestos solubles en agua, son los encargados de la mayoría de los colores azul, rojo y púrpura de flores, frutas y verduras. Presentan en su estructura tres anillos. De todas las antocianinas conocidas en la naturaleza, seis son las que están ampliamente en la dieta humana: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina (Garzón, 2008) (Figura 12). Las podemos encontrar en algunos cereales, en el vino tinto, en algunos vegetales (berenjenas, rábanos, cebollas...) aunque mayormente están presentes en las frutas, sobre todo en los frutos rojos (Harbone, 1993; Escribano-Bailon et al., 2004; Manach et al., 2004; D'Archivio et al., 2007).

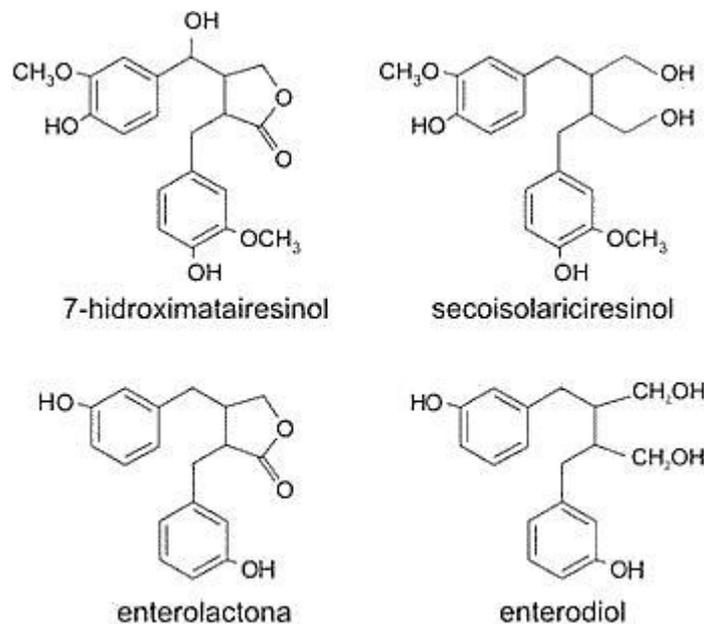
Figura 12. Estructuras de las principales antocianinas.

2.3.1.2. NO FLAVONOIDES

- **Lignanos**

Son que se producen por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano (Figura 13). Los encontramos ampliamente distribuidos entre los vegetales, sobre todo en semillas (aunque en cantidades muy reducidas, 1 µg por cada gr de producto seco) como las semillas de lino, semillas de calabaza, semillas de ajonjolí, centeno, soja y bayas (Crosby, 2005).

Figura 13. Estructura de los principales lignanos.



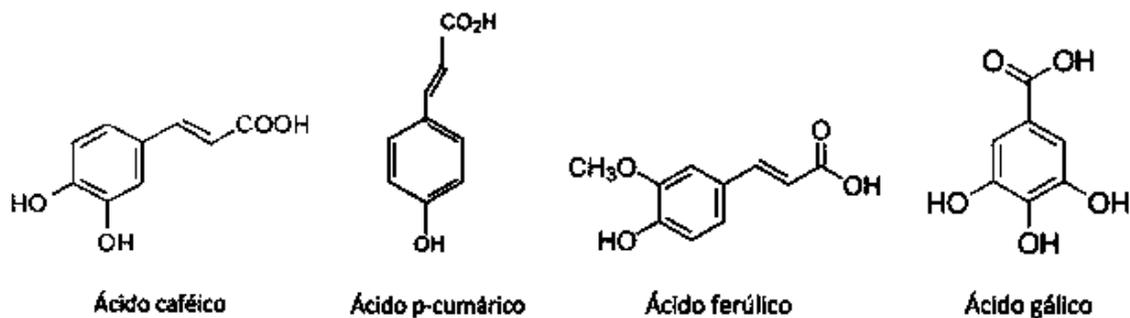
- **Ácidos Fenólicos**

Podemos encontrarlos libres o conjugados con azúcares, ácidos orgánicos u otros polímeros. Se diferencian dos grupos (Spencer et al., 2008), los derivados del ácido benzoico (ácido gálico, siríngico, protocatéquico y vanílico) y los derivados del ácido cinámico (p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico) (Figura 14). Pueden encontrarse en muchas especies de plantas:

- Los derivados del ácido benzoico: Su contenido en plantas comestibles es bajo excepto en rábanos, cebollas, vino y ciertos frutos rojos (Herrmann, 1989)

- Los derivados del ácido cinámico: su presencia en la naturaleza es mayor que la de los benzoicos siendo las principales fuentes las legumbres, los cereales, el cacao, la fruta, el aceite, los vegetales, las nueces y las bebidas como el café, la cerveza o el vino (Herrmann, 1989).

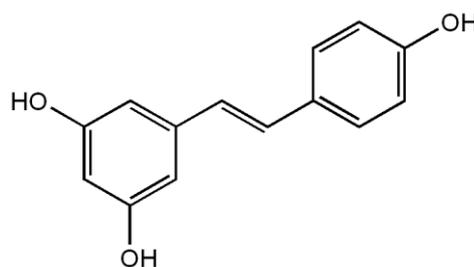
Figura 14. Estructura de algunos ácidos fenólicos.



- **Estilbenos**

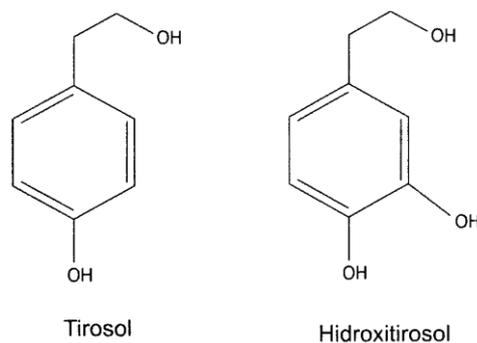
En este grupo de polifenoles naturales podemos encontrar a los derivados hidroxil- y metoxil- del estilbeno simple, así como sus formas glicósido y polímeros. No son muy abundantes en la dieta, el más conocido de este grupo es el resveratrol, presente en la uva y por lo tanto en el vino (Moreno-Franco et al., 2011) (Figura 15).

Figura 15. Estructura química del resveratrol.



- **Alcoholes Fenólicos**

Este grupo está representado por tirosol e hidroxitirosol (Figura 16), como principales fuentes de alcoholes fenólicos nos encontramos el aceite de oliva extra virgen y también bebidas como el vino (Cabrini et al., 2001; Piñeiro et al., 2011).

Figura 16. Estructuras químicas del tirosol e hidroxitirosol.

2.3.2. INGESTA DE POLIFENOLES

Los polifenoles son los principales antioxidantes de nuestra dieta. Sobre la ingesta dietética de este grupo de compuestos tan sólo encontramos estimaciones y no una información precisa disponible sobre la ingesta dietética. En 1976, la primera estimación de la ingesta dietética de flavonoides en Estados Unidos fue alrededor de 1g/día (Kuhnau, 1976). Más tarde, en 2011 se estimó un consumo total de polifenoles en la población francesa de 1.193 mg/día (Pérez-Jiménez et al., 2011). En 2016, la estimación de ingesta total media de polifenoles en Dinamarca fue entre 1626 y 1786 mg/día y en Grecia fue entre 584 y 744 mg/día (Zamora-Ros et al., 2016).

En la población española existen diversos estudios con estimaciones de ingesta de polifenoles en población adulta. En el año 2007 se estimó una ingesta media entre 2.590 y 3.016 mg/día (Saura-Calixto et al., 2007) incluyendo tanto la porción extraíble como la no extraíble. También en 2007, Agudo et al. estimaron la ingesta media en 1171 mg/persona/día. En 2011 se determinó una ingesta media de flavonoides entre 269 y 313 mg/día, (Zamora-Ros et al., 2011). Según el estudio de Tresserra et al. (2013), uno de los estudios más recientes, la ingesta media de polifenoles totales diarios fue de 820 ± 323 mg/día. Los distintos estudios publicados indican que las principales fuentes dietéticas de los polifenoles son frutas como manzana, uva, pera, cereza y diversas bayas (Mañach et al., 2004; Chun et al., 2005). Por otro lado, el vino tinto, té, café, cereales, chocolate y legumbres también contribuyen a la ingesta de polifenoles (Pandey et al., 2009).

La ingesta dietética media de polifenoles en su mayor medida viene dada por el consumo de flavonoides, que son los polifenoles más abundantes en la dieta del ser humano (Ross et al., 2002). De los 8.000 polifenoles que hay descritos, más de 4.000 son flavonoides identificados en plantas, en particular en frutas, verduras, nueces, semillas y flores, algunas bebidas como el té y el vino tinto, que también pueden ser fuentes importantes de flavonoides (Hertog et al., 1993).

2.3.3. BIODISPONIBILIDAD

La biodisponibilidad puede definirse de diferentes maneras. La más común indica que la biodisponibilidad es la proporción del nutriente que se digiere, absorbe y metaboliza a través de las vías normales (Manach et al., 2004; D'Archivio et al., 2007; Pandey and Rizvi, 2009). Los polifenoles que son más comunes en la dieta humana no tienen por qué ser los más activos dentro del cuerpo, bien porque tienen una actividad intrínseca más baja o porque sean mal absorbidos por el intestino, altamente metabolizados o rápidamente eliminados (Manach et al., 2004). En consecuencia, es tan importante saber la cantidad de polifenoles que está presente en un alimento específico o suplemento dietético como la cantidad de polifenoles biodisponibles (Srinivasan, 2001).

En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones común para todos ellos. Dentro de su metabolismo podemos diferenciar dos etapas. En la primera (fase I), la mayoría de los polifenoles, los que se encuentran formando polímeros, al no poder ser absorbidos en su forma natural, deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microbiota colónica (Bosscher et al., 2009). En la segunda fase (fase II), una vez han sido absorbidos, los polifenoles experimentan una modificación extensa, se conjugan en las células intestinales y posteriormente en el hígado por metilación, sulfatación y/o glucuronidación (Manach et al., 2004). Como consecuencia, las formas que alcanzan la sangre y los tejidos son diferentes de las presentes en los alimentos y es muy difícil identificar todos los metabolitos y evaluar sus propiedades biológicas (Day, 2001; Natsume et al., 2003).

Por todo ello, estudios de biodisponibilidad se usan para determinar cuáles son aquellos polifenoles que se absorben mejor, ver cuáles dan metabolitos activos y determinar la actividad biológica de sus metabolitos. La biodisponibilidad de los polifenoles se puede estudiar de forma indirecta, determinando el aumento en la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de alimentos ricos en polifenoles (Pecorari et al., 2010). También se puede determinar de forma directa, midiendo la concentración de polifenoles específicos en plasma y orina tras la ingesta de alimentos con cantidades conocidas de dichos compuestos (Fito et al., 2007). La concentración de polifenoles en el plasma es muy variable, por lo que es necesario ingerirlos de forma reiterada a lo largo del tiempo para mantener concentraciones elevadas en el plasma (Van het Hof et al., 1999).

Finalmente, los polifenoles y sus derivados son excretados principalmente en orina (metabolitos ampliamente conjugados) y bilis (metabolitos pocos conjugados) (Manach et al., 2004).

2.3.4. POLIFENOLES Y ENFERMEDADES HUMANAS

Los polifenoles presentes en los alimentos son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, presentando actividad antioxidante (Diplock et al., 1998, Förstermann, 2008). Dicha actividad depende en gran medida de su estructura química (Cotelle, 2001). Así, los flavonoides son los antioxidantes más potentes, correlacionándose su actividad directamente con el grado de hidroxilación y disminuyendo con la presencia de un resto de azúcar (Bravo, 1999; Cotelle, 2001).

Los polifenoles presentan efectos biológicos muy variados, como actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, efecto vasodilatador, actividad antitrombótica, efecto antilipémico, antiaterogénico (Wilcox et al., 2001; Pal et al., 2003; Actis-Goretta et al., 2006). Así se considera que los polifenoles presentan efectos beneficiosos sobre la salud y pueden proteger los constituyentes celulares contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (enfermedades crónicas neurodegenerativas y cardiovasculares, diabetes, la prevención

y el tratamiento del cáncer) (Scalbert et al., 2005; Luqman and Rizvi, 2006; D'Archivio et al., 2007; Pandey and Rizvi, 2009).

- **Actividad antiinflamatoria**

Se ha demostrado su actividad antiinflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo* (Chan et al., 1998; Ferrándiz et al., 1991). Dicha actividad la llevan a cabo mediante la modulación de la expresión de genes pro-inflamatorios tales como la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, sintasas de óxido nítrico, y varias citocinas fundamentales (González et al., 2011, Quiñones et al., 2013) Recientemente, el resveratrol se ha encontrado que ejerce un efecto beneficioso en el tratamiento de la isquemia y enfermedades neurodegenerativas debido a sus efectos antiinflamatorios (Kang et al., 2009). También se le atribuyen actividad antiinflamatoria a las catequinas derivados del té (Babu and Liu, 2008).

- **Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana *in vitro* de algunos polifenoles ha sido ampliamente demostrada por la literatura científica publicada en las últimas dos décadas (Diker et al., 1991; Isogai et al., 1998; Yanagawa, 2003; Rodríguez, 2010; Jayaraman et al., 2010). Los polifenoles destruyen o inhiben, de forma directa, el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos o protozoos, o suprimen factores de virulencia microbiana. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos presentes en aceitunas (Medina et al., 2009), vino (Larrosa et al., 2009), bayas (Puupponen-Pimiä et al., 2005; Nohynek et al., 2006) y té presentan propiedades antimicrobianas. Su nivel de inhibición depende de la estructura química del compuesto y la especie bacteriana.

Las propiedades antimicrobianas de ciertas clases de polifenoles se han propuesto para desarrollar nuevos conservantes de alimentos (Rodríguez-Vaquero, 2010), con el objeto de evitar los conservantes sintéticos en la industria alimentaria, o para desarrollar terapias innovadoras para el tratamiento de diversas infecciones microbianas (Saavedra et al., 2010; Jayaraman et al., 2010).

- **Efectos vasodilatadores**

Se ha determinado que este efecto está mediado por la producción de óxido nítrico (NO) (Andriambeloson et al., 1999; Duarte et al., 2004), ya que la homeostasis vascular se alcanza con una producción y una biodisponibilidad adecuada del mismo. Los polifenoles desarrollan este efecto porque modulan la producción de NO en células endoteliales a través de un mecanismo dependiente del calcio extracelular (Li et al., 2000). Varios estudios muestran que los compuestos fenólicos del vino tinto pueden inducir relajación del endotelio vascular (Pérez-Vizcaino, 2006; Zenebe, 2003, Quiñones et al., 2013).

- **Efecto antitrombótico**

Los polifenoles desarrollan actividad interesante como antiagregantes plaquetarios, inhibiendo la síntesis de moléculas involucradas en la regulación de la homeostasis vascular (Murphy et al., 2003). Tal actividad puede asociarse con una menor incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular (Pandey and Rizvi, 2009, Quiñones et al., 2013). Como ejemplo de este efecto, un estudio realizado con antocianinas ha demostrado que, éstas son capaces de inhibir la función plaquetaria (De Gaetano, 2002).

- **Efectos antilipémicos y antiaterogénicos**

Los polifenoles mejoran el perfil lipídico de los humanos que los ingieren en cantidades apreciables, de forma que pueden prevenir el desarrollo y aparición de aterosclerosis, obstrucción progresiva de las arterias por acumulación de lípidos en sus paredes (Arts and Hollman, 2005). Su acción sobre la aterosclerosis se debe a la moderación del inicio y la progresión de la misma, por su habilidad para atenuar la oxidación de las LDL (Aviram et al., 2000; Quiñones et al., 2013). Además, son capaces de producir un aumento en la concentración de HDL en el plasma y de inhibir la proliferación del músculo liso vascular (Abe et al., 2011; Osakabe et al., 2001).

- **Antinutritivas**

Algunos polifenoles interfieren con la absorción de nutrientes, todo esto se traduce en una disminución del valor nutritivo de los alimentos (Sharma et al., 1996).

También pueden actuar como quelantes de metales como el hierro y el zinc, reduciendo su absorción e inhibiendo las enzimas digestivas, pudiendo también precipitar las proteínas, llevando a una disminución de su biodisponibilidad en el intestino (Mukherjee et al., 2009). En los alimentos vegetales, la presencia de taninos, grupo de polifenoles con mayor actividad antinutritiva de todos, generalmente se acompaña de la digestibilidad reducida de la proteína y el consiguiente aumento del nitrógeno fecal (Barry et al., 1986; Waghorn et al., 1987).

2.3.5. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

La determinación de polifenoles totales no está directamente relacionada con la cuantificación de su actividad antioxidante, pero puede ser útil, sobre todo si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante. Dentro de los métodos que existen para la determinación de polifenoles totales los más usados son: Método de Folin-Ciocalteu, Ensayo del reactivo Fast Blue BB (FBBB) y Folin modificado.

2.3.5.1. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Es uno de los métodos más antiguos para determinación de polifenoles totales (Swain and Goldstein, 1964). Es comúnmente utilizado en industrias alimentarias por su simplicidad, disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado. Éste consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico (Na_2CO_3 al 5-10% en agua). Los polifenoles se oxidan con facilidad en medio básico, reaccionando con el molibdato para formar óxido de molibdeno, compuesto que puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de UV-Vis por su elevada absorción a 750 nm. Así, la absorbancia a dicha longitud de onda es proporcional a la cantidad de polifenoles. El contenido de fenoles totales generalmente se expresa en equivalentes de ácido gálico. Prior et al. (2005) puso de manifiesto que el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con una serie de compuestos químicos que no son compuestos fenólicos (interferencias) tales como el ácido ascórbico (ASA), azúcares (fructosa y

sacarosa) o aminas aromáticas, por lo que sería interesante contar con otros reactivos que interaccionasen de forma más selectiva con los polifenoles.

2.3.5.2. ENSAYO DEL REACTIVO FAST BLUE BB (FBBB)

El ensayo del reactivo Fast Blue BB es un nuevo método para la detección de compuestos fenólicos (Medina et al., 2011). Este método se basa en las interacciones directas de compuestos fenólicos con la sal de diazonio Fast Blue BB a pH alcalino, formando complejos azoicos con absorbancia medida a 420 nm tras 60 minutos de reacción. Este método es sencillo y económico y se puede utilizar para evaluar rápidamente los fenoles totales de alimentos y bebidas.

En un estudio comparativo de evaluación de fenoles totales en fresas a través de Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu (Lester et al., 2012), los resultados indicaron que el ensayo FBBB proporciona una estimación más alta y más precisa de fenoles totales, debido a su reacción directa con compuestos fenólicos en fresas y la ausencia de interferencias.

2.3.5.3. FOLIN MODIFICADO

En un estudio para estimar la ingesta de polifenoles mediante el contenido total de polifenoles excretado en la orina (Roura et al., 2006) se midió, mediante un ensayo de Folin-Ciocalteu modificado, la excreción de compuestos fenólicos. Dicha modificación consistió en la purificación de los polifenoles mediante extracción en fase sólida, de forma que se eliminaban los compuestos que interferían en la orina. La excreción de polifenoles se estandarizó mediante la excreción urinaria de creatinina, que es generalmente muy estable en ausencia de patologías (Valianpour, 2004). Así, la media de las concentraciones de polifenoles excretados en la orina 6 h después del consumo de las comidas fue significativamente diferente ($P < 0,05$) entre los individuos con una ingesta rica en polifenoles vs grupo control.

Krogholm et al. (2004) midieron también los flavonoides totales excretados en la orina mediante HPLC-MS y su correlación con la ingesta de frutas y verduras. Llegaron a la conclusión de que la excreción urinaria total de polifenoles en 24 h se puede usar

como un biomarcador para la ingesta de fruta y vegetales. El método de Folin modificado es menos costoso y más fácil de realizar que el método descrito por Krogholm et al. (2004).

2.3.6. BASES DE DATOS SOBRE POLIFENOLES

Para determinar el consumo de polifenoles en las poblaciones y estudiar su relación con la salud, es esencial contar con información detallada de su contenido en cada alimento. Sin embargo, esta información no se recoge fácilmente debido a la gran variedad de estructuras químicas y la variabilidad de su contenido.

2.3.6.1. BASE DE DATOS DE LA USDA

Esta base de datos fue creada por el Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de EEUU (USDA), en la cual se recoge un gran volumen de datos analíticos sobre los flavonoides de diferentes alimentos. En concreto consta de datos de 28 monómeros de unos 500 alimentos. En esta base de datos encontraremos principalmente el contenido de flavonoides y de 5 de sus subclases (flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas y flavan-3-oles). Esta base de datos ha sido actualizada muchas veces y en su última actualización se introdujeron unos 119 alimentos nuevos tras una revisión de artículos tanto de EE.UU. como de otros 50 países (Documentation for updating the USDA, 2011).

2.3.6.2. BASE DE DATOS PHENOL-EXPLORER

Es la primera base de datos integral sobre el contenido de polifenoles en los alimentos. Contiene 501 polifenoles diferentes en más de 459 alimentos (Neveu et al., 2010). En sus actualizaciones añadieron datos como metabolismo de polifenoles (Rothwell et al., 2012). En la última versión de Phenol-Explorer (3.6), se introducen datos sobre cambios en el contenido tras la transformación de alimentos (factores de retención), lo cual es útil para estimar la cantidad de polifenoles de los alimentos procesados (Rothwell et al., 2013).

Fenol-Explorer se ha desarrollado en el INRA (Instituto Científico de Investigación Agronómica) en colaboración con la Unión Europea y con apoyo financiero del Gobierno Francés, Unilever, Danone y Nestlé. Como comparación con otras bases de datos, Phenol-Explorer agrega información más detallada sobre el contenido de los distintos tipos de polifenoles, además de datos sobre metabolismo y factores de retención. La revisión bibliográfica es más exhaustiva puesto que fueron más de 1.300 publicaciones y de distintos países (Neveu et al., 2010).

2.3.6.3. OTRAS

EuroFIR-BASIS es otra base de datos desarrollada que incluye datos sobre el contenido de algunos polifenoles en los alimentos y sobre sus efectos biológicos (Gry et al., 2007).

2.4. EFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LOS ALIMENTOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

La Dieta Mediterránea no sólo se caracteriza por el tipo de alimentos que se consumen (aceite de oliva virgen, verduras, hortalizas, legumbres, frutas, cereales, frutos secos, pescado, vino, etc.) sino también por la forma en la que se elaboran los mismos. Así, en la Dieta Mediterránea abundan los procesados térmicos de los alimentos que no son drásticos, como las cocciones en medio acuoso, asados, horneados y frituras (Trichopoulou et al., 1995). Dichos tratamientos térmicos facilitan la digestión y conservación de los alimentos, mejorando a la vez sus características organolépticas de alimentos tan típicos como el pan o las carnes y pescados asados. Sin embargo, dicho procesado también tiene consecuencias negativas para la salud humana, las cuales se expondrán en los apartados siguientes.

2.4.1. PARDEAMIENTO QUÍMICO

El pardeamiento químico o pardeamiento no enzimático es un conjunto de reacciones que da lugar a la generación de color pardo-oscuro en alimentos sin que participen enzimas en la reacción. Todas estas reacciones tienen lugar cuando los alimentos son tratados térmicamente y conducen a la formación de polímeros oscuros que en algunos casos pueden ser deseables (pan, caramelo, café, aromas cárnicos sintéticos...) pero que en la mayoría de casos conllevan alteraciones organolépticas y pérdidas del valor nutritivo de los alimentos afectados (Cheftel and Cheftel, 1980).

Dentro de las reacciones que se producen en el pardeamiento químico nos encontramos:

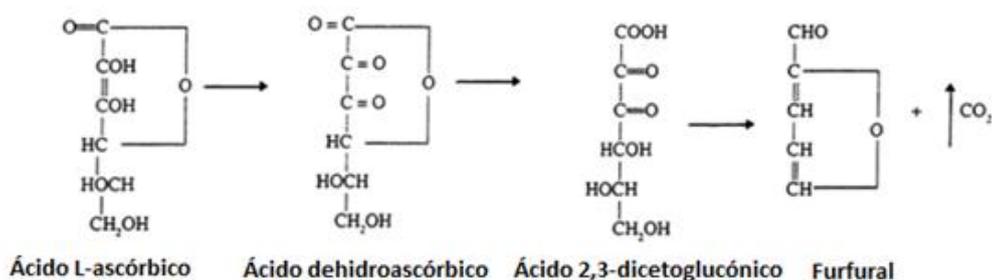
- Degradación del ácido ascórbico
- Caramelización (transformación de carbohidratos)
- Reacción de Maillard (interacción proteína-carbohidrato).

2.4.1.1. DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico o vitamina C es una vitamina hidrosoluble y con un gran poder antioxidante, ayudando a la prevención de numerosas enfermedades. En el organismo se encarga de funciones como reparación de tejidos, formación de colágeno y reducción de hierro para su correcta asimilación en el intestino (Goodman and Gilman 2002).

En la naturaleza lo encontramos mayormente en su forma de isómero L, de ahí que hablemos del ácido L-ascórbico. Su estructura es la de una lactona conjugada con un grupo enediol que le ofrece propiedades fuertemente reductoras, por lo que la hace sensible a diversas formas de degradación (Finholt et al., 1965). Durante la degradación oxidativa el ácido ascórbico se oxida dando lugar al ácido dehidroascórbico, y mediante la escisión del anillo lactona da el ácido 2,3 dicetogulónico, que ya no tiene actividad biológica. A partir de este producto se dan otras reacciones que dan como resultado diferentes compuestos (Castillo et al., 2000), entre ellos, furfural (Figura 17), 3-hidroxi-2-pirona, ácido 2-furancarboxílico, ácido acético y 2-acetilfurano. El ácido ascórbico puede romperse también en reacciones no oxidativas, especialmente en medio ácido (entre pH 3 y 4), por apertura del anillo lactona y posterior descarboxilación.

Figura 17. Degradación del ácido ascórbico.



2.4.1.2. CAMELIZACIÓN

La caramelización tiene lugar cuando los azúcares son sometidos a temperaturas elevadas, por encima de su temperatura de fusión, formándose una serie de sustancias volátiles o no, de sabor característico y color oscuro (Fennema, 1993). La caramelización puede llevarse a cabo a pH tanto ácido como básico, en ausencia de oxígeno y grupos amino, a actividades de agua (a_w) bajas y a pH tanto ácidos como básicos. En ella, los

monosacáridos forman enoles como paso inicial de la reacción (Badui, 2006). Las pentosas generan 2-furaldehído como principal producto de degradación, mientras que las hexosas producen entre otros 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF).

2.4.1.3. REACCIÓN DE MAILLARD

La reacción de Maillard fue descrita por primera vez en 1912 por el francés Louis Camille Maillard aunque fue John Hodge quien en 1953 propuso por primera vez un esquema de las etapas que aparecen en esta compleja reacción (Hodge, 1953). La reacción de Maillard es un conjunto de reacciones complejas en cadena, por medio de las cuales los azúcares reductores o los compuestos carbonílicos derivados de los lípidos oxidados que contienen los alimentos pueden reaccionar con grupos amino de un aminoácido, péptido o proteína (Rufián-Henares and Pastoriza, 2016). Como resultado de la reacción se forman pigmentos pardos con modificaciones del olor, color y sabor de los alimentos que, en algunos casos, pueden llegar incluso a disminuir el valor nutritivo de los mismos. Se desarrolla a a_w intermedias y diversos pH, necesitando un aporte de calor moderado (Badui, 2006).

Los productos que se obtienen a partir de estas reacciones se conocen como productos de la reacción de Maillard (PRMs) (Baxter, 1995). Estos productos están en cantidades considerables en la dieta diaria ya que la mayor parte de alimentos contienen carbohidratos y proteínas.

La reacción de Maillard puede dividirse en tres etapas:

A. Etapa temprana: (sin producción de color). Esta etapa empieza con una reacción de condensación entre el grupo carbonilo, normalmente de un azúcar reductor, aunque también puede ser un compuesto carbonílico generado en la etapa intermedia de la reacción de Maillard o procedente de la oxidación lipídica, y un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína originándose una base de Schiff. Por ciclación, la base de Schiff se transforma rápidamente en la glicosilamina N-sustituida correspondiente. Las glicosilaminas son más estables cuando proceden de aminas aromáticas que de aminoácidos (Rosen et al., 1953; Pigman and Jhonson, 1953; Finot and Magnenat, 1981). Cuando la base de Schiff es una aldósilamina N-sustituida, se

forma la 1-amino-1-deoxi-2-cetosa mediante la denominada transposición de Amadori. Sin embargo, cuando la molécula es una cetosilamina-N-sustituida se forma una 2-amino-2-deoxi-2-cetosa y se le conoce como transposición de Heyns (Matsuda et al., 1991). Durante la primera etapa las proteínas no sufren alteraciones estructurales importantes ni se produce formación de color (Oliver, 2006).

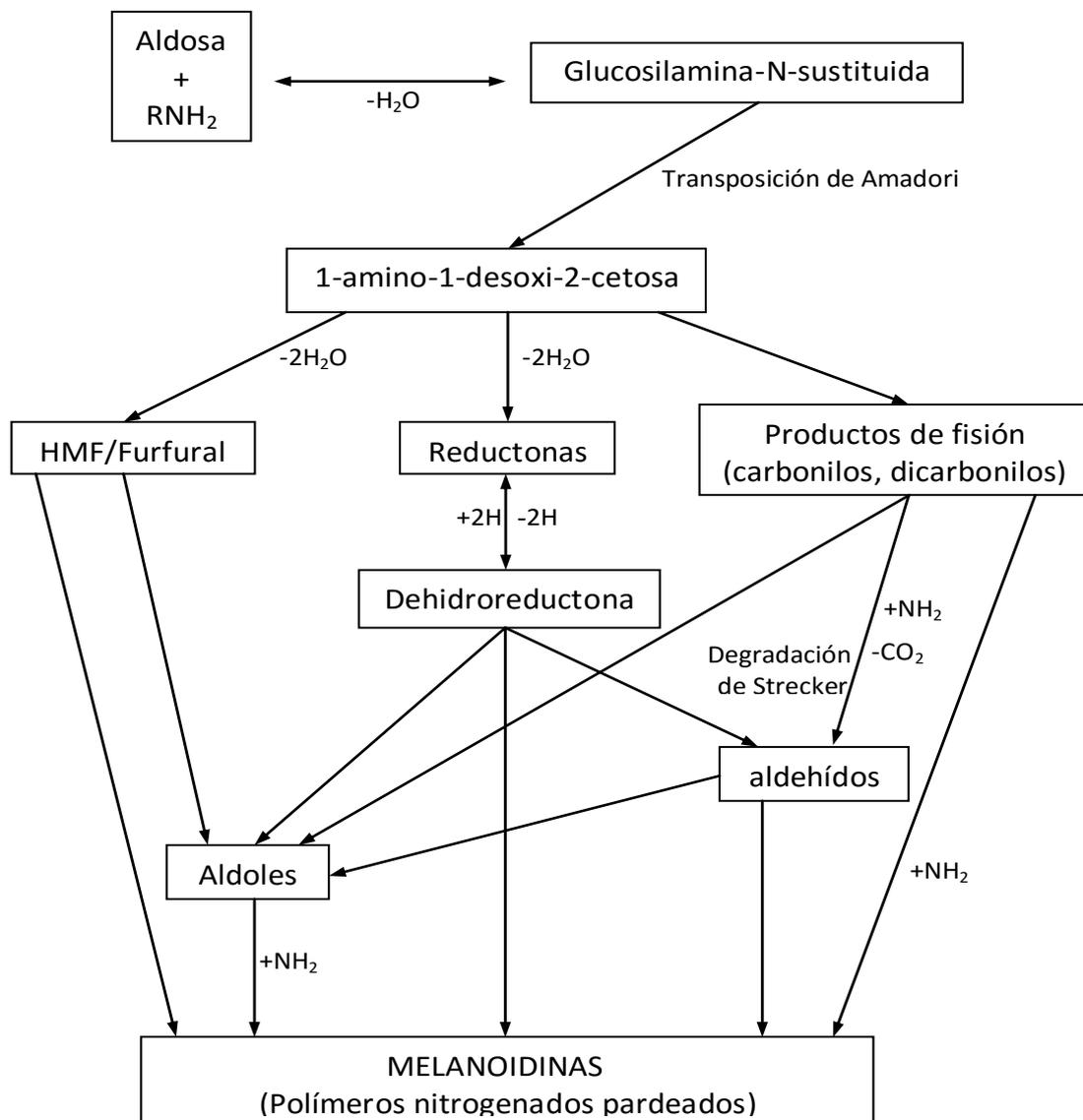
B. Etapa intermedia: (aparición de olor). Los productos de Amadori y Heyns se descomponen dependiendo del pH, la a_w , la presencia de metales divalentes o la temperatura, dando lugar a la formación de diferentes compuestos intermedios responsables del aroma que caracterizan a los alimentos cocinados. A pH neutro o ligeramente ácido, y en condiciones de baja a_w , la reacción predominante es una enolización-1,2 que da lugar a la formación de furfural cuando el azúcar reductor implicado es una pentosa o hidroximetilfurfural (HMF) en el caso de una hexosa (Moye and Krzeminski, 1963). Por el contrario, a pH básicos tiene lugar una enolización-2,3 formándose reductonas y una variedad de productos de fisión tales como acetol, piruvaldehído y diacetilo, todos ellos de gran reactividad, lo que hace que participen en nuevas reacciones con otros productos intermedios de la reacción (Cheftel and Cheftel, 1980).

Los productos de Amadori pueden degradarse también por vía oxidativa (ruta de Namiki) hacia compuestos carbonílicos (Nursten, 1986). Los compuestos dicarbonílicos producidos, mediante la degradación de Strecker, pueden reaccionar con aminoácidos y dar lugar a la formación de aldehídos con un carbono menos, α -aminocetonas y eliminación de CO_2 . Estos aldehídos también juegan un papel importante en el aroma y sabor de los alimentos cocinados (Stadtman et al., 1952).

C. Etapa avanzada: (formación de pigmentos). Engloba un gran número de reacciones complejas que incluyen ciclaciones, deshidrataciones, reorganizaciones y condensaciones originando dos clases diferentes de compuestos: los compuestos aromáticos volátiles (compuestos avanzados de la reacción de Maillard), siguiendo la vía paralela de Strecker y las melanoidinas. Las melanoidinas son polímeros coloreados producidos por reacciones de condensación de compuestos con grupos aminos procedentes de las etapas intermedias de la reacción Maillard como pirroles N-

sustituidos, 2-formilpirroles N-sustituidos, y 2-furaldehído. La estructura de las melanoidinas varía dependiendo de las condiciones en las que haya tenido lugar la reacción, así como del tipo de alimento. Además, poseen menor solubilidad que los PRM de partida (Morales et al., 2012). Los compuestos avanzados de la reacción de Maillard conocidos “in vivo” como AGEs se forman por la oxidación o fragmentación de azúcares o sus aductos con proteínas. Estas reacciones están catalizadas por especies reactivas del oxígeno (ROS) y peroxinitritos (Figura 18).

Figura 18. Esquema de la reacción de Maillard.



2.4.1.3.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA REACCIÓN DE MAILLARD

La intensidad con la que se dé la reacción de Maillard depende de la naturaleza de las sustancias reaccionantes, su concentración, la actividad de agua, el pH del medio, la temperatura del proceso, el tiempo de calentamiento... (O'Brien and Morrissey, 1989; Wijewickreme et al., 1997).

- **Sustancias reaccionantes**

Los sustratos que intervienen en la reacción de Maillard son los grupos carbonilos, principalmente de azúcares reductores (aunque también de lípidos oxidados) y los grupos amino, principalmente de aminoácidos libres, péptidos o proteínas con grupos amino en su cadena lateral. La concentración de sustrato también afecta a la reacción, viéndose favorecida con exceso de sustrato en el medio (Warmbier et al., 1976).

Se ha descrito que la reactividad de los azúcares reductores disminuye al aumentar el peso molecular (Nacka et al., 1998). Las aldosas intrínsecamente más reactivas que las cetosas (Yeboah et al., 1999), aunque se ha descrito que las cetosas podrían dar lugar a un mayor entrecruzamiento y agregación proteica durante las etapas avanzadas de la reacción de Maillard (Sun et al., 2004; Sun et al., 2006). De forma general, el grado de pardeamiento en los azúcares decrece en el siguiente orden: (1) pentosas, ribosa > xilosa > arabinosa; (2) hexosas, galactosa > manosa, glucosa > fructosa; (3) disacáridos, maltosa= lactosa.

El grado de reactividad del azúcar y su comportamiento depende también del estado y naturaleza de la proteína con la que reacciona. Así, la rafinosa destruye 6 veces más lisina de la lactoalbúmina que de la globulina, aunque pentosas y hexosas presentan una reactividad similar en ambas proteínas (Overby and Frost, 1952; Frangne and Adrian, 1972).

Cuando el pardeamiento de Maillard no es deseado se puede prevenir eliminando uno de los sustratos, normalmente el azúcar.

Otras moléculas con grupos carbonilo (Montgomery and Day, 1965; Pokorny, 1981) como los formados por degradación de Strecker (formaldehído, acetal, propional)

o los producidos durante la degradación de los compuestos de Amadori (furfural e hidroximetilfurfural) (Obretenov et al., 1983) pueden reaccionar con los grupos amino e iniciar otra vez la reacción. Cuando un alimento contiene productos de estas clases la reacción de Maillard puede producirse sin el concurso de los azúcares, como ocurre en el queso o en las frutas y zumos de fruta (Clegg, 1964).

Las proteínas, todas excepto las insolubles como la queratina, son susceptibles de reaccionar con los azúcares. Los α -aminoácidos, que forman junto al grupo carbonilo el enlace peptídico, son poco accesibles durante los tratamientos por calor y reacciones químicas a diferencia de los α -aminoácidos terminales y los que tienen un segundo grupo amino en estado libre como es el caso de la lisina. El grupo ϵ -amino de la lisina es el principal responsable del desarrollo de la reacción de Maillard en los alimentos proteicos (Rufián-Henares et al., 2009b). 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 más reactivo, seguido de los aminoácidos básicos.

Los aminoácidos básicos libres no reaccionan con los azúcares a una velocidad marcadamente superior al resto de aminoácidos, sino que es la configuración estereoquímica la que determina su comportamiento. Por otra parte, la presencia de aminoácidos libres condiciona el desarrollo de la reacción de Maillard entre lisina y azúcar, la valina acelera la velocidad de la reacción entre lisina-azúcar mientras que la arginina la disminuye.

Los aminoácidos que producen mayor grado de pardeamiento son la lisina, la glicina e incluso el triptófano, mientras que aminoácidos como la cisteína y arginina producen un bajo grado de pardeamiento (Ashoor and Zent 1984).

La mezcla de proteínas completas y aminoácidos libres produce una mayor pérdida nutricional y a la pérdida de lisina en proteínas intactas hay que unir la de los otros aminoácidos (Adrian and Frangne, 1973).

- **pH**

Los efectos del pH son complejos ya que cada una de las reacciones que intervienen en el pardeamiento tienen su propio pH óptimo: entre 6 y 8 para la condensación de Maillard, pH próximo a 7 para la reestructuración de Amadori y pH 5.5 para la degradación de cetosaminas por enolización (Cheflel and Chefiel, 1976). En la mayoría de los casos, la intensidad de la reacción aumenta al aumentar el pH (Adrian, 1974, Ashoor and Zent, 1984, Lignert, 1990). Este aumento es lineal desde valores de pH de 3 a 8 (Lee et al., 1984) y probablemente hasta 10 (Adrian, 1974), disminuyendo a valores de pH más elevados (Ashoor and Zent, 1984). Por debajo de pH 3 la intensidad de la reacción aumenta otra vez, probablemente debido a la hidrólisis de la proteína (Kaanane and Labuza, 1989).

Si estudiamos el efecto del pH en los alimentos, podemos distinguir:

- Alimentos cuyo pH está comprendido entre 6 y 8 (leche, huevos, cereales, carnes) en los que las condiciones son favorables a la reacción de Maillard. Un descenso del pH permite atenuar el pardeamiento durante la deshidratación, pero modifica desfavorablemente los caracteres organolépticos.
- Alimentos cuyo pH está comprendido entre 2.5 y 3.5 (zumos y concentrados de frutas ácidas). Estos productos son pobres en aminoácidos y la reacción de Maillard aparece de forma muy débil. Es la degradación del ácido ascórbico, así como la caramelización de los azúcares, la responsable del pardeamiento. Estas reacciones están catalizadas por el ácido cítrico y algunos aminoácidos presentes.
- Alimentos de pH intermedio (conservas vegetales, alimentos fermentados, miel, salsas, sopas) en los que puede ocurrir simultáneamente la reacción de Maillard y la degradación del ácido ascórbico.

- **Actividad del agua**

Uno de los factores que más influencia tiene en el desarrollo de la reacción de Maillard es el agua presente en los alimentos, expresado como actividad de agua (a_w) (Labuza and Saltmarch, 1981; Ames, 1990). El aumento de la a_w produce un incremento de la reacción de Maillard, hasta alcanzar un máximo, a partir del cual disminuye la reacción, posiblemente debido a la dilución de los reactivos. Diversos autores han demostrado que el intervalo óptimo de a_w es entre 0.3 y 0.7 (Labuza, 1977) y ya a partir de 0.8 la velocidad de reacción disminuye debido a la dilución del soluto en la fase acuosa (Kane and Labuza, 1989).

Por lo general, es durante la deshidratación cuando los riesgos de pardeamiento son mayores y en especial en la fase del proceso en que el contenido en agua es inferior al 20% y la temperatura es elevada. Tratamientos a temperaturas más bajas presentan el inconveniente de alargar el proceso de deshidratación y el alimento permanece más tiempo con un contenido crítico de agua. Así, por ejemplo, en la elaboración de pan la baja a_w favorece la formación de color durante el horneado, pero a medida que avanza la cocción, aumenta la temperatura y disminuye la a_w por lo que se acelera el pardeamiento y acumulación de compuestos coloreados en la corteza (Purlis, 2010).

- **Temperatura**

La temperatura y tiempo de calentamiento son considerados los factores más determinantes de la reacción de Maillard, estando ampliamente aceptado que el incremento de la temperatura, así como el tiempo de almacenamiento, favorecen de forma exponencial la reacción de Maillard (Ryu et al., 2003).

La temperatura no es un factor indispensable ya que la reacción de Maillard se produce tanto a temperatura ambiente (durante el almacenamiento) como a altas temperaturas (esterilización), pero sí depende del tiempo que se emplee dicha temperatura. A mayor temperatura el desarrollo del pardeamiento es más intenso, pero, a su vez, es posible obtener el mismo grado de pardeamiento si el producto se calienta a una temperatura elevada durante un periodo de tiempo corto, como si el tiempo empleado es mayor y la temperatura que se alcanza es menor. Por eso es

importante tener en cuenta que la mejor variable para predecir el pardeamiento es la carga de calor: cantidad de calorías aplicadas al producto. Este valor puede obtenerse multiplicando el tiempo de calentamiento (en minutos) por la temperatura (en grados centígrados) (Rufián-Henares et al., 2009a).

- **Presencia de metales**

La presencia de cationes metálicos afecta a 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 et al., 1981; O'Brien et al., 1994) y por tanto incrementar el desarrollo del pardeamiento. Hay que hacer notar que los primeros estudios atribuyen efectos a los cationes metálicos debidos al descenso del pH que se produce en su incorporación al sistema (Powell and Spark, 1971).

2.4.1.3.2. CONSECUENCIAS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD

2.4.1.3.2.1. Modificación de las características organolépticas de los alimentos

En la industria alimentaria, la reacción de Maillard se emplea para obtener sabores, aromas y colores que sean agradables para el consumidor, es decir, para mejorar sus características organolépticas, como puede ser el olor del café, la corteza del pan, las galletas, etc. Aunque, por otro lado, en la reacción de Maillard también se pueden obtener compuestos que puede ser desagradables para el consumidor, haciendo que el producto sea menos apetecible (Rufián-Henares et al., 2006).

2.4.1.3.2.2. Actividad antioxidante

Algunos de los compuestos generados tienen propiedades antioxidantes. Como ejemplo, la actividad antioxidante de las melanoidinas resulta especialmente interesante ya que se forman de manera natural en el alimento durante su procesado o su almacenamiento (Bendinghaus and Ockerman, 1995). Las melanoidinas pueden llevar ligados compuestos de bajo peso molecular (Cammerer et al., 2002; Delgado-Andrade et al., 2005). Se observó que los compuestos de bajo peso molecular unidos a las

melanoidinas tenían una actividad antioxidante mayor que las propias melanoidinas (Rufián-Henares and Morales, 2007).

2.4.1.3.2.3. Reducción del valor nutritivo

La reacción de Maillard produce importantes efectos negativos sobre la calidad nutricional de los alimentos durante su procesamiento y almacenamiento. Puede modificar el valor nutritivo de los alimentos actuando sobre ciertos componentes, como son: las proteínas, los minerales y las vitaminas.

- **Proteínas:**

La reacción de Maillard reduce el valor nutritivo de los alimentos, aunque no se observen cambios en el color y aroma de los alimentos (Mauron, 1981) al disminuir la biodisponibilidad de los aminoácidos esenciales (O'Brien and Morrissey, 1989). Esto se debe a la destrucción de aminoácidos durante la reacción de Maillard. La lisina es el aminoácido más afectado en la reacción de Maillard, no obstante, el tratamiento térmico de los alimentos puede producir la pérdida de otros aminoácidos esenciales como son los aminoácidos azufrados (Adrian, 1982; Bjorck et al., 1983), triptófano (Bjorck et al., 1983) e histidina (Lee et al., 1982).

La pérdida nutricional del alimento depende del tipo de proteína, carbohidrato, severidad del tratamiento y binomio tiempo/temperatura. La suplementación de alimentos tratados térmicamente con aminoácidos de síntesis no restituye el valor nutricional inicial del alimento.

- **Vitaminas:**

La influencia que ejercen los compuestos de la reacción de Maillard sobre las vitaminas no está muy estudiada, aunque existen algunas evidencias. Como por ejemplo que algunas premelanoidinas pueden reaccionar con las vitaminas y destruirlas (Ford et al., 1983). Se han encontrado pérdidas moderadas de vitamina B6 y tiamina en leches en polvo almacenadas a 60°C.

La destrucción del ácido ascórbico en algunos alimentos está estrechamente relacionada con la reacción de Maillard (Archer and Tannenbaum, 1979). El ácido dehidroascórbico reacciona, con los compuestos amino de los alimentos para formar pigmentos rojos y pardos (Namiki et al., 1986; Ishii et al., 1986). La pérdida nutricional de esta vitamina por la reacción de Maillard es insignificante (Archer and Tannenbaum, 1979).

- **Minerales:**

El efecto de los productos de la reacción de Maillard sobre la biodisponibilidad mineral se atribuye a su comportamiento como agentes quelantes de metales e interfiere en el metabolismo de los minerales. En 1976, Hrdlicka observó que cuando sales de Fe^{3+} o Cu^{2+} se calientan junto a una mezcla de glucosa-glicina o fructosa-glicina originan pigmentos (melanoidinas) capaces de formar complejos estables con estos cationes, pudiendo influir en su biodisponibilidad (Hrdlicka, 1976). Del mismo modo, se ha comprobado en animales de experimentación y en humanos, que los productos de la reacción de Maillard modifican la excreción urinaria del zinc y también de otros elementos como el cobre, hierro y calcio. En concreto, ensayos llevados a cabo en ratas, han mostrado la relación entre los productos de la reacción de Maillard y algunos minerales como el calcio, magnesio (Delgado-Andrade et al., 2007a), zinc (Navarro et al., 2000), hierro y cobre (Hurrell, 1990).

2.4.1.3.2.4. Actividad mutagénica y antimutagénica

Los compuestos con mayor poder mutagénico originados en la reacción de Maillard son las aminas heterocíclicas, que aparecen de la reacción entre aminoácidos, monosacáridos y creatinina cuando los alimentos son sometidos a tratamientos térmicos (Ames, 2003). Otros compuestos con poder mutagénico son: los hidrocarburos aromáticos policíclicos (ej. benzopireno), N-nitrosaminas, monocloropropanodiolos (ej. 3-MCPD), furano y recientemente y de gran importancia acrilamida e hidroximetilfurfural (Abraham, et al., 2011; Friedman, 2005; Nagao et al., 1983).

Según determinados estudios, se ha demostrado que algunos de los productos de la reacción de Maillard presentan efecto antimutagénico. Así, algunos compuestos de

Maillard son potentes inhibidores del crecimiento de las células tumorales humanas (Marko et al., 2003). El efecto antimutagénico pueden llevarlo a cabo por varios mecanismos, bien inhibiendo el crecimiento de células tumorales suprimiendo la inducción de la cadena de la proteinquinasa o bien inhibiendo la absorción mutágenos (Porwie et al., 1986)

2.4.1.3.2.5. Actividad antimicrobiana

Einarsson et al. (1983) encontraron que los productos de la reacción de Maillard obtenidos entre la arginina y xilosa, así como entre histidina y glucosa inhiben el crecimiento bacteriano. Einarsson (1987) estudió el efecto del tiempo, temperatura y pH sobre la formación de compuestos antibacterianos con mezclas de arginina-glucosa, arginina-xilosa e histidina-glucosa. Observó que eran más dependientes del aminoácido que del azúcar. En otros estudios se han encontrado que las melanoidinas presentes en alimentos como la cerveza y galletas, pero sobre todo las melanoidinas del café, tienen acción bacteriostática y bactericida, en función de la concentración que se utilicen (Rufián-Henares and Morales 2008).

2.4.1.3.2.6. Actividad alérgica y antialérgica

Dentro de los productos que pueden aparecer durante la reacción de Maillard, podemos encontrar que algunos presentan actividad alérgica y otros, actividad antialérgica. Existen algunos estudios que relacionan el desarrollo de la reacción de Maillard y la actividad alérgica de algunos alimentos, como son la leche (Bleumink and Young, 1968; Mukoyama et al., 1977; Kaminoawaga et al., 1984) y los cacahuets (Chung and Champagne, 1999; Maleki et al., 2000) porque durante el tratamiento térmico que sufren estos alimentos se puede incrementar la alergenidad de los mismos (Maleki et al., 2000).

Sin embargo existen otros estudios donde se ha demostrado que los productos de la reacción de Maillard procedentes de mezclas glucosa-ácido-6-aminocaproico presentan un efecto supresor sobre la reacción alérgica, como por ejemplo en la soja (Babiker et al., 1998) y en frutas como las cerezas, donde las proteínas que producen la reacción alérgica se unen a carbohidratos reductores, sufriendo una modificación

irreversible en su estructura terciaria inhibiendo así su actividad alérgica (Gruber et al., 2004).

2.5. HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

2.5.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

El HMF (5-hidroximetil-2-furaldehído) es un compuesto orgánico, concretamente, un aldehído cíclico que se puede obtener tanto en la deshidratación de algunos azúcares, caramelización y también se puede obtener como producto de la reacción de Maillard. El HMF se puede encontrar en diferentes estados: sólido (en forma de agujas o de polvos) o líquido, pero todos de color amarillo oscuro (Merck, 1989; MSDS, 1994; Lewis, 1997). En su estructura presenta dos grupos funcionales, un grupo hidroxilo y un grupo formilo (Figura 19). El mismo anillo de furano es también una estructura reactiva. Con estas características, el HMF puede sufrir reacciones de reducción, oxidación, esterificación y muchas otras reacciones. Esto nos puede llevar a la obtención de una serie de derivados y una variedad de aplicaciones. Su estructura y propiedades físico-químicas se detallan en la figura 19 y en la tabla 4.

Figura 19. Estructura del HMF.

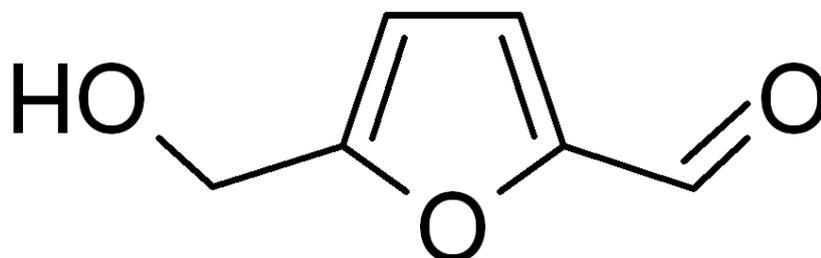


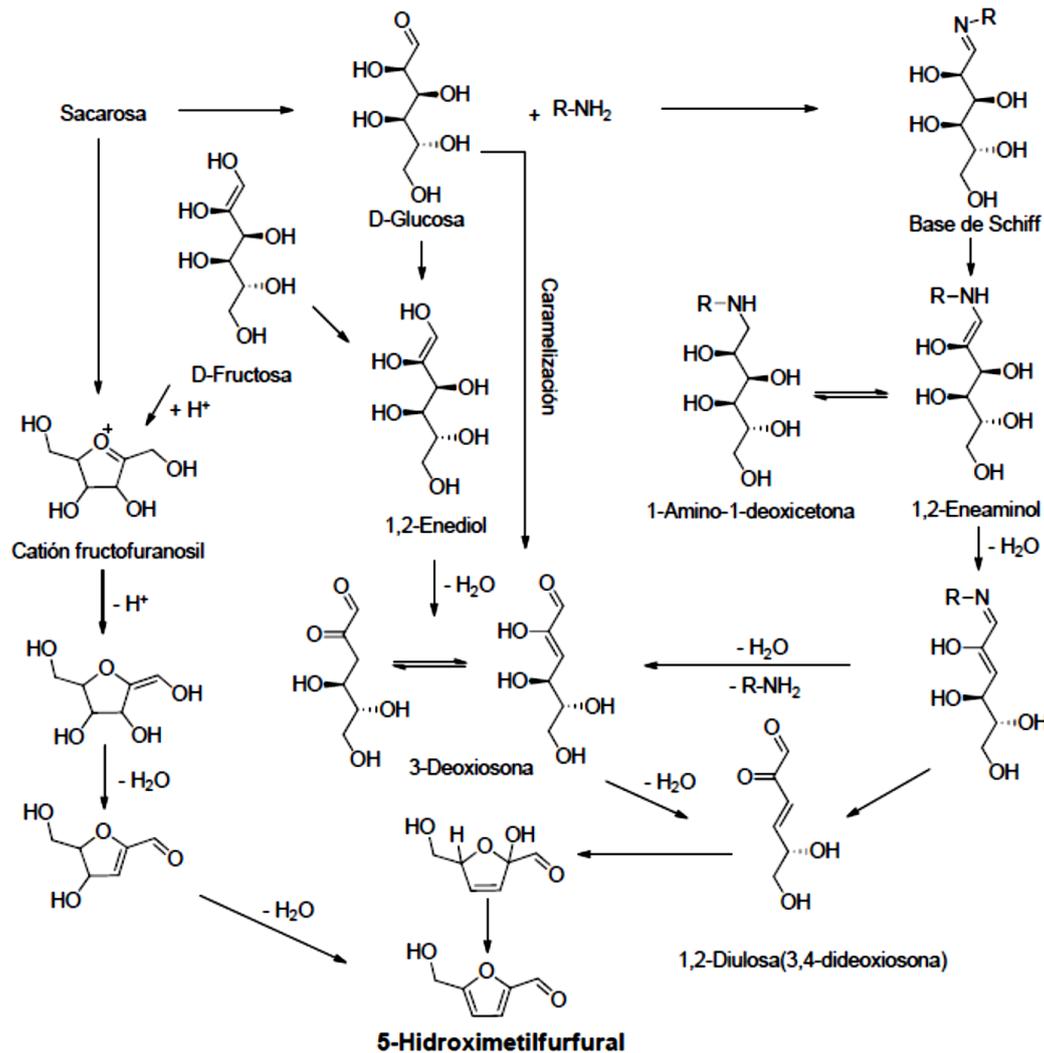
Tabla 4. Propiedades físico-químicas del HMF.

Propiedades Físico-Químicas	Valores
Peso molecular	126,11 g/mol
Punto de fusión	32-34°C
Punto de ebullición	114-116°C (1 mm Mg)
Densidad	1,243 g/cm ³ a 25°C
Solubilidad	Agua, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo
Máxima absorbancia	284nm

2.5.2. SÍNTESIS DEL HMF

La síntesis HMF se comenzó en la década de 1890, y fue en 1919 cuando Middendorp publicó su investigación sobre las propiedades físicas, químicas y métodos de síntesis del HMF (Middendorp, 1919). Desde entonces, se ha actualizado periódicamente (Lewkowski, 2001). El rendimiento de la obtención de HMF se puede mejorar utilizando catalizadores ácidos homogéneos o heterogéneos. La síntesis de HMF se puede llevar a cabo en disoluciones acuosas y disolventes orgánicos, así como líquidos iónicos (Dumesic and Roman-Leshkov, 2009; Ohara et al., 2010) Como ya se ha mencionado anteriormente, el HMF es un compuesto intermedio en la reacción de Maillard que se produce cuando las hexosas reductoras se calientan en presencia de aminoácidos o proteínas. También se puede obtener durante la caramelización (Figura 20) la deshidratación térmica directa de fructosa, sacarosa y en menor medida, de glucosa (Perez-Locas and Yaylayan, 2008).

Figura 20. Principales rutas de formación del HMF.



La velocidad de conversión de la materia prima y la selectividad del HMF se ven afectadas por varios factores en la reacción, incluyendo el disolvente, el catalizador y el método de calentamiento (Dumesic and Roman-Leshkov, 2009; Ohara et al., 2010). Los correspondientes mecanismos de reacción, catalizadores, mediadores de reacción y condiciones de reacción aplicadas a la producción de HMF se resumen de la siguiente manera: durante la síntesis de HMF, si partimos de monosacáridos (glucosa o fructosa) se produce una reacción de deshidratación directa, perdiendo tres moléculas de agua para formar el HMF. Pero, si partimos de polisacáridos (como celulosa) primero tiene que descomponerse en monosacáridos y posteriormente se produce una deshidratación, dando lugar al HMF (Li et al., 2009). Así, se ha observado que la glucosa con estructura de anillo estable tiene una menor reactividad que la fructosa, ya que la

tasa de enolización de la glucosa en solución es menor que la fructosa, que es el paso determinante en la formación de HMF (Bhosale et al., 1996).

2.5.3. REACTIVIDAD DEL HMF

- **Oxidación del HMF**

La oxidación del HMF puede ocurrir de varias formas: su grupo hidroxilo se puede oxidar dando un aldehído o grupo carboxilo y el aldehído, a su vez, se puede oxidar en un grupo carboxilo. El HMF puede someterse a una reacción de oxidación selectiva bajo diferentes condiciones. Los productos que se pueden obtener a partir de la oxidación del HMF son: furano-2,5-dicarboxaldehído (FDC), ácido 5-hidroximetilfuran-2-carboxílico (HFCA), ácido 5-formilfuran-2-carboxílico (FFCA) y ácido furan-2,5-dicarboxílico (FDA). Por ejemplo, la oxidación del HMF a FDC utilizando cloroperoxidasa como catalizador y peróxido de hidrógeno como oxidante, da lugar a una conversión del 92% de HMF y una selectividad máxima del 74% a FDC. (van Deurzen et al., 1997). Gorbanev et al. (2009) estudió el paso de HMF a FDA utilizando 1wt% Au / TiO₂ como catalizador y un 71% de rendimiento se obtuvo a 30°C en 18 horas con 20 bares de oxígeno en solución acuosa básica (Gorbanev et al., 2009). También se encontró que se produjo más producto de oxidación intermedio, HFCA, en comparación con FDA cuando se usa una presión más baja o una concentración más baja de base. Casanova et al., (2009) encontró que con los dos catalizadores de Au-CeO₂ y Au-TiO₂, las condiciones óptimas para convertir HMF en FDA eran 130°C y 10 bares de presión de aire, logrando un rendimiento de más del 99%.

- **Reducción del HMF**

La reducción del grupo formilo del HMF da lugar a la formación de 2,5-bis(hidroximetil)furano, que es un componente importante para la producción de polímeros y espumas de poliuretano (Moreau et al., 2004). Varios estudios demostraron altos rendimientos de la reacción con níquel, cromito de cobre, óxido de platino, óxido de cobalto, óxido de molibdeno y catalizadores de amalgama de sodio (Cottier, 2003; Goswami et al., 2008).

- **Otras reacciones y aplicaciones**

Los ésteres se pueden producir mediante la reacción del HMF con un alcohol u ácido orgánico. El producto puede ser utilizado como combustible, combustible aditivo o un material de partida para la síntesis de monómeros para las reacciones de polimerización (Gruter and Frist, 2009; Gruter et al., 2010). Otro producto que se puede obtener a partir del HMF es el 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxilato (mumefural, MF), que se ha visto que presenta aplicaciones farmacéuticas (Sriwilaijaroen et al., 2011). Así mismo, el ácido 5-aminolevulínico (DALA) es un insecticida útil (Rebeiz et al. 1988) y también un tipo de herbicida biodegradable. Otros derivados se utilizan como potenciadores del sabor en la industria alimentaria como el 5-hidroxiometil-2-furaldehído bis-(5-formilfurfuril) acetal, preparado a partir de HMF usando una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte como catalizador (Terada et al., 2010). Finalmente, el HMF también puede reaccionar con la L-alanina en condiciones alcalinas para producir N-(1-carboxietil)-6-(hidroximetil)piridinio-3-ol (alampiridaina), otro tipo de potenciador del sabor (Villard et al., 2003).

2.5.4. METABOLISMO

El HMF se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal de los roedores y se elimina con la misma rapidez de todos los tejidos, sin evidencia de una acumulación significativa (Godfrey et al., 1990). Esa absorción puede estar influenciada por algunos componentes de la dieta como por ejemplo el contenido en fibra, que parece reducir el transporte y la absorción de HMF en las líneas celulares CaCo-2 (Delgado-Andrade et al., 2008). Algunos estudios se ha demostrado que el HMF se metaboliza y finalmente es eliminado en la orina, siendo el HMFA (5-hidroxiometil-2-furanoico) y el HMFG (N-5-hidroxiometil-furoil-glicina) los principales metabolitos del HMF excretados (Godfrey et al., 1990).

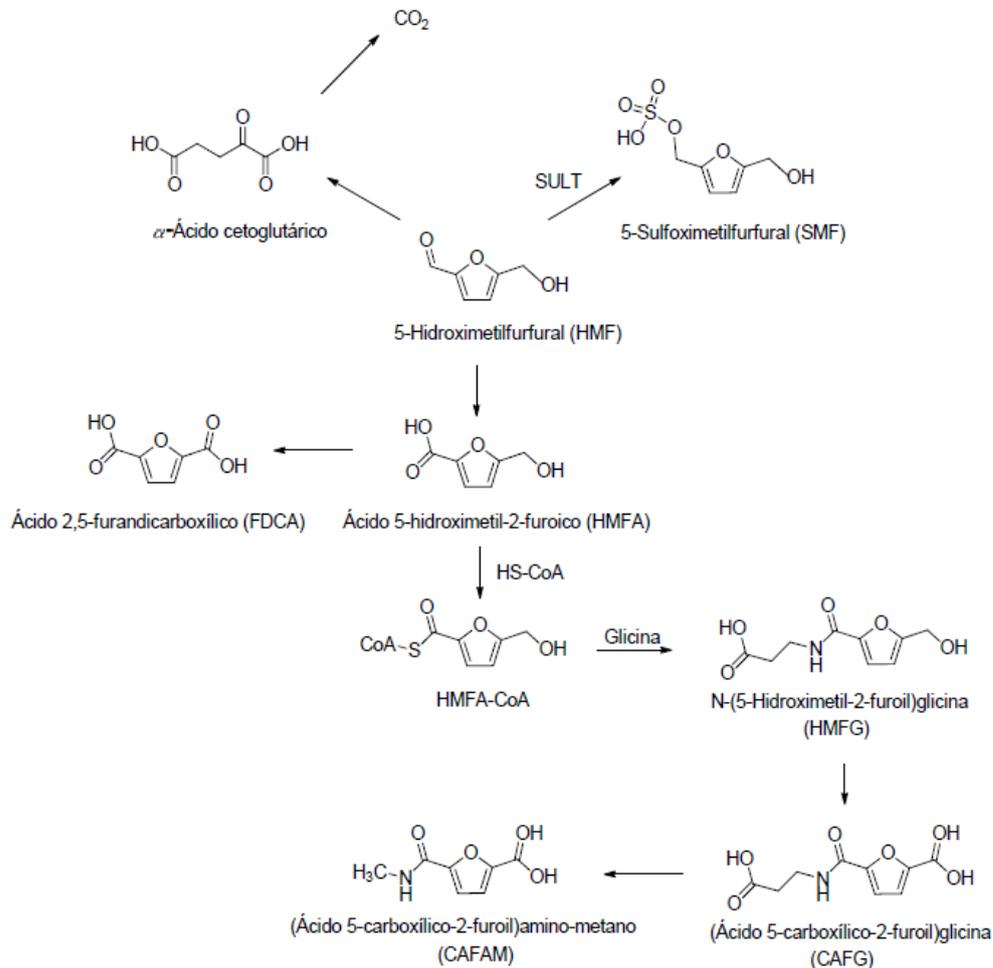
El metabolismo de HMF en mamíferos sigue las mismas rutas que las implicadas en la biotransformación de furfurales en roedores (Figura 21). El primer paso del metabolismo es la oxidación del grupo aldehído del HMF a 5-hidroxiometil-2-furanoico (HMFA) (Godfrey et al. 1999; European Food Safety Authority, 2005) y después puede

ocurrir una oxidación adicional a un ácido dicarboxílico, ácido 2,5-furandicarboxílico, FDCA, o conjugación con glicina formando N-(5-hidroximetil)-furoil-glicina, HMFG (HMFG, conjugado de glicina de HMFA).

La relación HMFA/HMFG disminuye cuando aumenta la ingesta de HMF, lo que sugiere que la disponibilidad de glicina libre puede limitar la tasa de conjugación. La cantidad de HMFG compuesto es limitada, ya que el aminoácido glicina es necesario para otros procesos bioquímicos. El HMFA, HMFG y FDCA se han identificado en la orina de ratas y ratones (Godfrey et al., 1999) y en los seres humanos se han detectado en la orina, y además se ha demostrado que éstos se derivan de HMF en los alimentos (Pettersen and Jellum, 1972; Husøy et al., 2008). El HMFA, HMFG, ácido (5-carboxílico-2-furoil)glicina (CAFG), y ácido (5-carboxílico-2-furoil)aminometano (CAFAM), pero no el FDCA, se han identificado recientemente en orina de sujetos que consumieron zumo de ciruela seca (Pryor et al., 2006). El HMF se convierte en 5-hidroximetilfuranacrilil-CoA (Pryor et al., 2006) y se excreta a través de la orina después de la conjugación de glicina como 5-hidroximetil-furanacrililglicina (HMFAG). Sin embargo, la HMFAG no se ha detectado aún en la orina de animales y roedores.

El HMF es biotransformado a SMF, pasando a ser un compuesto bioactivo, siendo detectado por primera vez, en 2009, *in vivo* en sangre de ratones (Monien et al., 2009). Éste se obtiene a partir del HMF por sulfonación de su grupo funcional hidroxilo alílico, reacción catalizada por sulfotransferasas (SULT) (Glatt and Sommer, 2006; Surh and Tannenbaum, 1994). Una ruta menor en la eliminación del HMF sería la oxidación completa de HMF a CO₂ a través de la apertura del anillo, formándose primero el ácido α -cetoglutarico. Esta vía se ha descrito en la literatura para roedores, pero aún no se ha confirmado en humanos (Nomeir et al., 1992).

Figura 21. Metabolismo del HMF.



2.5.5. TOXICOLOGÍA

El HMF es un compuesto que se conoce desde hace muchos años, aunque sólo recientemente se ha estudiado más a fondo la relación entre HMF, sus metabolitos y la salud. La toxicidad aguda por vía oral del HMF como compuesto puro es relativamente baja, siendo la dosis letal (DL50) de 2,5 g/kg de peso corporal en ratas (EPA, 1992).

El HMF tiene dos posibles formas de desarrollar efectos toxicológicos en seres humanos. A dosis muy altas, el HMF es citotóxico, causando irritación a las membranas mucosas de los ojos, las vías respiratorias superiores, la piel... (Ulbricht et al., 1984). A

dosis relevantes para la nutrición humana, que van desde 2-30 mg por persona/día (Husøy et al., 2008; Abraham et al., 2011) se concluyó que HMF no constituye un riesgo para la salud (Janzowski et al., 2008). Sin embargo, los resultados de otros grupos de investigación señalan que HMF exhibe una potencial actividad genotóxica y mutagénica debido a su activación metabólica a 5-sulfoximefurfural (SMF) (Surh and Tannenbaum, 1994; Sommer et al., 2003). Por lo tanto, algunos estudios indican que HMF y SMF puede actuar como un iniciador de cáncer de colon en ratas (Zhang et al., 1993; Svendsen et al., 2009) y la inducción de adenomas hepatocelulares en modelo murino (NTP, 2008).

El HMF puede convertirse en SMF por medio de sulfotransferasas (SULT). Las enzimas citosólicas de sulfotransferasa humana (SULT) catalizan la conjugación de sulfato de muchos fármacos, otros xenobióticos y hormonas, especialmente las hormonas esteroides (Falany, 1997). Existen 12 isoformas SULT humanas conocidas (Coughtrie, 2002; Weinshilboum and Adjei, 2005). La sulfo-conjugación de diversos sustratos también puede conducir a la formación de metabolitos reactivos que pueden inducir cáncer y causar otros daños. Los podemos encontrar en el tracto gastrointestinal humano (estómago, hígado, yeyuno, íleon, ciego) (Teubner et al., 2007). Se sospecha que éstas están involucradas en el metabolismo, bioactivación y desintoxicación de procarcinógenos ambientales y dietéticos, así como una serie de hormonas esteroides, incluyendo estrógenos (Coughtrie, 2002; Glatt and Meini, 2004, Adjei and Weinshilboum, 2002). Esto podría ser el vínculo entre HMF y carcinogénesis: el SMF es una especie química altamente electrofílica que puede reaccionar con el ADN, produciendo diferentes aductos (Monien et al., 2012). En este sentido, el HMF ha demostrado ser mutagénico en *Salmonella typhimurium* TA100, cepa que expresa diversas formas de SULT (Glatt et al., 2011). Aún más, el SMF se forma en ratones *in vivo* después de la administración de HMF (Monien et al., 2009). También se ha visto que el SMF es nefrotóxico (Nadiya et al., 2009), ya que se produce una reabsorción tubular que conduce a necrosis y agregados proteicos en los túbulos proximales. Aparte de los estudios *in vitro* e *in vivo*, se sabe poco sobre la conversión del HMF a SMF en seres humanos. Sólo existen algunos trabajos sobre el análisis de los metabolitos de HMF en la orina (Husøy et al., 2008; Prior et al., 2006) pero no hay información disponible sobre su concentración plasmática o el proceso de formación de SMF en las intervenciones

nutricionales humanas. A la luz de este conocimiento, debe tenerse en cuenta el posible riesgo para la salud mediado por la exposición humana al HMF dietético, que excede la ingesta de otros contaminantes alimentos procesados (como acrilamida o furano) en mayor proporción (Abraham et al., 2011).

2.5.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL HMF

Existen gran variedad de técnicas para determinar HMF en los alimentos, entre las que encontramos la espectrofotometría, la cromatografía y la colorimetría. Hoy en día, la más utilizada para detectar el HMF y derivados en los alimentos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de forma fiable y precisa. Esto se debe a que se puede determinar directamente sin que haya que usar ningún derivado coloreado. Así, esta técnica se ha utilizado para alimentos como los zumos y concentrados de frutas (Porretas and Sandei, 1991; Garza et al., 2001), vinagre (Theobald et al., 1998), miel (Teixidó et al., 2006; Serrano et al., 2007), café (Dauberte et al., 1990), cereales de desayuno (García-Villanova et al., 1993; Rufián-Henares et al., 2006), pan (Ramírez-Jiménez et al., 2000a; Ramírez-Jiménez et al., 2000b; Teixidó et al., 2006).

También existen métodos que han empleado una extracción líquido-líquido para purificar el HMF cuando hay presencia de compuestos que interfieran en su determinación (Rufián-Henares et al., 2001). En el caso del café (Murkovic and Pichler, 2006) se ha utilizado la extracción en fase sólida (SPE). También se han empleado técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para la determinación de HMF en alimentos (Teixidó et al., 2006).

2.5.7. CONCENTRACIÓN E INGESTA DE HMF

2.5.7.1. CONCENTRACIÓN DE HMF EN ALIMENTOS

El HMF está casi ausente en los alimentos frescos y no tratados térmicamente, su concentración tiende a aumentar durante el calentamiento y el almacenamiento de alimentos ricos en hidratos de carbono, por lo que es una herramienta útil para evaluar el daño por calor en los alimentos (Fallico et al., 2003). Además, es también un

parámetro reconocido de la frescura y calidad de los alimentos. Por lo tanto, el control analítico del HMF se ha utilizado en la vigilancia de los alimentos para evaluar tanto la calidad del método de elaboración como las características organolépticas del producto final.

El contenido de HMF en alimentos tales como pan, café, caramelo y otros ha sido estudiado por diversos grupos de investigación. Así Bachmann et al. (1997) estimaron la concentración de HMF en el pan entre 3,2-220 mg/kg mientras que Ramírez-Jiménez et al. (2000) obtuvieron concentraciones de HMF entre 2,2-68,8 mg/kg en pan español. En los frutos secos, Murkovic and Pichler (2006) encontraron valores de HMF entre 1-2200 mg/kg. En el caso del café, la concentración de HMF está comprendida entre 300-1900 mg/Kg (Murkovic and Bornik, 2007; Murkovic and Pichler, 2006). Bachmann et al. (1997) también analizaron la carne y los productos cárnicos y se encontraron concentraciones muy bajas, por debajo 0,9 mg/kg de producto, mientras que el caramelo presentó altas concentraciones de HMF, con valores entre 110-9500 mg/kg. En el caso de las galletas, se estimó que el HMF está presente en concentraciones de 0,5-74,6 mg/kg (Ait-Ameur et al., 2006; Rufián-Henares and de la Cueva, 2008). En los cereales infantiles la cantidad de HMF se encontró en el rango de 0,4-65,5 mg/kg (Fernández-Artigas et al., 1999; Ramírez-Jiménez et al., 2003). El contenido de HMF en cereales de desayuno se encontró en el intervalo de 6,9-240,5 mg/kg (Rufián-Henares et al., 2005)

Finalmente, hay que indicar que el aporte de HMF a la dieta por parte de los alimentos depende tanto del contenido de HMF de los mismos, así como de su frecuencia de consumo. Por ello, los alimentos más peligrosos en relación a la ingesta de HMF son aquellos que presentan concentraciones medias-bajas (café o pan) pero que se consumen diariamente en cantidades apreciables. Aquellos alimentos que presentan una concentración de HMF muy elevada (caramelo o vinagre balsámico) pero se consumen con menor frecuencia o en raciones pequeñas, no supondrían un peligro tan elevado como los anteriores (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008).

2.5.7.2. INGESTA DE HMF

En 1984 Ulbricht et al. estimaron una ingesta diaria de HMF entre 30-150 mg (Ulbricht et al., 1984). En el año 2000, Janzowski et al. estimaron la ingesta diaria en 30-

60 mg. Delgado-Andrade et al. (2007) calcularon una ingesta diaria de 5,1 mg para los adolescentes españoles, usando métodos de detección mucho más precisos que los usados anteriormente por los anteriores investigadores. Más tarde, en 2008, Rufián-Henares y de la Cueva estimaron una ingesta diaria para la población adulta española entre 2,1-23,0 mg de HMF (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008).

III. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral es evaluar la ingesta de compuestos potencialmente beneficiosos (polifenoles) o perjudiciales (HMF) en escolares de 10-12 años de edad de la provincia de Granada.

Para ello se han llevado a cabo los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar la ingesta diaria de polifenoles dieta de los escolares granadinos de 10-12 años de edad a partir de registros de 24 h y cuestionarios de frecuencia de consumo. Estudiando qué alimentos aportan más polifenoles a la dieta de los escolares, determinando las posibles diferencias por sexo y días de la semana.
- Determinar si la intervención nutricional puede modificar el patrón alimentario de los escolares, de forma que se incremente el consumo de alimentos saludables como frutas, hortalizas, aceite de oliva... estudiando su efecto sobre la ingesta de polifenoles.
- Poner a punto un método espectrofotométrico que sea fácil de llevar a cabo, rápido, repetible y económico para evaluar la excreción de polifenoles en orina, evaluando si existe una correlación entre la ingesta de polifenoles y su excreción.
- Determinar en un modelo animal si una ingesta elevada de HMF da lugar a la formación de SMF in vivo y si se produce daño a nivel genético, evaluado mediante la presencia de aductos de ADN.
- Evaluar la exposición dietética a HMF de los escolares granadinos de 10-12 años de edad a partir registros de 24 h y cuestionarios de frecuencia de consumo, determinando qué alimentos aportan más HMF y las posibles diferencias por sexo y días de la semana.
- Determinar si la exposición a HMF en niños da lugar a la formación de daño genético (determinado como aductos de ADN) y poder estudiar la correlación con diferentes metabolitos de HMF excretados en orina.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 POLIFENOLES

Para evaluar los posibles efectos beneficiosos de la dieta de los escolares granadinos se evaluó la ingesta de compuestos fenólicos, principales compuestos fitoquímicos de los alimentos con efectos saludables (Vauzour et al., 2010; Quiñones et al., 2012). Así mismo se realizó una intervención nutricional para determinar si se podía mejorar el patrón de consumo alimentario, de forma que siguiendo una Dieta Mediterránea se incrementara la ingesta de polifenoles.

4.1.1 DETERMINACIÓN DE INGESTA DE POLIFENOLES

4.1.1.1 SUJETOS

Para llevar a cabo este trabajo se eligieron 5 colegios del área metropolitana de Granada del mismo nivel socioeconómico. Los estudiantes tenían entre 10 y 11 años ($M=10,7\pm 0,5$) y participaron un total de 268 niños de 328 posibles (81,7%), concretamente 132 niñas y 136 niños. La muestra fue aleatoria, los niños estaban sanos y no estaban recibiendo ningún tratamiento médico. Todos los sujetos participaron voluntariamente de conformidad con la Declaración de Helsinki en relación con la investigación ética. El consentimiento informado se obtuvo también de todos los padres de los niños. Se obtuvo la aprobación del estudio por parte del Comité de Bioética de la Universidad de Granada (SA/11/AYU/246).

4.1.1.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Para evaluar la ingesta de alimentos se utilizaron dos tipos de cuestionarios alimentarios, uno de frecuencia de consumo estandarizado y un registro de alimentos de 24h de tres días.

- **Frecuencia-consumo**

Es un método retrospectivo y cualitativo donde se evalúa el consumo de alimentos divididos por grupos durante un periodo determinado de tiempo (3-12 meses). Los valores de alimentos vienen expresados en la cantidad estándar de ración, por lo que es

semi-cuantitativo, aunque es contestado de forma fácil y rápida. El cuestionario de frecuencia-consumo fue validado previamente (de la Fuente-Arrillaga et al., 2010) y estaba compuesto por 136 ítems de preguntas cerradas (Anexo I), identificando con qué frecuencia consumían los niños dichos alimentos a lo largo del último año. Para cada ítem se ofrecían 9 posibles respuestas: nunca o casi nunca, 1-3 veces al mes, una vez a la semana, 2-4 veces a la semana, 5-6 veces a la semana, 1 vez al día, 2-3 veces al día, 4-6 veces al día o más de 6 veces al día.

- **Recordatorio 24h**

Tiene por objetivo conocer el consumo de alimentos del día anterior de la persona entrevistada, conociendo no sólo las preparaciones consumidas sino cada ingrediente que la compone. En nuestro estudio el registro de alimentos de 24h fue completado durante 3 días consecutivos (dos días entre semana y 1 día de fin de semana). El documento entregado a los padres para realizar el registro de 24 horas contenía instrucciones, páginas para registrar alimentos consumidos durante cinco períodos de tiempo (desayuno, media mañana, almuerzo, merienda, cena) para cada día (Anexo I) durante 3 días.

Los cuestionarios, tanto de frecuencia-consumo como el registro de 24h, fueron rellenados por los padres con la ayuda de los niños, tomando nota de todos los alimentos que consumían, tanto dentro como fuera del hogar. Los padres como los niños fueron instruidos en la estimación de los tamaños y de las raciones de los alimentos que se consumían y de las partes comestibles de los productos. Para facilitar el trabajo se les proporcionó información de medidas caseras (tazas, cucharas, etc.) utilizadas además de las medidas de peso en gramos (Anexo I).

- **Evaluación de la ingesta de polifenoles**

Para determinar la cantidad de polifenoles de la dieta se elaboró una base de datos a partir de la base Phenol Explorer 3.6 (<http://phenol-explorer.eu>), la cual contenía información sobre más de 500 tipos de polifenoles de 462 alimentos (Rothwell et al., 2013). Para nuestro estudio preparamos una base de datos en Excel, a partir de los recogidos en Phenol-Explorer, con los alimentos más consumidos a nivel nacional. En

esta base se clasificaron los alimentos en 8 grupos: hidratos de carbono o cereales (los cuales engloban a los cereales y tubérculos como la patata y algunos procesados como el pan), verduras, frutas, legumbres, frutos secos, aceites, bebidas (zumos de frutas, café, té y bebidas alcohólicas) y “otros” (chocolate, cacao, vinagre, especias, aceitunas, entre otros). Los alimentos procesados como galletas, lasaña, pizzas, etc. fueron desglosados por ingredientes para poder tener los datos más cercanos y exactos posibles, de forma que se pudiera cuantificar el aporte real de compuestos fenólicos que estos alimentos procesados suponían en la dieta. A partir de dicha base de datos se calcularon los mg miligramos de polifenoles que aportaba cada alimento (teniendo en cuenta el gramaje consumido a partir de las raciones), se sumaron por comidas para cada niño y se agruparon por grupo de alimentos para luego realizar los cálculos pertinentes.

4.1.2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1.2.1 PRODUCTOS QUÍMICOS

El reactivo Folin-Ciocalteu y Fast Blue BB fueron de Sigma-Aldrich. Los demás reactivos y disolventes fueron de calidad analítica (Sigma-Aldrich).

4.1.2.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ZUMOS

4.1.2.2.1 MUESTRA

Se analizaron 34 zumos cítricos comerciales para cubrir las principales marcas consumidas en España: 23 zumos de naranja, 5 zumos de pomelo, 4 zumos de mandarina y 2 zumos de limón. Las muestras se obtuvieron de tres tiendas minoristas diferentes y se almacenaron bajo refrigeración o a temperatura ambiente (según las instrucciones del fabricante) durante un máximo de 3 días antes del análisis. Se realizaron al menos tres determinaciones para cada procedimiento en diferentes muestras.

4.1.2.2.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Los compuestos fenólicos totales en zumos de cítricos se determinaron de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). De forma resumida, se añadieron 30 µl de zumo a 15 µl del reactivo F-C, 190 µl de agua y 60 µl de carbonato de sodio 10% en una placa de 96 pocillos de poliestireno transparente (Biogen Científica). Entonces la mezcla se incubó 1h a 37°C, tomando lecturas cada 60 segundos a 765 nm en un lector de microplacas FLUOStar Omega. La cuantificación se llevó a cabo en la base de la recta de calibración de ácido gálico, utilizado como estándar externo. Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico por litro de zumo.

4.1.2.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ORINA

4.1.2.3.1 SUJETOS

El análisis de la excreción de compuestos fenólicos en orina se realizó en todos aquellos que completaron satisfactoriamente tanto el cuestionario de frecuencia de consumo como el recuerdo de 24 horas.

4.1.2.3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Para estudiar la correlación entre ingesta y excreción de polifenoles totales se tomó una muestra de la primera orina de la mañana. Las muestras de orina se acidificaron con HCl previo a su almacenamiento a -80°C. La determinación de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes, el método de Folin-Ciocalteu y el ensayo del reactivo de Fast Blue BB (Lester et al., 2012).

- **Método Folin-Ciocalteu**

La determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método Folin-Ciocalteu se llevó a cabo siguiendo el método modificado descrito por Singleton y Rossi (1965). En primer lugar, se purificó la muestra de orina usando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) Waters Oasis HLB (60 mg), útiles para eliminar interferencias de la matriz de la muestra, concentrar los polifenoles de interés y mejorar el rendimiento del sistema analítico (Roura et al., 2006). La orina previamente acidificada permitió que los

compuestos fenólicos se cargaran eléctricamente y fueran retenidos en el cartucho. Así, el cartucho se activó mediante la adición de 1 ml de metanol y 3 ml de H₂O. Posteriormente se cargó 1 ml de orina acidificada y el cartucho los compuestos interferentes se lavaron con 2 ml de ácido fórmico 1.5 M y 2 ml de agua-metanol al 5% (95:5). Finalmente, los compuestos fenólicos retenidos en el cartucho se eluyeron con 1 ml de ácido fórmico en metanol al 0.1%. En el caso de las muestras utilizadas sin purificar, la orina se centrifugó durante 5 minutos a 9000 rpm a 5°C, previo a su análisis.

El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) se realizó mezclando 30 µl de orina (purificada o sin purificar) con 15 µl del reactivo F-C, 190 µl H₂O y 60 µl de carbonato sódico 10% (para alcalinizar el medio de reacción). A continuación, la mezcla se incubó 1h en oscuridad a temperatura ambiente, tomando lecturas de absorbancia cada 60 segundos a una longitud de onda de 765 nm (Singleton y Rossi, 1965) durante 60 minutos en un lector de placas FLUOStar Omega (BMG Labtech) con control de temperatura (37°C). La cuantificación de polifenoles se realizó mediante el método de calibración por estándar externo, utilizando el ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico/g de creatinina.

- **Método Fast Blue BB (FBBB)**

Esta nueva determinación de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Medina (2011) y adaptado para orina. Brevemente, se tomaron 25 µl de orina y se diluyeron con 975 µl de agua. Posteriormente se añadieron 0,1 ml del reactivo Fast Blue BB (preparado al 0,1% en agua y disuelto mediante sonicación durante 5 minutos), se agitó durante 30 segundos y se añadieron 0,4 ml de NaOH al 5%. Tras 90 minutos de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 420 nm en un lector de placas FLUOStar Omega (BMG Labtech). La cuantificación de polifenoles se realizó mediante el método de calibración por estándar externo, utilizando el ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico/g de creatinina.

4.1.2.4 DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA

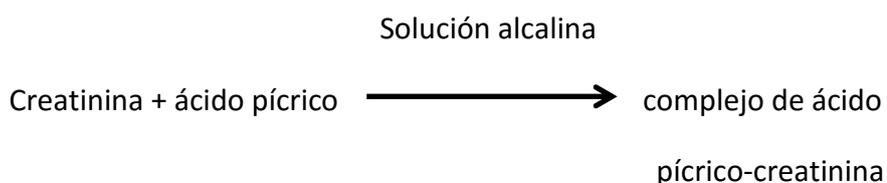
4.1.2.4.1 SUJETOS

Para la determinación de creatinina en orina, los sujetos fueron los mismos que para la excreción de compuestos fenólicos en orina, todos los que completaron satisfactoriamente ambos cuestionarios.

4.1.2.4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Puesto que la determinación de polifenoles excretados se realizó en muestras de la primera orina de la mañana y no en orina total de 24 horas, fue necesario estandarizar la diuresis utilizando el contenido de creatinina en orina (Roura et al., 2006), ya que, en ausencia de enfermedad, las concentraciones de creatinina en suero y orina son generalmente muy estables (Hodgson et al., 2004; Valianpour et al., 2004; Mir and Serdaroglu, 2005; Yager et al., 2006). El análisis se realizó según el método de Jaffe (1886), método colorimétrico que consiste en la reacción de la creatinina con ácido pícrico en medio alcalino, dando lugar a la formación de un complejo de color rojizo a una longitud de onda de 500 nm (Figura 22).

Figura 22. Determinación de creatinina por el método colorimétrico.



De forma resumida, se añadieron 40 μ l de orina en un tubo de ensayo y se mezclaron con 800 μ l de solución de ácido pícrico acuoso al 1% y 60 μ l de hidróxido sódico 0,01%. Tras agitación en vórtex, la mezcla se incubó en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 3,1 ml de agua destilada, midiendo la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer).

4.2 HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

Para evaluar los posibles efectos perjudiciales de la dieta de los escolares granadinos se evaluó la ingesta de HMF, compuesto generado durante el procesado térmico de los alimentos con posible actividad mutagénica (Surh and Tannenbaum, 1994; Sommer et al., 2003). Para ello se realizaron dos tipos de estudio: un estudio animal (ratones) donde se evaluó la transformación de HMF en SMF, su presencia en plasma a partir del HMF contenido en la dieta y la determinación de la presencia de aductos de SMF en ADN. Posteriormente se analizó la ingesta de HMF en los mismos escolares del estudio sobre polifenoles, evaluando también la presencia plasmática de HMF, SMF y aductos de ADN (Pastoriza et al., 2017).

4.2.1 DETERMINACIÓN DE HMF, SMF Y ADUCTOS DE ADN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se realizó un primer estudio con ratones con el fin de evaluar el metabolismo y la distribución de una dosis oral alta de HMF. Se aclimataron ratones FVB/N machos de diez semanas de edad procedentes de Charles River Laboratories durante 21 días antes de su uso. Un grupo de 21 animales, después de un período de ayuno nocturno, recibió una dosis oral (administrada mediante sonda nasogástrica) de 1500 mg HMF/kg peso corporal en solución salina isotónica, correspondiente a un 48,8% de la DL50 (3.100 mg/kg pc) (Abraham et al., 2011). Como control se administró a 3 ratones solución salina isotónica sola y se sacrificaron en el tiempo 0. Así mismo se sacrificaron tres ratones por punto de tiempo mediante sobredosis de isoflurano a 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos. Se extrajo sangre por punción cardiaca y se extrajo el hígado y los riñones. Se obtuvieron muestras de plasma por centrifugación de las muestras de sangre a 1715 g durante 20 minutos a 4°C en tubos que contenían EDTA. A continuación, el plasma, el hígado y los riñones se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Se realizó un segundo estudio con ratones para evaluar el efecto del consumo a largo plazo de una dosis alta de HMF sobre la presencia de SMF y sus principales aductos

de ADN. Treinta ratones FVB/N machos de 10 semanas de edad procedentes de Charles River Laboratories se aclimataron durante 21 días antes de su uso. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos (10 ratones por grupo) y se alimentaron *ad libitum* durante 28 días con una dieta AIN-93M estándar (Research Diets): Grupo control: 7 mg/Kg de dieta (HMF procedente de la dieta); Grupo de dosis baja: 50 mg/Kg de dieta (1,6% de DL50); Grupo de dosis alta: 300 mg HMF /kg de dieta (9,7% de DL50). Las dietas de ambos grupos se suplementaron con HMF puro comercial (Abraham et al., 2011). El día 29, después de un período de ayuno nocturno los ratones se sacrificaron por sobredosis de isoflurano y se extrajo sangre por punción cardiaca. En este caso, el plasma y los leucocitos se obtuvieron después de una centrifugación con gradiente diferencial en tubos Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Todos los procedimientos de gestión y experimentales llevados a cabo en este estudio estuvieron estrictamente de acuerdo con la normativa europea vigente (86/609 E.E.C.) relativa a los animales de laboratorio. El Comité de Bioética de Experimentación Animal de nuestra institución (Universidad de Granada) aprobó el protocolo de estudio.

4.2.2 DETERMINACIÓN DE INGESTA DE HMF EN HUMANOS

4.2.2.1 SUJETOS

Los sujetos de estudio son los mismos niños que los empleados en el apartado anterior (268 estudiantes de 10 y 11 años, $M = 10,7 \pm 0,5$) de cinco colegios del área metropolitana de Granada. La muestra fue aleatoria, los niños estaban sanos y no estaban recibiendo ningún tratamiento médico. Todos los sujetos participaron voluntariamente de conformidad con la Declaración de Helsinki en relación con la investigación ética. El consentimiento informado se obtuvo también de todos los padres de los niños. Se obtuvo la aprobación del estudio por parte del Comité de Bioética de la Universidad de Granada (SA/11/AYU/246).

4.2.2.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Para evaluar la ingesta de HMF se utilizaron los mismos cuestionarios alimentarios empleados para polifenoles, uno de frecuencia de consumo estandarizado y un registro de alimentos de 24h de tres días.

- **Desarrollo de una base de datos de HMF y evaluación de riesgos**

Los datos sobre el contenido de HMF en los alimentos están disponibles en la literatura científica, así como en la base de datos de AGEs de la Universidad Técnica de Dresde (2016). Sin embargo, con el fin de disponer de los datos más confiables posible sobre los niveles de HMF en los alimentos y preparaciones culinarias consumidos por nuestro colectivo y por lo tanto la mejor estimación sobre el consumo de HMF, decidimos realizar el análisis de HMF en nuestro laboratorio. De esta forma, se elaboró una base de datos sobre el contenido de HMF agrupando los datos obtenidos del análisis de 297 alimentos que son sometidos a tratamiento térmico tanto en el hogar como durante su procesado industrial. Los datos se dividieron en 10 grupos diferentes: carnes, pescados y mariscos, huevos, lácteos, legumbres, cereales y derivados, tubérculos y hortalizas, frutos secos, dulces y postres y bebidas (Anexo III).

El cálculo de la ingesta de HMF se realizó en base a los cuestionarios de la frecuencia consumo y recuerdo de 24 horas, ya que este último es mucho más exacto sobre las cantidades de alimentos ingeridos que la frecuencia de consumo. La ingesta de HMF se calculó multiplicando los datos de consumo de alimentos (en gramos) por la concentración promedio de HMF presente en cada producto. El uso de la concentración media de HMF en los cálculos de la ingesta proporciona una estimación realista y adecuada de la exposición a largo plazo (FAO/WHO, 1997). La ingesta diaria total de HMF se obtuvo entonces sumando las ingestas de todos los alimentos y expresadas en mg HMF/día. Además, se calculó la exposición a HMF teniendo en cuenta el peso de cada alumno, en $\mu\text{g HMF/kg peso corporal/día}$.

- **Obtención de muestras biológicas**

Tras completar los recuerdos de 24h, el lunes por la mañana se obtuvo sangre venosa de todos los participantes tras un período de ayuno de 8 horas. Las muestras se almacenaron en la oscuridad en recipientes con hielo y se procesaron dentro de la hora siguiente a la extracción. Se obtuvieron muestras de plasma por centrifugación de las muestras de sangre a 1715 g durante 20 minutos a 4°C. Los leucocitos se obtuvieron tras centrifugación de la sangre con tubos Ficoll-Hypaque (GE Healthcare).

Así mismo se recogió una muestra de orina de 24 horas, que englobaba desde la primera orina del domingo por la mañana hasta la primera orina del lunes. Para mantener la integridad de las muestras de orina, se añadió ácido bórico (2 g aproximadamente) a los recipientes de plástico (2000 ml) utilizado para el muestreo de orina para prevenir el crecimiento bacteriano. El volumen total de orina se calculó antes de dividir la muestra en alícuotas. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

4.2.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.2.3.1 REACTIVOS

El HMFA se adquirió de Matrix Scientific y HMF de Fluka (Buchs, Suiza). El [¹⁵N₅]dAdo marcado con isótopo estable y el [¹³C₁₀,¹⁵N₅]dGuo procedían de Campro Scientific. El SMF, N⁶-FFM-dAdo, [¹⁵N₅]N⁶-FFM-dAdo, [¹³C₁₀,¹⁵N₅]N²-FFM-dGuo y N²-FFM-dGuo se sintetizaron como se describe en los siguientes apartados (Monien et al., 2009; Monien et al., 2012). El compuesto de la matriz utilizada para la obtención de imágenes de espectrometría de masas (MSI) fue el ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, que como los demás reactivos y enzimas utilizados para síntesis químicas y reacciones analíticas fueron de calidad analítica (Sigma-Aldrich). Así mismo, todos los disolventes fueron de calidad HPLC (Sigma-Aldrich). La purificación del aducto de ADN se realizó con columnas Oasis HLB (60 mg, Waters). Se obtuvo agua desionizada doblemente destilada de un sistema Milli-Q (Millipore).

4.2.3.2 SÍNTESIS DE SMF Y ADUCTOS DE ADN

Debe mencionarse que la síntesis en laboratorio de las moléculas SMF, N^6 -FFM-dAdo y N^2 -FFM-dGuo utilizadas en el presente ensayo de cuantificación analítica fue objeto de publicación científica previa (Monien et al., 2012; Teubner et al., 2006), aunque la síntesis química y la pureza de los compuestos se incluye en la información suplementaria.

4.2.3.2.1 SÍNTESIS DE SMF

Se disolvieron 32 mg de HMF en 1 ml de tetrahidrofurano anhidro y se enfrió a 0°C. Posteriormente se añadieron 0,65 ml de una solución de trióxido de azufre-piridina (0,5 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra, siendo la mezcla agitada de nuevo a 0°C durante 4 h. A continuación, se añadieron 40 mg de metóxido de sodio en 0,35 ml de metanol y la mezcla resultante se centrifugó. El sobrenadante se añadió gota a gota a 80 ml de éter dietílico anhidro. Finalmente, el precipitado se filtró, se lavó de nuevo tres veces con éter dietílico anhidro y se secó al vacío. La sal sódica de SMF así obtenida mostró los siguientes desplazamientos químicos (^1H NMR, 400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6): δ [ppm] 9,63 (s, 1H, CHO), 7,54 (d, 1, H3, $J_{3,4} = 3,6$ Hz), 6,75 (d, 1, H4, $J_{4,3} = 3,6$ Hz), 4,83 (s, 2, $-\text{CH}_2-\text{O}$). La pureza fue del 98,7% como se indica mediante análisis LC/UV-MS/MS.

4.2.3.2.2 SÍNTESIS DE N^6 -FFM-dAdo, N^2 -FFMdDGuo, $[^{15}\text{N}_5]N^6$ -FFM-dAdo, $[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]N^2$ -FFM-dGuo

Los aductos de ADN se obtuvieron haciendo reaccionar dAdo comercial, dGuo, $[^{15}\text{N}_5]$ dAdo o $[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]$ dGuo. De forma resumida, se suspendieron 120 mg de dAdo (o dGuo) y 50 mg de SMF en 5 ml de tampón fosfato de sodio (pH=7; 0,1M) y se agitó durante 24h a 37°C (en el caso de $[^{15}\text{N}_5]$ dAdo o $[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]$ dGuo, se usaron 5,0 mg para la reacción). La mezcla se purificó usando un Prep LC 4000 (Waters) acoplado a un detector PDA. Los compuestos se purificaron con una columna semipreparativa SunFire C18 (5 μm , Waters) usando un gradiente lineal a partir de 5% de metanol a 55% de metanol en agua (v/v), caudal de 20 ml/min durante 20 minutos. Las fracciones que contenían los compuestos de interés se unieron y se liofilizaron. Los cambios químicos

obtenidos para N^6 -FFM-dAdo (1H NMR, 500 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) fueron los siguientes: δ [ppm] 9,50 (s, 1H, CHO), 8,49 (bs, 1H, N-H), 8,40 (s, 1H, H2), 8,24 (s, 1H, H8), 7,45 (d, $J_{4,5} = 1,6$ Hz, 1H, H3''), 6,54 (d, 1H, H4''), 6,35 (m, 1H, H1''), 5,32 (d, 1H, O-H3''), 5,16 (m, 1H, O-H5''), 4,75 (bs, 2H, N-CH₂), 4,39 (m, 1H, H3'), 3,89 (M, 1H, H4'), 3,62 (m, 1H, H5'), 3,52 (m, 1H, H5'*), 2,74 (m, 1H, H2'). Los cambios químicos obtenidos para N^6 -FFM-dGuo (1H NMR, 500 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) fueron los siguientes: δ [ppm] 10,76 (s, 1H, H1), 9,53 (s, 1H, CHO), 7,92 (s, 1H, H8), 7,50 (d, $J_{3,4} = 3,54$ Hz, 1H, H3''), 7,10 (bs, 1H, N-H), 6,61 (d, $J_{3,4} = 3,54$ Hz, 1H, H4''), 6,13 (m, 1H, H1'), 5,25 (d, 1H, O-H3'), 4,85 (m, 1H, O-H5'), 4,61 (m, 2H, N-CH₂), 4,32 (m, 1H, H3'), 3,80 (m, 1H, H4''), 3,52 (m, 1H, H5'), 3,45 (m, 1H, H5'*), 2,56 (m, 1H, H2'), 2,17 (m, 1H, H2'*). La pureza fue 99,2 y 99,1% para N^6 -FFM-dAdo y N^2 -FFM-dGuo, respectivamente, como se indica mediante análisis LC/UV-MS/MS.

4.2.3.3 DETERMINACIÓN DE HMF EN ALIMENTOS MEDIANTE HPLC

El análisis de HMF en los alimentos se evaluó mediante purificación acuosa de alimentos homogeneizados y se analizó mediante HPLC-UV en un equipo Accela 600 HPLC (Thermo Fisher Scientific) con el método desarrollado por nuestro grupo de investigación anteriormente (Rufián-Henares et al., 2006). En los alimentos con cantidades muy bajas de HMF la extracción se realizó de la misma manera, pero el análisis fue realizado con el equipo de HPLC-MS/MS como en el caso de muestras de plasma (Monien et al., 2009).

4.2.3.3.1 MUESTRAS

Se analizaron los alimentos que son sometidos a tratamiento térmico tanto en el hogar como durante su procesado industrial. Para trabajar con mayor facilidad, los numerosos alimentos analizados se agruparon en 10 categorías diferentes: carnes, pescados y mariscos, huevos, lácteos, legumbres, cereales y derivados, tubérculos y hortalizas, frutos secos, dulces y postres y bebidas (Anexo III).

También se analizó el HMF presente en los mismos 34 zumos cítricos que se usaron para la determinación de compuestos fenólicos. Las muestras se almacenaron durante

un máximo de 3 días antes del análisis. Se realizaron al menos tres determinaciones para cada muestra.

4.2.3.3.2 ALIMENTOS SÓLIDOS

El análisis de la concentración de HMF en alimentos sólidos se realizó según el método de Rufián-Henares et al. (2006). La muestra finalmente molida (500 mg) se resuspendió en 5 ml de agua desionizada en un tubo de centrífuga de 10 ml. El tubo se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se clarificó con 0,25 ml de cada una de las soluciones de ferrocianuro de potasio (15%) y acetato de zinc (30%). La mezcla resultante se centrifugó a 4500 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recogió en un matraz aforado de 10 ml y se realizaron dos extracciones adicionales utilizando 2 ml de agua desionizada. Los sobrenadantes se mezclaron y el volumen se llevó hasta 10 ml con agua desionizada y 1 ml se filtró (0,45 µm) en un vial de HPLC. La determinación del HMF se realizó con un HPLC. Los análisis para HMF, furfural y GIM se hicieron por HPLC sobre la solución filtrada (0,45 µm). El sistema HPLC fue el Accela 600 (Thermo Fisher Scientific) equipado con una bomba cuaternaria, un muestreador automático termostatzado a 4°C, un horno de columna termostatzado a 32°C y un detector de diodo UV-vis (PDA). Los datos obtenidos se procesaron con el software Chromquest 5.0 de Thermo Fisher. La fase móvil era una mezcla de acetonitrilo en agua (5% v/v) suministrada a un caudal de 1 ml/min en condiciones isocráticas a través de la columna analítica (Extrasyl-ODS2, 25 x 0,4 cm, tamaño de partícula de 5 µm, Tecknokroma). El detector se ajustó a 280 nm y se inyectaron 20 µl del extracto. El HMF se cuantificó mediante el método de estándar externo en el intervalo 2-100, 1-20 y 1-50 mM.

4.2.3.3.3 ALIMENTOS LÍQUIDOS

La determinación de HMF en alimentos líquidos se realizó con el método de Rufián-Henares et al. (2006). Brevemente, se clarificó la muestra líquida homogeneizada (4ml) con 0,5 ml de cada una de las soluciones de ferrocianuro de potasio (15%) y acetato de zinc (30%). Después de agitar vigorosamente durante 20 s, la mezcla resultante se centrifugó a 4500 g durante 10 min a 4°C. El procedimiento se realizó por dos veces más con 2 ml de agua. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación se

recogió, se llevó a 10 ml y se filtró (0,45 μm) en un vial de HPLC. El análisis de HMF se realizó de igual forma que en el caso de muestras sólidas.

4.2.3.4 ANÁLISIS MEDIANTE LC-MS/MS DE HMF, HMFA, SMF, N⁶-FFM-dAdo AND N²-FFM-dGuo EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

4.2.3.4.1 ANÁLISIS DE HMF

El análisis de HMF en el plasma y los tejidos se realizó tras derivatización con DNPH (dinitrofenilhidrazina) y detección MS/MS con el método desarrollado por Monien et al. (2009). En resumen, se determinó la cantidad de HMF en hígado y riñones de ratones con el sobrenadante obtenido tras homogeneización del tejido con una mezcla de metanol-agua (10:90), sonicación durante 5 minutos y centrifugación (15000 g durante 20 min a 4°C). Después se mezclaron 10 μl de plasma o extracto líquido de tejidos con 10 μl de DNPH (20 mM en 1 M ácido clorhídrico/acetoneitrilo, 1:3). La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos, se neutralizó con 6 μl de KOH (0,5 M en agua/etanol, 1:1) y se diluyó con 74 μl de agua. A continuación, se centrifugaron las muestras y se analizó el derivado HMF-DNPH presente en el sobrenadante usando un UPLC Waters XEVO TQ-S equipado con una columna UPLC BEH Phenyl (1,7 μm , 2,1 mm x 100 mm, Waters). Tras inyectar 5 μl de muestra, se llevó a cabo el análisis con un gradiente de disolvente a partir de 80:20 agua/acetoneitrilo hasta 30:70 agua/acetoneitrilo durante 4,5 min, suministrado a un flujo de 0,35 ml/min. Tanto el agua como el acetoneitrilo se acidificaron con ácido acético y ácido fórmico, respectivamente.

Los parámetros MS fueron los siguientes: fuente de electrospray a 115°C; temperatura de desolvatación de 450°C; gas nitrógeno de desolvatación suministrado a un caudal de 850 l/h; gas nitrógeno para el cono suministrado a un caudal de 50 l/h y el gas de colisión fue el argón (5×10^{-3} mbar). La detección del derivado HMF-DNPH se realizó con una fuente de electrospray que funcionó en modo positivo. La descomposición de HMF-DNPH en el anhídrido de 5-(hidroximetil)furano-2-carbonitrilo se utilizó para la cuantificación (307,2 \rightarrow 106,1) y se utilizó la deshidratación de HMF-DNPH (307,2 \rightarrow 289,2) como ión cualificador. Para obtener estos iones, las energías de colisión fueron 5 y 25 eV, respectivamente. El tiempo de permanencia se ajustó a 100

ms y el voltaje capilar se ajustó a 3,7 kV. Se analizaron muestras de plasma de ratones control adicionadas con HMF a diferentes concentraciones, obteniéndose una recuperación superior al 99% y una regresión de $r^2=0,9978$ en el intervalo entre 0,0001 y 300 μM .

4.2.3.4.2 ANÁLISIS DE HMFA

El análisis de HMFA se realizó por medio de UPLC-UV con el método de Jöbstl et al. (2010). Brevemente, se colocó orina o plasma (200 μl), respectivamente, en un Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 15000 g durante 15 min/4°C. El sobrenadante se diluyó 1:1 con agua y se analizó en un UPLC Accela 600 (Thermo Fisher Scientific). La columna analítica fue una Hypersil ODS C18 (3 μm , 2,1 mm x 100 mm, Thermo Scientific) y la fase móvil (metanol-agua 5:95 con 5 mM sulfato de tetrametilamonio como agente de par iónico) se suministró isocráticamente a 1 ml/min. La detección de HMFA se realizó a 255 nm. Se analizaron muestras de orina y plasma de ratones adicionadas de HMFA a diferentes concentraciones, obteniéndose una recuperación mayor de 98,7% y una regresión de $r^2=0,9964$ en el intervalo entre 0,5 y 200 $\mu\text{mol/l}$.

4.2.3.4.3 ANÁLISIS DE SMF

El análisis de SMF en plasma y tejidos se realizó con la detección de MS/MS tras extracción (en el caso de los tejidos) y la calibración externa con el SMF sintetizado. Se diluyeron 10 μl de plasma o extracto (obtenido como en el caso de HMF) con 30 μl de 2-propanol frío, se mezcló y se centrifugó a 15000 g durante 15 minutos/4°C. El sobrenadante se analizó directamente con el mismo equipo utilizado para el análisis de HMF. Sin embargo, la fuente de electrospray se utilizó esta vez en modo de iones negativos. Se inyectaron 5 μl de muestra y se eluyeron con acetato de amonio/metanol 10 mM (95:5) a un caudal de 0,35 ml/min.

Los parámetros MS fueron los siguientes: fuente de electrospray a 125°C; temperatura de solvatación de 510°C; gas nitrógeno de desolvatación suministrado a un caudal de 850 l/h; gas nitrógeno de cono suministrado a un caudal de 100 l/h y el gas de colisión fue de argón (5×10^{-3} mbar). El SMF se detectó a través de la disociación de SMF del radical ión sulfato (204,9 \rightarrow 96,0) y el ión sulfonato protonado (204,9 \rightarrow 81,0). Para

obtener estos iones, las energías de colisión fueron 18 y 22 eV, respectivamente; el tiempo de permanencia se ajustó a 100 ms y el voltaje capilar se ajustó a 0,35 kV. Se analizaron muestras de plasma de ratones control y niños adicionadas con HMF a diferentes concentraciones, obteniéndose una recuperación de 96,8% y una regresión de $r^2=0,9917$ en el intervalo entre 0,01 nM y 10 μ M.

4.2.3.5 ANÁLISIS DE N^6 -FFM-dAdo Y N^2 -FFM-dGuo

El análisis de aductos SMF-ADN se realizó con la detección de MS/MS tras digestión del ADN y calibración externa con el N^6 -FFM-dAdo y N^2 -FFM-dGuo sintetizados, utilizando $[^{15}\text{N}_5]N^6$ -FFM-dAdo y $[^{13}\text{C}_{10},^{15}\text{N}_5]N^2$ -FFM-dGuo como patrones internos para calcular la recuperación.

4.2.3.5.1. EXTRACCIÓN/DIGESTIÓN DE ADN

El ADN se extrajo de leucocitos recién obtenidos de ratones/niños tras centrifugación en gradiente Ficoll-Paque. Brevemente, 1 ml de sangre recolectada con EDTA se diluyó en 1 ml de solución salina (kit comercial de GE Healthcare). A continuación, se añadieron 2 ml de Ficoll-Paque (densidad 1,084 g/ml) y la mezcla se centrifugó a 400 g durante 40 min/20°C. La capa de plasma superior se usó para análisis de HMF, SMF y HMFA mientras que la capa de leucocitos se transfirió a un tubo de centrifuga estéril usando una pipeta estéril.

El aislamiento del ADN se realizó de la siguiente manera: se añadieron 3 ml de solución salina y se centrifugaron a 400 g durante 10 min/20°C. Tras retirar el sobrenadante, el sedimento de leucocitos se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (kit de extracción de ADN de Roche), se agitó en vórtex, se mezcló con la solución de precipitación de proteínas y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min/20°C. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se añadió 1 ml de etanol absoluto. Tras mezclar suavemente, el tubo se centrifugó a 875 g durante 10 min/20°C. Se eliminó el etanol absoluto y se añadió 1 ml de etanol frío (70%), mezclando suavemente las hebras de ADN, que se precipitaron tras una centrifugación adecuada a 875 g durante 10 min/20°C. Después de la eliminación del sobrenadante, el ADN se redisolvió en 1 ml de tampón Tris-EDTA (pH=8,0). La concentración de ADN se determinó

a partir de la absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

La digestión-purificación de ADN se realizó de la siguiente manera: se añadieron 50 µg de ADN con 190 fmol de [¹⁵N₅]N⁶-FFM-dAdo, 530 fmol [¹³C₁₀,¹⁵N₅]N²-FFM-dGuo y se desecó a presión reducida con un Speed-Vac. El residuo se redisolvió con CaCl₂ en agua (280 µl, 50 mM) y succinato sódico (80 µl, 100 mM a pH 6,0). A continuación, se añadieron 120 µl de fosfodiesterasa de bazo de ternera (2,2 mU/µl) y nucleasa microcócica (110 mU/µl), siendo la muestra digerida a 37°C durante 8 h. Posteriormente se añadieron 192 µl de Tris (0,5 M, pH=11) y 15 µl de fosfatasa alcalina (1 U/µl), después de la incubación durante 14 h. El ADN digerido se diluyó con 700 µl de agua y se centrifugó a 15.000 g durante 15 min/4°C. Los aductos SMF-ADN fueron concentrados mediante cartuchos de extracción en fase sólida Oasis HLB (60 mg, Waters) tal y como describe Monien et al. (2012). En primer lugar, los cartuchos se acondicionaron con 3 ml de metanol y 3 ml de agua. A continuación, el ADN digerido se cargó y se lavó con 3 ml de agua/metanol (95:5). Los aductos de ADN se eluyeron con 3 ml de metanol. Después de la evaporación de metanol bajo presión reducida (Speed-Vac), el residuo se redisolvió con 20 µl de agua/metanol (25:75) y finalmente se centrifugó a 15.000 g durante 15 min/4°C.

4.2.3.5.2. ANÁLISIS MS/MS

Tras la digestión y purificación del ADN, el extracto que contiene aductos SMF-ADN se analizó directamente con el mismo equipo utilizado para el análisis de HMF y SMF. Esta vez la columna analítica era una columna HSS T3 (1,8 µm, 2,1 mm x 100 mm, Waters). Los disolventes utilizados fueron agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) acidificado con ácidos acético y fórmico (0,25% de cada uno). Se inyectaron 10 µl de extracto, con una fase móvil inicial compuesta de 98% de disolvente A suministrado a 0,35 ml/min. Los aductos se separaron después con un gradiente de 10 minutos hasta un 85% de disolvente A.

Los parámetros MS fueron los siguientes: fuente de electrospray a 110°C; temperatura de desolvatación de 450°C; gas nitrógeno de desolvatación suministrado a un caudal de 850 l/h; gas nitrógeno de cono suministrado a un caudal de 50 l/h y el gas

de colisión fue el argón (5×10^{-3} mbar). La detección de los aductos de ADN-SMF se realizó con una fuente de electrospray que funcionaba en modo positivo. Se utilizó la pérdida neutra del anillo de furanosa para la cuantificación (360,1→244,1 para N^6 -FFM-dAdo, 376,1→260,1 para N^2 -FFM-dGuo) y se utilizó la fragmentación en el catión 5-metilfurfural como ion de calificación ($m/z=109,0$). Para obtener estos iones, en el caso de N^6 -FFM-dAdo las energías de colisión fueron 15 y 33 eV, respectivamente; el tiempo de permanencia se ajustó a 100 ms y el voltaje capilar se fijó a 2,0 kV. En el caso de N^2 -FFM-dGuo, las energías de colisión fueron 10 y 35 eV, respectivamente. La cuantificación se realizó mediante dilución isotópica utilizando como cuantificación la pérdida neutra del resto 2-desoxirribosilo (365,1→249,0 para $[^{15}N_5]N^6$ -FFM-dAdo; 391,1→270,1 para $[^{13}C_{10},^{15}N_5]N^2$ -FFM-dGuo) y la disociación del catión 5-metilfurfural como ion de calificación (365,1→109,0 para $[^{15}N_5]N^6$ -FFM-dAdo; 391,1→109,0 para $[^{13}C_{10},^{15}N_5]N^2$ -FFM-dGuo).

4.2.3.6 ANÁLISIS DE IMÁGENES MEDIANTE MALDI ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-MSI)

4.2.3.6.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se utilizaron soluciones de HMF y SMF en MeOH:H₂O (10:90) a una concentración de 0,1 mg/ml para determinar las propiedades de ionización en MALDI. Para ello se depositó una gota de cada compuesto sobre una placa MALDI y se dejaron secar en una campana de extracción. Tras el secado se depositó 1 μ l de una solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma-Aldrich) a una concentración de 3,5 mg/ml en acetonitrilo al 50% (AcN)/0,1% ácido trifluoroacético 0,1% (TFA). La solución matriz de CHCA se dejó secar en campana de extracción y el proceso se repitió 9 veces más (depósito total de matriz de 10 μ l) Las muestras de hígado y riñón de los ratones se cortaron a un espesor de 10 μ m usando un criostato a -20°C (Leica CM1950) y se recogieron en portaobjetos (25x75x1 mm Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific). La solución de matriz CHCA a una concentración de 7,5 mg/ml (en AcN al 50%/TFA al 0,1%) se pulverizó luego 10 veces sobre la superficie del tejido usando un aerógrafo (Aztek A470, Testor Corp.).

4.2.3.6.2 ANÁLISIS DE IMÁGENES POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La adquisición mediante MALDI-MS se realizó en un espectrómetro de masas MALDI LTQ Orbitrap XL de alta resolución (Thermo Fisher Scientific) usando un método que empleaba cinco disparos láser a 15 μJ en modo full scan. El control automático de ganancia fue desactivado. La superficie del tejido se muestreó en modo meandro a 100 - 150 μm de distancia entre cada posición. Los análisis full scan se realizaron en un rango de masas de m/z 50 a 500 en el Orbitrap a una resolución de 60.000 (en m/z 400) en polaridad positiva para HMF y en polaridad negativa para análisis de SMF. Los espectros de masas en tándem se recogieron en la trampa de iones lineales utilizando un rango de aislamiento de 2 Da y una energía de colisión del 40% normalizada con 0,25 Q en el rango de masa de 50-300 Da.

Tras la adquisición de datos, los archivos en bruto se abrieron utilizando el software ImageQuest™ (Thermo Fisher Scientific) y se extrajeron las masas precursoras de HMF (m/z 126,055) y SMF (m/z 204,980) así como las masas de sus fragmentos con una tolerancia de masas de 0,001 y 0,1 amu, respectivamente, mostrando su localización dentro de las secciones de tejido. Se tomaron capturas de pantalla de la distribución de iones precursores y sus fragmentos normalizados sobre el TIC.

4.3 ESTADÍSTICA

Todos los análisis se realizaron por triplicado. La normalidad de los datos obtenidos se analizó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lillieforts. Se determinaron los valores medios de todos los datos, así como sus desviaciones estándar. La significación estadística entre grupos (para ensayos animales y humanos) se evaluó mediante la t-Student, seguida del test de Duncan para comparar las medias que mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). La relación entre distintas variables se realizó mediante la correlación de Pearson a un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (2009).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. POLIFENOLES

5.1.1. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5.1.1.1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS

Para la determinación de la cantidad de compuestos fenólicos en los alimentos se elaboró una base de datos a partir de la base Phenol Explorer 3.6 (<http://phenol-explorer.eu>), la cual contiene información sobre más de 500 tipos de polifenoles de 462 alimentos (Rothwell et al., 2013). Para nuestro estudio se preparó una base de datos en Excel, a partir de los datos recogidos en Phenol-Explorer, con los alimentos más consumidos a nivel nacional, obteniendo una tabla que podemos encontrar en el Anexo IV.

- **Determinación de compuestos fenólicos en zumos cítricos**

Los zumos de frutas son una gran fuente de compuestos antioxidantes en la dieta debido a su alta concentración de ácido ascórbico, carotenoides y/o polifenoles (Stella et al., 2011). Basándonos en el alto consumo de zumos cítricos en España, se decidió realizar un ensayo para determinar la concentración de compuestos fenólicos presentes en los zumos de cítricos (naranja, mandarina, pomelo y limón), ya que apenas existían referencias sobre compuestos fenólicos en dicho tipo de zumos. En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de polifenoles en zumos cítricos comerciales y recién exprimidos, ya que los resultados de capacidad antioxidante no formaban parte, en un principio, de la presente tesis doctoral. Los polifenoles totales oscilaron en zumos comerciales entre 108 a 587 mg de ácido gálico/l para las muestras J2 y S1 (zumos de naranja), respectivamente, y aumentaron de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de la siguiente forma: pomelo = limón \leq naranja < mandarina. Los valores obtenidos para los zumos de mandarina inferiores a los reportados por Álvarez et al. (2012), pero los encontrados para los zumos de naranja están en línea con los indicados anteriormente por otros autores (Mullen et al., 2007). Los valores del pomelo fueron similares a los encontrados por Igual et al. (2010) y los de zumos de limón inferiores a los descritos por Khosa et al. (2011).

Tabla 5. Contenido de polifenoles (mg ácido gálico/l) de zumos cítricos comerciales¹.

Zumo	Código	Polifenoles
Pomelo	C12	128
	CO6	172
	G4	235
	H8	274
	T2	237
Media		209 ± 58.3^a
Limón	CO7	228
	D6	324
Media		276 ± 67.9^{ac}
Mandarina	C5	360
	C11	562
	D4	389
	D5	435
Media		437 ± 89.2^b
Naranja	C1	213
	C2	360
	C13	193
	C14	500
	C22	329
	D1	412
	D2	402
	D3	365
	G3	486
	H3	231
	H13	450
	J2	108
	J5	465
	J9	283
	K6	431
	M4	379
	P1	327
	P3	443
	S1	587
T1	205	
T4	495	
Z1	443	
Z2	453	
Media		372 ± 121^c

¹ Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

Tabla 6. Contenido de polifenoles (mg ácido gálico/l) de zumos cítricos recién exprimidos¹.

Zumo	Polifenoles
Pomelo	409 ± 62 ^a
Limón	314 ± 53 ^b
Mandarina	203 ± 32 ^c
Naranja	224 ± 39 ^c

¹ Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

En cuanto a la cantidad de fenoles totales en zumos recién exprimidos, el zumo de pomelo natural fue el que mostró más polifenoles y, sin embargo, los zumos de mandarina y naranja fueron los que presentaron menos polifenoles (P<0,05), seguidos del zumo de limón. Comparados con los zumos comerciales, los zumos naturales, de naranja y mandarina, tuvieron un contenido inferior que el de los comerciales (P<0,05), mientras que el contenido de polifenoles del zumo de pomelo natural fue superior al de las muestras comerciales. En el caso de los zumos de naranja y mandarina, la menor cantidad de fenoles puede explicarse teniendo en cuenta que sólo se utilizaron dos piezas de fruta para preparar el zumo casero. Además, se encontró una mayor variabilidad en zumos comerciales. Finalmente, el grado de madurez (generalmente bajo, en las frutas utilizadas para elaborar zumos comerciales) también podría jugar un papel importante en el contenido de polifenoles.

5.1.1.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ORINA

En la actualidad, el análisis de la excreción de compuestos fenólicos totales se realiza siguiendo el método de Folin-Ciocalteu previa purificación de la orina mediante extracción en fase sólida, de forma que se eliminen los compuestos que interfieren en la determinación. En nuestro trabajo decidimos utilizar una nueva técnica, Fast Blue BB, que tuviera un menor coste económico y que se pudiera realizar de forma más rápida.

- **Idoneidad de la extracción en fase sólida**

Se utilizó el método FBBB para determinar la cantidad de polifenoles excretados en orina ya que se ha demostrado en alimentos como una mejor opción analítica para determinar el contenido de fenoles (Medina, 2011; Lester et al., 2012; Palombini et al., 2016). De esta forma, la etapa de purificación mediante extracción en fase sólida (etapa con un coste elevado en tiempo y dinero) necesaria para el método Folin-Ciocalteu (F-

C) se podría evitar. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos con los métodos FBBB y F-C para una orina control y la misma muestra, adicionada de una cantidad conocida de ácido gálico 10 mM. Como se puede observar, mediante el método Folin-Ciocalteu la absorbancia de la muestra sin purificar era mucho mayor que la muestra analizada con el método FBBB. Así mismo, el análisis de la muestra de orina adicionada de ácido gálico 10 mM dió lugar a un incremento estadísticamente significativo ($P < 0,05$) de la absorbancia en el caso del método FBBB y de 0,3 unidades para el método F-C. Cuando se realizó la purificación mediante extracción en fase sólida de la orina control, la absorbancia obtenida fue estadísticamente similar ($P > 0,05$) a la obtenida sin dicha purificación para el método FBBB. Sin embargo, en el método F-C la absorbancia descendió hasta 0,329 ($P < 0,05$), demostrando de forma clara la presencia de compuestos interferentes en la orina, tal y como comentaron Roura et al. (2006). Cuando la orina se adicionó de ácido gálico, ambos métodos dieron lugar a absorbancias similares. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) con el método FBBB tanto para la muestra purificada como sin purificar. Por tanto, queda claro que en el caso del método F-C es necesaria una etapa previa de purificación mediante extracción en fase sólida para eliminar compuestos interferentes, mientras que el método FBBB permite la determinación de polifenoles y sus metabolitos en orina sin interacción con otros compuestos.

Tabla 7. Comparación efecto Folin-Ciocalteu vs. FBBB.

Muestra	Purificación SPE	Absorbancia Folin-Ciocalteu	Absorbancia FBBB
Blanco	No	0.006 ± 0.002 ^a	0.002 ± 0.001 ^a
Orina	No	1.122 ± 0.031 ^b	0.354 ± 0.008 ^b
Orina + Gálico 10 mM	No	1.435 ± 0.042 ^c	0.466 ± 0.010 ^c
Blanco	Si	0.008 ± 0.001 ^a	0.001 ± 0.001 ^a
Orina	Si	0.349 ± 0.009 ^d	0.369 ± 0.009 ^b
Orina + Gálico 10 mM	Si	0.456 ± 0.001 ^e	0.477 ± 0.011 ^c

- **Parámetros analíticos del método**

Tras observar que el método FBBB, comparado con el método Folin-Ciocalteu, era más útil para determinar la excreción de compuestos fenólicos totales, en nuestra intervención nutricional, se procedió a validar analíticamente la bondad del método.

- **Linealidad**

Se utilizó una batería de soluciones de ácido gálico con concentraciones que oscilaron entre los 0,1 y los 50 mg/l preparadas en agua destilada. El método FBBB mostró una linealidad excelente ($r^2=0,9997$) en el rango de concentración estudiado. Cuando las soluciones de patrón se adicionaron a la orina control, el rango lineal alcanzó los 40 mg/l de ácido gálico adicionado ($r^2=0,9994$) ya que, a partir de dicha concentración, el rango lineal desapareció por un exceso de absorbancia.

- **Recuperación**

Por recuperación de analitos en un ensayo se entiende la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero. Para que un método sea de utilidad no es necesario que la recuperación del analito sea del 100%, pero el grado de recuperación debe ser estable (con cualquier tipo de concentración analizada), precisa y reproducible. La recuperación se ensayó analizando la muestra de orina control adicionada de concentraciones crecientes de ácido gálico (Tabla 8). La recuperación media de polifenoles fue de $96,4 \pm 3,6\%$, en el rango de 10-55 μg ácido gálico/ml, ya que las concentraciones mayores de 55 μg ácido gálico/ml dieron lugar a recuperaciones menores ($\approx 76\%$) ya que se alcanzó el rango no-lineal del método.

Tabla 8. Recuperación del método FBBB en orina.

Muestra	Agua (μl)	Orina (μl)	Gálico (μl)	Gálico (μg)	Abs	Conc. Teórica (μg/ml)	Conc. Real (μg/ml)	Diferencia	%
Orina sola	975	25	0	0	0,202	13,3	13,3	0,0	99,9
Orina + gálico	925	25	50	5	0,242	18,3	16,0	2,3	87,2
Orina + gálico	915	25	60	6	0,284	19,3	18,8	0,5	97,2
Orina + gálico	905	25	70	7	0,298	20,3	19,7	0,6	97,0
Orina + gálico	895	25	80	8	0,335	21,3	22,2	-0,9	104,0
Orina + gálico	885	25	90	9	0,360	22,3	23,8	-1,5	106,8
Orina + gálico	875	25	100	10	0,358	23,3	23,7	-0,4	101,7
Orina + gálico	775	25	200	20	0,490	33,3	32,5	0,8	97,6
Orina + gálico	675	25	300	30	0,658	43,3	43,7	-0,4	100,9
Orina + gálico	575	25	400	40	0,736	53,3	48,9	4,4	91,7
Orina + gálico	475	25	500	50	0,728	63,3	48,4	14,9	76,4
								Media	96,4%
								S.D.	3,6

- **Precisión**

La precisión del método analítico describe la cercanía (grado de dispersión o repetibilidad) entre una serie de medidas obtenidas de múltiples repeticiones de una muestra bajo las condiciones de análisis establecidas (Milena G, 2005). Así, la repetibilidad refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto. El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media (Castillo-Aguilar, 1996). Para su evaluación, se prepararon 4 muestras de orina de diferentes niños, por triplicado, y se determinaron cada una 7 veces mediante el método FBBB. Para el ensayo de precisión intra-día se realizaron diversas medidas de una misma muestra (Tabla 9) mientras que la precisión inter-día se realizó analizando las muestras en dos días distintos (Tabla 10). Para la precisión intra-día se obtuvo un coeficiente de variación de 6,13% correspondiente a 4 muestras de orina diferentes, lo cual indica reproducibilidad bajo las condiciones establecidas de análisis. En el caso de la precisión inter-día, el coeficiente de variación fue de 1,86% para 2 muestras de orina distintas analizadas en 2 días no consecutivos. Estos resultados son similares a los encontrados por Roura et al. (2006) para el método F-C con purificación previa mediante extracción en fase sólida.

Tabla 9. Precisión intra-día.

Muestra	n	Promedio	Varianza	Precisión (%)	Mínimo	Máximo
1	7	0,184	0,0084	4,58	0,174	0,200
2	7	0,213	0,0145	6,83	0,203	0,230
3	7	0,241	0,0206	8,57	0,224	0,264
4	7	0,224	0,0101	4,53	0,213	0,233
Media				6,13 %		

Tabla 10. Precisión inter-día.

Muestra	Día	N	Promedio	Varianza	Precisión (%)	Mínimo	Máximo
1	1	7	0,213	0,0068	3,19	0,208	0,221
	2	7	0,217	0,0037	1,74	0,215	0,222
2	1	7	0,170	0,0026	1,56	0,168	0,173
	2	7	0,165	0,0015	0,93	0,164	0,167
Media					1,86 %		

5.1.2. DETERMINACIÓN DE INGESTA DE POLIFENOLES EN ESCOLARES

Los alimentos de origen vegetal forman parte de la base de la Dieta Mediterránea, siendo los polifenoles parte de los compuestos bioactivos presentes en dichos alimentos. En la actualidad se reconocen los beneficios en la salud que reporta un consumo adecuado de alimentos ricos en polifenoles, habiéndose estudiado la ingesta diaria y excreción urinaria en población adulta. Sin embargo, no se conoce la ingesta que existe de dichos compuestos en la población infantil, donde el consumo de alimentos vegetales puede ser, en algunos casos, muy baja.

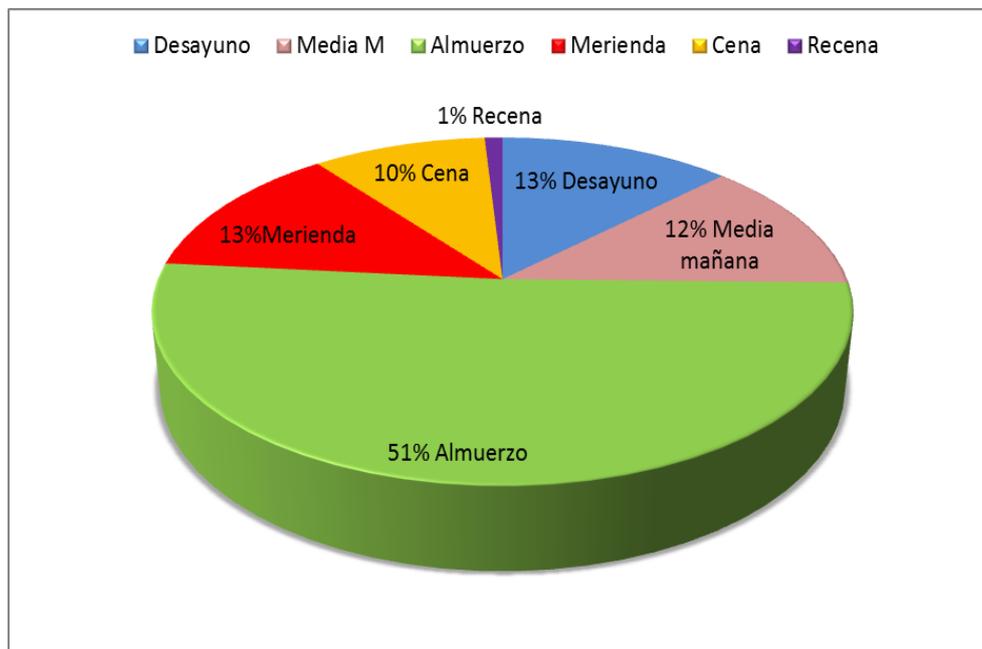
- ***Ingesta de compuestos fenólicos totales***

Tras analizar los cuestionarios, tanto el de frecuencia de consumo como el de registro de 24h de los niños objeto de estudio, se obtuvieron los siguientes resultados. El análisis de los datos obtenidos en el cuestionario frecuencia-consumo puso de manifiesto que la media de la ingesta de polifenoles diaria fue de 2079 ± 654 mg. Estudios actuales estiman la ingesta diaria entre 2590 y 3016 mg polifenoles/persona/día para población adulta, incluyendo polifenoles extraíbles e hidrolizables (Saura-Calixto et al., 2006), datos en consonancia con los encontrados en nuestro estudio. Con el registro 24h, se determinó una ingesta media de compuestos fenólicos de 1155 ± 774.5 mg. Según el estudio de Tresserra et al. (2013) la ingesta media de polifenoles totales diarios en población adulta fue de 820 ± 323 mg, resultados muy similares a los nuestros. Así mismo habría que resaltar que en dicho trabajo se utilizó como base de datos de referencia Phenol Explorer.

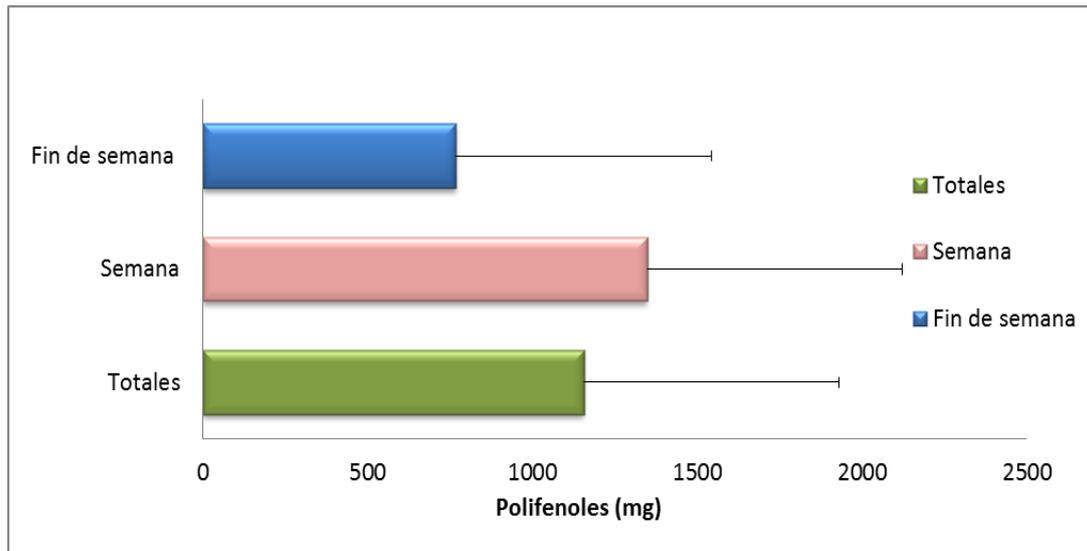
- **Ingesta de compuestos fenólicos semanal y por comidas**

Para este punto se utilizaron los datos obtenidos del recordatorio 24h. Así, si se divide el consumo diario de polifenoles por tomas, se puede observar (Figura 23) cómo el almuerzo es la toma más importante en lo que a ingesta de compuestos polifenoles se refiere, siendo la media de 607 ± 328 mg. La toma de media mañana fue la que más fluctuó, puesto que proporcionalmente es la que más desviación estándar presentó, siendo la ingesta de 266 ± 512 mg.

Figura 23. Proporción de la ingesta total de polifenoles por toma.



Si se compara la ingesta de polifenoles a lo largo de la semana, se observa (Figura 24) que la ingesta que se realiza entre semana (1348 ± 1666 mg) es prácticamente el doble que la ingesta del fin de semana (768 ± 1105 mg). Tras analizar los registros de 24h se observó cómo, durante el fin de semana, se incrementa el consumo de fritos y alimentos precocinados, chocolate y otros alimentos, a la vez de que se reduce el consumo de alimentos, como las legumbres y frutas (Figura 25).

Figura 24. Ingesta semanal de polifenoles.

En cuanto al reparto por tomas, y como se ha mencionado anteriormente, el almuerzo es la principal fuente de compuestos fenólicos en la dieta, tanto entre semana como durante el fin de semana. Sin embargo, mientras que entre semana el almuerzo es la principal fuente de polifenoles (Figura 25), durante el fin de semana (Figura 26) la importancia del almuerzo disminuye y se incrementa la del desayuno y la de media mañana, las cuales duplican su aporte respecto al de los días entre semana.

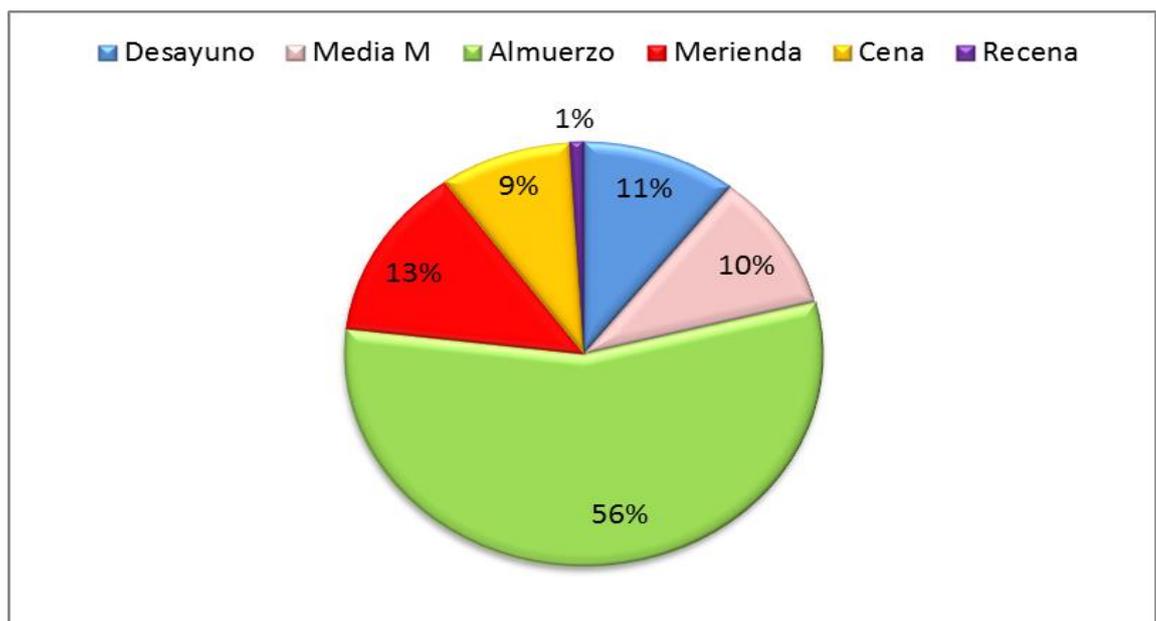
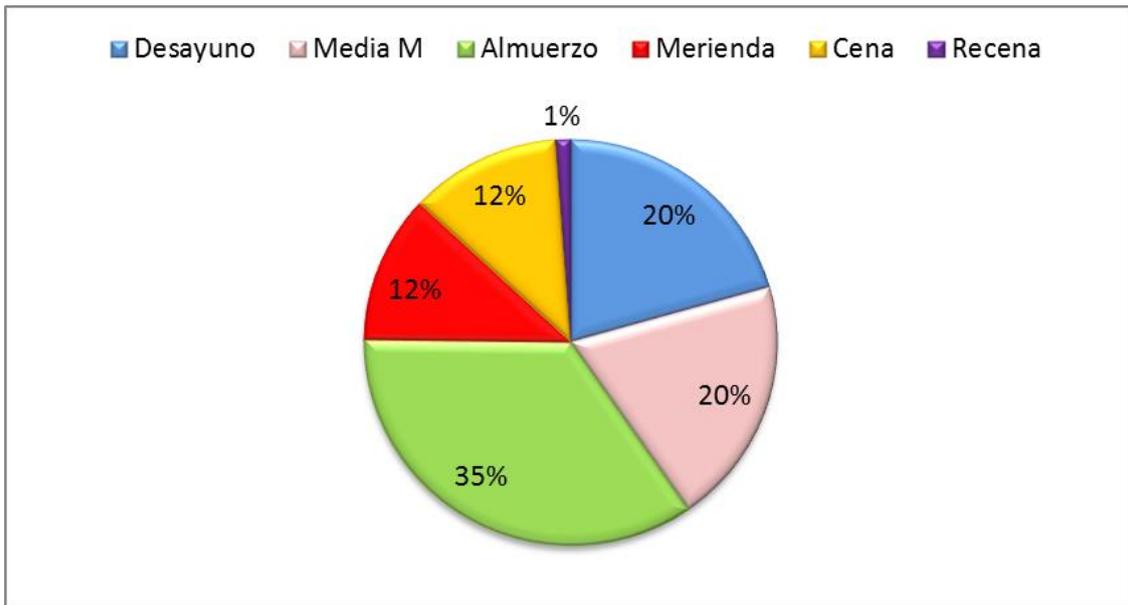
Figura 25. Proporción de la ingesta semanal de polifenoles por toma.

Figura 26. Proporción de la ingesta de fin de semana de polifenoles por toma.

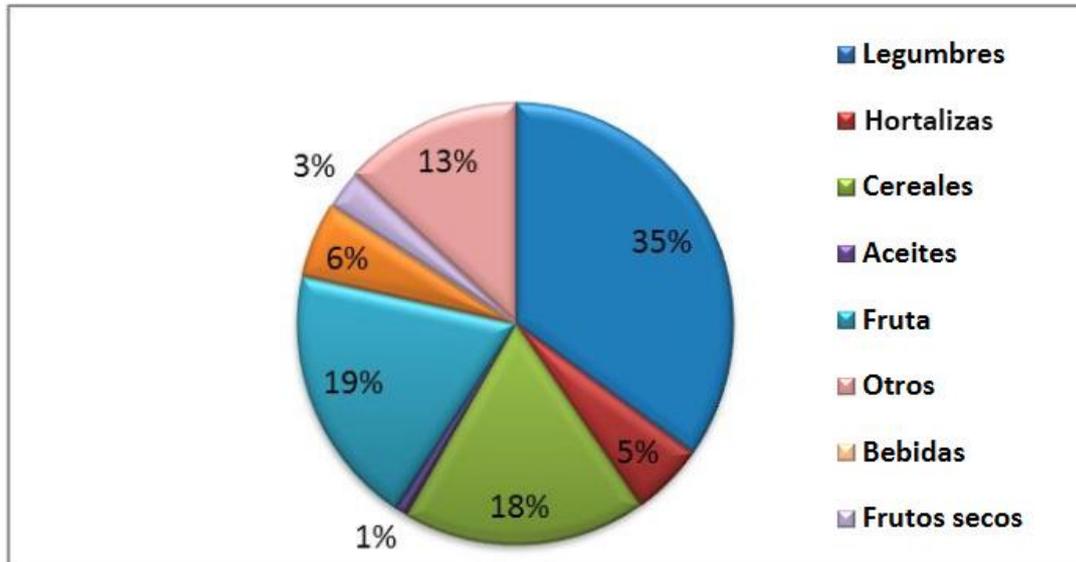
- **Ingesta de compuestos fenólicos por grupo de alimentos**

En función de si se utiliza el registro de frecuencia de consumo o el de 24h para determinar qué grupo de alimentos aporta una mayor concentración de compuestos fenólicos, podemos obtener algunas pequeñas diferencias y que pueden deberse a que en el cuestionario frecuencia de consumo se determinan los alimentos consumidos en todo un año y en el recordatorio 24h solo se determinan los alimentos consumidos en 3 días y por tanto dependerá de la dieta que llevaran esos días.

En cuanto al recordatorio de 24h, la ingesta media de polifenoles por grupo de alimentos (Figura 27) muestra que las legumbres son el principal grupo de alimentos que aporta una elevada cantidad de polifenoles. A pesar de que su consumo es bastante escaso, es el grupo de alimentos que presenta en su composición las cantidades más elevadas de compuestos fenólicos. Frutas y cereales son los otros dos grandes grupos cuyo aporte de compuestos fenólicos es importante en la dieta. Según Tresserra et al. (2013), el consumo de aceite de oliva y los frutos secos son el factor diferenciador en el perfil fenólico de la población española en comparación con otros países, aunque como principales fuentes dietéticas también destacan las frutas. En nuestro estudio, el aporte de frutos secos y aceite de oliva es escaso, aunque si lo juntamos con las frutas

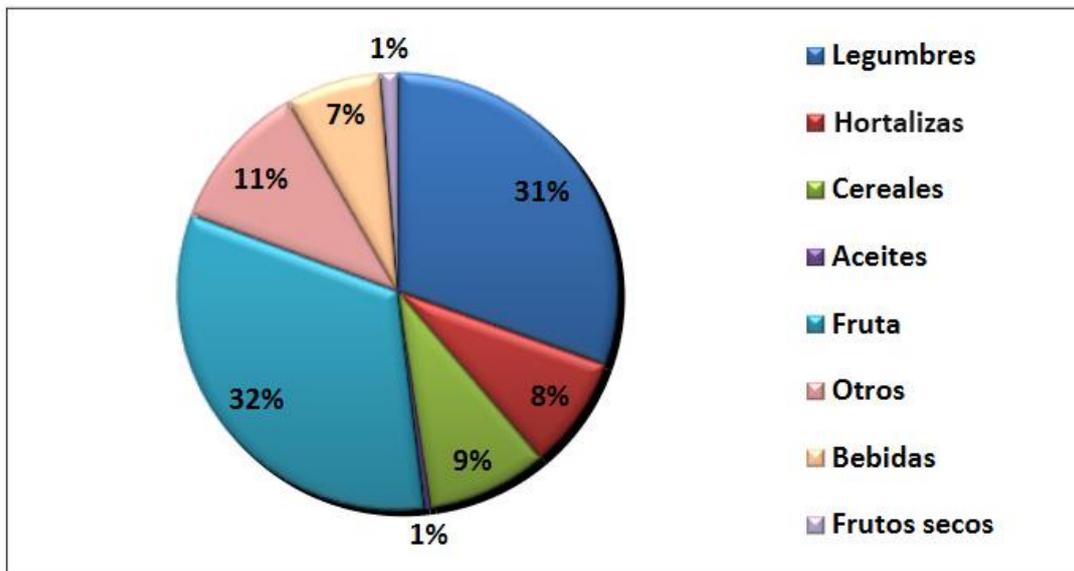
estaríamos hablando de un aporte de un 23% del total de la ingesta de compuestos fenólicos.

Figura 27. Polifenoles por grupo de alimentos a partir del recordatorio de 24h.

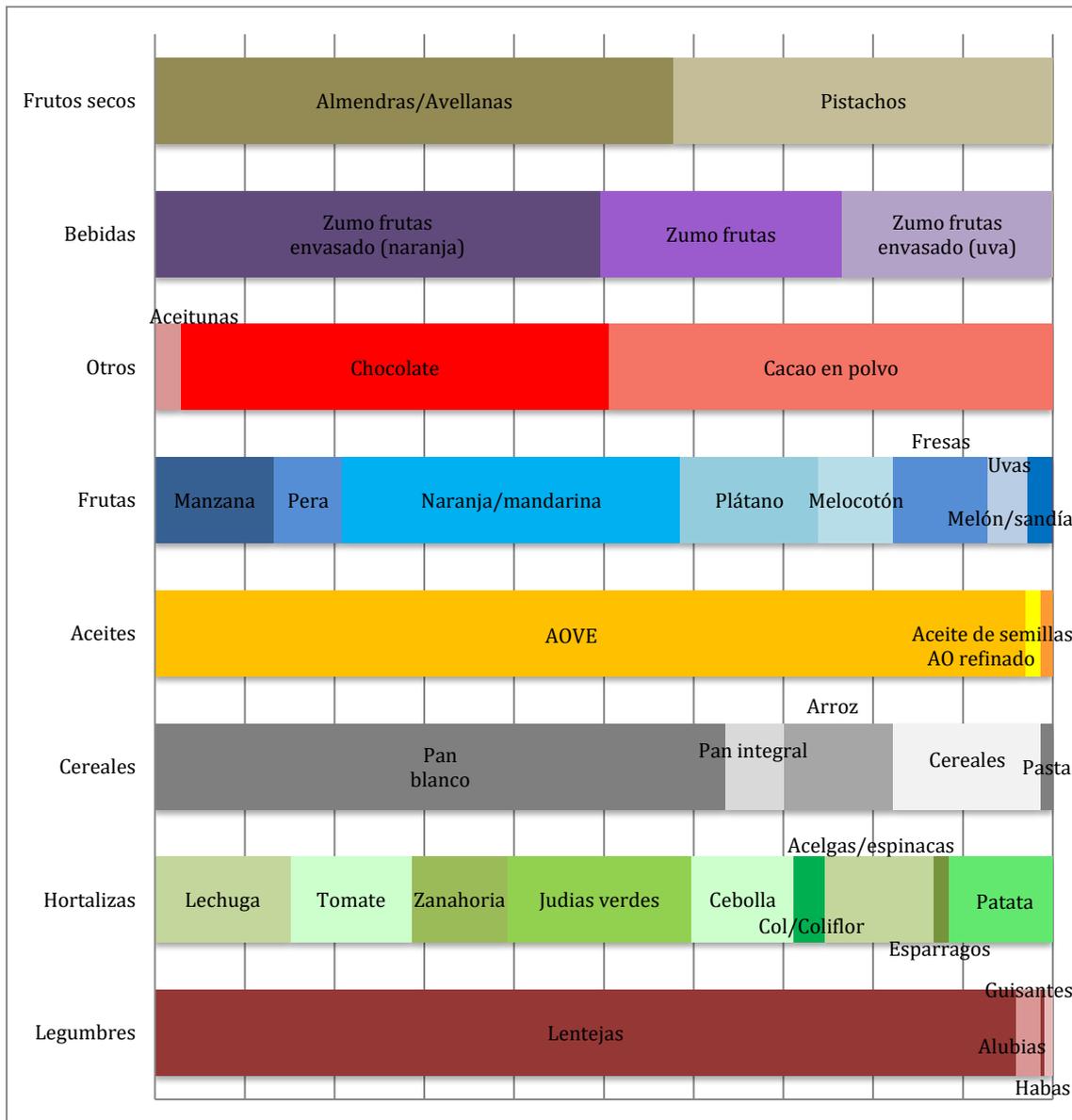


Si se analiza la ingesta de alimentos a partir del cuestionario de frecuencia-consumo, los grupos de alimentos que más polifenoles aportan a la dieta son las legumbres y la fruta, en torno al 31 y 32% del total de la ingesta, respectivamente. El grupo “otros” (11% del total) completa los grupos que suponen la mayor parte de los compuestos fenólicos ingeridos por la dieta (Figura 28). Un estudio actual evaluó la ingesta de compuestos fenólicos proporcionados por el consumo de fruta fresca en la dieta de la población portuguesa (Pinto et al., 2013), siendo esta de unos 784 ± 32 mg, haciendo referencia a la importancia de dicho aporte para una dieta saludable, sobre todo si su consumo es de forma natural. En el presente estudio, la ingesta diaria de este grupo de alimentos supone el 32% (670 ± 51 mg/día). Al igual que lo obtenido con el recordatorio de 24h, el aporte de frutos secos y aceite de oliva es escaso, aunque si lo juntamos con las frutas estaríamos hablando de un aporte de un 38% del total de la ingesta de compuestos fenólicos.

Figura 28. Promedio de polifenoles por grupo de alimentos a partir de la frecuencia de consumo.



De los alimentos que más compuestos fenólicos aportan a la dieta de los escolares cabría destacar aquéllos que se consumen más frecuentemente, como son las lentejas (dentro del grupo de las legumbres). En la figura 29 se describe la aportación de diversos alimentos individuales dentro de cada grupo. En el grupo de los frutos secos, las almendras/avellanas y pistachos tuvieron un aporte similar. Dentro del grupo de las bebidas, el zumo de naranja envasado fue la fuente de mayor aporte, al igual que el cacao en polvo y el chocolate en el grupo “otros”. Por otro lado, el aceite de oliva virgen extra (AOVE) fue claramente el aceite más consumido. Las naranjas y las mandarinas fueron las frutas que más polifenoles aportaron en el grupo de frutas, al igual que el pan blanco dentro del grupo de los cereales y las judías verdes en el grupo de las hortalizas.

Figura 29. Total de polifenoles aportados según alimento y grupo de alimentos.

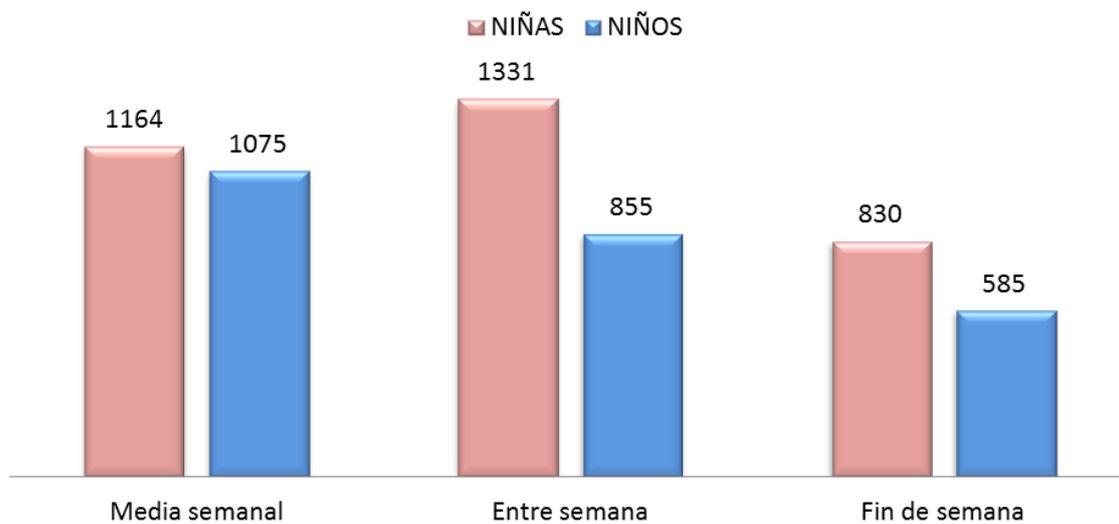
- **Ingesta de compuestos fenólicos diferenciadas por género**

Para determinar la ingesta de compuestos fenólicos según género, aunque se analizaron los datos de ambos cuestionarios, se utilizaron los datos obtenidos a partir del recordatorio de 24h, ya que cuando se analizan los datos en frecuencia de consumo, los resultados obtenidos son muy parecidos.

La ingesta total de polifenoles (Figura 30) de las niñas fue ligeramente superior a la de los niños, siendo el consumo un 6,4% mayor que la media del consumo total. Los niños consumieron un 7% menos de la media, mientras que las niñas ingirieron un 12,5%

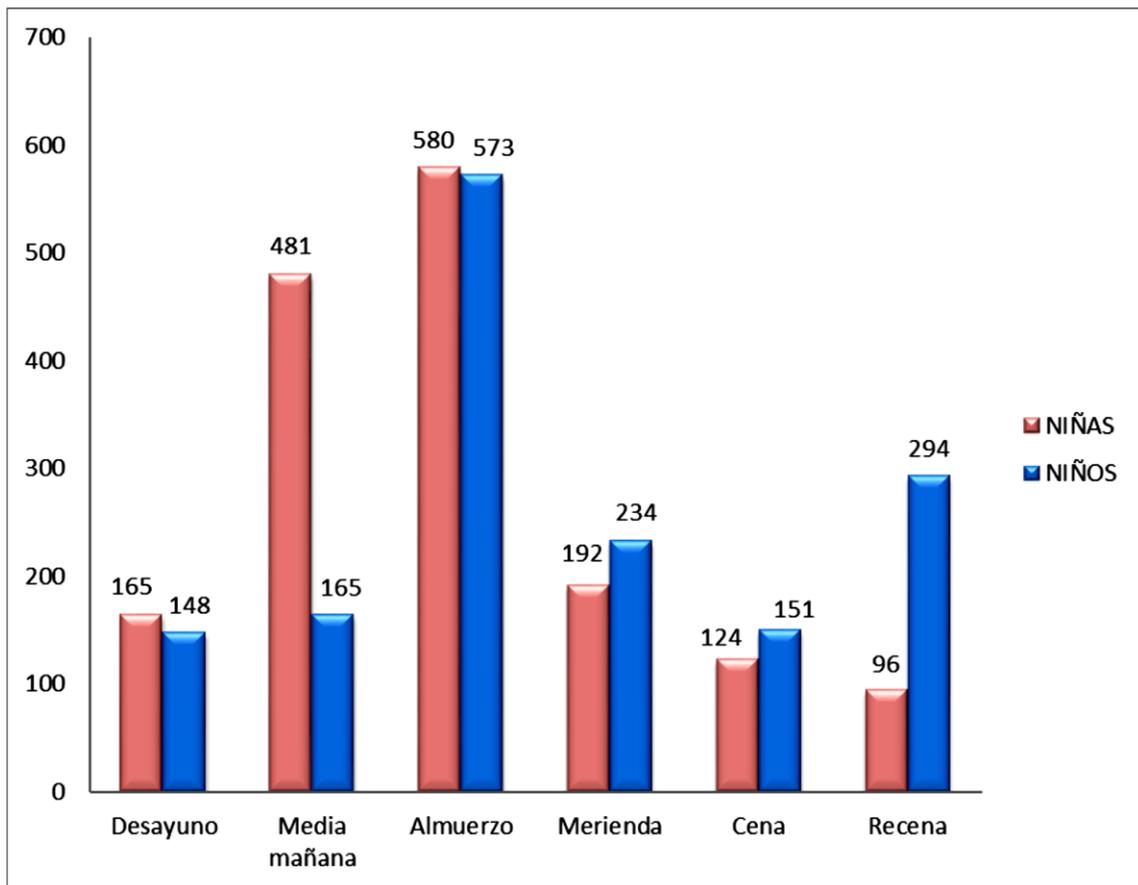
más compuestos fenólicos respecto a los niños. Durante el fin de semana el consumo de polifenoles descendió para ambos sexos, siendo llamativos los datos que demuestran que, el consumo de compuestos fenólicos en niñas, tanto en fin de semana como en días entre semana, es mayor de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$) que el de los niños. Una mayor preocupación acerca de su dieta en el caso de las niñas, por estar en la pre-adolescencia, podría dar lugar a una alimentación más sana a lo largo de toda la semana. Esto explicaría por qué la ingesta media de las niñas es superior a la de los niños.

Figura 30. Ingesta de polifenoles por género.



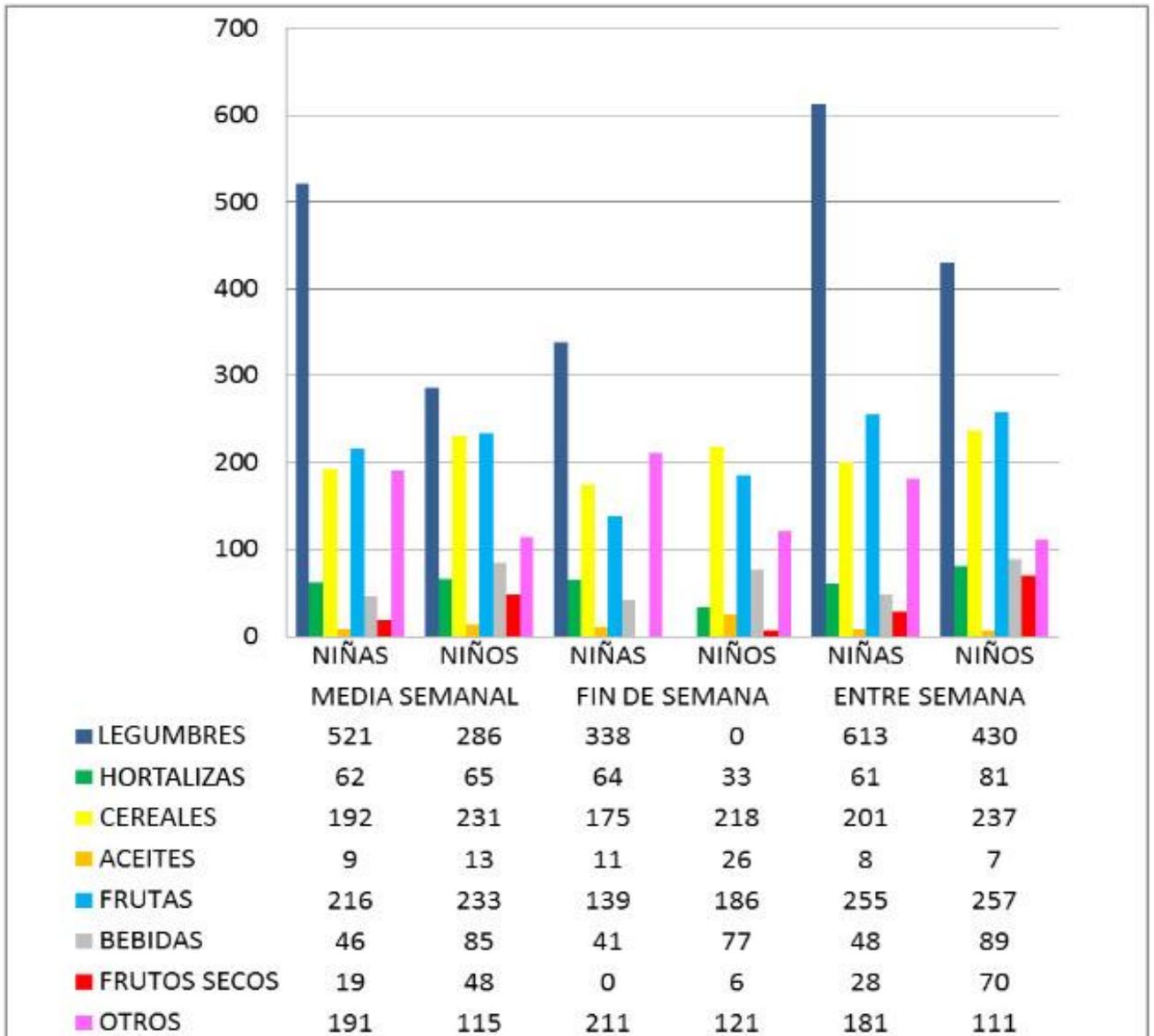
Para evaluar en qué comidas se producen las mayores diferencias en ingesta de compuestos fenólicos a lo largo de la semana, se analizaron los datos por separado en comidas y género (Figura 31). Como se puede observar, es en el tramo de media mañana y en la recena donde se encuentran más diferencias entre ambos sexos. Así, las niñas ingirieron un 65% más de compuesto fenólicos en estas comidas que los niños. Esto es debido a un mayor consumo de chocolate por parte de las niñas que los niños. El otro dato a destacar es que los niños ingieren ligeramente más polifenoles que las niñas en la recena, como consecuencia de un mayor consumo de frutas y batidos de cacao que las niñas en esta toma.

Figura 31. Ingesta de compuestos fenólicos diferenciada por tomas y género a lo largo de la semana.



Las diferencias que se observaron entre el grupo de las niñas y el de niños se deben principalmente al bajo aporte de legumbres y verduras durante el fin de semana (Figura 32). Durante la semana destaca que la principal fuente de alimentos que proporciona un aumento en la ingesta de compuestos fenólicos en las niñas respecto a los niños sigue siendo las legumbres, aunque a excepción de frutos secos y bebidas, en el resto de grupo de alimentos ambos sexos están equiparados a lo que aporte de polifenoles se refiere. Las niñas también tienen un mayor aporte del grupo “otros” principalmente por el consumo de chocolate, el cual es una buena fuente de compuestos fenólicos.

Figura 32. Ingesta por sexo y grupo de alimentos.



- **Actualidad**

En la actualidad no existen unas ingestas diarias de referencia (DRIs) para los compuestos fenólicos. Lo más parecido a unas DRIs que existen hoy en día son las recomendaciones de varios programas como “5 al día”. Este programa promueve el consumo de 5 raciones de frutas y/o verduras al día. Así, una persona que consumiera 5 raciones al día podría tomar 500 mg de polifenoles diarios. El consumo de cacao, té o café podrían fácilmente incrementar esta ingesta hasta los 1000 mg/día (Williamson, 2008). Sin embargo, los alimentos procesados también pueden contener diferentes cantidades y ayudarían a incrementar la ingesta diaria de polifenoles.

5.1.3. EFECTO DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA INGESTA DE POLIFENOLES EN ESCOLARES

El grupo de escolares estudiado se sometió a una intervención nutricional para mejorar su adhesión a la Dieta Mediterránea a través de un programa de educación nutricional donde se enseñaba, tanto a padres como niños, cómo realizar una alimentación más sana y adaptada a dicha Dieta Mediterránea. Los resultados de dicha intervención (Muros et al., 2015) mostraron que la intervención fue efectiva, ya que los niños participantes en el estudio no sólo mejoraron sus hábitos alimentarios, sino que sus parámetros bioquímicos (colesterol total, HDL, LDL triglicéridos) y capacidad antioxidante plasmática mejoraron significativamente. Teniendo en cuenta la presencia elevada de compuestos fenólicos en los alimentos de origen vegetal y la relación descrita en bibliografía entre ingesta de compuestos fenólicos y mejora de la capacidad antioxidante plasmática y diversos parámetros relacionados con la salud cardiovascular (niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos), se procedió a evaluar el efecto de dicha intervención sobre la ingesta de compuestos fenólicos. Así mismo, también se estudió si la excreción de compuestos fenólicos urinaria se correlacionaba con su ingesta y si podía utilizarse como herramienta para seguir los cambios en los hábitos alimentarios de los escolares.

- **Comparación de ingesta de polifenoles pre y post-intervención**

En primer lugar, se analizó la ingesta de polifenoles previo a la intervención nutricional del grupo control y del grupo intervención. Como no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) los grupos tenían una ingesta homogénea de compuestos fenólicos a nivel de pre-test.

La comparación entre la ingesta media de polifenoles totales en el grupo intervención, antes y después de las sesiones de educación nutricional, mostró un incremento estadísticamente significativo ($P = 0,00000002$) en el consumo de compuestos fenólicos, tal y como se muestra en el diagrama de cajas y bigotes (Figura 33). Así, la ingesta de polifenoles totales se incrementó en un 20,5% pasando de 2031 ± 180 a 2448 ± 215 mg ácido gálico/día. Esto se debió al seguimiento de una dieta

de estilo más mediterráneo, incrementando de forma estadísticamente significativa ($P > 0,05$) el consumo diario de frutas, hortalizas y cereales (Tabla 11).

Figura 33. Efecto de la educación nutricional en el grupo intervención.

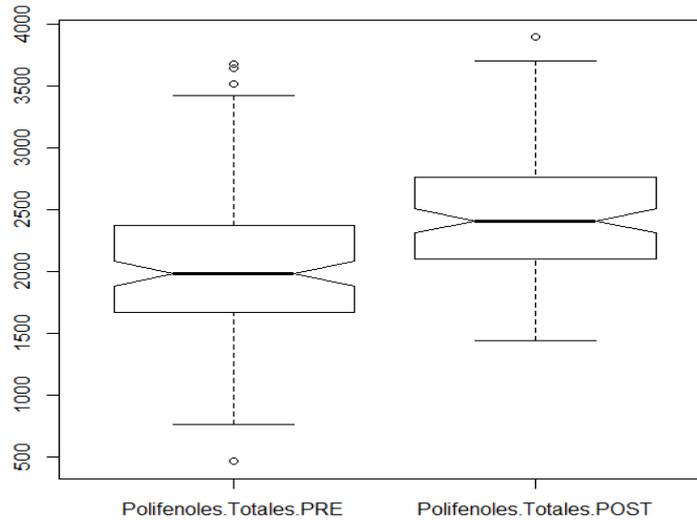


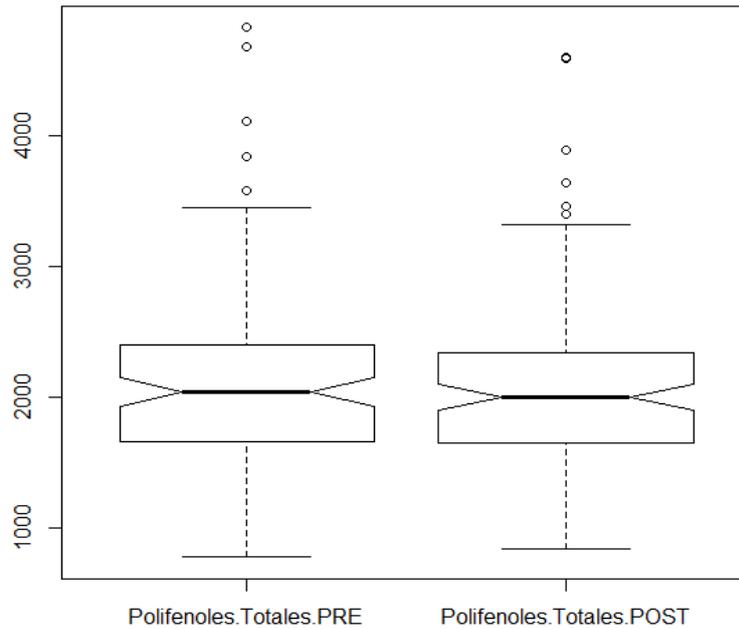
Tabla 11. Evolución de la ingesta de polifenoles en el grupo intervención.

Grupo de alimentos	Ingesta de polifenoles pre-intervención (mg/día)	Ingesta de polifenoles post-intervención (mg/día)
Aceites	13	19
Bebidas	106	59
Cereales	142	304
Frutas	372	523
Frutos secos	142	304
Legumbres	876	853
Otros	332	108
Verduras	142	278

Para poder afirmar que el incremento medio en la ingesta de polifenoles totales se debió al efecto de la intervención y no a otra causa desconocida, se analizó también su evolución temporal en el grupo control. Como se puede observar en la figura 34, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$), lo que indica que las

diferencias pre-test y post-test encontradas en el grupo intervención se debieron a la educación nutricional recibida y no a la evolución temporal.

Figura 34. Evolución temporal sin intervención.



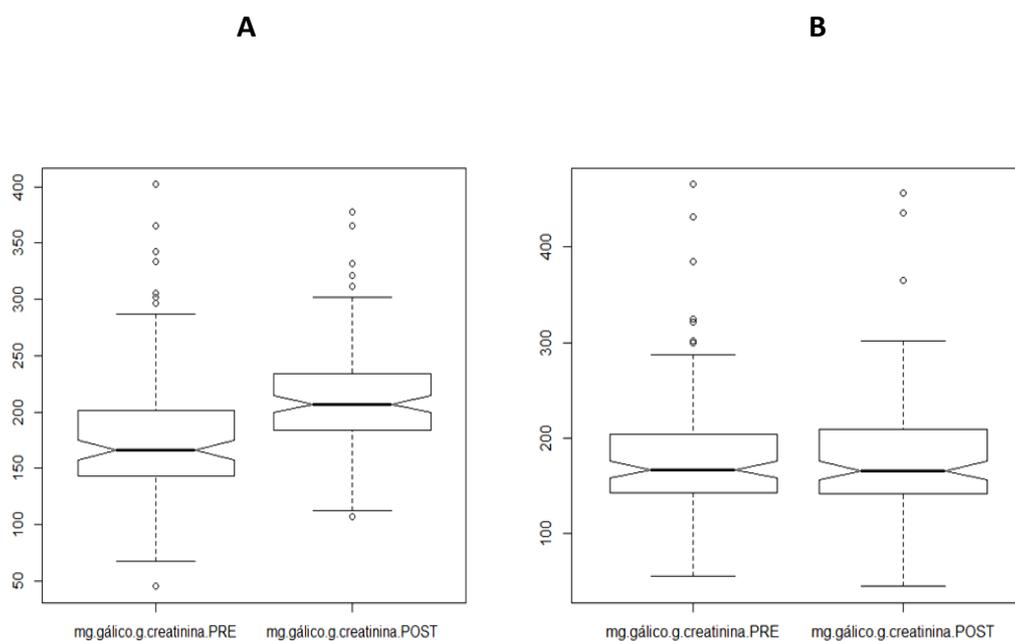
- **Relación entre ingesta y excreción de compuestos fenólicos**

Llegados a este punto, se determinó la excreción de compuestos fenólicos en el grupo control, así como en el grupo intervención, analizando su presencia en orina mediante el método Fast Blue BB puesto a punto previamente (Medina, 2011) y expresando los resultados como mg de ácido gálico/g creatinina según la técnica descrita por Roura et al. (2006). Se compararon los resultados obtenidos tanto en el grupo control como en grupo con intervención, antes y después de recibir educación nutricional. Como se puede apreciar en la figura 35A, en el grupo que recibió educación nutricional se produjo un incremento estadísticamente significativo ($P=0,000000005$), pasando de una excreción media de 180 ± 65 a 215 ± 52 mg ácido gálico/g creatinina. Este rango de excreción de compuestos fenólicos es similar al encontrado por Hussein

et al. (2009) y Zamora-Ros et al. (2011) en poblaciones de niños-adolescentes y ancianos, respectivamente. Destacar que los análisis de excreción de polifenoles en dichos estudios se realizaron mediante el método Folin-Ciocalteu modificado por Roura et al. (2006) para incluir una etapa de purificación mediante extracción en fase sólida, lo que confirma que el método desarrollado por nosotros (Fast Blue BB) es un método válido para realizar dicha determinación. Destacar que Hussein et al. (2009) encontraron un incremento en la excreción de polifenoles urinarios (en una población egipcia de 7-14 años) desde 90 ± 9 mg ácido gálico/g creatinina a 287 ± 64 mg ácido gálico/g creatinina, tras una intervención nutricional durante 7 días que incluía la suplementación dietética con zumo de tomate. El incremento encontrado por dichos autores está dentro del rango encontrado en nuestra intervención nutricional.

Por otro lado, los resultados obtenidos en grupo control (figura 35B) no mostraron cambios estadísticamente significativos ($P > 0,05$), lo que confirma que el incremento en la excreción de compuestos fenólicos en el grupo intervención se debe al efecto de la intervención nutricional y no al mero paso del tiempo.

Figura 35. Efecto de la educación nutricional sobre la excreción de compuestos fenólicos.



Finalmente, para determinar si existe relación entre los datos de ingesta de polifenoles totales (aportados por el cuestionario de frecuencia de consumo) y la excreción de compuestos fenólicos (obtenidos a partir del análisis de la orina) se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson. Como se puede observar, existe una correlación muy alta ($r=0,94$) entre la ingesta de compuestos fenólicos totales y su excreción urinaria pre-intervención (Figura 36) y post-intervención (Figura 37). Esto indica que la determinación de compuestos fenólicos en orina puede ser una herramienta muy útil para asegurar la ingesta de compuestos fenólicos que muestran los cuestionarios de frecuencia de consumo, a la vez que permitiría evaluar el seguimiento de cualquier intervención nutricional (régimen hipocalórico para pérdida de peso o mejora general del patrón dietético) que suponga un consumo elevado de alimentos de origen vegetal.

Figura 36. Correlación entre ingesta y excreción de polifenoles pre-intervención.

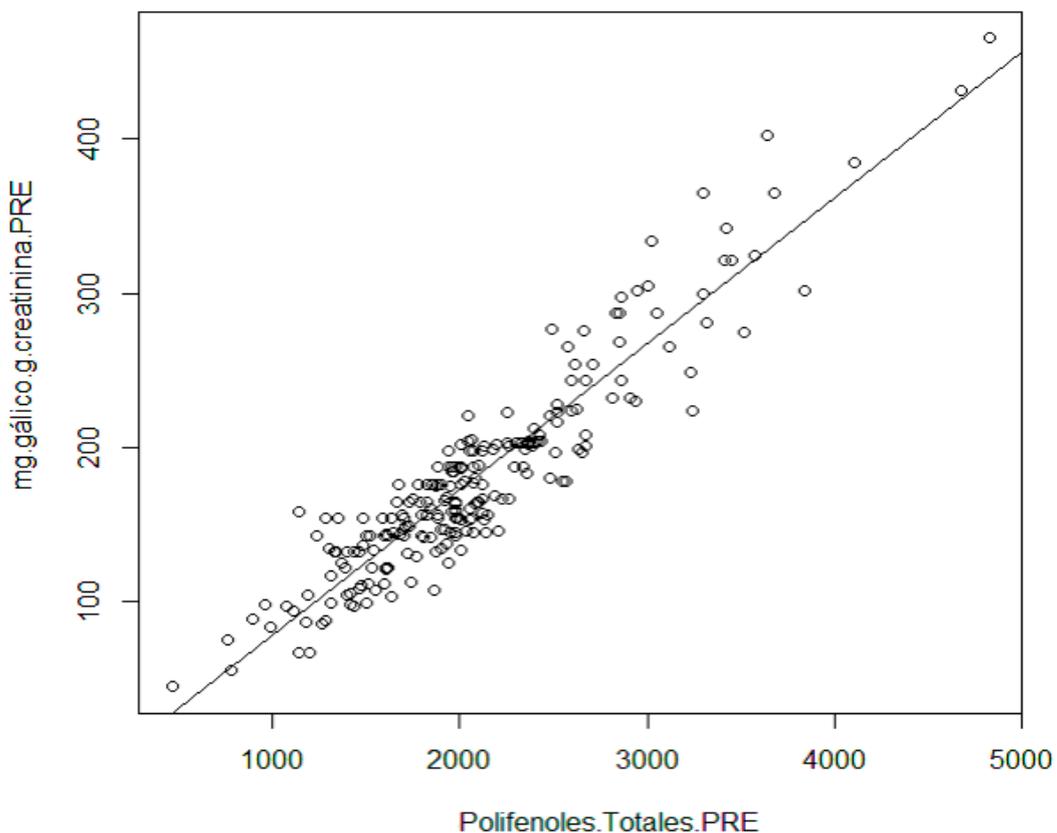
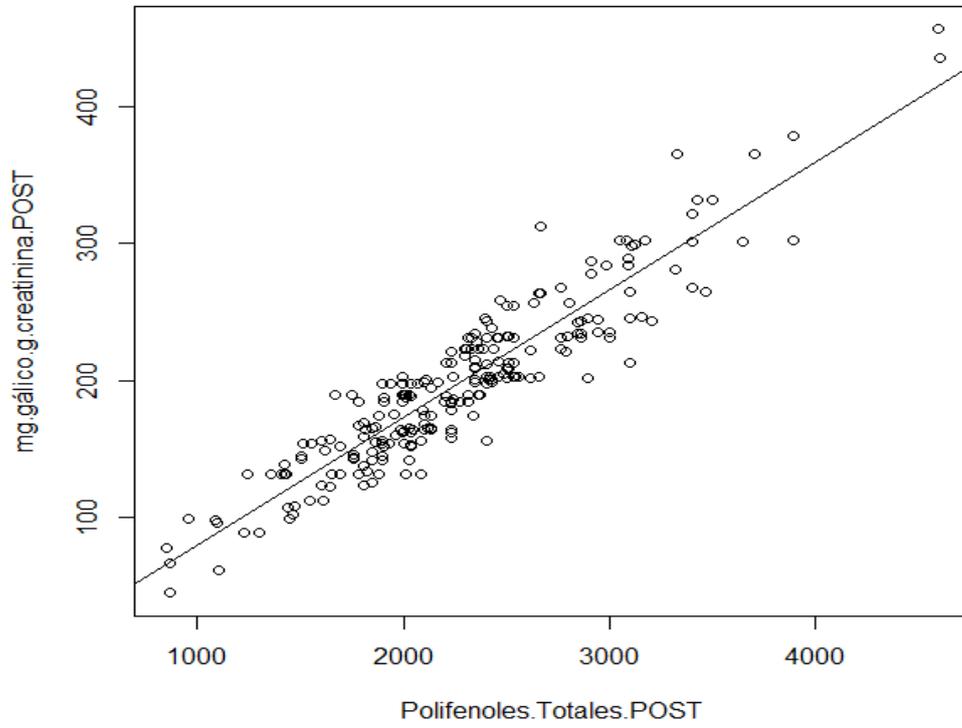


Figura 37. Correlación entre ingesta y excreción de polifenoles post-intervención.



5.2. HIDROXIMETILFURFURAL

5.2.1. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5.2.1.1. DETERMINACIÓN DE HMF EN ALIMENTOS

Tras elaborar la base de datos con el consumo de alimentos por parte de los sujetos objeto de estudio a partir de los cuestionarios rellenados (recordatorio de 24h y frecuencia de consumo), se determinaron qué alimentos fueron los más consumidos por la población escolar. Posteriormente se analizaron en el laboratorio dichos alimentos para evaluar la concentración de HMF presente en cada uno de ellos (Pastoriza et al., 2017). Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el método desarrollado por nuestro grupo de investigación anteriormente (Rufián-Henares et al., 2006). Los datos obtenidos se encuentran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de HMF en los principales alimentos consumidos por la población escolar.

Grupo Alimentos	Alimentos	Contenido HMF	SD	n
Carne	Lomo de cerdo (a la parrilla)	0,66	0,16	3
	Lomo de cerdo (hervido + salsa)	36,43	3,19	2
	Estofado de ternera	<LOQ	0,00	2
	Pollo (horneado)	<LOQ	0,00	3
	Pollo hervido	<LOQ	0,00	3
	Lomo de cerdo empanado	11,65	1,38	3
	Hamburguesa	28,85	5,97	3
	Salami	0,04	0,02	3
	Jamón cocido	0,05	0,04	3
	Salchichas	0,12	0,03	3
	Albóndigas	3,58	0,89	2
Pescados y mariscos	Merluza (plancha)	0,16	0,08	3
	Merluza empanada	1,62	0,35	3

	Calamares rebozados	0,13	0,02	3
	Boquerones (fritos)	0,71	0,16	2
	Boquerones en vinagre	<LOQ	0,00	2
	Atún (en lata)	0,06	0,03	3
	Mejillones (en lata)	0,10	0,02	2
Huevos	Frito	<LOQ	0,00	3
	Cocido	<LOQ	0,00	3
Productos lácteos	Leche entera (UHT)	0,04	0,02	3
	Leche semidesnatada (UHT)	0,06	0,04	4
	Leche desnatada (UHT)	0,08	0,04	3
	Leche entera (pasteurizada)	0,14	0,08	4
	Yogur desnatado	0,06	0,02	3
	Yogur entero	0,12	0,04	3
	Leche condensada	132,60	28,92	2
	Batido de chocolate	1,34	0,46	3
	Flan de huevo	14,32	1,98	3
	Flan de vainilla	13,07	1,53	3
	Natillas	2,25	1,02	3
	Helado crocanti	0,88	0,45	3
	Helado de cucurucho de caramelo	30,79	9,41	4
	Tarrina helado de chocolate	9,03	4,35	2
	Helado de cucurucho de chocolate	16,92	7,98	3
	Tarrina helado de fresa	4,39	2,21	3
	Helado de cucurucho de fresa	12,22	4,65	3
	Queso en loncha	0,07	0,03	3
Legumbres	Lentejas (cocidas)	0,10	0,04	2
	Garbanzos (cocidas)	0,28	0,09	2
	Alubias (cocidas)	<LOQ	0,00	2
Cereales	Pan blanco	26,93	9,57	4
	Pan integral	20,18	6,98	4
	Pan de centeno	4,80	1,32	3

	Pan de molde blanco	11,80	3,86	4
	Pan de molde integral	8,70	3,54	3
	Pan tostado	33,11	11,05	3
	Galletas	14,40	4,68	5
	Galletas integrales	34,10	16,53	4
	Cookies	12,37	5,92	5
	Cereales de desayuno	36,24	11,03	4
	Cereales de desayuno (chocolate)	28,68	12,09	3
	Cereales de desayuno integrales	35,76	13,29	4
	Magdalenas	2,80	1,18	4
	Donuts	0,08	0,04	2
	Espaguetis	0,62	0,19	3
	Espaguetis con salsa boloñesa	1,35	0,23	2
	Lasaña (con carne y tomate)	8,69	3,99	3
	Pizza	8,79	3,28	3
	Tallarines	1,10	0,26	3
	Croquetas (fritas)	28,62	10,04	2
	Empanadillas (tomate)	17,91	9,87	3
	Churros	19,50	9,36	3
	Snack de maíz	3,98	1,09	3
	Palomitas de maíz	24,60	11,19	2
	Paella	21,00	10,94	2
	Sopa de arroz	3,57	1,25	2
Tubérculos y Vegetales	Patatas fritas	1,06	0,24	3
	Patatas fritas (chips)	0,24	0,09	4
	Patata (cocida)	0,04	0,01	3
	Tortilla de patatas	0,20	0,11	2
	Puré instantáneo de patatas	35,00	18,03	3
	Salsa de tomate	27,02	16,48	4
	Ketchup	0,03	0,01	3
	Aceitunas	8,49	1,89	3

Frutos secos	Almendras	3,26	0,89	4
	Avellanas	8,70	2,38	4
	Cacahuetes	0,44	0,16	4
	Pistachos	0,65	0,25	4
	Pipas de girasol	0,80	0,31	4
Dulces y Postres	Mermeladas	13,27	3,29	3
	Frutas en conserva	2,51	0,78	2
	Melocotón (almíbar)	5,80	2,35	3
	Miel	4,80	2,01	3
	Chocolate	93,74	39,84	5
	Cacao en polvo	1,31	0,98	2
	Azúcar	0,04	0,01	2
	Crema cacao	1,87	0,46	2
	Caramelos	28,27	13,28	4
	Gominolas	6,77	2,11	4
Bebidas	Refrescos (coca cola)	134,38	39,87	3
	Refrescos (naranja y limón)	26,43	13,27	3
	Cerveza	6,40	2,94	4
	Café	2433,00	567,82	5
	Zumos de frutas (procesados)	4,87	2,75	2
	Vinagre (vino)	3,72	1,18	2
	Vinagre (balsámico)	963,99	365,39	3

^a Contenido de HMF expresado en mg/l para alimentos líquidos y mg/kg para alimentos sólidos.
LOQ: Límite de cuantificación

- **Determinación de HMF en zumos cítricos**

Los consumidores exigen zumos de frutas seguros y de alta calidad, con sabor y color similar al de los recién preparados y con un mínimo de conservantes químicos (Corté et al., 2008). Varios métodos de procesado se utilizan en la industria alimentaria para preservar la calidad nutricional y sensorial de los zumos. Entre estos métodos, el tratamiento térmico prolonga la vida útil, inactivando microorganismos y enzimas (Quitao-Teixeira et al., 2009). El procesado térmico conduce a la formación de HMF, que

se correlaciona con la alteración del olor fresco, por la pérdida de compuestos aromáticos y la formación de aromas perjudiciales (Arena et al., 2001). Debido al elevado consumo de zumos cítricos por la población escolar estudiada (y la población española, en general) y por las pocas referencias bibliográficas existentes sobre ellos, se decidió determinar el contenido de HMF y furfural en los zumos cítricos a los que se les había medido previamente el contenido de polifenoles totales.

Los resultados obtenidos para HMF y furfural se muestran en la Tabla 13. En el caso del HMF, los valores de zumos individuales oscilaron entre no detectado hasta 16,4 mg/l. Cuando los zumos se agruparon por tipos, los valores medios oscilaron entre 0,57 y 2,22 mg/l para zumos de mandarina y limón, respectivamente. Estos valores son similares a los descritos por otros autores para el zumo de naranja (Rober et al., 2001; Roig et al., 1999), de mandarina (Ibarz et al., 2011) y pomelo (Roig et al., 1999). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) entre los grupos ensayados. En el caso del furfural, los valores de zumos individuales oscilaron entre no detectado hasta 4,27 mg/l, mientras que los valores de los grupos estudiados oscilaron entre 0,60 y 1,58 mg/l para los zumos de mandarina y limón, respectivamente. Al igual que con el HMF, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P>0.05$). Se encontraron algunos valores atípicos para HMF y furfural (muestra C22 para HMF y muestras C22 y S1 para furfural). La alta cantidad de estos compuestos, especialmente en la muestra C22, podría estar relacionada con un intenso proceso de esterilización o con un almacenamiento inadecuado, lo que incrementaría concentración de estos subproductos (Roig et al., 1999).

Tabla 13. Contenido de HMF y furfural (mg/l) de zumos cítricos comerciales¹.

Zumo	Código	HMF	Furfural
Pomelo	C12	4,30	0,43
	CO6	0,66	1,27
	G4	0,76	0,20
	H8	1,54	0,35
	T2	ND ¹	ND
<i>Media</i>		<i>1,45 ± 1,68^a</i>	<i>0,75 ± 0,71^a</i>
Limón	CO7	2,90	2,67
	D6	1,55	0,49
<i>Media</i>		<i>2,22 ± 0,96^a</i>	<i>1,58 ± 1,54^a</i>
Mandarina	C5	0,18	0,13
	C11	1,77	1,96
	D4	0,07	0,11
	D5	0,27	0,19
<i>Media</i>		<i>0,57 ± 0,80^a</i>	<i>0,60 ± 0,91^a</i>
Naranja	C1	0,31	0,90
	C2	0,37	1,04
	C13	2,42	1,18
	C14	1,39	1,56
	C22	16,40	4,27
	D1	0,12	0,70
	D2	0,11	0,93
	D3	0,11	0,91
	G3	0,30	0,16
	H3	0,43	0,86
	H13	0,04	0,13
	J2	2,22	0,46
	J5	0,39	0,51
	J9	0,26	0,80
	K6	0,33	0,79
	M4	ND	ND
	P1	0,14	0,95
	P3	0,09	0,91
	S1	2,43	3,09
	T1	0,02	0,73
T4	ND	ND	
Z1	0,08	ND	
Z2	0,12	ND	
<i>Media</i>		<i>1,22 ± 3,39^a</i>	<i>0,91 ± 0,99^a</i>

¹Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).
ND = No detectado.

La Tabla 14 muestra las diferencias encontradas en el contenido de HMF y furfural en zumos de naranja comerciales dependiendo de las condiciones de almacenamiento (refrigerado vs. no refrigerado) y tipo de zumo (zumo vs. néctar). Como era de esperar, los zumos de naranja no refrigerados presentaron valores más altos de HMF ($P < 0,05$) que los refrigerados, pero niveles similares de furfural. Esto podría estar relacionado con los diferentes tratamientos térmicos utilizados durante la producción de zumo de naranja (pasteurización para zumos refrigerados y esterilización UHT para zumos no refrigerados) lo que conlleva un mayor daño térmico en aquellos esterilizados mediante UHT. El tipo de zumo no tuvo ningún efecto sobre los niveles de HMF o furfural, lo cual es un resultado lógico si se tiene en cuenta que la única diferencia en su composición es la adición de azúcar a los néctares.

Tabla 14. Análisis estadístico de los diferentes zumos de naranja comerciales agrupados por condiciones de almacenamiento y tipo de zumo¹.

Indicador	Refrigerado	No refrigerado	Zumo	Néctar
<i>HMF</i>	0.34±0.45 ^a	1.69±0.94 ^b	0.53±0.81 ^a	0.55±0.83 ^a
<i>Furfural</i>	0.87±0.43 ^a	0.93±0.80 ^a	0.72±0.47 ^a	0.47±0.36 ^a

¹Diferentes letras entre refrigerado-no refrigerado y entre zumo-néctar indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0,05$. HMF y furfural expresados en mg/l.

El HMF se considera un buen indicador de un exceso de temperatura de procesado y/o tiempo de almacenamiento, pero también tiene implicaciones nutricionales. El HMF se metaboliza en SMF, que tiene actividad mutagénica y nefrotóxica (Glatt and Sommer, 2006; Nadiya et al., 2009). Teniendo en cuenta la ingesta media de zumo de naranja en España en el año 2013 (3,1 l/habitante/año) y el contenido medio de HMF de los zumos de naranja (1,22 mg/l), la ingesta diaria de HMF es de 8,5 µg, lo que significa un 0,1% de la ingesta total de HMF para la población española (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008). Sin embargo, esta ingesta puede aumentar a 138 µg en aquellos consumidores que beban el zumo muestra C22 (zumo de naranja). Se trata de una estimación media para la población española, pero debe utilizarse la ración (200 ml) para conocer la contribución real en un consumidor. Así, la ingesta se encontraría en 244 µg de HMF, lo que representa el 2,44% de la ingesta diaria (10 mg/día). Sin embargo, esta contribución puede llegar a 3240 µg (32% de la ingesta diaria) en el caso de la muestra C22. Por lo

tanto, el consumo de zumos de cítricos debe tenerse en cuenta en futuros estudios centrados en la ingesta de HMF a nivel de población/individuo.

5.2.1.2 DETERMINACIÓN DE HMF Y SMF EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El HMF es conocido por ser bioactivado en SMF, un metabolito fuertemente genotóxico (Surh and Tannenbaum, 1994; Sommer, et al., 2003). Dicha metabolización es realizada por los enzimas SULT (sulfotransferasas), enzimas desintoxicantes expresadas en diferentes órganos y especialmente en el tracto gastrointestinal (Delgado-Andrade et al., 2007; Bakhiya, et al., 2009). Así mismo, el SMF es nefrotóxico por su acumulación en el riñón a través de la reabsorción en los túbulos proximales mediada por los transportadores OAT1 y OAT3 (Zaitzev et al., 1975). Por lo tanto, se puede plantear la hipótesis de que, a lo largo del proceso digestivo, el HMF no sólo se absorbe, sino que también podría ser metabolizado a SMF en el lumen del tracto gastrointestinal y el hígado. Así mismo, el SMF no se excretaría correctamente debido a la reabsorción renal, dando lugar a concentraciones de SMF elevadas, lo que incrementarían las posibilidades de que dicho metabolito reaccionara con el ADN y las proteínas.

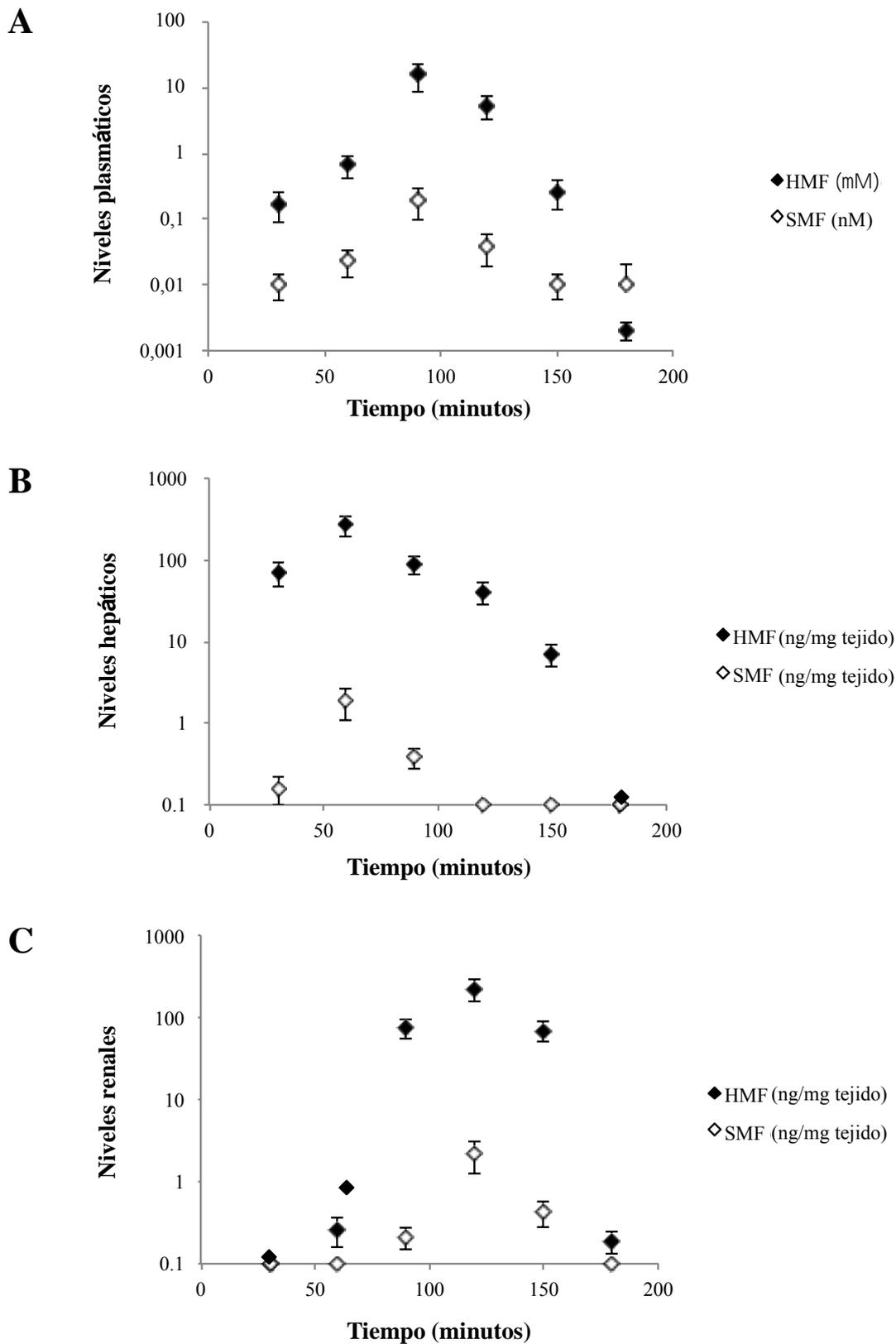
5.2.1.2.1 ENSAYO DE INGESTA AGUDA DE HMF

Los ensayos con animales que se han llevado a cabo por otros autores (Monien et al., 2009) se realizaron con ratones, con el fin de evaluar la tasa de conversión metabólica de HMF a SMF tras inyección intravenosa de una concentración elevada de HMF. En nuestro primer ensayo se pretendió evaluar la conversión real de HMF en SMF tras administración oral aguda, ya que el HMF puede convertirse en SMF a nivel intestinal y hepático, aunque al mismo tiempo puede reaccionar directamente con macromoléculas biológicas antes de alcanzar la circulación plasmática.

La dieta de control AIN-93M suministrada a los ratones del ensayo mostró niveles de HMF de 7,9 mg/Kg. Así, los ratones control mostraron una concentración plasmática de HMF de 0,07 nM, mientras que no se detectó HMF o SMF ni en hígado ni en riñones, probablemente debido a su eliminación tras el período de ayuno nocturno. Como se

observa en la Figura 38A, niveles bajos de HMF fueron detectados por LC-MS/MS en plasma sólo 30 minutos después de la ingestión, alcanzando un pico a los 90 minutos, y luego disminuyeron de nuevo a la concentración determinada tras los primeros 30 minutos. Los niveles de HMF en el hígado aumentaron más rápidamente (Figura 38B), alcanzando la concentración máxima sólo 60 minutos tras de la ingestión de HMF, mientras que el pico máximo de HMF en el riñón se alcanzó después de 120 minutos (Figura 38C). Por lo tanto, teniendo en cuenta la secuencia temporal, está claro que HMF es rápidamente absorbido y parcialmente metabolizado en el hígado, luego se vierte al torrente sanguíneo y finalmente se excreta a través de los riñones. El HMF se transformó fácilmente en SMF después de la sobrecarga oral de HMF, ya que el SMF fue detectado en plasma después de 30 minutos tras la ingestión del HMF (Figura 38A). El comportamiento de SMF fue similar al del HMF en plasma (Figura 38A), hígado (Figura 38B) y riñones (Figura 38C), aunque los niveles detectados fueron 100 veces menores que los de HMF en hígado o riñones y 1000 veces menor en plasma. Esta observación refleja que son muy bajas las cantidades de HMF las que se convierten en SMF, pero aun así es potencialmente peligroso. Los niveles encontrados para HMF y SMF están en línea con los descritos por Monien et al. en 2009, lo que indica que a partir de una alta carga oral de HMF se produce la transformación en SMF, como en el caso de la inyección intravenosa, pero de forma más sostenida en el tiempo. Además, la tendencia similar de HMF y SMF presente en plasma o tejidos podría indicar que la administración oral de HMF no satura el sistema de sulfo-conjugación, como en el caso de la inyección en bolo (Monien et al., 2009). Estos hallazgos sugieren la idea de que la ingestión oral diaria de HMF podría generar un nivel basal permanente de SMF.

Figura 38. Análisis mediante LC-MS/MS del contenido de HMF y SMF en plasma (A), hígado (B) y riñón (C) de ratones tratados con HMF oral.



El siguiente objetivo planteado consistió en determinar la distribución espacial de HMF y SMF en el hígado y los tejidos renales por medio de MALDI-MSI. En primer lugar, estudiamos las propiedades de ionización de ambos compuestos por MALDI-MSI. Para ello depositamos soluciones patrón de dichos compuestos en la placa MALDI y se evaluó la ionización del HMF y SMF en modo positivo y negativo, respectivamente. El análisis de masa exacta con el analizador de masas Orbitrap señaló las masas exactas del HMF y SMF a m/z 126,055 y 204,980, respectivamente (los mismos precursores también se observaron en la formación de imágenes de tejido como se muestra en las Figuras 39A-B y 40A-B, respectivamente). Los patrones de fragmentación se determinaron en la trampa de iones lineales tras colisión en la cámara de CID con un 40% de energía de colisión normalizada (valor que todavía permitía la detección de los iones precursores en los espectros MS/MS resultantes). Los iones fragmentos característicos del HMF y SMF (Figuras 39C y 39D) se detectaron como m/z 98,1, 81,1 y m/z 125,1, 96,0 (radical de iones sulfato SO_4) y 81,0 (ión HSO_3 -sulfonato). Los análisis de imagen MALDI-MSI iniciales revelaron que los niveles de HMF y SMF en el hígado de ratones tras la administración de HMF oral estaban por debajo del límite de detección (Figura 41B) que puede ser típicamente al menos un orden de magnitud menor que el medido directamente por MALDI (Figuras 41C-E y 42A-E). Sin embargo, la deposición manual de 0,5 μ l de soluciones de compuesto (0,1 mg/ml) permitió la demostración de iones precursores y fragmentos de HMF y SMF en la superficie del tejido hepático (Figuras 41C-E y 42A-E), demostrando que ambos compuestos pueden ser analizados en los tejidos si están presentes en concentraciones elevadas, pero a bajas concentraciones la supresión iónica del tejido impide su visualización.

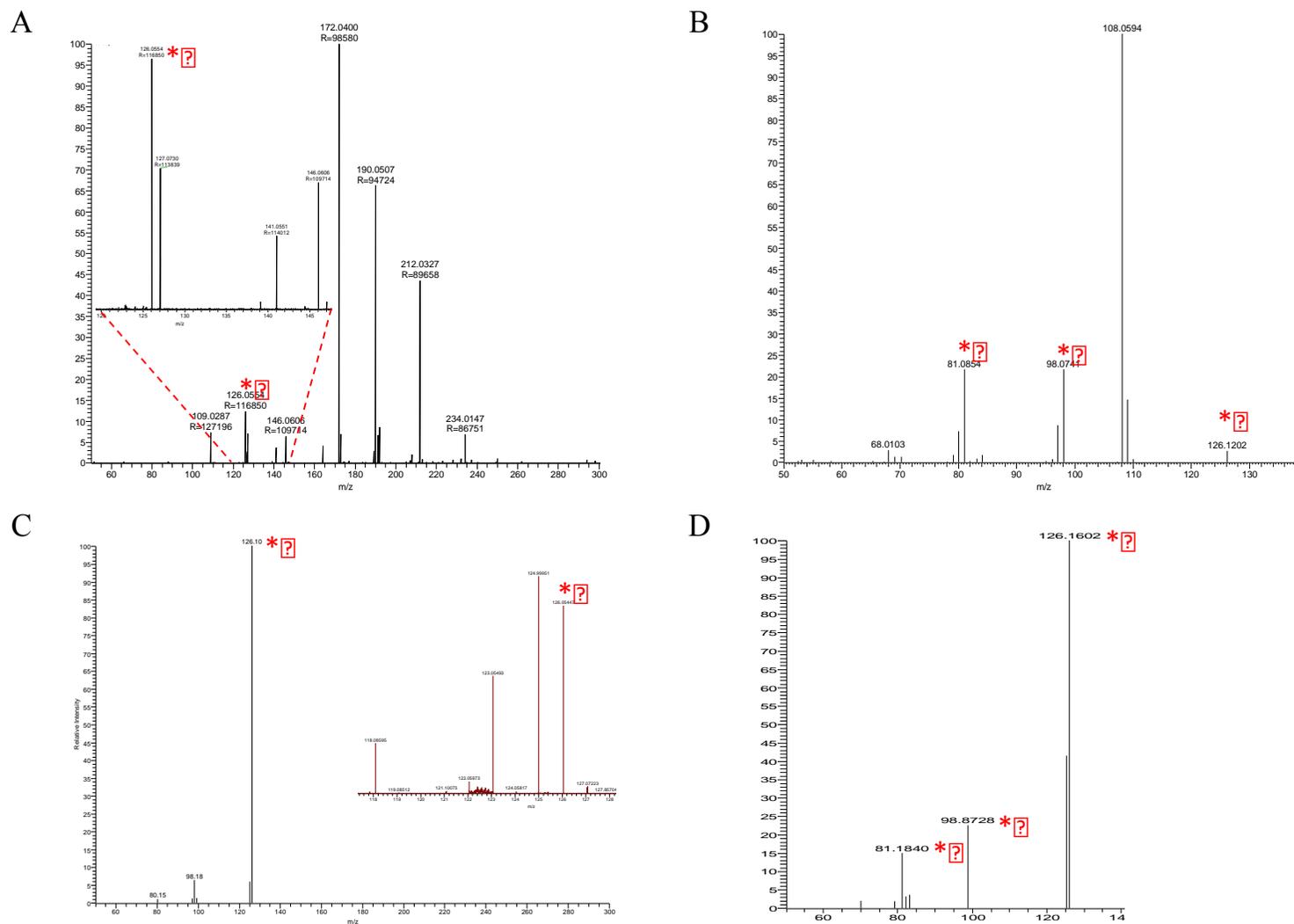
Figura 39. Detección de HMF en modo de iones positivos en la placa MALDI (A y B) y en la sección de tejido hepático (C y D).

Figura 40. Detección de SMF en modo de iones negativos en la placa MALDI (A y B) y en la sección de tejido hepático (C y D).

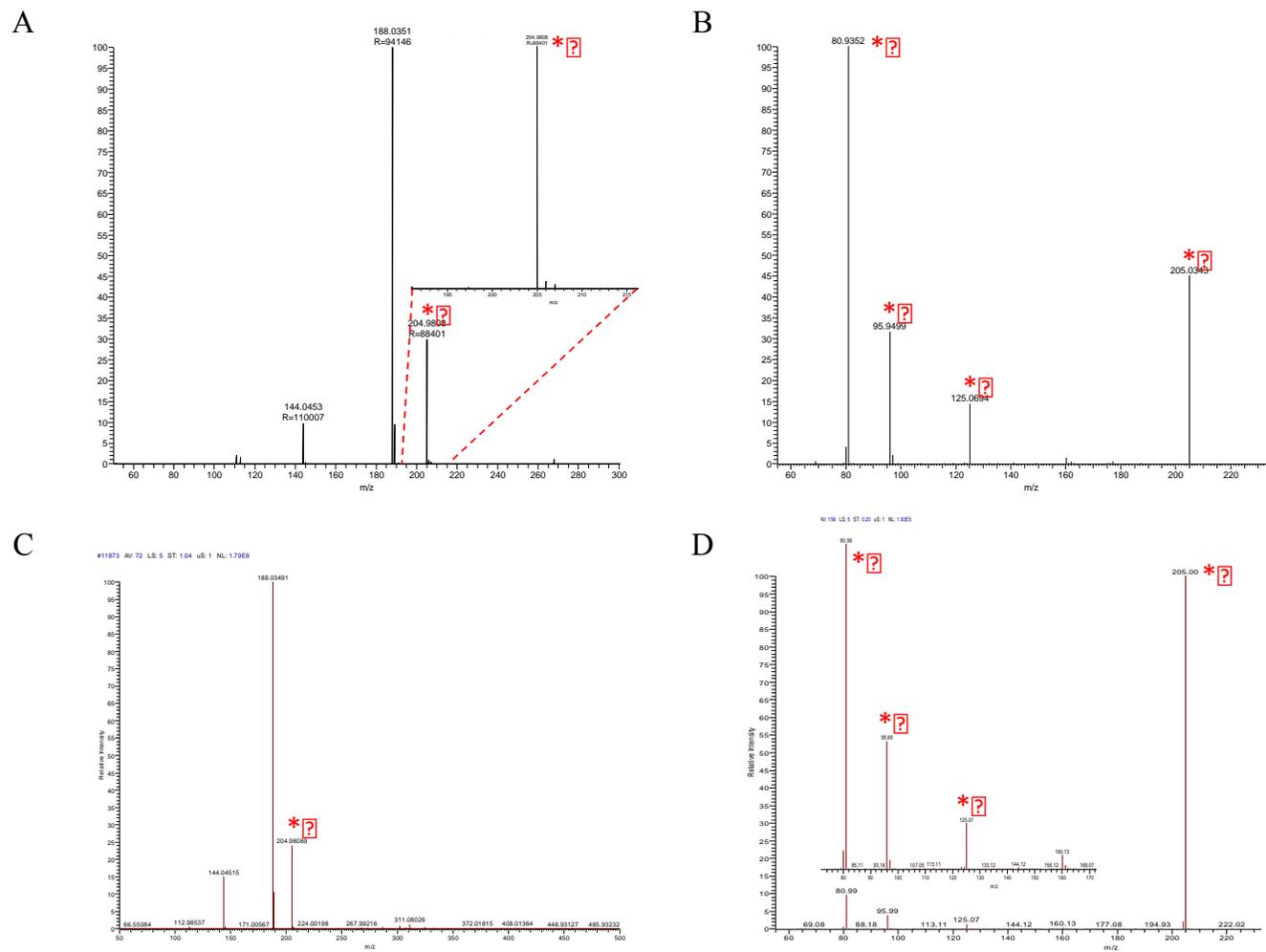


Figura 41. (A) Distribución de un ión seleccionado (m/z 124,999) en el hígado de los ratones que estaba uniformemente distribuido sobre la sección de tejido, mientras que el ión precursor de HMF no se detectó (m/z 126,055). **(B)** Detección del precursor de HMF por Orbitrap en análisis de masa exacta tras deposición manual de 0,5 μ l en la superficie del tejido y en el vidrio fuera de la sección (parte inferior). **(C)** Detección del precursor de HMF por trampa de iones en modo MS/MS en las mismas condiciones que en (B). **(D)** Detección de los iones fragmentos principales de HMF (m/z 98,1 y 81,1) en análisis MS/MS mostrando localizaciones perfectamente emparejadas con el precursor de HMF en tejido hepático.

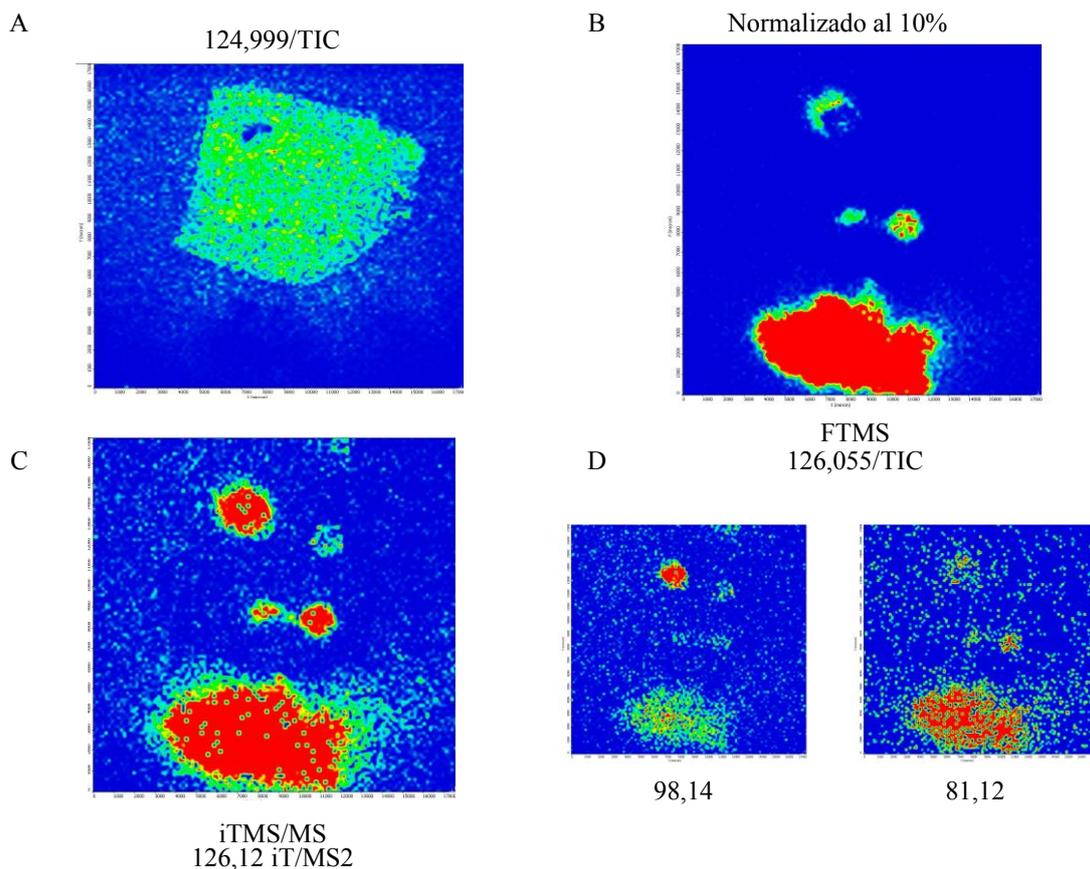
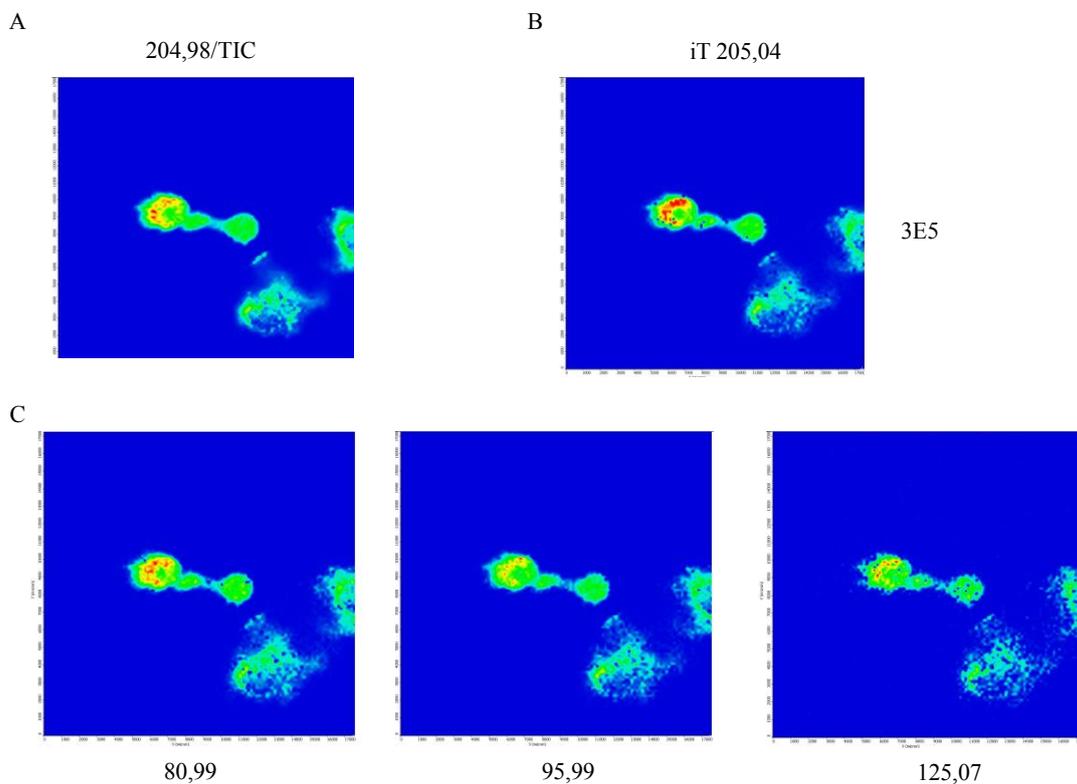


Figura 42. (A) Distribución del ión precursor SMF (m/z 204) mediante Orbitrap en análisis de masa exacta tras deposición manual de 0,5 μ l en la superficie del tejido y en el vidrio fuera de la sección (parte inferior) después de que el compuesto no fue detectado en las secciones de tejido. **(B)** Detección del precursor de SMF mediante trampa de iones en modo MS/MS en las mismas condiciones que en (A). **(C)** Detección de los iones fragmentos principales de SMF (m/z 125,07, 95,9 y 80,9) en análisis MS/MS, mostrando localizaciones perfectamente emparejadas con el precursor de SMF en tejido hepático.

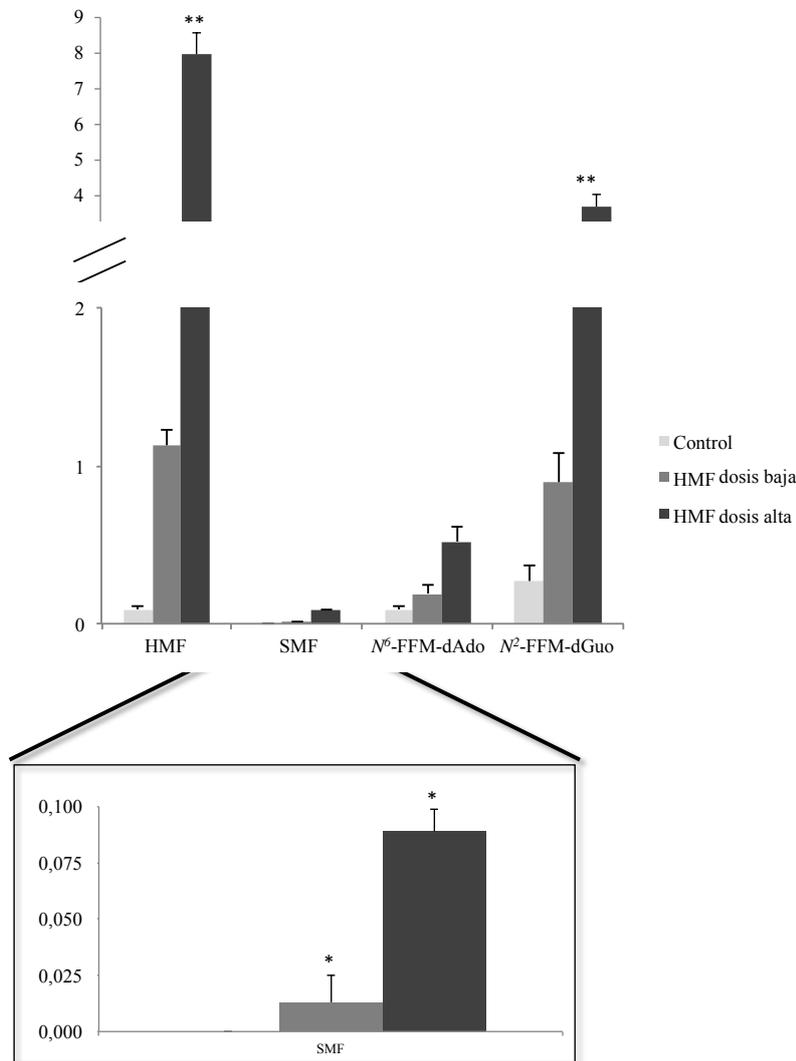


5.2.1.2.2 ENSAYO DE INGESTA CRÓNICA DE HMF

El último experimento con animales se realizó con ratones alimentados durante 4 semanas con una dieta suplementada con diferentes concentraciones de HMF. Los ratones control mostraron una concentración plasmática de HMF de 0,09 nM después del ayuno, que aumentó significativamente ($P < 0,001$) hasta 1,13 y 7,97 nM con dietas que contenían 50 y 300 mg HMF/kg, respectivamente (Figura 43). Tales concentraciones fueron alrededor de 100 veces más bajas que las obtenidas tras la dosis oral masiva de HMF administrada a ratones en el experimento anterior, pero la presencia de trazas de

HMF en plasma después del ayuno podría indicar que los niveles circulantes de SMF pueden estar presentes debido a la actividad metabólica de las SULT. Como se representa en la Figura 43 (cuadro ampliado) no se detectó SMF en animales alimentados con la dieta estándar, pero se detectó una concentración estadísticamente más alta ($P < 0,001$) dependiente de la dosis, de 0,013 y 0,089 nM en ratones alimentados con una dosis baja y alta de HMF, respectivamente. Se obtuvo una clara correlación entre los niveles plasmáticos de HMF y SMF (coeficiente lineal de Pearson $r = 0,9958$; $P < 0,05$). Teniendo en cuenta que la ingesta diaria de HMF en los ratones de control fue de 0,18 mg/día, mientras que la de los ratones de dosis baja fue de 0,93 mg/día, se puede suponer que hay una concentración entre estas ingestas donde el SMF no se elimina eficientemente del organismo, haciéndolo propenso a reaccionar con macromoléculas como el ADN. En este sentido, se midieron los niveles de aductos SMF-ADN presentes en los glóbulos blancos y se encontró una concentración dosis-dependiente de N^6 -FFM-dAdo (moléculas de aducto por cada 10^8 nucleósidos de ADN) y N^2 -FFM-dGuo (Figura 43). Estos aductos de ADN han sido descritos por Monien et al. (2012) como estructuras mutagénicas con potencial hepatocarcinogénico procedentes de la ingesta de HMF y posterior metabolización hasta SMF. Estos autores encontraron que dichos aductos son en gran parte resistentes a la reparación del ADN en células V79-hSULT1A1 tratadas con HMF. Los niveles encontrados en ratones estaban en el mismo rango que los encontrados en el cultivo celular utilizado por estos autores.

Figura 43. HMF (nM) y SMF (nM) en plasma y N^6 -FFM-dAdo y N^2 -FFM-dGuo (moléculas por cada 10^8 nucleósidos de ADN) en leucocitos de ratones tratados con HMF.



Basado en nuestros hallazgos en el estudio con animales y considerando la intensa exposición a HMF en la dieta occidental, que es mayor que la de otros contaminantes de procesamiento de alimentos como la acrilamida o furano (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008), llegamos a la conclusión de que sería posible la presencia de HMF, SMF y aductos de ADN en humanos. Por otra parte, se sabe que los seres humanos expresan *SULT1A1* en el hígado y casi todos los tejidos extrahepáticos a niveles más altos que los encontrados en ratones (Monien et al., 2009), lo que daría a mayores niveles de biotransformación de HMF en SMF. Por todo ello pensamos evaluar la presencia de dichos compuestos en los niños del estudio acerca de la ingesta-excreción de polifenoles.

5.2.1.3 DETERMINACIÓN DE HMF Y SMF EN SERES HUMANOS

5.2.1.3.1 DETERMINACIÓN DE INGESTA DE HMF

- Ingesta de HMF

Después de los resultados obtenidos con ensayos con animales, se estudió la exposición a HMF en niños, cuyas preferencias nutricionales los convierten en un sector de alto riesgo relacionado con la ingesta de contaminantes de nueva formación inducidos por el calor en los alimentos (EFSA, 2005). En estudios anteriores la exposición a HMF se calculó teniendo en cuenta los niveles de HMF publicados en diversos trabajos científicos (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008). Para hacer más riguroso nuestro estudio se evaluó el contenido de HMF en los alimentos más consumidos por los niños del estudio mediante HPLC-UV. Los resultados del contenido HMF de los alimentos españoles y preparaciones culinarias se resumen en la Tabla 12 (pág. 111). Muchos alimentos sometidos a tratamientos térmicos no tenían niveles detectables de HMF (principalmente alimentos derivados de carne y pescado) probablemente debido a los bajos niveles de azúcares que contienen. Los alimentos procesados térmicamente ricos en carbohidratos (leche condensada, caramelo, pan, galletas, etc.) son aquellos en los que más se da la reacción de Maillard y la caramelización, con la posterior formación de HMF. Así, se encontraron niveles de hasta 2400 mg/kg en el café, un valor en el mismo orden de magnitud que los reportados por Arribas-Lorenzo y Morales para café torrefacto y café soluble (Arribas-Lorenzo and Morales, 2010). Dado que nuestro estudio se desarrolló en población preadolescente, el consumo de café fue muy bajo, por lo que su contribución en la dieta no sería elevada, al contrario que en los adultos.

Tras el análisis de los cuestionarios de frecuencia de consumo se determinó una ingesta media de HMF de $13,72 \pm 9,33$ mg/día (Tabla 15), oscilando entre 3,14 y 68,86 mg/día, con una exposición diaria equivalente de 321 μ g/kg de peso corporal/día. Estos valores están en línea con los reportados anteriormente para la población adulta española (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008) y adolescente (Delgado-Andrade et al., 2007), así como la población adulta noruega (Husøy et al., 2008). Para el registro 24h, la ingesta media se estableció en $6,82 \pm 5,78$ mg/día. Las diferencias que encontramos entre ambos valores (frecuencia de consumo y registros de 24h) pueden deberse a la mayor precisión del registro de 24h.

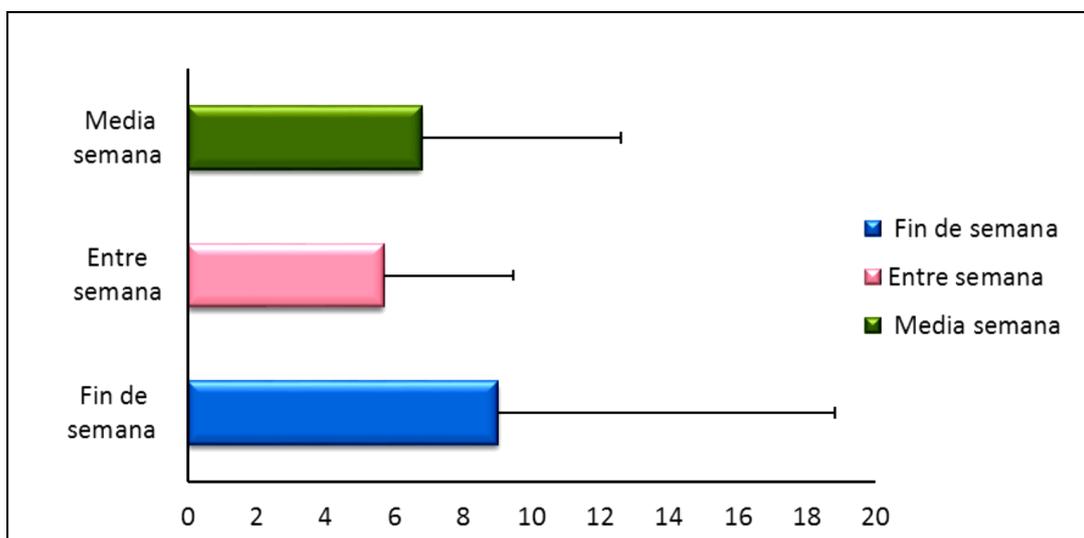
Tabla 15. Ingesta de HMF, niveles de HMFA urinario, HMFA y SMF plasmáticos y N^6 -FFM-dAdo y N^2 -FFM-dGuo en leucocitos de la población escolar bajo patrón dietético regular.

Compuesto químico	Media	Min.	Max.	Niños	Niñas
HMF (mg/día)	13,92 ± 9,33	3,14	68,86	13,78 ± 9,10	13,99 ± 9,77
HMFA orina (mg/24h)	14,58 ± 10,40	2,87	79,80	14,87 ± 9,57	14,54 ± 11,52
HMFA plasma (μmol/l)	13,97 ± 8,01	1,04	53,52	13,90 ± 8,12	14,43 ± 8,45
SMF plasma (nmol/l)	0,33 ± 0,13	0,20	0,98	0,32 ± 0,15	0,34 ± 0,13
N^6 -FFM-dAdo (moléculas por 10 ⁸ nucleósidos ADN)	0,50 ± 0,20	0,25	1,39	0,48 ± 0,18	0,51 ± 0,21
N^2 -FFM-dGuo (moléculas por 10 ⁸ nucleósidos ADN)	4,67 ± 1,76	2,54	12,01	4,49 ± 1,52	4,90 ± 1,91

- **Distribución de la ingesta de HMF por comidas y a lo largo de la semana**

Si hacemos distinción entre la ingesta de HMF en días laborables y la que se realiza durante el fin de semana (Figura 44) observamos que la ingesta del fin de semana ($9,05 \pm 9,78$ mg/día) es mayor que en los días laborables ($5,71 \pm 3,78$ mg/día). Para evaluar a qué podía ser debida dicha diferencia, se procedió a evaluar la distribución de la ingesta de alimentos a lo largo de las cinco comidas diarias de la población estudiada.

Figura 44. Distribución semanal de la ingesta de HMF.



Para determinar qué comidas son las que mayor cantidad de HMF aportan al día, se utilizaron los datos obtenidos del análisis de los recordatorios de 24h. El almuerzo fue la comida que proporcionó mayores concentraciones de HMF (27%) seguido de la cena, merienda, media mañana y desayuno, todos ellos con casi un 20% (Figura 45). Durante los días laborables la ingesta de HMF estuvo bien equilibrada a lo largo del día (Figura 46), ya que la cena (23%), media mañana (22%) y el almuerzo (20%) son las comidas que aportaron más HMF a la ingesta diaria. Sin embargo, en el fin de semana la ingesta mostró un consumo menos equilibrado (Figura 47), con la mayor cantidad de HMF ingerida con almuerzo (35%), merienda (22%) y cena (18%). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que durante los fines de semana la dieta de los niños de nuestro estudio es menos cuidada, incrementándose el consumo de alimentos con

concentraciones de HMF muy elevadas como refrescos, hamburguesas, helados, chocolate...

Por otro lado, cabe destacar que durante el fin de semana la toma de media mañana (13%) sufre una disminución importante con respecto a la media mañana de los días laborables (22%). Este menor aporte de HMF podría ser debido a que una gran cantidad de niños no la llevan a cabo, mientras que entre semana se corresponde a la hora del recreo, donde la mayoría de niños comen algún alimento, siendo mayormente del grupo de los cereales (pan, galletas, bollería...) y bebidas (zumos comerciales o batidos), alimentos de alto contenido en HMF.

Figura 45. Proporción de la ingesta total de HMF por comida.

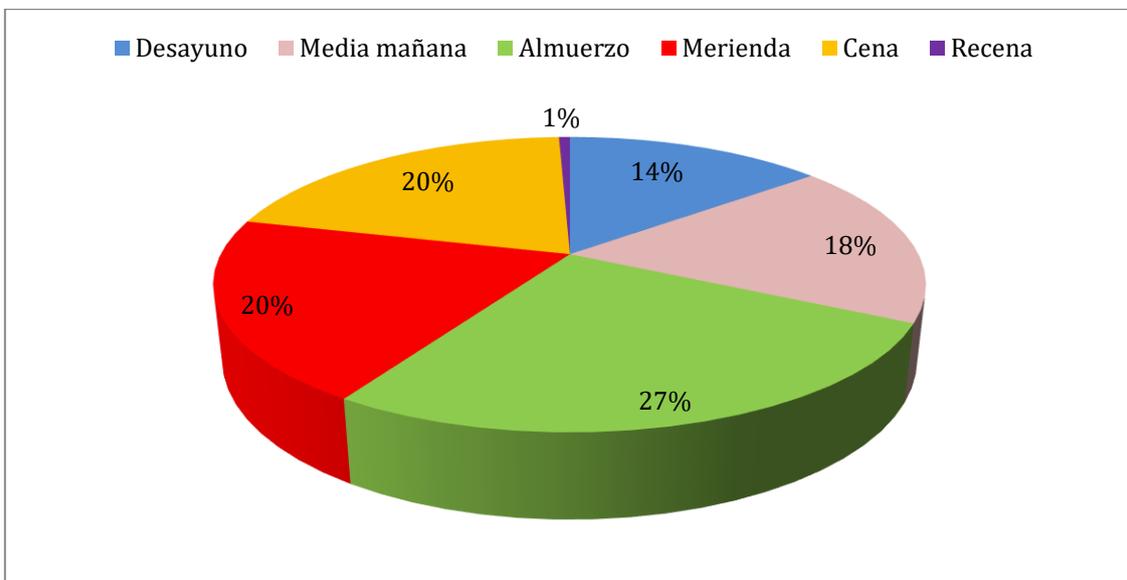


Figura 46. Distribución de la ingesta de HMF en las cinco comidas diarias a lo largo de los días laborables.

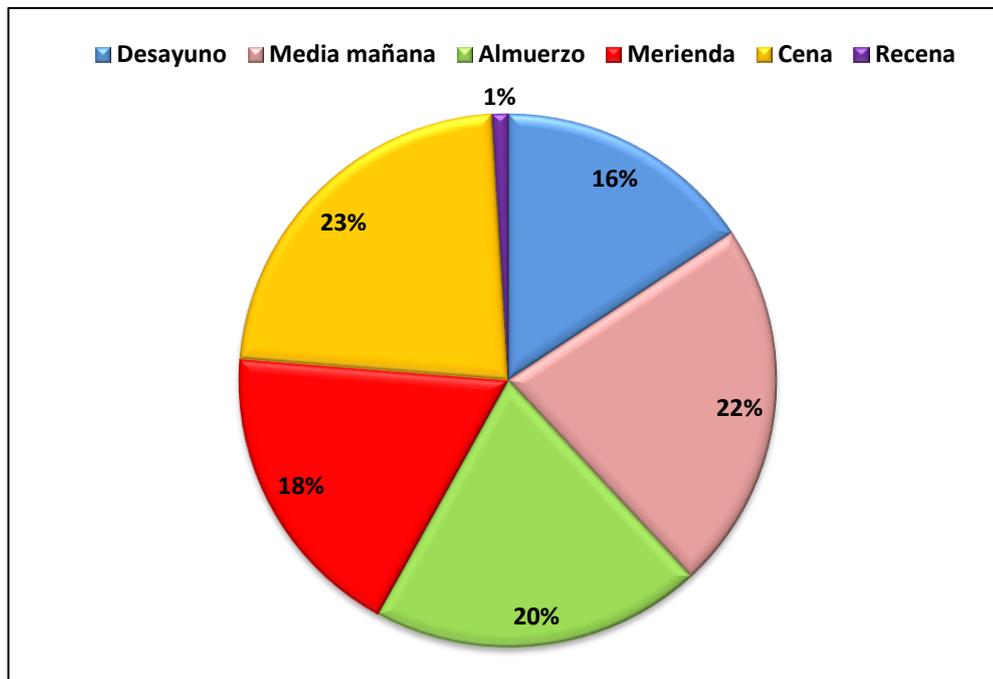
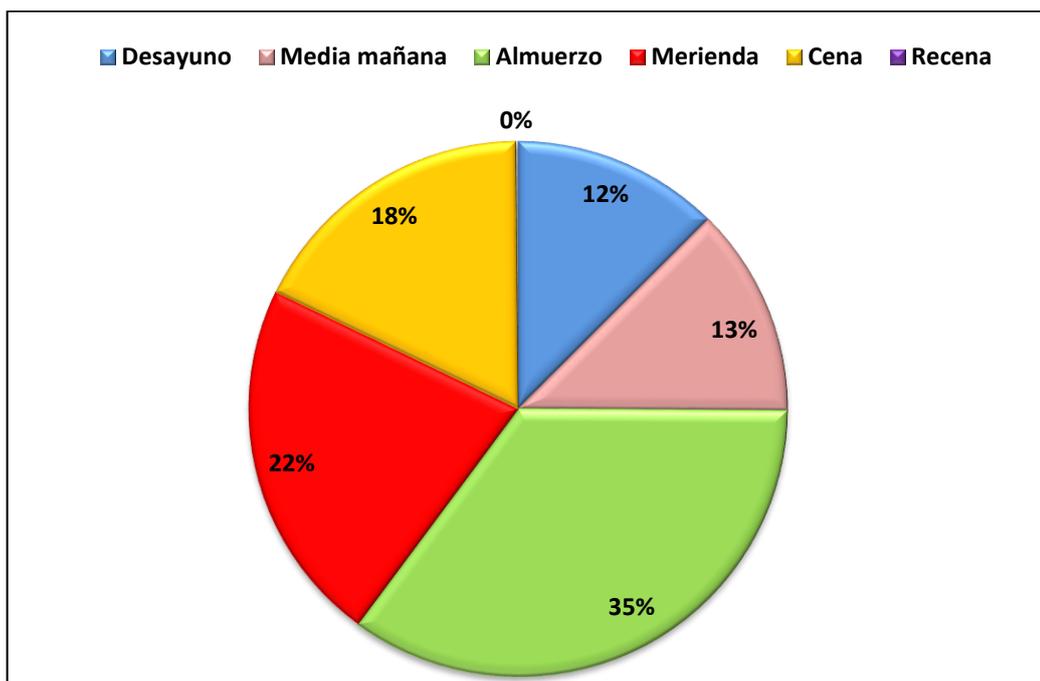


Figura 47. Distribución de la ingesta de HMF en las cinco comidas diarias a lo largo del fin de semana.



- **Ingesta de HMF por grupo de alimentos**

Al analizar la ingesta de HMF dependiendo del grupo de alimentos consumidos (Anexo III) y de los datos de ingesta de referencia que utilizemos (registros de 24h o cuestionarios de frecuencia de consumo) podemos obtener algunas diferencias, aunque pequeñas (como ya se comentó en el apartado de ingestas de polifenoles). Esto se debe a que en el cuestionario frecuencia de consumo es más impreciso, ya que determina los alimentos consumidos a lo largo de todo un año, mientras que en el recordatorio 24h solo se determinan los alimentos consumidos en 3 días (por lo que la ingesta de HMF puede variar mucho más dependiendo de la dieta que llevaron los niños esos días).

A partir de los recordatorios de 24h, la contribución promedio de diferentes alimentos a la exposición a HMF reveló que hubo grandes variaciones entre los participantes en el estudio dependiendo de sus preferencias dietéticas (Figura 48). La fuente más importante de HMF fueron los derivados de cereales (51%) debido al alto consumo de pan (que a su vez es un alimento básico en la Dieta Mediterránea) y a la concentración relativamente alta de HMF en dicho alimento (10-20 mg/kg). La segunda fuente más importante de HMF fue el grupo de bebidas (37%), seguido de lejos por los demás grupos de alimentos. La contribución de las bebidas a la ingesta de HMF podría estar relacionada con un cierto consumo de café (bajo consumo, pero concentración muy elevada de HMF) y altas cantidades de refrescos carbonatados, que tienen una concentración de HMF muy alta (134 mg/l) y se consumen regularmente en la población estudiada.

En cuanto a los resultados derivados de los cuestionarios de frecuencia de consumo (Figura 49), también son los grupos de cereales y bebidas los que más HMF aportan a la dieta de los niños. Pero en este caso, de forma invertida, son las bebidas las que más contribuyen a la ingesta de HMF (con un 52%) mientras que los cereales suponen un 26% del aporte. Así mismo, es importante señalar la contribución que hace el grupo de los estimulantes y edulcorantes (café, cacao en polvo y chocolate), ya que supone un 11% de la ingesta de HMF a partir de la dieta.

Figura 48. Distribución de la ingesta de HMF por grupos de alimentos a partir de los recordatorios de 24h.

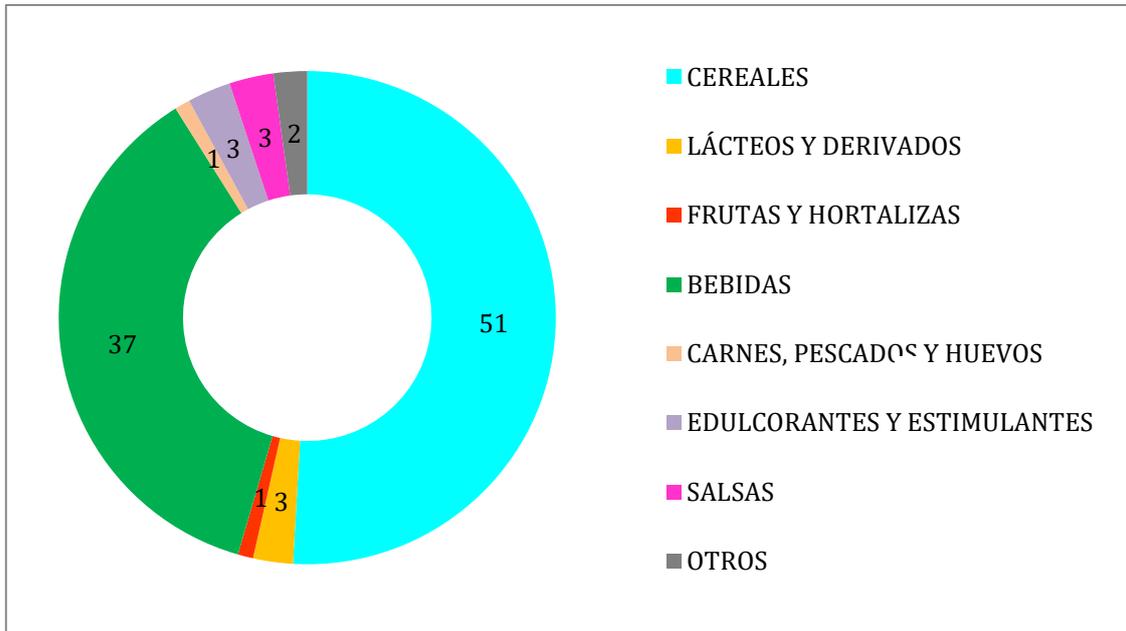
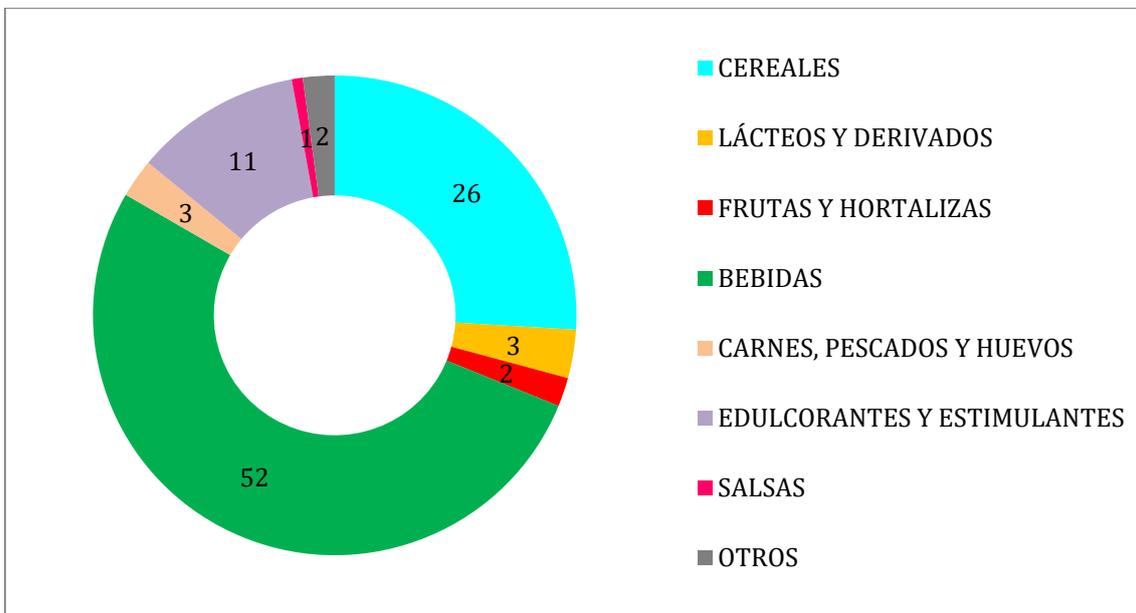


Figura 49. Distribución de la ingesta de HMF por grupos de alimentos a partir de los cuestionarios de frecuencia de consumo.



Sea cual sea el método de obtención de los datos de ingesta de HMF a partir de la dieta (recuerdos de 24h o cuestionarios de frecuencia de consumo), se puede afirmar que durante los días laborables la contribución del grupo de cereales fue mayor que el grupo de bebidas (64 vs. 20%, respectivamente), pero durante el fin de semana la contribución al consumo de HMF del grupo de bebidas fue casi el doble que en la del grupo de cereales (33 vs. 58%, respectivamente). Así, la exposición media al HMF aumenta de 282 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día durante los días laborables hasta 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día los fines de semana. Por lo tanto, si una intervención futura fuese necesaria para disminuir la ingesta de HMF en los niños, los derivados de cereales y refrescos podrían ser los alimentos objetivo en este grupo de población, pudiendo prescindirse primero del consumo de refrescos, puesto que su valor nutricional se centra exclusivamente en el aporte de carbohidratos sencillos (azúcar).

- **Ingesta de HMF Diferenciadas por Género**

A la hora de determinar la ingesta de HMF por género, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) entre niños y niñas, ni estudiándola de forma general (Figura 50), ni dividiendo el consumo de alimento por tomas (Figura 51), ni haciendo distinción por grupos de alimentos (Figura 52). Esto refleja una dieta homogénea dentro del sector de población estudiado.

Figura 50. Ingesta de HMF diferenciada por género.

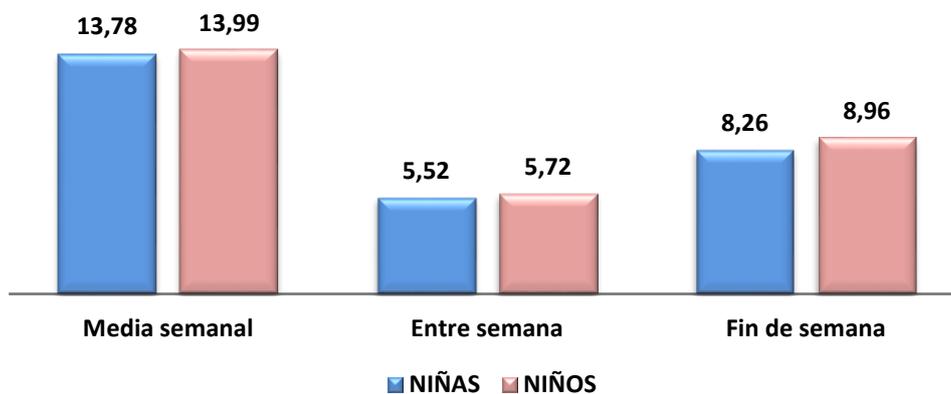


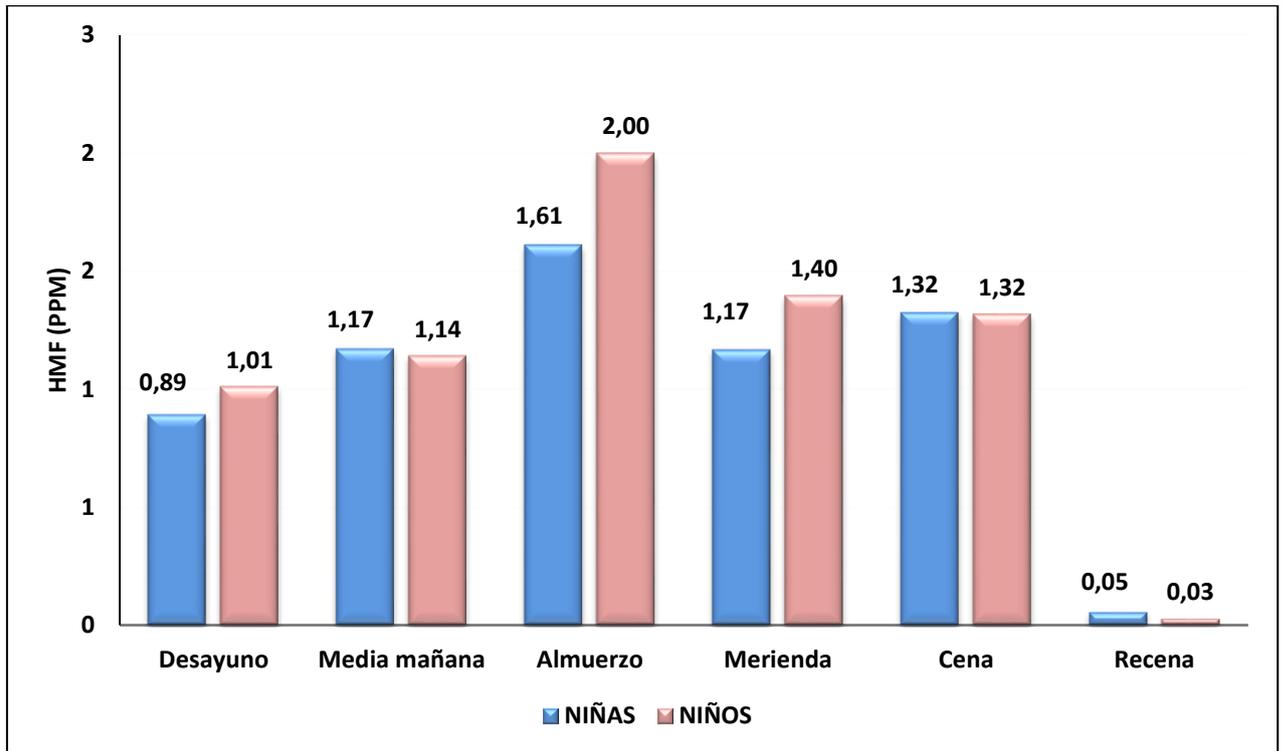
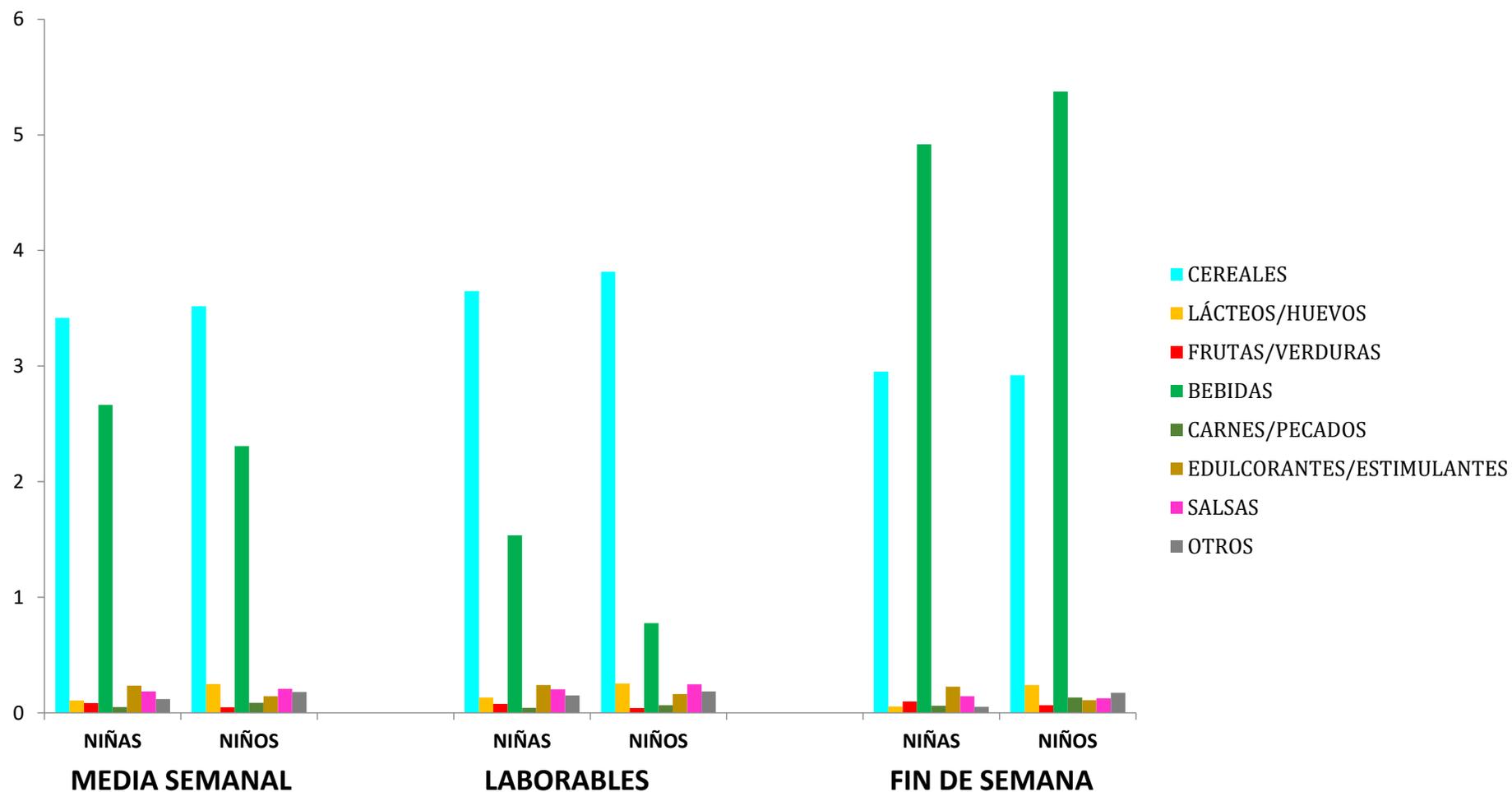
Figura 51. Ingesta de HMF diferenciada por comidas y género.

Figura 52: Ingesta de HMF diferenciada por sexo, grupo de alimentos y días de la semana.

5.2.1.3.2 EXPOSICIÓN DIETÉTICA A HMF

La exposición a HMF, en comparación con otros contaminantes de procesado térmico (acrilamida y furano) supera en muchos órdenes de magnitud a la de dichos contaminantes, ya que su consumo está en el orden de pocos $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día (Rufián-Henares and de la Cueva, 2008). En las evaluaciones del riesgo de los consumidores también es importante establecer la Ingesta Diaria Tolerable (TDI), que indica la concentración de HMF que se puede consumir durante toda la vida sin riesgo apreciable para la salud. Zaitzev et al. (1975) establecieron una TDI de 132 mg/día utilizando un margen de seguridad de 40 veces, mientras que la EFSA definió un umbral de preocupación de 540 $\mu\text{g}/\text{día}$ para la ingesta de derivados de furano no sustituidos con azufre (16 sustancias, incluido el HMF) utilizados como sustancias aromatizantes en Europa (EFSA, 2005). Dado que la ingesta diaria media de HMF en niños fue 13,7 mg/día, está sólo 10 veces por debajo de la TDI declarada por Zaitzev et al. (1975) y 25 veces por encima del umbral de preocupación declarado por la EFSA (EFSA, 2005). Aún más, la exposición a HMF de los niños con la mayor ingesta de HMF (68,86 mg/día) estaba solamente 1,9 veces por debajo de la TDI de Zaitzev et al. (1975) y 128 veces por encima del límite de la EFSA. Por lo tanto, existe un margen de seguridad bajo en consumidores con ingestas elevadas de HMF, los cuales serían propensos a los efectos del HMF, mediados principalmente por la posible formación *in vivo* de SMF y su reactividad con moléculas tales como ADN o proteínas.

5.2.1.3.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HMFA EN ORINA Y PLASMA

El HMFA es uno de los principales metabolitos de HMF excretado en la orina (Prior et al., 2006). Por lo tanto, se midió la excreción de HMFA en orina 24h, tratando de establecer la relación con la ingesta de HMF. La excreción media de HMFA en orina fue de 14,58 mg/día, oscilando entre 2,87 a 79,80 mg/día (Tabla 15). Estos valores están en línea con los reportados por Prior et al. (2006) y Husøy et al. (2008) que encontraron una excreción media de HMFA de 12,4 mg/día en la población adulta noruega. Estos autores encontraron que, para las ingestas más bajas, la excreción de HMFA era 10 veces más alta que la ingesta de HMF, atribuyendo esto a una estimación pobre de la ingesta de HMF. En nuestro caso, la ingesta de HMF y la excreción de HMFA fueron bastante similares, tanto para los consumidores con ingestas baja como alta de HMF, lo que

refleja una mejor estimación de la ingestión de HMF en nuestro estudio. Aún más, las diferencias podrían provenir del hecho de que el estudio de Husøy et al. (2008) se realizó con 53 voluntarios, mientras que el número de sujetos en nuestro estudio fue bastante mayor ($n = 268$). De esta forma, encontramos una correlación lineal estadísticamente significativa ($r = 0,9011$; $P < 0,05$) entre la ingesta de HMF y el HMFA urinario (Tabla 16), que es mayor que la encontrada por Husøy ($r = 0,5700$). Por tanto, la excreción total de HMFA es un buen indicador de la ingesta de HMF.

A continuación, se midió la presencia de HMFA en plasma, obteniéndose valores comprendidos entre 1,04 a 53,52 $\mu\text{mol/l}$ y una concentración media de 13,87 $\mu\text{mol/l}$ (Tabla 15). Como en el caso del HMFA urinario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre niños y niñas, lo cual es lógico ya que no se encontraron diferencias en la ingesta dietética de HMF. La correlación de HMFA plasmático con HMF dietético y HMFA urinario también fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Tabla 16), lo que podría estar relacionado con un metabolismo continuo de HMF dietético, incluso durante el período de ayuno.

Tabla 16. Correlación lineal de Pearson (r) entre HMF, HMFA, SMF, N^6 -FFM-dAdo y N^2 -FFM-dGuo.

	HMFA orina	HMFA plasma	SMF plasma	N^6 -FFM-dAdo	N^2 -FFM-dGuo
Ingesta HMF	0.9011*	0.8162*	0.9306*	0.9284*	0.9609*
HMFA orina		0.8648*	0.7939*	0.8437*	0.8799*
HMFA plasma			0.5017*	0.4639*	0.4881*
SMF plasma				0.7627*	0.8212*
N^6-FFM-dAdo					0.9235*

* Indica una correlación estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

5.2.1.3.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SMF EN PLASMA

Como se indicó en la sección anterior para los ratones, el SMF fue detectado en el plasma de los animales con una dieta rica en HMF. Se sabe que HMF es metabolizado por los enzimas de la familia *SULT*, que están especialmente expresados en los seres humanos en comparación con los ratones (Sommer et al., 2003; Teubner et al., 2006; Sachse et al., 2016). Por lo tanto, el SMF podría ser generado en mayores proporciones en los seres humanos, con el consiguiente daño a las moléculas de importancia biológica (Husøy et al., 2008). Los niveles plasmáticos de SMF se detectaron en 70 de 268 niños (74% con niveles por debajo de LOD) con una concentración media de 0,33 nM (rango 0,20-0,98 nM (Tabla 15). Estos valores son 3 veces más altos que los obtenidos en ratones para la ingesta aguda de HMF (Figura 38A) y HMF dietético (Figura 43). Por lo tanto, la mayor presencia de *SULT* en seres humanos en comparación con los ratones, podría ser el responsable de una mayor concentración plasmática SMF procedentes de la dieta HMF. El SMF es una molécula muy reactiva (Surh and Tannenbaum, 1994; Bakhiya et al., 2009) con una rápida eliminación plasmática (Monien et al., 2009). Por lo tanto, aunque el HMF puede convertirse en SMF en el intestino a partir de la actividad de las *SULT* intestinales (Teubner et al., 2006), es más factible que el SMF plasmático pudiera provenir del metabolismo de HMF en otros órganos como el hígado, ya que el HMF es permeable a la membrana y distribuido de manera eficaz (Monien et al., 2009).

En cuanto a los datos obtenidos para SMF, se encontró que los niños situados en el cuartil superior de la ingesta de HMF (>17,5 mg/día) tenían niveles de SMF plasmático detectables. Se debe tener en cuenta que las muestras de plasma se obtuvieron después del domingo, donde la ingesta media de HMF de estos niños fue aún mayor (24,85 mg/día). Además, estos niños realizan comidas como hamburguesas, pizzas y bebidas de tipo cola en la cena del domingo (así como a lo largo del día). Por lo tanto, se podría plantear la hipótesis de que debido a una gran carga de HMF diaria en la dieta de ese día, la sulfo-conjugación de HMF se produjo de forma homogénea durante el domingo (y especialmente durante la noche) con el consiguiente aumento de los niveles plasmáticos de SMF, haciéndolo detectable en estos niños y no en otros. Finalmente, se obtuvo una fuerte correlación lineal ($P < 0,05$) entre el consumo plasmático de SMF y HMF o HMFA en orina (Tabla 16) pero no con el HMFA plasmático. Probablemente esto podría explicarse por las diferencias en la tasa de conversión

de HMF a HMFA y SMF, que se producen a través de diferentes sistemas enzimáticos (Abraham et al., 2011).

5.2.1.3.5 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ADUCTOS DE SMF EN ADN

Dado que los niveles plasmáticos de SMF se detectaron en muestras de plasma de seres humanos por primera vez, es plausible que se pudieran encontrar aductos de ADN en células sanguíneas debido a su exposición de SMF circulante. Los niveles de N^6 -FFM-dAdo oscilaron entre 0,25 a 1,39 moléculas por 10^8 nucleósidos de ADN (valor medio 0,13) mientras que los niveles de N^2 -FFM-dGuo fueron diez veces superiores (valor medio 1,20 moléculas por 10^8 nucleósidos de ADN) (Tabla 15). En el caso del SMF, los aductos de ADN sólo se encontraron en aquellos niños con niveles de SMF plasmático cuantificables. Aunque Monien et al. (2012) encontraron que parte de los aductos N^6 -FFM-dAdo y N^2 -FFM-dGuo podían ser reparados a nivel celular, con el conocimiento actual no se puede descartar un daño permanente o posteriores mutaciones. Por último, los niveles de aductos de ADN se correlacionaron estadísticamente ($P < 0,05$) con la ingesta de HMF y los niveles en orina de HMFA (Tabla 16) haciendo de este compuesto un biomarcador prometedor de exposición a HMF.

VI. CONCLUSIONES

6.1. POLIFENOLES

- Los registros de 24 h y los cuestionarios de frecuencia de consumo permiten la evaluación de la ingesta de compuestos fenólicos en la población escolar, siendo la ingesta media diaria de 1155 mg/día y 2079 mg/día, respectivamente.
- Los alimentos que más compuestos fenólicos aportan en la dieta son las legumbres (lentejas), fruta (naranjas y mandarinas), cereales y chocolate. Los zumos de cítricos, en especial los zumos de mandarina y naranja son una gran fuente de compuestos fenólicos en la dieta, con contenido de hasta 587 mg de ácido gálico.
- La ingesta de compuestos fenólicos fue mucho mayor en los días laborables que los fines de semana, siendo el almuerzo la comida que aporta más polifenoles. La ingesta de compuestos fenólicos de las niñas fue superior a la de los niños.
- La intervención nutricional modificó el patrón alimentario de los niños, incrementando el consumo de hortalizas, frutas y cereales. Así, tras la intervención se incrementó la ingesta de compuestos fenólicos en un 20,5%.
- El método FBBB permite evaluar de forma eficiente, rápida y económica la excreción de compuestos fenólicos en orina. Así, la elevada correlación encontrada entre la ingesta y excreción de compuestos polifenoles permite concluir que la evaluación de la excreción de dichos compuestos puede ser utilizada como una herramienta analítica para el seguimiento del consumo de alimentos de origen vegetal.

6.2. HMF

- Los registros de 24 h y los cuestionarios de frecuencia de consumo también permiten evaluar la ingesta de HMF en la población escolar, estando la ingesta media diaria entre 6,82 y 13,72 mg/día, para los registros de 24h y cuestionarios de frecuencia de consumo, respectivamente.
- Los alimentos que más HMF aportan a la dieta son los pertenecientes a los cereales (pan, galletas, bollería, etc.) y el de las bebidas (refrescos carbonatados). La contribución de los zumos de cítricos a la ingesta de HMF en la dieta española es relativamente baja (2,5% para un vaso de zumo). Sin embargo, si el zumo consumido se encuentra muy dañado térmicamente, dicha contribución puede alcanzar hasta un 32% de la ingesta diaria de HMF.
- La ingesta de HMF, al contrario que la ingesta de polifenoles fue mucho mayor en los fines de semana, siendo el almuerzo la comida del día que contribuye con más HMF a la dieta. Así mismo, al contrario que en el caso de los polifenoles, no se encontraron diferencias significativas en la ingesta de HMF entre niños y niñas.
- El HMF ingerido a partir de la dieta se metaboliza a SMF in vivo en ratones de experimentación, dando lugar a un daño genético evaluado mediante la formación de aductos de SMF en el ADN.
- Esta tesis doctoral ha demostrado por primera vez que el HMF se metaboliza eficazmente hasta SMF en niños expuestos a niveles elevados, pero habituales, de HMF dietético. La exposición a SMF da lugar a la formación de aductos de ADN que podrían tener consecuencias negativas en la salud de los niños a lo largo de la vida.
- El HMFA podría ser utilizado como marcador de la exposición a HMF proveniente de la dieta.

- Teniendo en cuenta que la exposición humana diaria a HMF es muy elevada, estando comprendida en el intervalo de 10-70 mg, la evaluación de la exposición de HMF es una cuestión muy importante ya que el margen de seguridad existente entre la ingesta dietética y el TDI es muy bajo. Son obligatorios esfuerzos internacionales para la elaboración de una gran base de datos acerca del contenido de HMF en alimentos, así como datos toxicológicos adicionales con el fin de estimar con precisión la TDI para HMF.

VII. BIBLIOGRAFÍA

-
- **Abe, R., Beckett, J., Abe, R., Nixon, A., Rochier, A., Yamashita, N., Sumpio, B.** Olive Oil Polyphenol oleuropein inhibits smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 2011, 41, 814-820.
 - **Abraham, K., Gurtler, R., Berg, K., Heinemeyer, G., Lampen A., Appel K.E.** Toxicology and risk assessment of 5- Hydroxymethylfurfural in food. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, 55, 667-678.
 - **Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I., Fraga, C.G.,** Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J. Agric. Food. Chem.*, 2006, 54, 229-234.
 - **Adjei, A.A., Weinshilboum, R.M.** Catecholestrogen sulfation: possible role in carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 292, 402-408.
 - **Affé, M.** Über den niederschlag welchen pikrinsäure in normalen harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z. Physiol. Chem.*, 1886, 10, 391-400.
 - **Ahn, Y.J., Kawamura, T., Kim, M., Yamamoto, T., Mitsuoka, T.** Tea polyphenols: selective growth inhibitors of *Clostridium* spp. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, 55, 1425-1426.
 - **Andriambelason, E., Kleschyov, A.L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R.** Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 120, 1053-1058.
 - **Andriambelason, E., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R.** Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1999, 33, 248-254.
 - **Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G., Ciriolo, M. R.** Role of nitric oxide synthase in Parkinson's disease: A review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res.*, 2008, 33, 2416-2426.
 - **Arena, E., Fallico, B., Maccarone, E.** Thermal damage in blood orange juice: kinetics of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde formation. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2001, 36, 145-151.

- **Arribas-Lorenzo, G., Morales, F.J.** Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48, 644-649.
- **Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H.** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81, 317S-25S
- **Avello, M., Suwalsky, M.** Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atena, (Concepc.)*, 2006, 494, 161-172.
- **Aviram, M., Rosenblat, M.** Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J. Lipid. Res.* 1994, 35, 385-398.
- **Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B.** Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, 71, 1062-1076.
- **Aviram, M., Volkova, N., Coleman, R., Dreher, M., Reddy, M.K., Ferreira, D., Rosenblat, M.** Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: Studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice and in vitro in cultured macrophages and upoproteins. *J. Agric. Food. Chem.*, 2008, 56, 1148-1157.
- **Babu, P.V., Liu D.** Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr. Med. Chem.*, 2008, 15, 1840-1850.
- **Badía, E., Sacanella, E., Fernández-Sola, J., Nicolás, J.M., Antúnez, E., Rotilio, D., de Gaetano, G., Urbano-Márquez, A., Estruch, R.** Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 80, 225-230.
- **Bakhiya, N., Monien, B., Frank, H., Seidel, A., Glatt, H.** Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-

sulfooxymethylfurfural, a reactive, nephrotoxic metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 78, 414-419.

- **Barry, T.N., Manley, T.R., Duncan, S.J.** The role of condensed tannins in the nutritional values of *Lotus pedunculatus* for sheep. *British J. Nutr.*, 1986, 55, 123-137.
- **Beaton, G.H., Burema, J., Ritenbaugh, C.** Errors in the interpretation of dietary assessments. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 65, 1100S-1107S.
- **Beckman, C.H.** Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2000, 57, 101-110.
- **Beckman, J.S., Koppel, W.H.** Nitric oxide superoxide, and peroxynitrite- the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996, 40, C1424-C1437.
- **Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V.** Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev.*, 1996, 60, 280-300.
- **Bingham, S. A., Gill, C., Welch, A., Day, K., Cassidy, A., Khaw, K.T., Sneyd, M. J., Key, T.J.A., Roe, L., Day, N. E.** Comparison of dietary assessment methods in nutritional epidemiology: weighed records v. 24-h recalls, food frequency questionnaires and estimated- diet records. *Br. J. Nutr.*, 1994, 72, 619-643.
- **Bravo, L.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 1998, 317-333.
- **Buedo, A.P., Elustondo, M.P., Urbicain, M.J.** Non-enzymatic browning of peach juice concentrate during storage. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2001, 1, 255-260.
- **Bull, M.K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R., Sellahewa, J. Szabo, E.A., Johnson, R.L., Stewart, C.M.** The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2004, 5, 135-149.

- **Cabrini, L., Barzanti, V., Cipollone, M., Fiorentini, D., Grossi, G., Tolomelli, B., Zambonin, L., Landi, L.** Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *J. Agric. Food. Chem.*, 2001, 49, 6026-6032.
- **Cade, J., Thompson, R., Burley, V., Warm, D.** Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public. Health Nutr.*, 2002, 5, 567-587.
- **Casanova, O., Iborra S., Corma, A.** Biomass into Chemicals: Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethyl-2-furfural into 2,5-Furandicarboxylic Acid with Gold Nanoparticle Catalysts. *ChemSusChem*, 2009, 2, 1138-1144.
- **Castillo-Pichardo, L., Martínez-Montemayor, M.M., Martínez, J.E., Wall, K.M., Cubano, L.A.** Dharmawardhane, S. Inhibition of mammary tumors growth and metastases to bone and liver by dietary grape polyphenols. *Clin. Experiment. Metas.*, 2009, 26, 505-516.
- **Chan, M.Y., Huang, H.I., Fenton, M.R., Fong, D.** In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem. Pharmacol.*, 1998, 55, 1955-1962.
- **Cheesman, K.H., Slater, T.F.** Free Radicals in Medicine. *Br. Med. Bull.*, 1998, 49, 118-121.
- **Cheesman, K.H., Slater, T.F.** An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 1998, 49, 481-493.
- **Chun, O.K., Kim, D.O., Smith, N., Schroeder, D., Han, J.T., Lee, C.Y.** Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J. Sci. Food Agr.*, 2005, 85, 1715-1724.
- **CIE Colorimeter Committee.** Technical notes: working program on colour differences. *J. Optical Soc. of Am.*, 1974, 64, 896-897.
- **Cook, N., Samman, S.** Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, 1996, 7, 66-76.

-
- **Cortés, C., Esteve, M.J., Frígola, A.** Color of orange juice treated by High intensity pulsed electric fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food Control*, 2008, 19, 151-158.
 - **Cottier, L., Descotes, G.R., Soro, Y.** Heteromacrocycles from ring-closing metathesis of unsaturated furanic ethers. *Synt. Commun.*, 2003, 33, 4285-4295.
 - **Cotelle, N.** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Topics Med. Chem.*, 2001, 1, 569-590.
 - **Coultate, T.P., Carandang, R., Ziegler, G.** Food: The Chemistry of Its Components. *J. Chem. Educ.*, 1998, 75, 152-152.
 - **Coughtrie, M.W.** Sulfation through the looking glass - recent advances in sulfotransferase research for the curious. *Pharmacogenomics J.*, 2002, 2, 297-308.
 - **Crosby, G.A.** Lignans in food and nutrition. *Food Tech.*, 2005, 59, 32-35.
 - **D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 2007, 43, 348-361.
 - **Dai, J., Mumper, R.J.** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, 15, 7313-7352.
 - **Dahlawi, H., Jordan-Mahy, N., Clench, M.R., Le maître, C.L.** Bioactive actions of pomegranate fruit extracts on leukemia cell lines in vitro hold promise for new therapeutic agents for leukemia. *Nutr. Cancer*, 2012, 64, 100-110.
 - **Davies, K.J.A.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 9895-9901.
 - **Day, A.J., Williamson, G.** Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br J Nutr.*, 2001, 1, 105-110.

- **De la Fuente-Arrillaga, C., Ruiz, Z.V., Bes-Rastrollo, M., Sampson L., Martínez-González MA.** Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Health Nutr.*, 2010, 13, 1364-1372.
- **De Gaetano, G., De Curtis, A., di Castelnuovo, A., Donati, MB., Lacoviello, L., Rotondo, S.** Antithrombotic effect of polyphenols in experimental models: a mechanism of reduced vascular risk by moderate wine consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002, 957, 174-188.
- **De Salvo, V.L., Gimeno, S.G.** Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire. *Rev. Saude Public.*, 2002, 36, 505-512.
- **Dehkharghanian, M., Lacroix, M., Vijayalakshmi, M.A.** Antioxidant properties of green tea polyphenols encapsulated in caseinate beads. *Dairy Sci. Technol.*, 2009, 69, 485-499.
- **Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J.** Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50, 799-804.
- **Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P., Morales, F.J.** Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, 51, 341-351.
- **Diplock, A.T., Charuleaux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J.** Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British J. Nutr.*, 1998, 80, S77-S112.
- **Diker, K.S., Akan, M., Hascelik, G., Yurdakok, M.** The bacterial activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1991, 12, 34-35.
- **Documentation for updating the USDA** database for the flavonoid content of Selected Foods, Release 3, 2011. Disponible en <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/usda-database-for-the-flavonoid-content-of-selected-foods-release-31-december-2013/>. Accedido el 27 de noviembre de 2016.

- **Duarte, J., Andriambeloson, E., Diebolt, M., Andriantsitohaina, R.** Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res.*, 2004, 53, 595-602.
- **Dumesic, J.A, Roman-Leshkov, Y.** Solvent Effects on Fructose Dehydration to 5-Hydroxymethylfurfural in Biphasic Systems Saturated with Inorganic Salts. *Top. Catal.*, 2009, 52, 297-303.
- **European Food Safety Authority (EFSA Publication).** Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Flavouring Group Evaluation 13: Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14. *EFSA J.*, 2005, 215, 1-73.
- **Erkkola, M., Karppinen, M., Javanainen, J., Rasanen, L., Knip, M., Virtanen, S.M.** Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire for pregnant Finnish women. *Am. J. Epidemiol.*, 2001, 154, 466-476.
- **Escribano-Bailón, M.T., Beulga-Santos, C., Rivas-Gonzalo J. C.** Anthocyanins in Cereals. *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1054, 129-141.
- **Falany, C.N.** Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.*, 1997, 11, 206-216.
- **Fan, E., Zhang, L., Jiang, S., Bai, Y.** Beneficial effects of resveratrol on atherosclerosis. *J. Med. Food* 2008, 11, 610-614.
- **FAO/WHO.** Food consumption and exposure assessment of chemicals. Report of a FAO/WHO Consultation, Geneva, Switzerland, 10–14 February 1997. WHO/FSF/FOS/97.5. Geneva: WHO
- **Förstermann, U.** Oxidative stress in vascular disease: Causes, defense, mechanisms, and potential therapies. *Nature Clin. Pract. Cardio. Med.*, 2008, 5, 338-349.
- **Ferrándiz, M.L., Alcaraz, M.J.** Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Inflam. Immunomod.*, 1991, 32, 283-288.

- **Feskanich, D., Rimm E. B., Giovannucci E. L., Colditz G. A., Stampfer M. J., Litin L. B., Willett W.** Reproducibility and validity of food intake measurements from a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc*, 1993, 93, 790-796.
- **Finkel, T., Holbrook, N.J.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000, 408, 239-247.
- **Flaschenträger, B., Cagianut, B., Meier, F.** Die Bildung von Furan-2,5-dicarbonsäure aus d-Glucuron und d-Galakturonsäure beim Menschen. Ein neuer Abbauweg für Kohlenhydrate. *HCA.*, 1945, 1489-1496.
- **Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Kinsella, J.E.** Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.*, 1993, 341, 1103-1104.
- **Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E., Kozukue, N.** Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, 2006, 69, 354-361.
- **Garzón, G.A.** Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biol. Colomb.*, 2008, 13, 27-36.
- **Gendron, M.E, Théorêt, J.F., Mamarbachi, A.M., Drouin, A., Nguyen, A., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Merhi, Y., Thorin, E.** Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010, 298, H2062-H2070.
- **Glatt, H., Meini, W.** Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2004, 369, 55-68.
- **Glatt, H.R., Sommer, Y.** Health risks by 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: Skog, K., Alexander, J., editors. Acrylamide and other health hazardous compounds in heat-treated foods. *Cambridge: Woodhead Publishing*, 2006, 328-357.
- **Glatt, H.R., Schneider, H., Murkovic, M., Monien, B.H., Meini, W.** Hydroxymethyl-substituted furans: mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strains engineered for

- expression of various human and rodent sulphotransferases. *Mutagenesis.*, 2011, 27, 41-48.
- **Gibson, R.S.** Principles of Nutritional Assessment. *New York: Oxford University Press*, 1990.
 - **Godfrey, V., Chen, L., Griffin, R., Lebetkin, E., Burka, L.** "Distribution and metabolism of (5-hydroxymethyl)furfural in male F344 rats and B6C3F1 mice after oral administration," *J. Toxic. Environm. Health A.*, 1999, 57, 199-210.
 - **Gökmen, V., Serpen, A., Fogliano, V.** Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends Food Sci. Tech.*, 2009, 20, 278-288.
 - **González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., Sánchez de Medina, F.** Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2011, 51, 331-362.
 - **Goodman & Gilman.** Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica. *McGraw Hill Interamericana.*, 2002, Vol II. 10ª Edición, 1787-1790.
 - **Gorbanev, Y.Y, Klitgaard, S.K, Woodley, J.M., Christensen, C.H., Riisager, A.** Gold-Catalyzed Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural in Water at Ambient Temperature. *ChemSusChem*, 2009, 2, 672-675.
 - **Goswami, S., Dey, S., Jana, S.** Design and synthesis of a unique ditopic macrocyclic fluorescent receptor containing furan ring as a spacer for the recognition of dicarboxylic acids. *Tetrahedron*, 2008, 64, 6358-6363.
 - **Graf, B.A., Milbury, P.E., Blumberg, J.B.** Flavonols, flavones, flavanones and human health: Epidemiological evidence. *J Med Food.*, 2005, 8, 281-290.
 - **Grace, S.C.** Phenolics as antioxidants. In *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (ed. Smirnoff, N.) Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2005, 141-168.
 - **Gruter, G.J.M.D., Dautzenberg F.** Method for the synthesis of organic acid esters of 5-hydroxymethylfurfural and their use. EP 2 050 742 A1, 2009.

-
- **Gruter, G.J.M.M, Manzer, L.E, de Sousa Dias, A.S., Dautzenberg, F., Purmova, J.** Hydroxymethylfurfural ethers and esters prepared in ionic liquids. EP2183236 B1, 2010.
 - **Gry, J., Black, L., Eriksen, F.D., Pilegaard K., Plumb J., Rhodes M., Sheehan D., Kiely M., Kroon P.A.** EuroFIR-BASIS a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 2007, 18, 434-444.
 - **Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A., Ferreira I.** Infusions and Decoctions of Mixed Herbs used in Folk Medicine: Synergism in Antioxidant Potential. *Phytother. Res.*, 2011, 25, 1209-1214.
 - **Halliwel, B.** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.*, 1990, 9, 1-32.
 - **Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C.** The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, 280, 1-8.
 - **Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C.** Free radicals in biology and medicine (3rd Ed). Oxford University Press., 1999.
 - **Harbone, J. B.** The Flavonoids: advances in research since 1986. *Chapman and Hall*, 1993, London.
 - **Herrmann, K.** Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1989, 28, 315-347.
 - **Hernández Ávila, M., Romieu, I., Parra, S., Hernández Ávila, J., Madrigal, H., Willett, W.** Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico City. *Salud Publica Mex.*, 1998, 40, 133-140.
 - **Hodgson, J.M., Chan, S.Y., Puddey, I.B., Devine, A., Wattanapenpaiboon, N., Wahlqvist, M.L., Lukito, W., Burke, V., Ward, N.C., Prince, R.L., Croft, K.D.** Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects. *Br. J. Nutr.* 2004, 91, 301-306.

-
- **Hollebeeck, S., Winand, J., Herent, M.F., During, A., Leclercq, J., Larondelle, Y., Schneider, J.** Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica Granatum L.*) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food Funct.*, 2012, 3, 875-885.
 - **Hollman, P.C.H., Arts I.C.W.** Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, 80, 1081-1093.
 - **Hu, F.B.** Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2002, 13, 3-9.
 - **Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 1841-1856.
 - **Hunter, R.S.** Photoelectric tristimulus colorimetry with three filters. NBS Circular C429, Washington D.C.: Department of Commerce. 1942.
 - **Husøy, T., Haugen, M., Murkovic, M., Jöbstl, D., Stølen, L.H., Bjellaas, T., Rønningborg, C., Glatt, H., Alexander, J.** Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46, 3697-3702.
 - **Ibarz, A., Garza, S., Garvín, A., Pagán, J.** Degradation of mandarin juice concentrates treated at high temperatures. *J. Food Process. Eng.*, 2011, 34, 682-696.
 - **Isogai, E., Isogai, H., Takeshi, K., Nishikawa, T.** Protective effect of Japanese green tea extract on gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Microbiol. Immunol.*, 1998, 42, 125-128.
 - **Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., Eisenbrand, G.** 5-Hydroxymethylfurfural: Assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 38, 801-809.
 - **Jayaraman, P., Sakharkar, M.K., Lim, C.S., Tang, T.H., Sakharkar, K.R.** Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Int. J. Biol. Sci.*, 2010, 6, 556-568.

- **Jiménez, L.G., Martín Moreno, J.M.** Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario. In: *Nutrición y Salud Pública – Métodos, bases científicas y aplicaciones*. Ed. *LI Serra, J Aranceta*, 2006, 120-125.
- **Jöbstl, D., Husøy, T., Alexander, J., Bjellaas, T., Murkovic, M.** Analysis of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid (HMFA) the main metabolite of alimentary 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) with HPLC and GC in urine. *Food Chem.* 2010, 123, 814-818.
- **Kang, O.H., Jang, H.J., Chae, H.S., Oh, Y.C., Choi, J.G., Lee, Y.S., Kim, J.H., Kim, Y.C., Sohn, D. H., Park, H., Kwon, D.Y.** Anti-inflammatory mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: Pivotal roles of NF-kB and MAPK. *Pharmacol. Res.*, 2009, 59, 330-337.
- **Katsouyanni, K., Rimm, EB., Gnardellis, C., Trichopoulos, D., Polychronopoulos, E., Trichopoulou, A.** Reproducibility and relative validity of an extensive semi-quantitative food frequency questionnaire using dietary records and biochemical markers among Greek schoolteachers. *Int. J. Epidemiol.*, 1997, 26, S118-S127.
- **Khosa, M.K., Chatha, S.A.S., Hussain, A.I., Zia, K.M., Riaz, H., Aslam, K.** Spectrophotometric quantification of antioxidant phytochemicals in juices from four different varieties of citrus limon, indigenous to Pakistan. *J. Chem. Soc. Pakistan*, 2011, 33, 188-192.
- **Knoops, K.T.B, de Groot, L.C.P.G.M., Kromhout, D., Perrin, A., Moreiras-Varela, O., Menotti, A., van Staveren, W.A.** Mediterranean Diet, Lifestyle Factors, and 10-Year Mortality in Elderly European Men and Women The HALE Project. *JAMA.*, 2004, 292, 1433-1439.
- **Krogholm, K.S., Haraldsdottir, J., Knuthsen, P., Rasmussen, S.E.** Urinary total flavonoid excretion, but not 4-pyridoxic acid or potassium, can be used as a biomarker for the intake of fruits and vegetables. *J. Nutr.*, 2004, 134, 445-451.
- **Kuhnau, J.** The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, 1976, 117-191.

- **Kuhr, S. Engelhardt, U.H.** Determination of flavanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC. *Zeit. Lebens. Forschung A.*, 1991, 192, 526-529.
- **Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., Engelhardt, U.H.** Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 2848-2852.
- **Larrosa, M., Yañez-Gascón, M.J., Selma, M.V., González Sarrías, A., Toti, S., Cerón, J.J., Tomás-Barberán, F., Dolará, P., Espín, J.C.** Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J. Agr. Food Chem.*, 2009, 57, 2211-2220.
- **Lee, H.C., Jenner, A.M., Low C.S., Lee, Y.K.** Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.*, 2006, 157, 876-884.
- **Lester, G., Lewers, K., Medina, M., Saftner, R.** Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *J. Food Comp. Anal.* 2012, 27, 102-107.
- **Lewkowski, J.** Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives. *Arkivoc.*, 2001, 17-54.
- **Li, C.Z., Zhang, Z.H, and Zhao, Z.B.K.** Direct conversion of glucose and cellulose to 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquid under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.*, 2009, 50, 5403-5405.
- **Li, H.F., Chen, S.A., Wu, S.N.** Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, 2000, 45, 1035-1045.
- **Liu, H., Qiu, N., Ding, H., Yoa, R.** Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbs suitable for medical or food uses. *Food Res. Int.*, 2008, 41, 363-370.
- **Liu, R.H.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanisms of action. *J. Nutr.*, 2004, 134, S3479-S3485.

- **López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., Del Valle-Ribes, C.** The study of phenolics compounds as natural antioxidants in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2003, 43, 233-244.
- **Luqman, S., Rizvi, S.I.** Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytother. Res.*, 2006, 20, 303-306.
- **Malekshah, AF., Kimiagar M., Saadatian Elahi, M., Pourshams A., M Nouraié M., Goglaní G., Hoshiarrad A., Sadatsafavi M., Golestan B., Yoonesi A., Rakhshani N., S Fahimi S., Nasrollahzadeh D., Salahi R., Ghafarpour A., Semnani, S., Steghens, J.P, Abnet, C.C., Kamangar, F., Dawsey, S.M., Brennan, P., Boffetta, P., Malekzadeh, R.** Validity and reliability of a new food frequency questionnaire compared to 24 h recalls and biochemical measurements: pilot phase of Golestan cohort study of esophageal cancer. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2006, 60, 971-977.
- **Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81, S230-S242.
- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79, 727-747.
- **Martínez-González, MA., García-Arellano, A., Toledo, E., Salas-Salvador, J., Buil-Cosiales, P., Corella D., Covas M. I., Schröder H., Arós F., Gómez-Gracia E., Fiol M., Ruiz-Gutiérrez V., Lapetra J.** A 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool and Obesity Indexes among High-Risk Subjects: The PREDIMED Trial. *PLoS ONE*, 2012, 7, e43134.
- **Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovanninni, C.** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 2005, 16, 577-586.
- **Medina, E., Garcia, A., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M.** Study of the anti-lactic acid bacteria compounds in table olives. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009, 7, 1286-1291.

- **Medina, M.** Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J. Funct. Foods.*, 2011, 3, 79-87.
- **Mercasa.** La alimentación en España, 2012. Disponible en http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion_2012/index2.html. Accedido el 12 octubre 2016.
- **Mir, S., Serdaroglu, E.** Quantification of hypercalciuria with the urine calcium osmolality ratio in children. *Pediatr. Nephrol.* 2005, 20, 1562-1565.
- **Mitrou, P., Kipnis, V., Thiébaud, A., Reedy, J., Subar, A., Wirfält, E., Flood, A., Mouw, T., Hollenbeck, A.R., Leitzmann, M.F., Schatzkin, A.** Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: result from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Arch. Intern. Med.*, 2007, 167, 2461-2478.
- **Monien, B.H., Frank, H., Seidel, A., Glatt, H.R.,** Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* 2009, 22, 1123-1128.
- **Monien, B.H., Engst, W., Barknowitz, G., Seidel, A., Glatt, H.,** Mutagenicity of 5-Hydroxymethylfurfural in V79 Cells Expressing Human SULT1A1: Identification and Mass Spectrometric Quantification of DNA Adducts Formed. *Chem. Res. Toxicol.* 2012, 25, 1484-1492.
- **Moreau, C., Belgacem, M.N., Gandini, A.** Recent catalytic advances in the chemistry of substituted furans from carbohydrates and in the ensuing polymers. *Top. Catalysis.*, 2004, 27, 11-30.
- **Moreno-Franco, B., García-González A., Montero-Bravo A.M., Iglesias-Gutiérrez, E., Úbeda, N., Maroto-Núñez, L., Adlercreutz, H., Peñalvo, J.L.** Dietary alkylresorcinols and lignans in the Spanish diet: Development of the Alignia database. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 9827-9834.
- **Mukherjee, S., Das, S.K., Vasudevan, D.M.** Role of polyphenols in diet and nutrition- an updated review. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 2009, 5, 149-159.

- **Muros, J., Zabala, M., Oliveras-López, M.J., Rodríguez-Bouzas, P., Knox, E. Rufián-Henares, J.A., López-García de la Serrana, H.** Effect of Physical Activity, Nutritional Education, and Consumption of Extra Virgin Olive Oil on Lipid, Physiological, and Anthropometric Profiles in a Pediatric Population. *J. Phys. Activ. Health* 2015, 12, 1245-1252.
- **Murphy, K.J., Chronopoulos, A.K., Singh, I., Francis, M.A., Moriarty, H., Pike, M.J., Turner, A.H., Mann, N.J., Sinclair, A.J.** Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 77, 1466-1473.
- **Naczki, M., Shahidi, F.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 41, 1523-1542.
- **Nadiya, B., Bernhard, M., Heinz, F., Albrecht, S., & Hansruedi, G.** Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-sulfooxymethylfurfural, a reactive, nephrotoxic metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 78, 414-419.
- **Nagy, S., & Randall, V.** Use of furfural content as an index of storage temperature abuse in commercially processed orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 1973, 21, 272-275.
- **Naqui A, Britton C, Cadenas E.** Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, 55, 137-166.
- **National Toxicology Program,** Toxicology and carcinogenesis studies of 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural (CAS No. 67-47-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, 2008, 554, 1-202.
- **Natsume, M., Osakabe, N., Oyama, M., Sasaki, M., Baba, S., Nakamura, Y., Osawa, T., Terao, J.** Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 34, 840-849.
- **Navarro, P., Pérez-López, A.J., Mercader, M.T., Carbonell-Barrachina, A.A., & Gabaldón, J.A.** (2011). Antioxidant activity, color, carotenoids composition, minerals,

- vitamin C and sensory quality of organic and conventional mandarin juice, cv. Orogrande. *Food Sci. Technol. Int.*, 2011, 17, 241-248.
- **Neveu, V., Pérez-Jiménez J., Vos F., Crespy V., du Chaffaut L., MennenL., KnoxC., Eisner R., Cruz J., Wishart D., Scalbert A.** Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database: J. Biol. Datab. Curat.* 2010, bap024.
 - **Nichols, J.A., Katiyar, S.K.** Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* 2010, 302, 71-83.
 - **Ohara, M., Takagaki, A., Nishimura, S., Ebitani, K.** Syntheses of 5-hydroxymethylfurfural and levoglucosan by selective dehydration of glucose using solid acid and base catalysts. *Appl. Catal. A-Gen.* 2010, 383, 149-155.
 - **Onsekizoglu, P.** Production of high quality clarified pomegranate juice concentrate by membrane processes. *J. Membrane Sci.*, 2013, 442, 264-271.
 - **Osakabe, N., Baba S., Yasuda A., Iwamoto T., Kamiyama M., Takizawa T., Itakura H., Kondo K.** Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic. Res.*, 2001, 34, 93-99.
 - **Pacifi, R.E., Davies, K.J.** Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised. *Gerontology.*, 1991, 37, 166-180.
 - **Pal, S., Ho, N., Santos, C., Dubois, P., Mamo, J., Croft, K., Allister, E.** Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J. Nutr.*, 2003, 133, 700-706.
 - **Palombini, S., Claus, T., Maruyama, S., Carbonera, F., Montanher, P., Visentainer, J., Matsushita, M.** Optimization of a new methodology for determination of total phenolic content in rice employing fast blue BB and QUENCHER procedure. *J. Brazilian Chem. Soc.* 2016, 27, 1188-1194.

-
- **Pan, M.H., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Zhu, N.Q., Ho, C.T., Lin, J.K.** Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin a through cytochrome c release and activation of caspase-1 and caspase-3 in human U937 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 6337-6346.
 - **Pandey, K.B., Rizvi, S.I.** Current understanding of dietary polyphenols and their role in health and disease. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 2009, 5, 249-263.
 - **Pandey, K.B., Rizvi, S.I.** Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. *Phytother. Res.*, 2010, 24, S11-S14.
 - **Pandey, K.B., Rizvi, S.I.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2009, 2(5), 270-278.
 - **Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., Rufián-Henares, J.A.** A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chem.*, 2011, 129, 1926-1932.
 - **Pastoriza, S., Álvarez, J., Végvári, A., Montilla-Gómez, J., Cruz-López, O., Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A.** Relation ship between HMF intake and SMF formation in vivo: An animal and human study. *Mol. Nutr. Food Chem.*, 2017, 61, 1600773.
 - **Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.** Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res. Intern.*, 2006, 39, 791-800.
 - **Pérez-Jiménez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., Scalbert, A.** Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am. J. Clin Nutr.*, 2011, 93, 1-9.
 - **Pérez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R.** Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic. Res.*, 2006, 40, 1054-1065.

- **Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., Puertas, B.** Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 11683-11689.
- **Poulose, S.M., Harris, E.D., Patil, B.S.** Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *J. Nutr.*, 2005, 135, 870-877.
- **Prior, R.L., Wu, X., Gu, L.** Identification and Urinary Excretion of Metabolites of 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural in Human Subjects following Consumption of Dried Plums or Dried Plum Juice. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3744-3749.
- **Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., KahkÖnen, M., Heinonen M., Matta-Riihinen, K., Oksman -aldentey, K. M.** Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, 98, 991-1000.
- **Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A.** Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.*, 2012, 27, 76-89.
- **Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A.** Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol. Res.*, 2013, 68, 125-131.
- **Quitao-Teixeira, L.J., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Mota-Ramos, A., Martín-Belloso, O.** Comparative study on antioxidant properties of carrot juice stabilised by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *J. Sci. Food Agric.*, 2009, 89, 2636-2642.
- **Ramírez-Jiménez A, García-Villanova B, Guerra-Hernández E.** Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Res. Int.*, 2000a, 33, 833-838.
- **Ramírez-Jiménez A, Guerra-Hernández E, García- Villanova B.** 2000b. Browning indicators in bread. *J. Agric. Food Chem.*, 2000b, 46, 4176-4181.
- **Rebeiz, C.A., Juvik, J.A, Rebeiz, C.C.** Porphyrin Insecticides. Concept and Phenomenology. *Pestic. Bioch. Physiol.*, 1998, 30, 11-27.

- **Rodrigo, D., Arranz, J.I., Koch, S., Frígola, A., Rodrigo, M.C., Esteve, M.J.** Physicochemical characteristics and quality of refrigerated Spanish orange-carrot juices and influence of storage conditions. *J. Food Sci.*, 2003, 68, 2111-2116.
- **Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Graü, M.A., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O.** Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 1859-1867.
- **Rodríguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R.; Manca de Nadra, M.C.** Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control.*, 2007, 18, 93-101.
- **Rodríguez-Vaquero, M.J., Aredes Fernández, P.A., Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M.** Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *J. Agric. Food. Chem.*, 2010, 58, 6048-6052.
- **Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez Cordoves, C., Mancheno, J.M., Muñoz, R.** Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 132, 79-90.
- **Roig, M.G., Bello, J.F., Rivera, Z.S., Kennedy, J.F.** Studies on the occurrence on non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Res. Intern.*, 1999, 32, 609-619.
- **Rothwell J.A., Urpi-Sarda M., Boto-Ordóñez M., Knox C., Llorach R., Eisner R., Cruz J., Neveu V., Wishart D., Manach C., Andres-Lacueva C. Scalbert A.** Phenol Explorer 2.0: a major update of the Phenol Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database*, 2012, bas031.
- **Rothwell, J.A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Medina-Remón A., M'Hiri N., García-Lobato P., Manach C., Knox C., Eisner R., S. Wishart D. and Scalbert A.** Phenol Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013, bat070.

-
- **Roura, A.C., Andrés-Lacueva, C., Estruch R., Lamuela-Raventos, R.M.** Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urine. *Clin Chem.*, 2006, 52, 749-752.
 - **Ruf, J.C.** Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 1999, 25, 125-131.
 - **Rufián-Henares, J.A., Guerra-Hernández, E., Garcia-Villanova, B.** Maillard reaction in enteral formula processing: furosine, loss of o-phthalaldehyde reactivity, and fluorescence. *Food Res. Int.*, 2002, 35, 527-533.
 - **Rufián-Henares, J.A., Garcia-Villanova, B., Guerra-Hernández, E.** Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 5354-5358.
 - **Rufián-Henares, J.A., Delgado-Andrade, C., Morales, F.J.** Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *J. Cereal Sci.*, 2006, 43, 63-69.
 - **Rufián-Henares, J.A., Delgado-Andrade, C., Morales, F.J.** Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *J. AOAC Int.*, 2006, 89, 161-165.
 - **Rufián-Henares, J.A., de la Cueva, S.P.** Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Addit. Contam.*, 2008, 25, 1306-1312.
 - **Rufián-Henares, J.A., Delgado-Andrade, C.** Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Res. Int.*, 2009, 42, 394-400.
 - **Rufián-Henares, J.A., Pastoriza, S.** Browning: Non-enzymatic browning. In: Caballero, B., Finglas, P., and Toldrá, F. (eds.) *The Encyclopedia of Food and Health*, 2016, 1, 515-521. Oxford: Academic Press.

- **Rufián-Henares, J.A., Pastoriza, S.** Maillard Reaction. In: Caballero, B., Finglas, P., and Toldrá, F. (eds.) *The Encyclopedia of Food and Health*, 2016, 3, 593-600. Oxford: Academic Press.
- **Rusznayk, S., Gyorgyi, A.S.** Vitamin P - Flavonols as vitamins. *Nature*. 1936, 138: 127.
- **Ryan, L., Prescott, S.L.** Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2010, 45, 1191-1197.
- **Saavedra, M.J., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R.N., Rosa, E.S., Simões, M.** Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med. Chem.*, 2010, 6, 174-183.
- **Saura-Calixto, F., Goñi, I.** Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem.*, 2006, 94, 442-447.
- **Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goni, I.** Intake and bioaccessibility of total polyphenols in whole diet. *Food Chem.*, 2007, 101, 492-501.
- **Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C.** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2005, 45, 287-306.
- **Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H.H., Kelm M.** (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 1024-1029.
- **Serrano, S., Espejo, R., Villarejo, M., Jodral, M.L.** 2007. Diastase and invertase activities in Andalusian honeys. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2007, 42, 76-79.
- **Shahidi, F.** Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung.*, 2000, 44, 158-163.
- **Sachse, B., Meinl, W., Glatt, H., Monien, B.H.** Conversion of Suspected Food Carcinogen 5-Hydroxymethylfurfural by Sulfotransferases and Aldehyde Dehydrogenases in Postmitochondrial Tissue Preparations of Humans, Mice, and Rats. *Toxicol. Sci.*, 2016, 149, 192-201.

- **Shahidi, F., Naczk, M.** Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: *Technomic Publishing Co. Inc.*, 1995.
- **Sharma, A., Jood, S., Sehgal, S.** Antinutrients (phytic acid, polyphenols) and minerals (Ca, Fe) availability (in vitro) of chickpea and lentil cultivars. *Nahrung.*, 1996, 40, 182-184.
- **Sommer, Y., Hollnagl, H., Schneider, H., Glatt, H.R.** Metabolism of 5-HMF to the mutagen, SMF by individual human sulfotransferases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2003, 367, 650-655.
- **Spencer, J.P., Abd El Mohsen, M.M., Minihane, A.M., Mathers, J.C.** Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application nutrition research. *Br. J. Nutr.*, 2008, 99, 12-22.
- **Srinivasan, V.S.** Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *J. Nutr.*, 2001, 131, S1349-S50.
- **Sriwilaijaroen, N., Kadowaki, A., Onishi, Y., Gato, N., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M., Suzuki, Y.** Mume-fural and related HMF derivatives from Japanese apricot fruit juice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A (H1N1) virus. *Food Chem.*, 2011, 127, 1-9.
- **Stella, S.P., Ferrarezi, A.C., dos Santos, K.O., Monteiro, M.** Antioxidant activity of commercial ready-to-drink-orange juice and nectar. *J. Food Sci.*, 2011, 76, 392-397.
- **Stevenson, D.E., Hurst, R.D.** Polyphenolic phytochemicals: Just antioxidant or much more? *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, 64, 2900-2916.
- **Su, X.W., Sangster, M.Y., D'Souza, D.H.** In vitro effects of pomegranate polyphenols on foodborne viral surrogates. *Foodborne Pathol. Dis.*, 2010, 7, 1473-1479.
- **Surh, Y.J., Tannenbaum, S.R.** Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination. *Chem. Res. Toxicol.*, 1994, 7, 313-318.

- **Surh, Y.J., Liem, A., Miller, J.A., Tannenbaum, S.R.** 5-Sulfooxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis*, 1994, 15, 2375-2377.
- **Svendsen, C., Husoy, T., Glatt, H., Paulsen, J.E., Alexander, J.** 5-Hydroxymethylfurfural and 5-Sulfooxymethylfurfural Increase Adenoma and Flat ACF Number in the Intestine of Min/+ Mice. *Anticancer Res.*, 2009, 29, 1921-1926.
- **Teixidó, E., Santos, F.J., Puignou, L., Galceran, M.T.** Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatograph. A.*, 2006, 1135, 85-90.
- **Teubner W., Meinel W., Florian S., Kretzschmar M., Glatt H.** Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem. J.*, 2006, 404, 207-215.
- **Theobald, A., Müller, A., Anklam, E.** Determination of 5-hydroxymethylfurfural in vinegar samples by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 1850-1854.
- **Tipoe, G.L., Leung, T.M., Hung, M.W., Fung, M.L.** Green Tea Polyphenols as an Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agent for Cardiovascular Protection. *Cardiov. Haematol. Disord. Drug Targets.*, 2007, 7, 135-144.
- **Tomás-Barberán, F.A., Clifford, M.N.** Dietary hydroxybenzoic acid derivatives nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, 80, 1024-1032.
- **Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M.A., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Saez, G.T., Ruiz-Gutiérrez, V., Warnberg, J., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M.** Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 2013, 23, 953-959.
- **Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E.B., Medina-Remón, A., Martínez-González, M.A., López-Sabater, M.C., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Gea,**

- A., Ruiz-Gutiérrez, V., Estruch, R., Lamuela-Raventos, R.** Polyphenol intake and mortality risk: a re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Med.*, 2014, 12, 77.
- **Trinidad, I., Fernández, J., Cucó, G., Biarnés, E., Arija, V.** Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: reproducibilidad y validez. *Nutr. Hosp.*, 2008, 23, 242-252
 - **Trichopoulou, A., Kouris-Blazos, A., Wahlqvist, ML., Gnardellis, C., Polychronopoulos, E., Vassilakou, T., Lipworth, L., Trichopoulos, D.** Diet and overall survival in elderly people. *BMJ.*, 1995, 311, 1457-1460.
 - **Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., Trichopoulos, D.** Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.*, 2003, 348, 2599-2608.
 - **Ulbricht, R.J., Northup, S.J., Thomas, J.A.** A review of 5-hydroxymethyl-furfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. App. Toxicol.* 1984, 4, 843-853.
 - **Universidad Técnica de Dresde.** Base de datos de AGEs, 2016. Disponible en https://tu-dresden.de/die_tu_dresden/fakultaet_mathematik_und_naturwissenschaften/fachrichtung_chemie/lc/forschung/age_intro. Accedido el 14 enero 2017.
 - **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, 39, 44-84.
 - **Vall, J., Millan, S., Marti, M.P., Borrás, E., Arola, L.** Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J. Chromatogr. A.*, 2009, 1216, 7143-7172.
 - **Valianpour, F., Abeling N.G.G.M., Duran M., Huijmans, J.G.M., Kulik, W.** Quantification of free sialic acid in urine by HPLC–electrospray tandem mass spectrometry: a tool for the diagnosis of sialic acid storage disease. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 403-409.

- **Van het Hof, K.H., Wiseman, S.A., Yang, C.S., Tijburg, L.B.** Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999, 220, 203-209.
- **Van Deurzen M.P.J., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.** Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural. *J. Carbohydr. Chem.*, 1997, 16, 299-309.
- **Venereo-Gutiérrez, J.R.** Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med Mil.*, 2002, 31, 126-33.
- **Villard, R., Robert, F., Blank, I., Bernardinelli, G., Soldo, T., Hofmann, T.** Racemic and enantiopure synthesis and physicochemical characterization of the novel taste enhancer N-(1-carboxyethyl)-6-(hydroxymethyl)pyridinium-3-ol inner salt. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 4040-4045.
- **Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J.** Dried fruits: Excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2005, 24, 44-50.
- **Waghorn, G.C., Ulyatt, M.J., John, A., Fisher, M.T.** The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British J. Nutr.*, 1987, 57, 115-126.
- **Wang, H., Provan, G.J., Halliwell, K.** Tea flavonoids: Their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci. Tech.*, 2000, 11, 152-160.
- **Wang, H., Cao, G., Prior, R.L.** Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 701-705.
- **Weinshilboum, R.M., Adjei, A.A.** Sulfate conjugation: pharmacogenetics and pharmacogenomics. In Pacifici, G.M. and Coughtrie, M.W.H. (eds), *Human Cytosolic Sulfotransferases*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005, 61-78.
- **Wilcox, L.J., Borradaile, N.M., de Dreu, L.E., Huff, M.W.** Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid. Res.*, 2001, 42, 725-734.

- **Wilcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L.** Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, 44, 275-295.
- **Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., Trichopoulos, D.** Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.*, 1995, 61, 1402S-1406S.
- **Willett, W.C., Sampson, L., Stampfer, M.J., Rosner B., Bain C., Witschi J., Hennekens C., Speizer F.** Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am. J. Epidemiol.*, 1985, 122, 51–65.
- **Williamson, G., Holst, B.** Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *Br. J. Nutr.*, 2008, 99, S55- S58.
- **Yager, C., Wehrli, S., Segal, S.** Urinary galactitol and galactonate quantified by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.* 2006, 366, 216-224.
- **Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y., Shimamura, T.A.** Combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. *Curr. Microbiol.*, 2003, 47, 244-249.
- **Zaitzev, A.N., Simonyan, T.A., Pozdnyakov, A.L.** Hygienic standardization of oxymethylfurfurol in food products. *Vopr. Pitan.*, 1975, 1, 52-55.
- **Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Barricarte, A., Ardanaz, E., Amiano, P., Dorronsoro, M., Larrañaga, N., Martínez, C., Sánchez, M.J., Navarro, C., Chirlaque, M.D., Tormo, M.J., Quirós, J.R., González, C.A.** Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a spanish adult population (EPIC-Spain). *J. Am. Diet. Assoc.*, 2010, 110, 390-398.
- **Zamora-Ros, R., Forouhi, N.G., Sharp, S.J., González, C.A., Buijsse, B., Guevara, M., van der Schouw, Y.T., Amiano, P., Boeing, H., Bredsdorff, L., Clavel-Chapelon, F., Fagherazzi, G., Feskens, E.J., et al.** The association between dietary flavonoid and lignan intakes and incident type 2 diabetes in European populations: the EPIC-InterAct study. *Diabetes Care.*, 2013, 36, 3961-3970.

-
- **Zamora-Ros, R., Jiménez, C., Cleries, R., Agudo, A., Sánchez, M.J., Sánchez-Cantalejo, E., Molina-Montes, E., Navarro, C., Chirlaque, M.D., María Huerta, J., Amiano, P., Redondo, M.L., Barricarte, A., González, C.A.** Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in a Spanish cohort. *Epidemiology*, 2013, 24, 726-733.
 - **Zamora-Ros, R., Serafini, M., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., Martínez-González, M.A., Salas-Salvadó, J., Fiol, M., Lapetra, J., Arósd, F., Covas, M.I., Andres-Lacueva, C.** Mediterranean diet and non-enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: Evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2013, 23, 1167-1174.
 - **Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Rothwell, J.A.; Hemon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Kyro, C.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M.C., et al.** Dietary polyphenol intake in Europe: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur. J. Nutr.*, 2016, 55, 1359-1375.
 - **Zhang, X.M., Chan, C.C., Stamp, D., Minkin, S., Archer, M.C., Bruce, W.R.** Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose. *Carcinogenesis*, 1993, 14, 773-775.
 - **Zhao B.** Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem. Res.*, 2009, 34, 630-638.
 - **Zenebe, W., Pechanova, O., Andriantsitohaina, R.** Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol. Res.*, 2003, 52, 425-432.
 - **Zern, T.L., Fernandez, M.L.** Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.*, 2005, 135, 2291-2294.

VIII. ANEXOS

ANEXO I: CUESTIONARIO RECORDATORIO 24H Y FRECUENCIA DE CONSUMO**DATOS PERSONALES - PREGUNTAS INICIALES****IDENTIFICACIÓN**

Fecha de
entrevista.....

Día de la
semana.....

DATOS PERSONALES

Nombre _____

Edad.....

Sexo (H-Hombre / M-Mujer)

Teléfono.....

1.-) ¿AYER Y ANTEAYER, COMIÓ O CENO FUERA DE CASA?

AYER	ANTEAYER	FIESTA	
Sí, una vez.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sí, las dos veces.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
No.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2.-) CONSIDERA QUE SU DIETA AYER Y ANTEAYER FUE LA HABITUAL?

AYER	ANTEAYER	FIESTA	
Sí, fue un día habitual.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La comida fue especial.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La cena fue especial.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Todas las comidas fueron especiales.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3.-) REALIZA EN LA ACTUALIDAD ALGUNA DIETA/RÉGIMEN/RESTRICCIÓN?

1.- Sí..... Motivo (_____)
2.- No.....

ALIMENTOS	PREPARACIÓN	MEDIDA CASERA	CANTIDAD (gr)
DESAYUNO:			
MEDIA MAÑANA:			
APERITIVO:			
COMIDA:			

OTRO DÍA (FESTIVO)

ALIMENTOS	PREPARACIÓN	MEDIDA CASERA	CANTIDAD (gr)
DESAYUNO:			
MEDIA MAÑANA:			
APERITIVO:			
COMIDA:			

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS					
ALIMENTOS	NUNCA	VECES/DÍA	VECES/ SEMANA	VECES/ MES	VECES/ AÑO

DURANTE EL ÚLTIMO AÑO, CON QUÉ FRECUENCIA CONSUMIÓ LOS SIGUIENTES ALIMENTOS:

CARNE					
Pollo/ carne de aves					
Ternera/toro					
Cerdo					
Cordero					
Conejo					
Jamón Serrano					
Jamón York					
Embutidos (chorizo, salchichas, mortadela etc)					
Hígado, riñón, corazón, sesos					

PESCADO Y MARISCO					
Pescado blanco (merluza, pescada, lenguado)					
Pescado azul (atún, sardina, boquerón, caballa)					
Pescado en conserva					
Calamares, chopitos, pulpo, sepia					
MARISCOS (gambas, langostinos, almejas, mejillones)					
Peces de río (trucha, salmón etc.)					

HUEVOS					
Huevo frito, cocido, tortilla etc.					

LEGUMBRES					
Lentejas					
Garbanzos					
Judías blancas/chícharos					
Guisantes					

CEREALES					
Pan blanco					
Pan integral					
Pan de molde					
Pan tostado					
Arroz (en todas sus modalidades)					

Cereales desayuno					
Cereales desayuno (con chocolate)					
Cereales desayuno (integrales)					

ALIMENTOS	NUNCA	VECES/ DÍA	VECES/ SEMANA	VECES/ MES	VECES/ AÑO
-----------	-------	---------------	------------------	---------------	---------------

Pasta (fideos, macarrones, pizza etc.)					
Patatas (fritas, cocidas, asadas, en tortilla etc.)					

LÁCTEOS

Leche entera					
Leche semidesnatada					
Leche desnatada					
Leche condensada					
Yogur entero					
Yogur desnatado					
Natillas/flan					
Queso fresco					
Queso manchego, bola					
Queso en porciones					
Queso fundido					
Helados					

GRASAS

Mantequilla					
Margarina					
Tocino, manteca					
Mayonesa					
Aceite de oliva virgen					
Aceite de oliva refinado (no virgen)					
Aceite de orujo (oliva)					
Aceite mezcla virgen-refinado					

ALIMENTOS	NUNCA	VECES/ DÍA	VECES/ SEMANA	VECES/ MES	VECES/ AÑO
-----------	-------	------------	---------------	------------	------------

Aceite de semillas (girasol, otros)					
Aceitunas					

VERDURA

Lechuga					
Tomate (natural, frito, en ensaladas)					
Pimiento (natural, frito, en					
Zanahoria					
Judías verdes					

Cebolla					
Col/coliflor					
Acelgas/espinacas					
Espárragos					
Habas frescas					
Champiñón y setas					

FRUTAS

Manzanas					
Peras					
Naranjas/mandarinas					
Plátanos					
Melocotón					
Melocotón en almíbar					
Fresas					
Uvas					
Melón/sandía					
En conserva					

DULCES Y PASTELES

Azúcar					
Miel					
Mermelada					
Chocolate					

ALIMENTOS	NUNCA	VECES/ DÍA	VECES/ SEMANA	VECES/ MES	VECES/ AÑO
Galletas					
Pastas/pasteles					
Bollería (donuts, napolitana,					
BEBIDAS					
Agua					
Zumos de frutas					
Zumos de frutas					
Zumos de frutas envasados(uva)					
Coca cola					
Refrescos					
Cerveza/sidra					
Vino					
Ron/ginebra/coñac/anís/whisky					
FRUTOS SECOS					
Almendras, avellanas,					
Pistachos					
OTROS					
Café					

ALIMENTOS	NUNCA	VECES/ DÍA	VECES/ SEMANA	VECES/ MES	VECES/ AÑO
Tomate frito					
Kétchup					
Cola cao					
Palomitas					
Patatas Chip					
Snack de maíz (fritos de maíz...)					
Pipas					
Cacahuetes					
Almendras					
Vinagre de vino					
Vinagre de módena					

ALIMENTOS	NUNCA	VECES/ DÍA	VECES/ SEMANA	VECES/ MES	VECES/ AÑO
-----------	-------	---------------	------------------	---------------	---------------

PLATOS PREPARADOS

Lomo de cerdo a la parrilla (sartén)					
Paella					
Arroz caldoso					
Patatas cocidas					
Patatas fritas (freidora)					
Tortilla de patatas					
Boquerones fritos					
Lentejas					
Estofado de ternera					
Churros					
Pizza					
Calamares Fritos					
Merluza a la plancha					
Palitos de merluza					
San Jacobos					
Cocido					
Fabada (alubias)					
Pollo asado					
Carne en salsa					
Boquerones en vinagre					
Pollo en salsa					
Hamburguesa (McDonald's, Burger King)					
Albóndigas					
Croquetas					
Empanadillas					

Ejemplo de cómo realizarlo

DURANTE EL ÚLTIMO AÑO, ¿CON QUÉ FRECUENCIA CONSUMIÓ LOS SIGUIENTES ALIMENTOS:

CARNE

Pollo/ carne de aves			3		
Ternera/toro				1	
Cerdo		1			

CONSUMO DE ACEITE

Tipo de aceite _____

Compra semanal media (litros)

N.º de miembros familia

CONSUMO DE PAN

Tipo _____

Compra por día (g)

Sobrante medio por día (g)

Comprobar si la cantidad sobrante del día la aprovecha para el desayuno del día siguiente.

ANEXO II: PESOS Y MEDIDAS CASERAS

Fuente: Carbajal, A y Sánchez-Muniz, FJ. Guía de prácticas (2003). En: Nutrición y dietética. Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales, Universidad de León.

ACEITES

cucharada sopera colmada = 14 g
 cucharada de postre = 5 g
 cucharada de café = 3 g
 cucharada sopera rasa = 10 g
 para una tortilla francesa de 1 huevo =
 8 g
 para un huevo frito = 10 g
 para una ración de tortilla de patatas =
 13 g
 para freír una croqueta/albóndiga = 3 g
 para una ración de ensalada = 10 g
 para una ración de verdura rehogada
 =10 g
 para un "sofrito" (por ración) = 5 g
 para freír 100 g de patatas = 10 g
 para freír una empanadilla = 5 g

ACEITUNAS CON HUESO

unidad = 4 g

ACEITUNAS SIN HUESO

latita (peso escurrido) = 40 g

AGUA

vaso = 200 g

AGUACATE

unidad mediana = 200 g

AJO

diente = 5 g

cabeza = 50 g

ALBARICOQUE

unidad mediana = 50 g

ALBARICOQUE DESECADO

unidad = 30 g

ALBÓNDIGAS PREPARADAS**ENLATADAS**

unidad = 37 g

ALCACHOFA

unidad mediana = 95 g

unidad grande = 130 g

ALCACHOFA CONGELADA

unidad = 30 g

ALCACHOFA EN CONSERVA

lata (peso escurrido) = 240 g

unidad grande = 36 g

unidad mediana = 25 g

ALMEJA

5 unidades enteras = 65 g

ALUBIAS, JUDÍAS SECAS

ración en crudo = 70 g

ANCHOAS EN ACEITE

unidad = 3-4 g

APIO

rama = 200 g

ARROZ

cucharada sopera colmada = 30 g

ración = 70 – 100 g

ración para sopa = 20 - 30 g

ARROZ CON LECHE

unidad = 170 g

ATÚN, BONITO, CABALLA EN**CONSERVA**

lata = 82 g

lata pequeña = 56 g

AZÚCAR

cucharada de café rasa = 2 g

cucharada de café colmada = 4 g

cucharada de postre colmada = 8 g

cucharada de postre rasa = 4 g

cucharada sopera colmada = 25 g

cucharada sopera rasa = 12 g

sobre = 7 g

BACON, PANCETA

loncha delgada = 12 g

loncha = 25 g

BATIDOS

Botella individual = 200 g

BERBERECHOS

5 unidades enteras = 40 g

BERBERECHOS, ALMEJAS EN

CONSERVA

lata (peso escurrido) = 65 g

BERENJENA

unidad pequeña = 200 g

unidad mediana = 270 g

unidad grande = 350 g

BESUGO

rodaja mediana = 125 g

BISCOTES

unidad = 10 g

BOLLERÍA

unidad mediana = 80 g

BOLLO CON CREMA

unidad = 60 g

BOMBONES

unidad mediana = 15 g

unidad pequeña = 11 g

unidad grande = 20 g

BONIATO, BATATA

mediana = 150 g

BOQUERÓN, ANCHOA

unidad mediana = 20 g

BUTIFARRA

unidad mediana = 150 g

unidad grande = 200 g

CABEZA DE CERDO, CHICHARRONES

rodaja = 20 g

CACAHUETE

ración = 20 g

CACAO EN POLVO

cucharada de postre = 9 g

cucharada sopera = 20 g

CAFÉ SOLUBLE EN POLVO

cucharada de postre colmada = 2 g

cucharada de postre rasa = 1 g

sobre = 2 g

CAFÉ, INFUSIÓN

taza pequeña = 50 g

CALABACÍN

unidad mediana = 100 g

unidad grande = 200 g

CALDO EN CUBITOS

unidad = 11 g

CAQUI

unidad mediana = 200 g

unidad grande = 250 g

CARACOLES

unidad = 10 g

CARAMELOS

unidad = 5 – 10 g

CARNES

ración = 100-150 g

CARNE PICADA, HAMBURGUESAS

unidad hamburguesa = 90 g

CASTAÑA

unidad = 10 g

CAVA

copa = 80 - 120 g

CEBOLLA

unidad grande = 270 g

unidad mediana = 150 g

unidad pequeña = 100 g

CEREZAS, PICOTAS

10 unidades = 50 g

CERVEZA

mediana = 300 g

lata = 330 g

caña = 200 g

botellín = 200 g

CHAMPIÑÓN EN CONSERVA

Latita (peso escurrido) = 85 g

CHICLE

unidad = 2 – 5 g

CHIRIMOYA

unidad mediana = 200 g

unidad grande = 350 g

CHIRLAS

5 unidades enteras = 40 g

CHOCOLATE

tableta = 150 g

CHORIZO

rodaja = 10 g

CHULETA DE CERDO

unidad = 80 - 120 g

CHULETA DE CORDERO

unidad = 50 – 90 g

CHULETA DE TERNERA

unidad = 180 - 250 g

CHURROS

unidad = 9 g

CIRUELA

unidad grande = 80 g

unidad mediana = 50 g

CIRUELA SECA CON HUESO

unidad = 15 g

CIRUELA SECA SIN HUESO

unidad = 10 g

CLARA DE HUEVO

60% del peso del huevo entero

COLES DE BRUSELAS

unidad = 25 g

CONFITURA

cucharada sopera = 25 g

cucharada de postre = 13 g

CREMA CATALANA

unidad = 125 g

CREMA DE CACAO Y AVELLANAS

cucharada de postre = 15 g

cucharada sopera = 25 g

para untar una tostada = 30 g

CROQUETAS CONGELADAS

unidad = 20 – 30 g

CRUASÁN

unidad mini = 20 g

unidad grande = 90 g

CUAJADA

unidad = 150 g

DÁTIL SECO CON HUESO

unidad = 10 g

DÁTIL SECO SIN HUESO

unidad = 8 g

DONUTS

unidad = 50 g

EMPANADILLAS CONGELADAS

unidad = 25 - 35 g

ENDIVIA

hoja = 7 g

unidad grande = 150 g

ENSAIMADA

unidad grande = 90 g

ESPÁRRAGO

unidad grande = 25 g

FIDEOS

puñado = 23 g

ración para sopa = 20 - 25 g

FLAN

unidad = 125 g

FOIE-GRÁS, PATÉS

para untar una tostada = 15 g

FRESA, FRESÓN

unidad mediana = 17 g

FRUTOS SECOS, MEZCLA

ración = 30 g

GALLETAS

unidad (media de varios tipos) = 8 g

GALLETAS (COOKIES)

unidad mediana = 15 g

GALLETAS CUBIERTAS DE CHOCOLATE

unidad (media de varios tipos) = 10 g

GALLETAS TIPO MARÍA

unidad = 6 g

GALLETAS SALADAS

unidad = 4 g

GALLETAS TIPO SANDWICH

unidad (media de varios tipos) = 25 g

GARBANZOS

ración en crudo = 70 g

GRANADA

unidad = 275 g

GUISANTES EN CONSERVA

latita (peso escurrido) = 95 g

HAMBURGUESA COCINADA

unidad = 100 – 130 g

HARINA

cucharada sobera rasa = 10 g

cucharada sobera colmada = 17 g

cucharada de postre rasa = 3 g

cucharada de postre colmada = 6 g

cucharada de café rasa = 2 g

cucharada de café colmada = 4 g

para rebozar una ración = 10 g

HELADOS

bola grande = 160 g

bola mediana = 115 g

bola pequeña = 75 g

con palo = 80 – 125 g

HIGOS SECOS

unidad = 14 g

HIGOS, BREVAS

unidad = 40 g

HUEVO

unidad pequeña = 55 g

unidad mediana = 60 g

unidad grande = 65 g

supergrande = 70 g

JALEAS

cucharada sopera = 25 g

cucharada de postre = 13 g

JAMÓN COCIDO (YORK, DULCE, ETC.)

loncha fina = 20 g

loncha = 30 - 40 g

JAMÓN SERRANO

loncha = 30 g

KETCHUP

cucharada sopera = 17 g

cucharada de postre = 9 g

sobre = 11 g

KIWI

unidad mediana = 100 g

LASAÑA

unidad = 12 g

ración = 38 g

LECHE

vaso = 200 g

tazón = 360 g

taza = 250 g

cucharada sopera = 15 g

cucharada de postre = 10 g

cucharada de café = 5 g

LECHE CONDENSADA

cucharada sopera = 20 g

cucharada de postre = 10 g

LECHE EN POLVO, SIN DILUIR

cucharada de postre colmada = 6 g

cucharada de postre rasa = 3 g

cucharada sopera colmada = 15 g

cucharada sopera rasa = 10 g

LECHUGA

hoja grande = 10 g

LEGUMBRES

ración en crudo = 70 g

LENTEJAS

ración en crudo = 70 g

LEVADURA QUÍMICA EN POLVO

sobre = 16 g

cucharada sopera rasa = 10 g

cucharada de postre = 4 g

LICORES

copa = 30 – 60 g

LIMÓN

unidad mediana = 110 g

rodaja = 15 g

LOMO EMBUCHADO

loncha = 10 g

MAGDALENAS

unidad pequeña = 27 g

unidad grande = 42 g

MANDARINA

unidad mediana = 85 g

unidad pequeña = 60 g

unidad grande = 120 g

MANTECA DE CERDO

cucharada sopera = 30 g

cucharada de postre = 15 g

MANTEQUILLA Y MARGARINA

nuez = 15 g

porción de cafetería = 15 g

para untar una galleta = 5 g

para untar una tostada = 15 g

MANZANA

unidad pequeña = 150 g

unidad mediana = 200 g

unidad grande = 250 g

MAYONESA COMERCIAL

cucharada sopera = 28 g

cucharada de postre = 14 g

MAZAPÁN

unidad = 15 g

MEDIAS NOCHES

unidad = 30 g

MEJILLÓN

unidad entera = 30 g

MEJILLÓN EN CONSERVA

lata (peso escurrido) = 70 g

unidad pequeña = 4 g

unidad mediana = 8 g

MELOCOTÓN

unidad mediana = 200 g

MERMELADA

porción de cafetería = 15 g

cucharada de postre = 13 g

cucharada sopera = 25 g

MIEL

cucharada sopera = 40 g

cucharada de postre = 20 g

MORCILLA

rodaja = 15 g

unidad = 100 g

MORTADELA, CHOPPED

loncha = 17 g

MOUSSE DE CHOCOLATE

unidad = 70 g

MUESLI

ración = 40 g

NABO

unidad mediana = 125 g

NARANJA

unidad pequeña = 170 g

unidad grande = 270 g

unidad mediana = 225 g

NATA

cucharada sopera = 15 g

NATILLAS

unidad = 140 g

NECTARINA

unidad = 200 g

NÍSPERO

unidad pequeña = 60 g

unidad grande = 100 g

NUECES CON CÁSCARA

unidad = 13 g

OSTRAS

unidad = 50 g

PALMERAS

unidad grande = 90 g

PAN

rebanada = 30 g

panecillo/barrita = 80 g

rebanada de pan payés = 60 g

picos o colines pequeños (unidad) = 2 g

rebanada grande = 40 g

PAN DE MOLDE

rebanada pequeña = 16 g

rebanada grande = 40 g

rebanada mediana = 20 g

panecillo para hamburguesa = 55 g

PAN RALLADO

cucharada sopera rasa = 6 g

cucharada sopera colmada = 12 g

cucharada de postre rasa = 2 g

cucharada de postre colmada = 4 g

cucharada de café colmada = 2 g

cucharada de café rasa = 1 g

PAN TOSTADO

biscote = 10 g

PASTA

canelón, ración = 38 g

canelón, unidad = 6 g

fideos, ración para sopa = 20 – 25 g

macarrones, espaguetis (ración) = 70–
100 g

PASTAS DE TÉ

unidad = 20 g

PATATA

unidad pequeña = 100 g

unidad mediana = 170 g

unidad grande = 240 g

PATATAS FRITAS DE BOLSA

bolsa = 100 g

PATÉ

para untar una tostada = 15 g

PECHUGA DE PAVO

loncha = 25 g

PECHUGA DE POLLO

unidad = 150 g

PEPINO

unidad mediana = 125 g

ración = 100 g

PERA

unidad grande = 240 g

unidad mediana = 190 g

unidad pequeña = 140 g

PESCADOS

ración = 125-200 g

PIMIENTO MORRÓN

unidad grande = 67 g

PIMIENTO ROJO

unidad grande = 280 g

unidad mediana = 180 g

PIMIENTO VERDE

unidad pequeña = 100 g

unidad mediana = 180 g

unidad grande = 250 g

PIPAS DE GIRASOL CON CÁSCARA

puñado = 25 g

PISTACHO CON CÁSCARA

puñado = 45 g

PIZZA

ración = 160 g

PIÑA

rodaja = 160 g

PIÑA EN ALMÍBAR

rodaja pequeña = 35 g

rodaja mediana = 50 g

rodaja grande = 70 g

PIÑÓN

cucharada sopera = 11 g

PLÁTANO

unidad pequeña = 125 g

unidad mediana = 160 g

unidad grande = 225 g

POLLO, GALLINA

ración = $\frac{1}{4}$ de pollo (300 g)

POMELO

unidad = 375 g

PORRAS

unidad = 29 g

PUERRO

unidad mediana = 75 g

PURÉ DE PATATA EN ESCAMAS SIN**RECONSTITUIR**

cucharada sopera = 6 g

QUESOS

ración = 40 – 60 g

QUESO DE BOLA

loncha = 20 g

QUESO DE BURGOS

tarrina = 75 g

QUESO DE SANDWICH

loncha = 20 g

QUESO EN PORCIONES

unidad = 20 g

QUESO MANCHEGO SEMICURADO

loncha = 45 g

QUESO RALLADO

cucharada sopera = 11 g

RÁBANO

unidad mediana = 40 g

unidad pequeña = 20 g

manejo = 200 g

REFRESCOS, GASEOSAS, COLAS, BITER

vaso = 200 g

lata = 330 g

REMOLACHA EN CONSERVA

rodaja = 6 g

SAL DE MESA

pellizco = 2 g

cucharada sopera colmada = 25 g

cucharada sopera rasa = 17 g

cucharada de postre colmada = 8 g

cucharada de postre rasa = 6 g

cucharada de café colmada = 4 g

cucharada de café rasa = 2 g

SALAMI

loncha = 15 g

SALCHICHAS FRESCAS

unidad pequeña = 40 g

unidad mediana = 100 g

SALCHICHAS TIPO FRANCKFURT

unidad pequeña = 25 g

unidad grande = 45 g

SALCHICHÓN

rodaja = 13 g

SALMÓN AHUMADO

loncha = 20 g

SALVADO DE TRIGO

cucharada sopera = 10 g

SARDINA

unidad mediana = 40 g

SARDINA EN CONSERVA

lata (peso escurrido) = 85 g

unidad grande = 20 g

unidad pequeña = 5 g

SÉMOLA DE TRIGO

cucharada sopera colmada = 15 g

SIDRA

vaso = 160 g

SOBAOS

unidad = 40 g

SOPAS DESECADAS

ración = 25 g

TAPIOCA

cucharada sopera = 15 g

TOMATE

unidad pequeña = 90 g

unidad mediana = 150 g

unidad grande = 250 g

rodaja = 20 g

TOMATE ENTERO ENLATADO

unidad = 70 g

TOMATE FRITO

cucharada de postre = 8 g

cucharada sopera = 15 g

UVAS

racimo grande = 250 g

racimo mediano = 160 g

UVAS PASAS

puñado = 40 g

VERDURAS

ración = 200 –300 g

VERMUT

copa = 100 g

VINAGRE

cucharada de café = 1 g

cucharada de postre = 3 g

cucharada sopera = 7 g

VINO DE MESA

vaso = 90 g

VINOS DULCES, FINOS

copa = 75 g

YEMA DE HUEVO

30% del peso del huevo entero

YOGUR

unidad = 125 g

unidad de cristal = 140 g

ZANAHORIA

unidad pequeña = 40 g

unidad mediana = 80 g

unidad grande = 100 g

ZUMOS

vaso = 200 g

cucharada sopera = 15 g

cucharada de postre = 10 g

cucharada de café = 5 g

ANEXO III:

CEREALES Y ARROZ: pan blanco, pan integral, pan molde, pan tostado, cereales desayuno, cereales con chocolate, cereales integrales, pasta, galletas, bollería, churro, pizza, paella y arroz caldoso.

LACTEOS Y DERIVADOS: leche entera, leche semi, leche desnatada, leche condensada, yogur entero, yogur desnatado, natilla, flan, helados, crema de cacao y avellanas, queso fresco, queso manchego, queso en porciones, queso fundido (en lonchas).

FRUTAS, VERDURAS, TUBÉRCULOS: patatas, aceitunas, melocotón en almíbar, frutas en conserva, mermeladas, patatas cocidas, patatas fritas, lentejas, cocido, fabada, frutos secos (almendra/avellanas/cacahuets, pistachos, pipas, cacahuets, almendras).

BEBIDAS: zumos de frutas, refrescos, cerveza/sidra, vino.

CARNES, EMBUTIDOS, PESCADOS Y HUEVO: jamón cocido, embutidos, lomo a la parrilla, estofado ternera, san jacobos, carne en salsa, hamburguesa, albóndigas, pescado en conserva, boquerones fritos, calamares fritos, merluza plancha, palitos merluza, huevo frito/cocido/tortilla.

EDULCORANTES Y ESTIMULANTES: azúcar, miel, chocolate, café, cola cao.

SALSAS: mayonesa, tomate frito, ketchup.

OTROS: palomitas, patatas chips, snacks maíz, vinagre vino, vinagre balsámico, croquetas, empanadillas, tortilla patata.

ANEXO IV:

Food Group	Food Sub-Grupo	Food	Polyphenols, total
Pulses - Beans - Other beans	Seeds	Adzuki bean, whole, raw	8970,0
Nuts	Seeds	Almond	287,1
Nuts	Seeds	Almond, dehulled	61,8
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	American cranberry	315,0
Herbs	Seasonings	Anise herb, dried	180,0
Fruits – Pomes	Fruits and fruit products	Apple [Cider], peeled	250,9
Fruit juices - Pome juices	Non-alcoholic beverages	Apple [Cider], pure juice	142,6
Fruits – Pomes	Fruits and fruit products	Apple [Dessert], peeled	130,9
Fruit juices - Pome juices	Non-alcoholic beverages	Apple [Dessert], pure juice	33,9
Fruits – Pomes	Fruits and fruit products	Apple [Dessert], whole	201,5
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Apricot	133,0
Leaf vegetables	Vegetables	Arugula, raw	136,4
Shoot vegetables	Vegetables	Asparagus, raw	75,1
Fruit vegetables	Vegetables	Avocado, raw	152,1
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Banana	154,7
Cereals	Cereals and cereal products	Barley, whole grain flour	72,9
Beers	Alcoholic beverages	Beer [Alcohol free]	12,2
Beers	Alcoholic beverages	Beer [Ale]	52,3
Beers	Alcoholic beverages	Beer [Dark]	41,6
Beers	Alcoholic beverages	Beer [Regular]	27,8
Leaf vegetables	Vegetables	Beet greens, raw	61,1
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Bilberry	525,0
Cabbages	Vegetables	Black cabbage, raw	108,6
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Black chokeberry	1752,1

Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Black elderberry	1950,0
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Black huckleberry	485,2
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Black raspberry	980,0
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Blackberry	569,4
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Blackcurrant	820,6
Wines - Berry wines	Alcoholic beverages	Blackcurrant, wine	69,8
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Bog bilberry	161,0
Nuts	Seeds	Brazil nut	244,0
Cereal products	Cereals and cereal products	Bread, whole grain flour	154,3
Cereal products	Cereals and cereal products	Breakfast cereals, oat, whole-meal	183,4
Pulses - Beans - Other beans	Seeds	Broad bean seed, dehulled, raw	33,2
Pulses - Beans - Other beans	Seeds	Broad bean seed, whole, raw	1039,0
Cabbages	Vegetables	Broccoli, raw	198,6
Cabbages	Vegetables	Brussel sprouts, raw	220,8
Cereals	Cereals and cereal products	Buckwheat, refined flour	157,5
Cereals	Cereals and cereal products	Buckwheat, thermally treated groats	455,0
Cereals	Cereals and cereal products	Buckwheat, whole grain flour	737,3
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Buffalo	958,0
Root vegetables	Vegetables	Burdock root, raw	141,2
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Canada blueberry	656,0
Fruits – Gourds	Fruits and fruit products	Cantaloupe	109,6
Spices	Seasonings	Capers	3600,0
Spices	Seasonings	Caraway	2913,3
Spices	Seasonings	Cardamom	602,6
Root vegetables	Vegetables	Carrot, raw	57,8
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Cascade huckleberry	296,8
Nuts	Seeds	Cashew nut	232,9

Cabbages	Vegetables	Cauliflower, raw	81,7
Root vegetables	Vegetables	Celeriac, raw	59,0
Stalk vegetables	Vegetables	Celery stalks, raw	13,6
Spices	Seasonings	Ceylan cinnamon	9700,0
Wines - Sparkling wines	Alcoholic beverages	Champagne	18,8
Nuts	Seeds	Chestnut, raw	2756,7
Leaf vegetables	Vegetables	Chicory [Red], raw	129,5
Fruit vegetables	Vegetables	Chilli pepper [Green], raw	243,4
Fruit vegetables	Vegetables	Chilli pepper [Red], raw	326,4
Fruit vegetables	Vegetables	Chilli pepper [Yellow], raw	349,1
Herbs	Seasonings	Chives, fresh	80,9
Cocoa – Chocolate	Cocoa	Chocolate, dark	1859,9
Cocoa – Chocolate	Cocoa	Chocolate, milk	854,3
Ciders	Alcoholic beverages	Cider	98,3
Pulses - Beans - Other beans	Seeds	Climbing bean, whole, raw	109,0
Spices	Seasonings	Cloves	16047,3
Cocoa - Cocoa powders	Cocoa	Cocoa, powder	1104,5
Coffee beverage - Unknown Coffee beverages	Non-alcoholic beverages	Coffee beverage [Filter]	266,7
Coffee beverage - Unknown Coffee beverages	Non-alcoholic beverages	Coffee beverage [Filter], decaffeinated	268,2
Pulses - Beans - Common bean	Seeds	Common bean [Black], dehulled, raw	664,8
Pulses - Beans - Common bean	Seeds	Common bean [Black], whole, raw	1390,8
Pulses - Beans - Common bean	Seeds	Common bean [Others], dehulled, raw	495,7
Pulses - Beans - Common bean	Seeds	Common bean [Others], whole, raw	1269,6

Pulses - Beans - Common bean	Seeds	Common bean [White], dehulled, raw	47,3
Pulses - Beans - Common bean	Seeds	Common bean [White], whole, raw	137,8
Cabbages	Vegetables	Common cabbage [Green], raw	88,6
Cabbages	Vegetables	Common cabbage [Red], raw	348,0
Cabbages	Vegetables	Common cabbage [White], raw	15,3
Herbs	Seasonings	Common sage, dried	2919,7
Herbs	Seasonings	Common sage, fresh	185,2
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Common sage, tea	43,2
Herbs	Seasonings	Common thyme, dried	1815,0
Herbs	Seasonings	Common thyme, fresh	1173,3
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Common thyme, tea	51,1
Cereals	Cereals and cereal products	Common wheat, germ	696,2
Cereals	Cereals and cereal products	Common wheat, refined flour	68,4
Cereals	Cereals and cereal products	Common wheat, whole grain flour	90,5
Spices	Seasonings	Coriander seed	357,4
Herbs	Seasonings	Coriander, dried	2260,0
Herbs	Seasonings	Coriander, fresh	158,9
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Coriander, tea	11,9
Gourds	Vegetables	Cucumber, raw	21,0
Spices	Seasonings	Cumin	2038,3
Spices - Spice blends	Seasonings	Curry, powder	1075,0
Leaf vegetables	Vegetables	Dandelion, raw	385,5
Dried fruits - Dried other fruits	Fruits and fruit products	Date, dried	487,7
Fruits - Other fruits	Fruits and fruit products	Date, fresh	61,3
Herbs	Seasonings	Dill, dried	1250,0
Herbs	Seasonings	Dill, fresh	208,2

Pulses – Peas	Seeds	Dried pea, dehulled, raw	16,1
Pulses – Peas	Seeds	Dried pea, whole, raw	118,7
Fruit vegetables	Vegetables	Eggplant [Purple], whole, raw	61,1
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	European cranberry	139,5
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Evergreen huckleberry	644,0
Shoot vegetables	Vegetables	Fennel	27,5
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Fennel, tea	23,2
Spices	Seasonings	Fenugreek seed	830,0
Herbs	Seasonings	Fenugreek, dried	2250,0
Herbs	Seasonings	Fenugreek, fresh	208,2
Dried fruits - Dried other fruits	Fruits and fruit products	Fig, dried	960,0
Fruits - Other fruits	Fruits and fruit products	Fig, peeled, fresh	58,3
Fruits - Other fruits	Fruits and fruit products	Fig, whole, fresh	95,7
Herbs	Seasonings	Garlic, fresh	87,0
Herbs	Seasonings	German camomile, dried	1010,0
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	German camomile, tea	22,8
Spices	Seasonings	Ginger, dried	473,5
Spices	Seasonings	Ginger, fresh	204,7
Shoot vegetables	Vegetables	Globe artichoke, heads, raw	1142,4
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Gooseberry	470,1
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Grape [Black]	185,0
Fruit juices - Berry juices	Non-alcoholic beverages	Grape [Black], pure juice	68,0
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Grape [Green]	121,8
Dried fruits - Dried berries	Fruits and fruit products	Grape, raisin	1065,0
Fruits – Citrus	Fruits and fruit products	Grapefruit	162,7
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Grapefruit, juice from concentrate	351,0
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Grapefruit, pure juice	53,6

Pod vegetables	Vegetables	Green bean, raw	303,8
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Guava	126,4
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Half-highbush blueberry	151,3
Cereals	Cereals and cereal products	Hard wheat, refined flour	56,2
Cereals	Cereals and cereal products	Hard wheat, whole grain flour	185,9
Nuts	Seeds	Hazelnut	686,6
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Highbush blueberry	223,4
Fruits – Gourds	Fruits and fruit products	Honeydew melon	59,3
Spices	Seasonings	Horseradish, fresh	90,0
Herbs	Seasonings	Hyssop, dried	1623,0
Herbs	Seasonings	Hyssop, fresh	214,5
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Hyssop, tea	17,0
Cabbages	Vegetables	Italian cabbage, raw	108,0
Herbs	Seasonings	Italian oregano, fresh	1165,0
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Jostaberry	309,4
Cabbages	Vegetables	Kale, raw	176,7
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Kiwi	179,7
Root vegetables	Vegetables	Kohlrabi, raw	168,0
Onion-family vegetables	Vegetables	Leek, raw	61,5
Fruits – Citrus	Fruits and fruit products	Lemon	59,8
Herbs	Seasonings	Lemon balm, dried	1700,0
Herbs	Seasonings	Lemon balm, fresh	899,7
Herbs	Seasonings	Lemon grass, fresh	662,0
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Lemon grass, tea	9,8
Herbs	Seasonings	Lemon thyme, fresh	178,0
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Lemon thyme, tea	25,4
Herbs	Seasonings	Lemon verbena, fresh	462,9

Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Lemon verbena, tea	7,7
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Lemon, juice from concentrate	180,0
Pulses – Lentils	Seeds	Lentils, whole, raw	6553,0
Leaf vegetables	Vegetables	Lettuce [Green], raw	65,9
Leaf vegetables	Vegetables	Lettuce [Red], raw	114,0
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Lichee	28,8
Pulses - Beans - Other beans	Seeds	Lima bean, whole, raw	96,0
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Lime, pure juice	122,0
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Lingonberry	652,0
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Longan	15,4
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Loquat	116,0
Herbs	Seasonings	Lovage, fresh	263,0
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Lovage, tea	11,4
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Lowbush blueberry	471,5
Nuts	Seeds	Macadamia nut	126,0
Cereals	Cereals and cereal products	Maize, refined flour	102,0
Cereals	Cereals and cereal products	Maize, whole grain	180,7
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Mango	144,8
Herbs	Seasonings	Marjoram, dried	3846,0
Herbs	Seasonings	Marjoram, fresh	854,0
Cabbages	Vegetables	Mustard cabbage, raw	183,0
Cabbages - Chinese cabbages	Vegetables	Napa cabbage, raw	116,5
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Nectarine, peeled	47,3
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Nectarine, whole	55,4
Spices	Seasonings	Nutmeg	1905,0
Cereals	Cereals and cereal products	Oat, rolled	26,4
Cereals	Cereals and cereal products	Oat, whole grain flour	82,2

Fruit vegetables	Vegetables	Olive [Black], raw	117,2
Fruit vegetables	Vegetables	Olive [Green], raw	161,2
Oils - Fruit vegetable oils	Oils	Olive, oil, extra virgin	55,1
Oils - Fruit vegetable oils	Oils	Olive, oil, refined	19,8
Oils - Fruit vegetable oils	Oils	Olive, oil, virgin	20,7
Onion-family vegetables	Vegetables	Onion [Red], raw	102,8
Onion-family vegetables	Vegetables	Onion [White], raw	45,5
Onion-family vegetables	Vegetables	Onion [Yellow], raw	75,7
Fruits – Citrus	Fruits and fruit products	Orange [Blond]	278,6
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Orange [Blond], pure juice	48,9
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Orange [Blood], juice from concentrate	72,1
Herbs	Seasonings	Orange mint, fresh	226,0
Herbs	Seasonings	Oregano, dried (wild marjoram)	6367,0
Herbs	Seasonings	Oregano, fresh (wild marjoram)	935,3
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Oval-leaf huckleberry	768,2
Cabbages - Chinese cabbages	Vegetables	Pak choy, raw	193,5
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Papaya	57,6
Herbs	Seasonings	Parsley, dried	1584,7
Herbs	Seasonings	Parsley, fresh	89,3
Root vegetables	Vegetables	Parsnip, raw	1,0
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Passion fruit	57,4
Cereal products	Cereals and cereal products	Pasta	1,8
Cereal products	Cereals and cereal products	Pasta, whole grain	11,9
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Peach, peeled	106,8
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Peach, whole	279,1
Nuts	Seeds	Peanut	406,3

Oils - Nut oils	Oils	Peanut, butter	536,0
Nuts	Seeds	Peanut, dehulled	101,3
Nuts	Seeds	Peanut, roasted	0,0
Nuts	Seeds	Peanut, roasted, dehulled	43,6
Fruits – Pomes	Fruits and fruit products	Pear, peeled	126,4
Fruit juices - Pome juices	Non-alcoholic beverages	Pear, pure juice	38,5
Fruits – Pomes	Fruits and fruit products	Pear, whole	107,9
Nuts	Seeds	Pecan nut	1816,4
Spices	Seasonings	Pepper spice [Black]	1000,0
Spices	Seasonings	Pepper spice [Green]	380,0
Spices	Seasonings	Pepper spice [White]	780,0
Herbs	Seasonings	Peppermint, dried	8051,6
Herbs	Seasonings	Peppermint, fresh	980,4
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Peppermint, tea	30,8
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Persimmon, fresh	0,6
Pulses – Peas	Seeds	Pigeon pea, dehulled, raw	1,8
Pulses – Peas	Seeds	Pigeon pea, whole, raw	556,4
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Pineapple	147,9
Herbs	Seasonings	Pineapple sage, fresh	131,0
Fruit juices - Tropical fruit juices	Non-alcoholic beverages	Pineapple, pure juice	35,8
Nuts	Seeds	Pines	58,2
Nuts	Seeds	Pistachio	1420,0
Nuts	Seeds	Pistachio, dehulled	0,0
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Plum, fresh	409,8
Jams - Drupe jams	Fruits and fruit products	Plum, jam	142,7
Dried fruits - Dried drupes	Fruits and fruit products	Plum, prune	1195,0
Fruit juices - Drupe juices	Non-alcoholic beverages	Plum, prune juice from concentrate	17,9

Fruit juices - Drupe juices	Non-alcoholic beverages	Plum, prune pure juice	5,9
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Pomegranate	0,4
Fruit juices - Tropical fruit juices	Non-alcoholic beverages	Pomegranate, juice from concentrate	6,7
Fruit juices - Tropical fruit juices	Non-alcoholic beverages	Pomegranate, pure juice	203,8
Other seeds	Seeds	Poppy seed, meal	0,0
Herbs	Seasonings	Pot marjoram, dried	9306,0
Tubers	Vegetables	Potato, raw	53,9
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Pummelo, pure juice	0,5
Gourds	Vegetables	Pumpkin, raw	86,5
Jams - Pome jams	Fruits and fruit products	Quince, jam	7,1
Fruits – Pomes	Fruits and fruit products	Quince, peeled	0,8
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Rabbiteye blueberry	550,0
Root vegetables	Vegetables	Radish [Black], raw	2,1
Root vegetables	Vegetables	Radish, raw	44,3
Oils - Other seed oils	Oils	Rape seed, oil	18,3
Root vegetables	Vegetables	Red beetroot, raw	164,1
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Red huckleberry	117,8
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Red raspberry	148,1
Jams - Berry jams	Fruits and fruit products	Red raspberry, jam	218,9
Fruit juices - Berry juices	Non-alcoholic beverages	Red raspberry, pure juice	0,0
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Redcurrant	448,4
Fruits - Stalk vegetables	Fruits and fruit products	Rhubarb, raw	2,2
Cereals	Cereals and cereal products	Rice, parboiled	0,3
Cereals	Cereals and cereal products	Rice, refined	0,2
Cereals	Cereals and cereal products	Rice, whole grain	94,5

Coffee beverage - Robusta Coffee beverages	Non-alcoholic beverages	Robusta coffee beverage [Filter]	32,3
Herbs	Seasonings	Roman camomile, dried	2483,0
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Roman camomile, tea	18,0
Herbs	Seasonings	Rosemary, dried	2518,7
Herbs	Seasonings	Rosemary, fresh	1082,4
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Rosemary, tea	35,8
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Rowanberry	6,3
Fruit juices - Berry juices	Non-alcoholic beverages	Rowanberry, pure juice	2,5
Spirits – Rum	Alcoholic beverages	Rum	0,1
Cereals	Cereals and cereal products	Rye, refined flour	45,0
Cereals	Cereals and cereal products	Rye, whole grain flour	72,0
Spices	Seasonings	Saffron	150,7
Cabbages	Vegetables	Sauerkraut	67,0
Cabbages	Vegetables	Savoy cabbage, raw	119,9
Spirits – Whisky	Alcoholic beverages	Scotch whisky	0,1
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Sea-buckthornberry	6,2
Fruit juices - Berry juices	Non-alcoholic beverages	Sea-buckthornberry, pure juice	2,2
Oils - Other seed oils	Oils	Sesame seed [Black], oil	644,5
Other seeds	Seeds	Sesame seed, meal	0,1
Oils - Other seed oils	Oils	Sesame seed, oil	2,3
Onion-family vegetables	Vegetables	Shallot [Pink], raw	114,7
Onion-family vegetables	Vegetables	Shallot, raw	2,0
Wines - Fortified Wines	Alcoholic beverages	Sherry	2,4
Herbs	Seasonings	Silver linden, dried	120,0
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Skunk currant	1790,0
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Small-leaf linden, tea	23,3

Cereals	Cereals and cereal products	Sorghum, whole grain	412,8
Herbs	Seasonings	Sorrel, dried	350,0
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Sour cherry	352,2
Jams - Drupe jams	Fruits and fruit products	Sour cherry, jam	177,1
Soy and soy products	Seeds	Soy paste, cheonggukang	12,1
Soy and soy products	Seeds	Soy paste, doenjang	1,9
Soy and soy products	Seeds	Soy paste, miso	5,3
Other seasonings	Seasonings	Soy sauce	0,7
Soy and soy products	Seeds	Soy, bacon bits	48,2
Soy and soy products	Seeds	Soy, burger, raw	2,3
Soy and soy products	Seeds	Soy, cheese	21,1
Soy and soy products	Seeds	Soy, flakes	7,0
Soy and soy products	Seeds	Soy, flour	2,6
Soy and soy products	Seeds	Soy, flour, defatted	28,8
Soy and soy products	Seeds	Soy, meat	6,2
Soy drinks	Non-alcoholic beverages	Soy, milk	3,1
Soy and soy products	Seeds	Soy, milk powder	1,1
Oils - Other seed oils	Oils	Soy, oil	0,7
Soy and soy products	Seeds	Soy, pudding	0,1
Soy and soy products	Seeds	Soy, sausage	2,2
Soy and soy products	Seeds	Soy, tempeh	7,0
Soy and soy products	Seeds	Soy, tofu	7,4
Soy and soy products	Seeds	Soy, tofu, fermented (sufu)	7,3
Soy and soy products	Seeds	Soy, yogurt	3,359999895
Soy and soy products	Seeds	Soybean, green (edamame)	12,19999981
Soy and soy products	Seeds	Soybean, roasted (soy nut)	28,35000038
Soy and soy products	Seeds	Soybean, sprout, raw	12,98900003

Herbs	Seasonings	Spearmint, dried	6575
Herbs	Seasonings	Spearmint, dried	0,699999988
Herbs	Seasonings	Spearmint, dried	25
Herbs	Seasonings	Spearmint, fresh	246,8999939
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Spearmint, tea	35,5
Leaf vegetables	Vegetables	Spinach, raw	248,646128
Leaf vegetables	Vegetables	Spinach, raw	1,106666644
Leaf vegetables	Vegetables	Spinach, raw	19,16655166
Gourds	Vegetables	Squash, raw	34,18888961
Spices	Seasonings	Star anise	1810
Spices	Seasonings	Star anise	32,20000076
Fruits - Tropical fruits	Fruits and fruit products	Star fruit	142,8999939
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Strawberry	289,2010534
Jams - Berry jams	Fruits and fruit products	Strawberry, jam	22,64999986
Herbs	Seasonings	Summer savory, dried	4512
Herbs	Seasonings	Summer savory, fresh	201,1999969
Other seeds	Seeds	Sunflower seed, meal	0,050000001
Oils - Other seed oils	Oils	Sunflower seed, oil	1
Root vegetables	Vegetables	Swede, raw	3,849999905
Herbs	Seasonings	Sweet basil, dried	4317,888889
Herbs	Seasonings	Sweet basil, fresh	231,8
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Sweet basil, tea	15,5
Herbs	Seasonings	Sweet bay, dried	4170
Herbs	Seasonings	Sweet bay, fresh	402
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Sweet bay, tea	16,70000076
Fruits – Drupes	Fruits and fruit products	Sweet cherry	173,0977778
Jams - Drupe jams	Fruits and fruit products	Sweet cherry, jam	3,319999933

Fruit vegetables	Vegetables	Sweet pepper [Green], raw	181,5199997
Fruit vegetables	Vegetables	Sweet pepper [Red], raw	229,0433333
Fruit vegetables	Vegetables	Sweet pepper [Yellow], raw	217,5666656
Tubers	Vegetables	Sweet potato, raw	74
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Sweet rowanberry	8,5
Leaf vegetables	Vegetables	Swiss chard leaves [Red], raw	1320
Leaf vegetables	Vegetables	Swiss chard leaves [White], raw	830
Stalk vegetables	Vegetables	Swiss chard stems [Red], raw	410
Stalk vegetables	Vegetables	Swiss chard stems [White], raw	290
Fruits – Citrus	Fruits and fruit products	Tangerine	192
Fruit juices - Citrus juices	Non-alcoholic beverages	Tangerine, juice from concentrate	36,10749948
Herbs	Seasonings	Tarragon, fresh	570
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Tarragon, tea	30,10000038
Tea infusions	Non-alcoholic beverages	Tea [Black], bottled	0,81666668
Tea infusions	Non-alcoholic beverages	Tea [Black], infusion	104,4810809
Tea infusions	Non-alcoholic beverages	Tea [Green], infusion	61,85624957
Tea infusions	Non-alcoholic beverages	Tea [Oolong], bottled	1,26000002
Tea infusions	Non-alcoholic beverages	Tea [Oolong], infusion	0,899999976
Fruit vegetables	Vegetables	Tomato [Cherry], whole, raw	3,841666698
Fruit vegetables	Vegetables	Tomato, whole, raw	45,06365832
Spices	Seasonings	Turmeric, dried	2117
Root vegetables	Vegetables	Turnip root, raw	54,5
Other seasonings	Seasonings	Vinegar	1,231871668
Nuts	Seeds	Walnut	1576,272727
Liquors - Nut liquors	Alcoholic beverages	Walnut, liquor	237,4133346
Herbs	Seasonings	Watercress, fresh	1
Fruits – Gourds	Fruits and fruit products	Watermelon	51,44142859

Herbs	Seasonings	Welsh onion, fresh	0,007
Fruits – Berries	Fruits and fruit products	Whitecurrant	0,699999988
Herbs	Seasonings	Wild turnip tops, fresh	93,5
Wines - Grape wines	Alcoholic beverages	Wine [Red]	215,4796633
Wines - Grape wines	Alcoholic beverages	Wine [Rosé]	82,21499634
Wines - Grape wines	Alcoholic beverages	Wine [White]	32,10477283
Herbs	Seasonings	Winter savory, dried	1880
Herbs	Seasonings	Winter savory, fresh	316
Herb infusions	Non-alcoholic beverages	Winter savory, tea	26
Gourds	Vegetables	Zucchini, raw	30,35555606