

UNIVERSIDAD DE BURGOS



**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES Y EFECTO SOBRE
BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO DEL ZUMO DE
POMELO DESAMARGADO POR TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA Y
POR TRATAMIENTO CON RESINAS DE INTERCAMBIO**

**MÓNICA CAVIA SAIZ
BURGOS 2010**

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes de una u otra forma me han ayudado y apoyado en la realización de esta tesis y que han hecho posible la consecución de un reto profesional y personal.

A la Dra. Pilar Muñiz, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y depositar en mí su confianza desde el primer día. Por guiarme a lo largo de todo este periodo no solo académicamente sino también personalmente. Por hacerme participe de todos sus proyectos y por despertar en mí el entusiasmo por la ciencia.

A la Dra. M^a Dolores Busto, por sus conocimientos y consejos, siendo en todo momento mi apoyo y orientación en la elaboración de esta tesis.

Quiero igualmente agradecer a todo el Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos, M^a Concepción, Natividad, Manolo y Lourdes, por ofrecerme su apoyo.

También a todos mis compañeros y amigos que han estado o siguen estando en este Área, con quienes he compartido horas de laboratorio y ratos de café, Susana, Verónica, María, Juan, Rocío, y Rubén. Ellos han sido cómplices del esfuerzo, de las alegrías y también de los malos momentos que conllevan esta tesis.

A la Dra. M^a Jesús Coma, Jefa de la Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe por animarme continuamente en este trabajo, ofreciéndome su ayuda, apoyo y comprensión.

También a mis compañeras de la Unidad de Investigación del Hospital General Yagüe, Celia B., Silvia, Nuria, Celia G., Yolanda y Carolina, con quienes he compartido no sólo los vaivenes del trabajo sino muchas cosas más.

A M^a Dolores Rivero por ofrecerme siempre su apoyo y saberme escuchar.

Gracias a mis amigos y a mi familia, a pesar de todas las horas que les he tenido que robar y no he podido compartir con ellos, siempre los he sentido ahí al lado, pacientes y pendientes de mí. Especialmente, a Alberto y Angélica por estar siempre, antes, ahora, aquí y allí, en las autopistas y las carreteras con baches. Hay cosas que son para siempre: gracias.

A mi hermano, Gustavo, que ha soportado con infinita paciencia mis malos y peores momentos durante la realización de esta tesis, por su apoyo y por confiar siempre en mí.

Por último a mis padres, que sin entender del todo lo que hago, valoran como el que más mi trabajo y han respetado y apoyado siempre mis decisiones. Muchas gracias, este trabajo es fruto de vuestra renuncia y vuestro esfuerzo.

A todas aquellas personas y amigos que no he citado y que de alguna forma han contribuido a que esta tesis llegue a buen término.

A todos, muchas gracias.

*A mis padres,
ejemplo siempre de ilusión y lucha*

INDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	5
2.1 ESTRÉS OXIDATIVO	5
2.1.1 CONCEPTO Y GENERALIDADES	5
2.1.2 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO	5
2.1.3 EFECTOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS ESTRÉS OXIDATIVO	9
2.1.3.1 Oxidación proteica	11
2.1.3.2 Oxidación de azúcares	12
2.1.3.3 Peroxidación lipídica	12
2.1.3.4 Oxidación de ácidos nucleicos	14
2.1.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES	16
2.1.4.1 Antioxidantes Endógenos	18
2.1.4.2 Antioxidantes Exógenos	23
2.1.4.2.1 Vitaminas y carotenoides	23
2.1.4.2.2 Compuestos fenólicos	26
2.1.4.2.2.1 Clasificación	26
2.1.4.2.2.2 Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos	29
2.1.4.2.2.3 Efecto prooxidante de los compuestos fenólicos	34
2.1.4.2.2.4 Efectos de los compuestos fenólicos sobre la salud	36
2.1.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	39
2.1.5.1 Capacidad antioxidante expresada en equivalentes de trolox	40
2.1.5.2 Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante.	
Ensayo FRAP	41
2.1.5.3 Evaluación de la capacidad estabilizadora de radicales	41
2.1.5.4 Evaluación de biomarcadores del daño oxidativo a biomoléculas	42
2.2 ZUMO DE POMELO: COMPUESTOS BIOACTIVOS Y TÉCNICAS DE DESAMARGADO	43
2.2.1 ASPECTOS GENERALES	43
2.2.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL POMELO	45
2.2.2.1 Compuestos fenólicos	45
2.2.2.2 Vitaminas y carotenoides del pomelo	48

2.2.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL POMELO.....	48
2.2.4	EFFECTOS SALUDABLES DEL POMELO.....	52
2.2.5	DESAMARGADO DE ZUMO DE POMELO.....	54
2.2.5.1	Procesado de zumos cítricos.....	54
2.2.5.2	Fundamento del sabor amargo.....	57
2.2.5.3	Técnicas para el desamargado de zumo de pomelo.....	57
2.2.6	INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS PARA EL DESAMARGADO DEL ZUMO DE POMELO.....	62
2.2.6.1	Métodos de inmovilización.....	64
2.2.6.2	Inmovilización de naringinasa por atrapamiento en criogeles de alcohol polivinílico.....	69
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	77
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
4.1	MATERIAL.....	81
4.2	METODOLOGIA.....	82
4.2.1	PROCESADO DEL ZUMO Y TRATAMIENTOS DE DESAMARGADO.....	82
4.2.2	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE POLIFENOLES TOTALES.....	83
4.2.3	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE NARINGINA.....	84
4.2.4	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL.....	85
4.2.4.1	Método del ABTS ^{•+}	85
4.2.4.2	Determinación de la capacidad reductora. Método del FRAP.....	86
4.2.5	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ESTABILIZADORA DEL RADICAL SUPERÓXIDO.....	87
4.2.5.1	Método enzimático.....	87
4.2.5.2	Método no enzimático.....	88
4.2.6	EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL RADICAL HIDROXILO.....	89
4.2.7	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	90
4.2.8	CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE GSH.....	90
4.2.9	ENSAYO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	91
4.2.9.1	Peroxidación lipídica inducida por Fe (II)/H ₂ O ₂	91
4.2.9.2	Inducción de la peroxidación lipídica por ABAP.....	91
4.2.9.3	Evaluación de los niveles de TBARs.....	91
4.2.10	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	92
4.2.11	EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO AL DNA.....	93

4.2.11.1	Daño oxidativo al DNA de timo de ternera.....	93
4.2.11.2	Electroforésis en gel de agarosa.....	94
4.2.11.3	Cuantificación de los niveles de 8OHdG.....	95
4.2.12	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	96
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
	Estudio 1. Antioxidant properties, radical-scavenging activity and biomolecules protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study.....	103
	Estudio 2. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin.....	113
	Estudio 3. Evaluation of antioxidant properties of grapefruit juice as influenced by debittering with naringinase immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogels.....	121
	Estudio 4. Análisis comparativo de la capacidad antioxidante y efecto protector frente al estrés oxidativo del zumo de pomelo en base al proceso de desamargado aplicado.....	151
6	CONCLUSIONES.....	171
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	175
8	ANEXO.....	213
9	ABREVIATURAS.....	227

1. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que dietas ricas en frutas y vegetales reducen de forma significativa la incidencia y tasas de mortalidad de enfermedades degenerativas causadas por el estrés oxidativo. Este efecto protector ha sido atribuido principalmente a compuestos bioactivos como las vitaminas, los carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos presentes en dichos alimentos cuya actividad antioxidante contribuye a reforzar la capacidad antioxidante endógena.

Los cítricos, constituyen una de las fuentes más importantes de compuestos bioactivos de la dieta. En particular, el pomelo se caracteriza por la presencia de ácido ascórbico, carotenoides, compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, en particular, la naringina, que se encuentra en abundancia en el zumo, y esteroides como el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol. Sus propiedades y efectos beneficiosos sobre la salud han sido asociados a estos componentes, debido a sus características antioxidantes naturales.

El creciente interés de la industria alimentaria por los zumos cítricos, y en concreto por el zumo de pomelo, se debe entre otros aspectos a estos componentes bioactivos, y a los cambios que se pueden producir en su contenido durante el procesado. El sabor amargo del zumo de pomelo se debe fundamentalmente al flavonoide naringina, que hace que en concentraciones naturales sea rechazado por gran parte de los consumidores. La naringina (4,5,7-trihidroxi-flavanona-7-O-rutinosido) es con diferencia el principal flavonoide responsable del sabor amargo dominante en el pomelo lo que hace necesario un tratamiento de desamargado.

Se han planteado infinidad de soluciones para disminuir el amargor basadas en las propiedades de los flavonoides. Sin embargo, aunque son técnicas de gran aceptación por la industria alimentaria tienen una serie de limitaciones intrínsecas ya que los métodos son inespecíficos y no sólo actúan sobre los compuestos amargos sino también sobre otros componentes, lo que supone un detrimento de la calidad del zumo y una pérdida de las propiedades beneficiosas para la salud que aportan los zumos de cítricos. Por todo ello, la búsqueda de nuevas tecnologías, como la enzimática, que causen el mínimo daño a las características nutricionales y a los efectos beneficiosos para la salud de los productos procesados de las frutas cítricas puede ser considerado como una interesante alternativa a los procesos convencionales por adsorción física.

Para estabilizar el sabor y evitar el amargor en el zumo se ha planteado el uso de la enzima naringinasa frente a los métodos físico-químicos como resinas

intercambiadoras tradicionalmente usadas. Sin embargo, el uso de enzimas solubles implica un gasto continuo y constante ya que, una vez utilizadas, no pueden recuperarse para sucesivas aplicaciones. Por ello, la fijación y estabilización de la enzima a un soporte de inmovilización puede resultar una aplicación industrial ventajosa, ya que podría permitir la recuperación del biocatalizador y su reutilización facilitando, además, la posibilidad del procesado en continuo de los zumos.

En este marco de referencia, el presente trabajo de investigación se ha centrado en evaluar en qué grado los tratamientos empleados para desamargar el zumo de pomelo afectan a sus propiedades saludables. Es decir, la finalidad fue analizar si la disminución del amargor, cuantificado en función de los niveles de naringina, afectaba a las propiedades antioxidantes del zumo. Para ello, se procedió a determinar la capacidad antioxidante total del zumo y su actividad estabilizadora de radicales específicos. Así mismo, se evaluó si las técnicas de desamargado modifican la capacidad del zumo para ejercer un efecto protector sobre las biomoléculas, medido a través de diferentes biomarcadores de estrés oxidativo, que se consideran potenciales marcadores del efecto preventivo de dichos zumos sobre la salud.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1.1. CONCEPTO Y GENERALIDADES

El estrés oxidativo (EO), se define como el desequilibrio entre la producción de especies oxidantes y las defensas antioxidantes en favor de las primeras (Sies, 1991). Está implicado en numerosos procesos fisiopatológicos y su desregulación se asocia al desarrollo de numerosas enfermedades crónicas y al proceso de envejecimiento como resultado del daño a las diferentes biomoléculas y de las alteraciones en las vías de señalización y control redox (Jones, 2008).

Los radicales libres son una consecuencia del metabolismo aeróbico, sin embargo bajo determinadas condiciones fisiopatológicas, puede aumentar su producción y concentración (Halliwell, 1996), frente a este incremento de radicales libres el organismo evolutivamente desarrolla un mecanismo de defensa formado por antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos.

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, principalmente a través del consumo de alimentos con compuestos bioactivos como las vitaminas, los carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos cuya actividad antioxidante contribuye a reforzar la capacidad antioxidante endógena (Prior, 2003). Cada vez más y con el objetivo de mantener el efecto saludable de los alimentos, la industria alimentaria demanda técnicas que puedan ser utilizadas para el procesamiento de los alimentos sin que se vean modificados los compuestos bioactivos o que resultado del tratamiento mejore su actividad.

2.1.2. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO

Entre las especies reactivas (Tabla 2.1) cabe destacar los **radicales libres**, especies químicas que contienen en su estructura uno o más electrones desapareados y, por tanto, dotadas de propiedades paramagnéticas que las convierte en compuestos altamente inestables y de gran reactividad, asociada a la necesidad de ceder o tomar un electrón de una estructura molecular adyacente con la finalidad de estabilizarse (Halliwell y Gutteridge, 2006; Gilbert, 2000) y los **no radicales**, especies químicas que por sí mismas no son reactivas pero en presencia de metales de transición (hierro y cobre) u otros radicales generan radicales libres altamente

reactivos (Nordberg y Arner, 2001). Todos ellos se agrupan con el nombre de especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS). De forma análoga existen especies reactivas del cloro (RCIS) y del bromo (RBrS) (Halliwell, 2006).

Tabla 2.1. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

	Radicales	No Radicales
ROS	$O_2^{\bullet-}$: Radical superóxido	H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno
	$\bullet OH$: Radical hidroxilo	1O_2 : Oxígeno singlete
	$\bullet OOH$: Radical hidroperoxilo	O_3 : Ozono
RNS	NO^{\bullet} : Radical óxido nítrico	NO: Óxido nítrico
		$ONOO^-$: Peroxinitrito
		NO^- : Anión nitroxilo

La toxicidad de las especies oxigénicas reactivas viene determinada desde el punto de vista químico, por cuatro características básicas, como son: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Los tres componentes con mayor capacidad de difusión son $O_2^{\bullet-} < H_2O_2 < OH^{\bullet}$, lo que hace que sean capaces de reaccionar con moléculas que se encuentran alejadas del lugar de origen incluso con capacidad de atravesar membranas celulares.

El **radical superóxido** ($O_2^{\bullet-}$), es un radical libre cargado, formado como consecuencia de una reducción monovalente del oxígeno molecular (Miller y cols., 1990). Ha sido implicado en la fisiopatología de una variedad de enfermedades (Aki y cols., 2009; Valdivia y cols., 2009; Rhoden y cols., 2008; Bedard y cols., 2007; Kovacic y cols., 2005). Es una especie menos reactiva que otros radicales aunque puede actuar como oxidante débil o como agente reductor de iones metálicos de transición (Valko y cols., 2005). Así, el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} convirtiéndose en un agente oxidante muy activo, selectivo y específico. Por lo tanto, su importancia fundamental radica en ser fuente de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno.

El **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2), se le considera el principal intermediario en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno, no es un radical libre, pero en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, o en presencia de otros radicales libres puede dar lugar a la formación del radical OH^\bullet , a través de las reacciones de Fenton o Haber-Weiss (Andreyev y cols., 2005).



El **radical hidroxilo** (OH^\bullet), es una de las especies oxigénicas más reactivas presentes en el organismo, está implicado en numerosos procesos fisiopatológicos como el cáncer, envejecimiento, diabetes, isquemia (Halliwell y Gutteridge, 2006). De vida extremadamente corta y alta reactividad (Pastor y cols., 2000), su electrón desapareado puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier tipo de molécula, DNA, proteínas y lípidos. Además, es el responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares, ya que puede atravesar membranas celulares y producir reacciones en cadena.

El **radical óxido nítrico** (NO^\bullet), un derivado gaseoso e inestable del nitrógeno con un número impar de electrones que le confiere una extraordinaria reactividad química. Radical fisiológico de considerable interés por su papel como mediador vascular y puede reaccionar con iones superóxido formando especies reactivas altamente tóxicas y oxidantes, como el peroxinitrito, que se puede disociar generando otros productos como el radical hidroxilo.

Los ROS como los RNS pueden generarse endógenamente, dentro de las células como intermediarios metabólicos o exógenamente en respuesta a agentes externos (Inoue y cols., 2003; Cadenas, 1989).

Una de las principales fuentes endógenas generadora de ROS es la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 2.1), la reducción parcial de la molécula de oxígeno durante la respiración aeróbica genera anión superóxido, y radical hidroxilo (Turrens, 2003). Entre un 5-10% del total del oxígeno consumido en la mitocondria, se transforma en radical superóxido, que dismuta a H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa, y, en presencia de iones metálicos, a través de la reacción de Fenton y / o reacciones de Haber-Weiss se genera el radical hidroxilo, altamente reactivo, causando importantes daños en las proteínas celulares, los lípidos y el DNA (Andreyev y cols., 2005) (Figura 2.2).

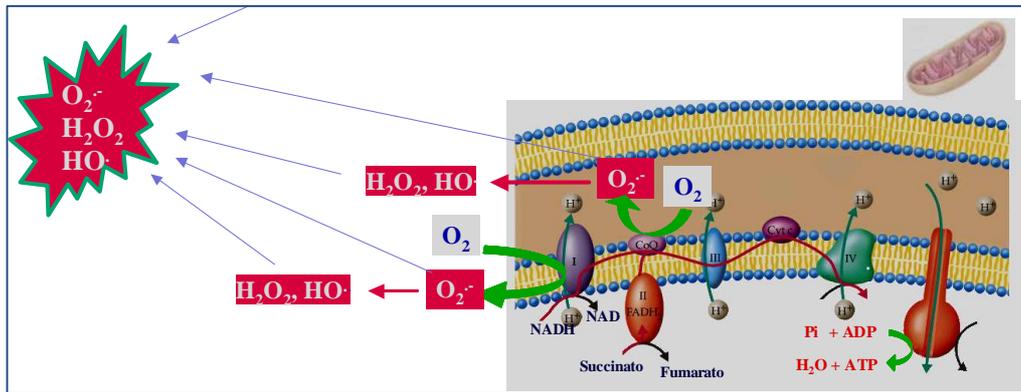


Figura 2.1. Reacciones de generación de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

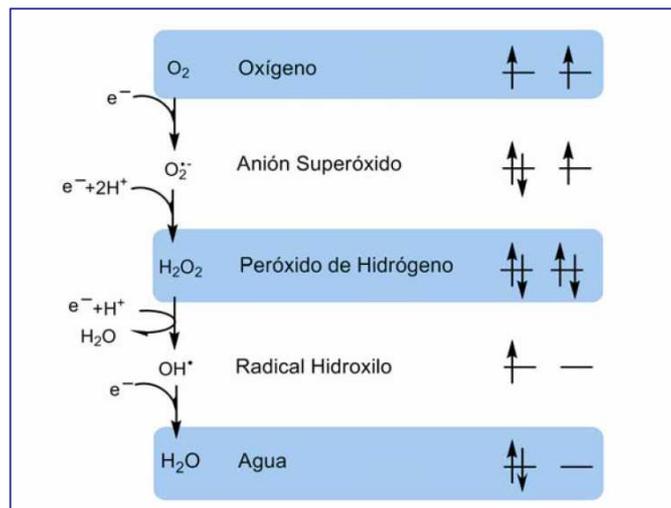


Figura 2.2. Reacciones de generación de radicales libres del oxígeno.

Otras fuentes endógenas de ROS y RNS, son la cadena de transporte electrónico no fosforilante en el retículo endoplásmico (Gupta y cols., 1997), las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos) (Figura 2.3) que utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente el radical superóxido (Lambeth, 2004), o la oxido nítrico sintasa que genera óxido nítrico (NO) a partir de la arginina intracelular. La autooxidación de compuestos de carbono reducido como los

aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos, da lugar también a la formación de estos compuestos.

La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario celular, como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, que utilizan el O_2 como sustrato, también contribuyen al incremento endógeno de especies reactivas (Halliwell y Gutteridge, 2006; Li y Jackson, 2002).

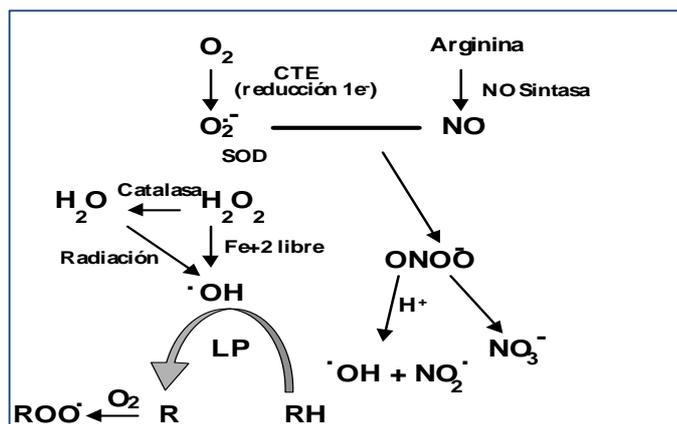


Figura 2.3. Generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en las células fagocitarias.

Como fuentes exógenas, se encuentran tanto factores ambientales, farmacológicos, como nutricionales (Limón-Pacheco y cols., 2009). Entre los agentes medioambientales destacan, el humo (Bloomer y cols., 2007), la exposición a metales, benceno, polvo de cemento, luz solar, radiaciones electromagnéticas, que se asocian con incrementos en el daño oxidativo de biomoléculas y la disminución de antioxidantes como la vitamina E y C (Chia y cols., 2008; Rossner y cols., 2008; Yoshioka y cols., 2008).

2.1.3. EFECTOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Esta bien establecido el papel dual de las ROS y de las RNS como especies beneficiosas o perjudiciales para los sistemas vivos (Valko y cols., 2006; Pervaiz y Clement, 2007). A bajas concentraciones, los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros, estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células (Weinberg y Chandel, 2009). Sin embargo, a altas concentraciones son

capaces de dañar de forma reversible o irreversible todo tipo de biomoléculas, incluyendo proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos (Valko y cols., 2007). Como consecuencia de ello, los ROS están implicados en el control de la patogénesis de muchas enfermedades degenerativas (Kell y cols., 2009; Valko y cols., 2007) tales como cáncer, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, etc. (Aliev y cols., 2009; Fearon y cols., 2009; Chinta y cols., 2008; Muller y cols., 2007) (Figura 2.4).

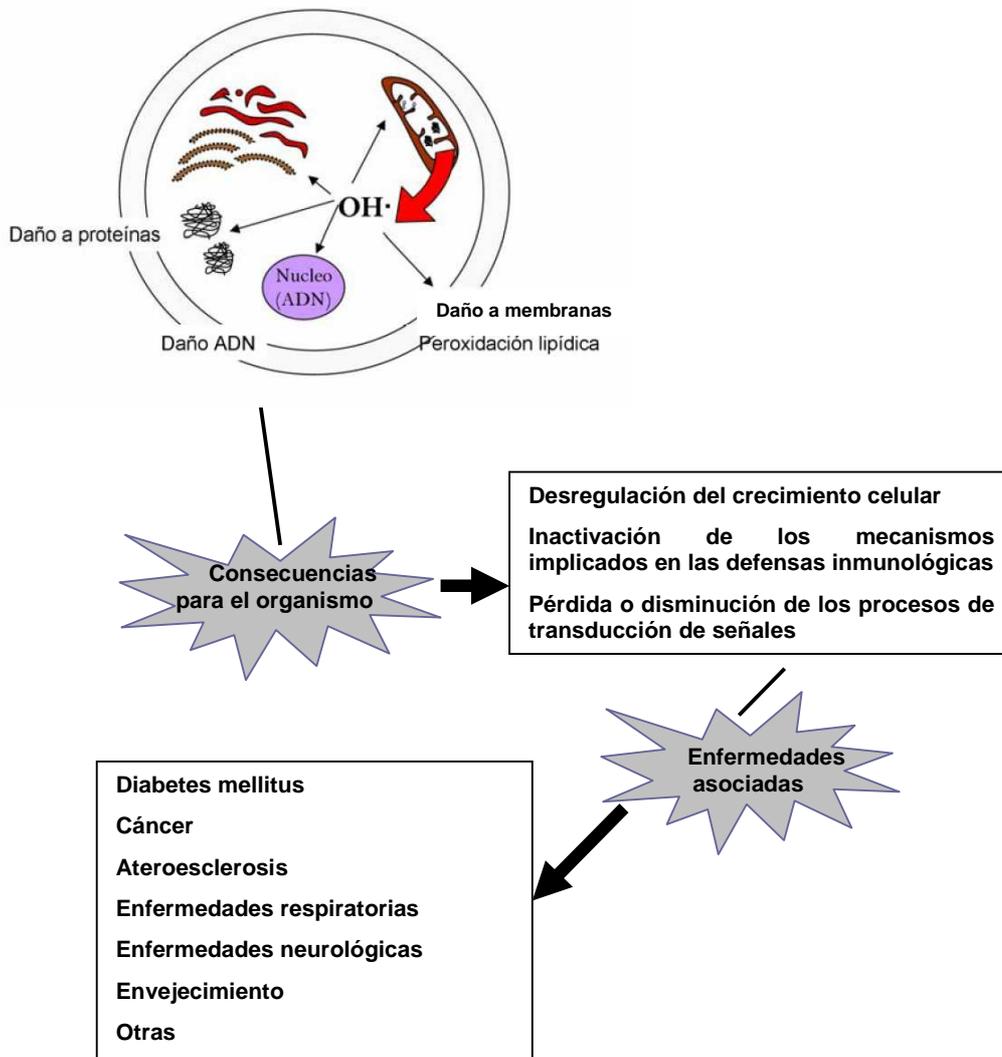


Figura 2.4. Daños producidos por las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

El daño oxidativo a las biomoléculas causado por los radicales son de muy diversa naturaleza, pero en general actúan a través uno de los siguientes mecanismos: a) captando un hidrogenión de una molécula; b) introduciéndose como tal en una

molécula diana; c) transfiriendo un electrón. En cualquiera de los tres casos, la reacción de un radical libre con otra molécula origina la formación de un nuevo radical que puede o no ser tan reactivo como la especie original.

Este daño oxidativo a las distintas biomoléculas causa alteraciones y disfunciones metabólicas (Valko y cols., 2007), como inactivación y desnaturalización proteica, asociado a lesiones en el citoesqueleto celular, peroxidación lipídica, que provoca la pérdida de fluidez de membrana, lisis celular, oxidación de las LDL, etc., daño a los ácidos nucleicos, con la consecuente ruptura de cadenas y la modificación de las bases nitrogenadas, relacionado con procesos de mutagénesis, carcinogénesis y modificación de las vías de señalización, implicadas en el metabolismo y regulación del ciclo celular.

2.1.3.1. Oxidación proteica

La oxidación proteica se define como una modificación covalente en una proteína inducida por especies reactivas. Los cambios oxidativos en proteínas pueden comportar diversas consecuencias en su función, como la inhibición de la actividad enzimática, un incremento de la susceptibilidad a la agregación y proteólisis, un aumento o disminución de la captación celular y una alteración de la inmunogénesis. Esta oxidación se origina por la acción de los ROS o RNS sobre las cadenas laterales de los aminoácidos, principalmente sobre la cisteína y la metionina (Stadman, 2004). Como resultado se produce un incremento de grupos carbonilo de las cadenas laterales de los aminoácidos, un descenso de grupos tiol, que resulta en un incremento en el entrecruzamiento entre cadenas peptídicas o en la fragmentación de enlaces peptídicos. La concentración de los grupos carbonilos generados son los marcadores de la modificación oxidativa más ampliamente utilizados (Mutlu-Turkoglu y cols., 2003). Esta oxidación aparece asociada con el envejecimiento y la severidad de algunas patologías (Dalle-Donne y cols., 2006; Stadman, 2004; Levine, 2001).

2.1.3.2. Oxidación de azúcares

Los azúcares reductores (como la glucosa o la ADP-ribosa) provocan la alteración de las proteínas mediante la reacción de glucosilación no enzimática también llamada reacción de Maillard. Esta reacción se produce en varias etapas, dando lugar a una

serie de productos muy inestables y reactivos denominados productos de glicosilación avanzada (AGEs) (Baynes y Thorpe, 2000). Estos compuestos actúan a través de dos mecanismos: 1) modificando proteínas estructurales intra y extracelulares y 2) desencadenando procesos intracelulares a través de la unión con sus receptores (de la familia de las inmunoglobulinas) localizados en la superficie celular de monocitos, macrófagos, células endoteliales y células del músculo liso vascular (Yamagishi y cols., 2008; Schmidt, 1996).

La unión de los AGEs a estos receptores desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno que modulan la función celular induciendo, por ejemplo, procesos inflamatorios. Los AGEs están implicados en procesos de envejecimiento celular y en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes como el daño vascular y renal, cataratas y neuropatías (Liu y cols., 2010; Cardenas- León y cols., 2009).

2.1.3.3. Peroxidación lipídica

Los radicales libres inician y causan la peroxidación de lípidos particularmente aquellos que componen la membrana celular y está asociado con distintas alteraciones fisiopatológicas principalmente con el daño vascular.

Esta peroxidación lipídica, que es la destrucción de la porción hidrofóbica o interna de la membrana de los ácidos grasos poliinsaturados, resulta en la formación de hidroperóxidos lipídicos en un sistema de propagación en cadena. La peroxidación es un proceso radicalario autocatalítico que transcurre en 3 etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 2.5) (Esterbauer y cols., 1991).

En la etapa de iniciación, los radicales libres captan un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de los ácidos grasos dejando un electrón no apareado en el carbono convirtiéndose así en un radical lipídico. Los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles al ataque por radicales libres, debido a que la presencia de dobles enlaces debilita el enlace carbono-hidrógeno en el átomo de carbono adyacente. El radical generado sobre el carbono sufre un reajuste molecular para formar un dieno conjugado que es capaz de combinarse con el oxígeno para formar un radical peroxilo (ROO^{\bullet}) que puede sustraer un nuevo átomo de hidrógeno y empezar una reacción en cadena que continúa hasta el agotamiento del sustrato o la interrupción del proceso por antioxidantes. Los peróxidos lipídicos resultantes son compuestos bastante estables pero su descomposición puede ser catalizada por

metales de transición y complejos de metales dando lugar a nuevos radicales capaces de estimular más la peroxidación lipídica o a la formación de productos terminales de oxidación de toxicidad diversa como el malondialdehído (MDA), hidroxinonenal y hexanal (Niki, 2009).

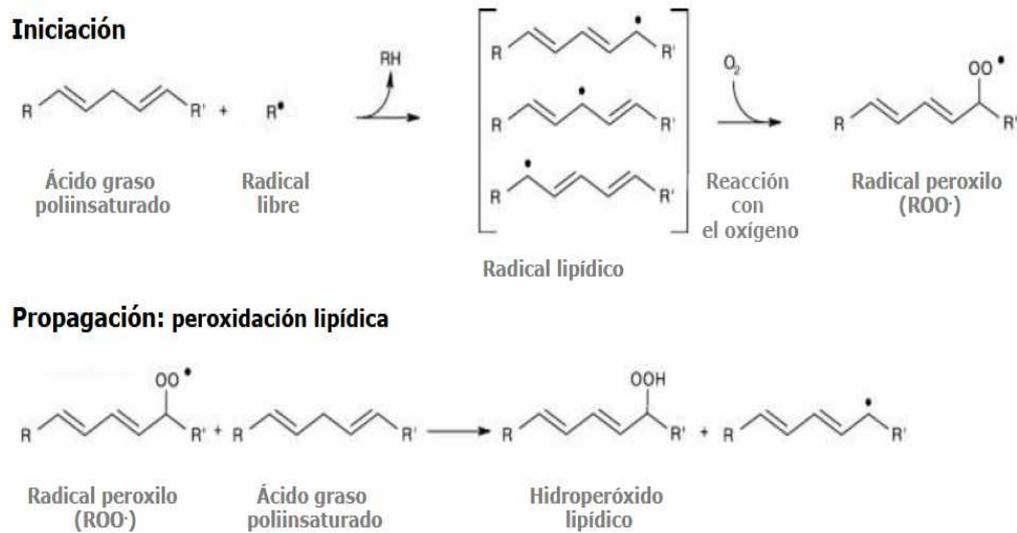


Figura 2.5. Mecanismo de acción de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica puede tener diversos efectos sobre las funciones celulares ya sea directamente, al reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos o indirectamente a través de receptores de las vías de señalización (Katsiki y Manes, 2009; Forman y cols., 2008; Ceaser y cols., 2004). Así, la peroxidación lipídica de las membranas resulta en cambios de fluidez, aumento de permeabilidad, disminución del potencial de membrana (Greenberg y cols., 2008) que puede conllevar a la muerte celular. Especialmente susceptibles a la peroxidación lipídica son las células del sistema nervioso central (Sultana y cols., 2006) y la oxidación de las partículas LDL que tienen un papel trascendental en la fisiopatología de la aterosclerosis (Steinberg y cols., 2009; Noguchi y cols., 2008). Los aldehídos, resultado del proceso de peroxidación lipídica reaccionan con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos dando productos que son mutagénicos y cancerígenos asociados a determinadas patologías (Blair, 2008; Nair y cols., 2007).

2.1.3.4. Oxidación de ácidos nucleicos

El DNA en las células vivas sufre constantemente lesiones a nivel molecular como consecuencia del metabolismo aeróbico. Fundamentalmente en la estructura del DNA, los radicales libres, alteran la secuencia de azúcares-fosfatos que forman la cadena del ácido desoxirribonucleico directamente o por unión a las bases púricas o pirimidínicas convirtiéndolas en inestables y altamente reactivas (Halliwell y Gutteridge, 2006). En condiciones normales, el daño oxidativo al DNA producido es de una modificación por cada 130000 nucleótidos del DNA (Ritcher, 1992) siendo el radical hidroxilo el principal causante del daño oxidativo al DNA (von Sonntag, 2006; Evans y cols., 2004).

Los efectos de los radicales libres sobre el DNA incluyen la escisión monocatenaria o bicatenaria de la molécula de DNA, sitios abásicos, hidroxilación de las bases nitrogenadas y entrecruzamientos DNA-proteína (Valko y cols., 2006; Cooke y cols., 2003; Dizdroglu y cols., 2002; Marnett, 2000). Estos daños persistentes sobre el DNA dan lugar a la detención o inducción de factores de transcripción, alteraciones en las vías de transducción de señal, errores de replicación e inestabilidad genómica, estando involucrados en muchos procesos relacionados con la carcinogénesis.

Se ha demostrado que el fenotipo maligno de las células cancerosas puede ser revertido mediante la reducción de los niveles celulares de $O_2^{\cdot-}$ y la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa que puede reducir el crecimiento celular tumoral, la metástasis, y otras características malignas de las células cancerígenas (Zhang y cols., 2002). Varios estudios han demostrado también, que el H_2O_2 puede inducir la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis, aumento de la angiogénesis, la invasión y la metástasis (López-Lázaro y cols., 2007).

Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas, destaca la formación de 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG), resultado de la acción del radical hidroxilo, sobre la desoxiguanosina (dG) y sus niveles se consideran como biomarcador del daño oxidativo al DNA. Su importancia reside en su alto efecto mutagénico, ya que la 8-OHdG durante la replicación del DNA, pueden dar lugar a transversiones GC a TA (Oliva y cols., 1997; Cheng y cols., 1992). Distintos estudios correlacionan altos niveles de 8-OHdG con un mal pronóstico en cáncer colorrectal, renal y de pulmón (Sheridan y cols., 2009; Shen y cols., 2007; Miyake y cols., 2004). Defectos en algunas de las enzimas de reparación del DNA también dan lugar a altos niveles de 8-OHdG y a otras mutaciones en las bases del DNA asociadas al

envejecimiento y a una mayor incidencia de cáncer (Nakabeppu y cols., 2006). La mayoría de estas modificaciones promutagénicas exocíclicas del DNA se consideran de origen endógeno, cuyos niveles son considerablemente influenciados por la dieta y el estilo de vida (Bartsch y Nair, 2006).

En los últimos años, un número elevado de estudios se ha centrado en la investigación del papel de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, en las vías de señalización implicadas en diferentes patologías celulares (Stowe y Camarra, 2009; Jones, 2008; Halliwell y Gutteridge, 2006). Estudiando la implicación del estrés oxidativo en la expresión de pro-oncogenes y en la homeostasis del estado redox celular a través de su implicación en la regulación de la expresión génica (Weinberg y Chandel, 2009). Así, se ha observado que los radicales libres influyen en el estado redox celular (Circu y cols., 2010) a través de cambios en el estado oxidativo de proteínas sensores intracelulares con grupos tiol (-SH) (Figura 2.6).

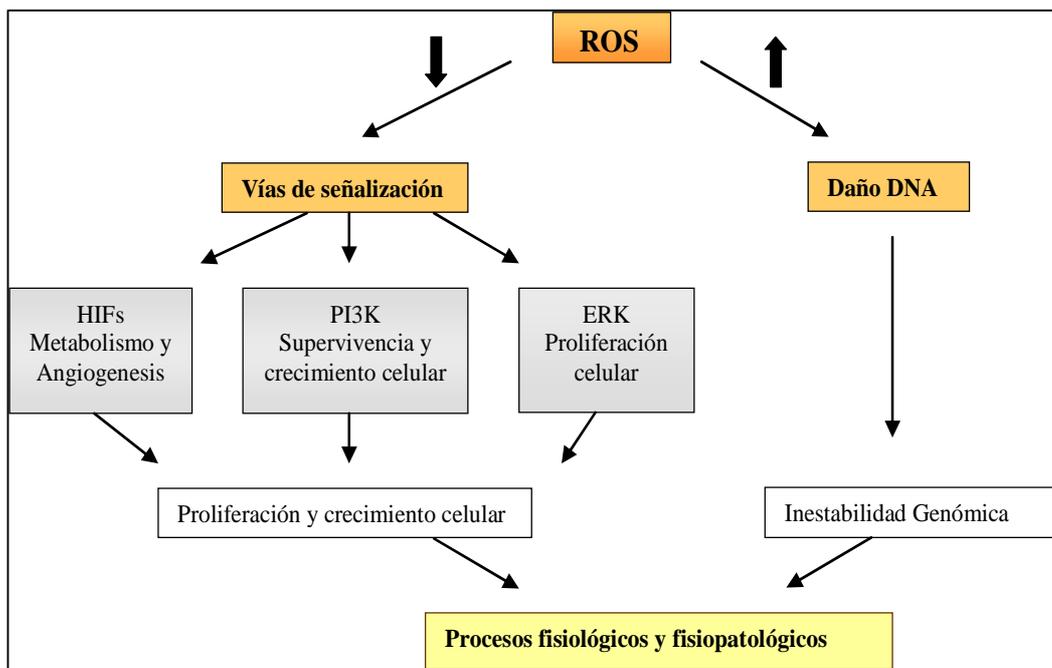


Figura 2.6. Mecanismo de acción de los ROS en la regulación del estado redox celular.

2.1.4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Debido a la alta toxicidad de los ROS y RNS, los organismos aeróbicos han desarrollado numerosos mecanismos de defensa que limitan su actividad y producción y mantienen el sistema bajo control (Cadenas, 1997). Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis redox del tejido solo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y la intensidad de eliminación de radicales libres.

En condiciones normales, hay un equilibrio entre las actividades y los niveles intracelulares de estos antioxidantes que es esencial para la supervivencia de los organismos y su salud. Cuando se produce una alteración del estrés oxidativo, las células son capaces de inducir una respuesta adaptativa por parte del organismo. Por una parte, habrá una activación de la defensa antioxidante mediante la activación de factores de transcripción, dando lugar a un incremento en la concentración de las enzimas antioxidantes. Por otra parte, habrá una represión o inhibición de los sistemas productores de ROS, mediante la inhibición de la actividad mitocondrial o de enzimas productoras de radicales.

De acuerdo con Halliwell y Gutteridge, se puede definir **antioxidante** como “cualquier sustancia que estando presente a bajas concentraciones, en relación a las del sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato” (Halliwell y Gutteridge, 1989). Así, un buen antioxidante se caracteriza por su alta efectividad, su variabilidad operativa y versatilidad para poder combinarse con una importante variedad de radicales libres.

Existen diferentes sistemas de defensa antioxidante en el organismo, y se pueden clasificar en función de su naturaleza, como antioxidantes enzimáticos, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) y no enzimáticos en las que se incluyen tanto vitaminas como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), tioles como el glutatión (GSH) o la tiorredoxina, carotenoides, flavonoides y otros antioxidantes. En función de su procedencia se pueden clasificar, como antioxidantes endógenos y exógenos. La Figura 2.7 esquematiza los diversos tipos de antioxidantes.

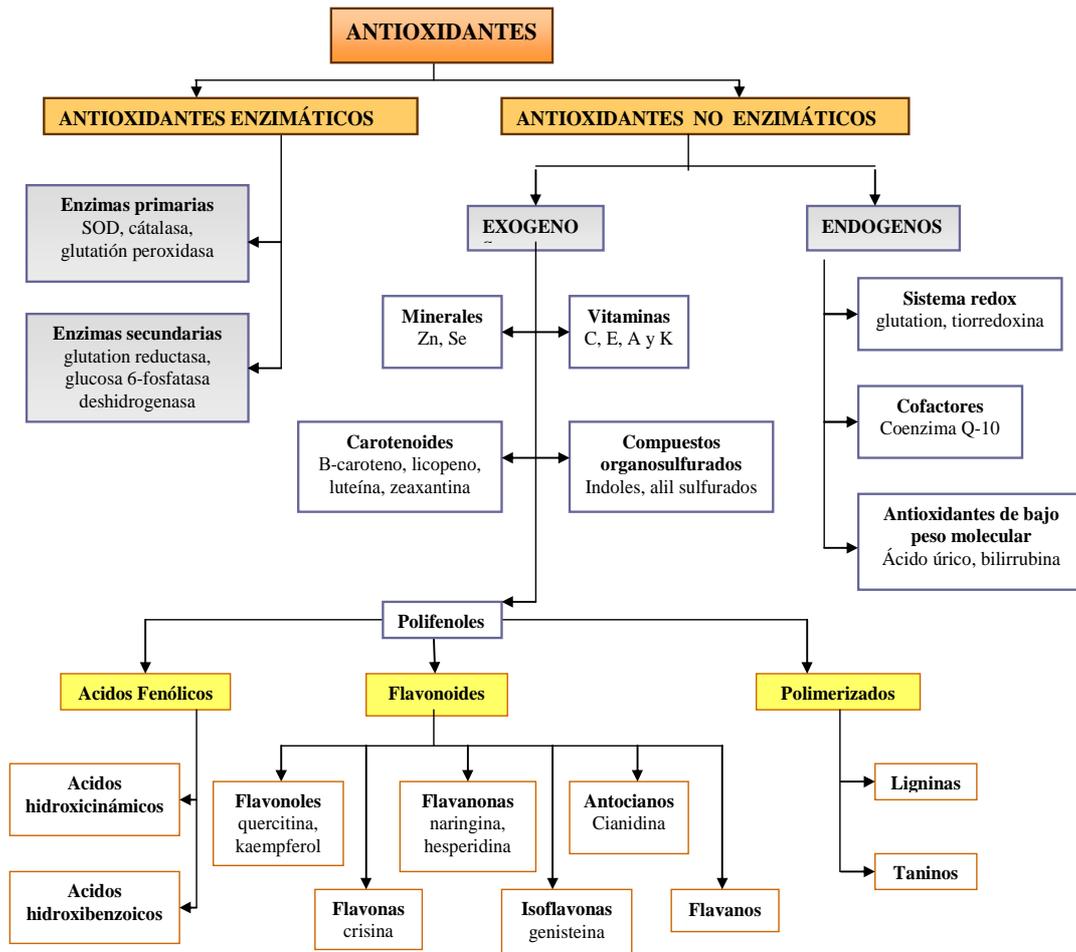


Figura 2.7. Clasificación de los mecanismos de defensa antioxidante.

Los mecanismos de acción de los antioxidantes incluyen tres niveles de actuación, prevención, estabilización de los radicales (secuestradores) y eliminación (Figura 2.8) (Sies, 1993; Vall-Bellés y cols., 2001). En el ámbito preventivo: previenen la formación de radicales libres y su finalidad o estrategia corre a cargo de mecanismos de tipo **enzimático**, capaces de metabolizar las especies reactivas oxigénicas a estructuras más estables, o de tipo **no enzimático** como agentes quelantes capaces de secuestrar metales que participan en la formación de radicales libres. Como captadores de radicales libres los estabilizan, inhibiendo la cadena de inicio y rompiendo la de propagación. Dentro de este grupo se encuentran tanto antioxidantes de origen endógeno como exógenos obtenidos a partir de la dieta. Los mecanismos de eliminación y o reparadores, actúan cuando las biomoléculas ya han sufrido el daño eliminándolas o reparándolas (glicosilasas de DNA, las fosfolipasas y las proteasas).

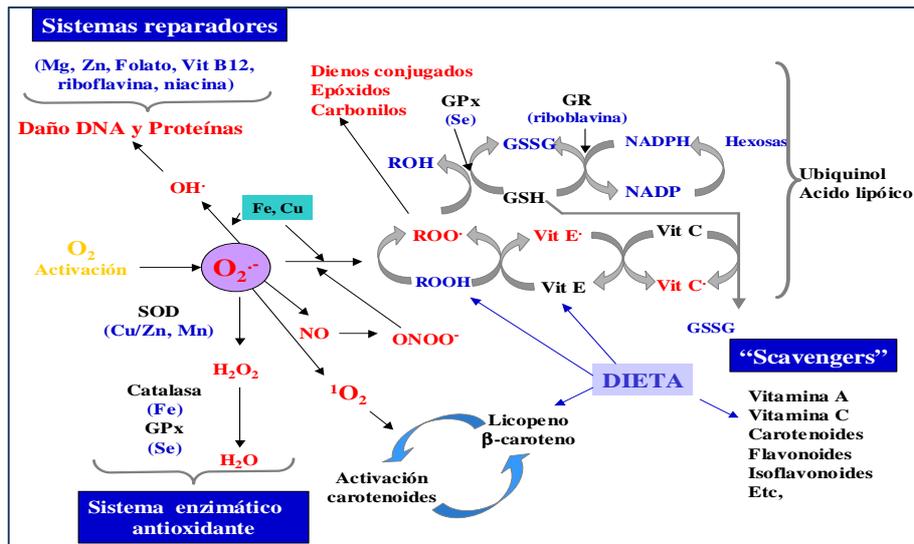


Figura 2.8. Esquema de la producción de ROS y de los mecanismos de defensa antioxidante.

2.1.4.1. Antioxidantes endógenos

Constituyen la primera defensa de las células frente a la agresión por radicales libres y radica principalmente en la acción conjunta de tres enzimas, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

La eficacia de esta triada enzimática reside en una triple acción defensiva al disminuir la producción de estas especies oxigénicas e impedir la interacción de estas entre sí o con metales de transición para dar lugar a especies de mayor reactividad como el radical hidroxilo. La SOD cataliza la reacción de dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , que en una reacción posterior es reducido por la catalasa o glutatión peroxidasa (GPx) formando H_2O y O_2 . La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su principal función es eliminar el H_2O_2 generado en la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que la glutatión peroxidasa degradará el H_2O_2 citoplasmático (Muñiz y cols., 2000; Michiels y cols., 1994). Sus concentraciones están sujetas a regulación génica, de forma que aumentan rápidamente en respuesta a factores de transcripción, que detectan cambios a nivel de estrés oxidativo (Harris, 1992).

La acción de las 3 enzimas es vital para el funcionamiento normal de la célula y para el estatus antioxidante de las células de mamíferos. Aquello que interfiere con el balance de estas tres enzimas trabajando cooperativamente, resulta en un desequilibrio prooxidante/antioxidante que favorece la producción de ROS y el daño celular. El mantenimiento de estas actividades enzimáticas será por lo tanto requisito

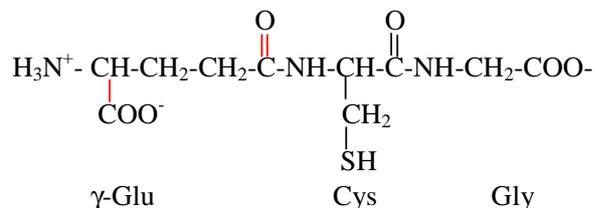
imprescindible para el desarrollo de los organismos y su lucha contra el estrés oxidativo.

Además del sistema antioxidante enzimático los organismos vivos disponen de un sistema antioxidante no enzimático que constituye la segunda línea de defensa y está formado básicamente por antioxidantes de bajo peso molecular que constituyen un numeroso conjunto de compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por interacción directa o indirecta con los ROS (Kohen, 1999).

El mecanismo de acción indirecta implica principalmente la quelación de metales de transición para evitar su participación en reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss. Las moléculas que actúan de forma directa sobre las especies reactivas lo hacen por medio de la transferencia de electrones o por medio del secuestro de radicales evitando así que ataquen a las moléculas diana. Por su pequeño tamaño, pueden atravesar las membranas celulares y localizarse cerca de las dianas biológicas; además, la propia célula puede regenerarlas y regular sus concentraciones. Estas moléculas, aunque normalmente actúan como antioxidantes, desarrollan otras funciones biológicas en la célula.

Estos sistemas no enzimáticos están conformados por compuestos como el glutathion reducido, la tiorredoxina, urato etc. que estabilizan los ROS o provocan la quelación de iones metálicos de elementos de transición que al estar en estado reducido potencian su autooxidación y generación del anion superóxido (Sies, 1993). Su acción defensiva dependerá en algunos casos de una interacción directa sobre la especie reactiva para dar lugar a complejos estables o de menor reactividad, componentes que reaccionan directamente con agentes oxidantes y los inutilizan.

El *glutathión* (GSH), es un tripéptido de γ -glutamil-cisteinil-glicina que constituye el principal tiol celular no proteico más abundante y ampliamente distribuido en los tejidos (Masella y cols., 2005). Su papel en el mantenimiento del estado redox esta bien establecido (Circu y cols., 2010; Ekshyyan y cols., 2005).



La forma biológica activa es el glutatión reducido (GSH), que es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG) durante procesos de estrés oxidativo, la relación entre el GSH y GSSG ha sido utilizada para describir de forma general el estado redox celular (Schafer y Buettner, 2001). Normalmente, las células presentan una relación GSH /GSSG alta, y más del 90% del total de GSH se mantiene en la forma reducida a través de la síntesis citosólica de novo de GSH, la reducción enzimática de GSSG, y la absorción de GSH exógeno (Meister y cols., 1976). La síntesis del GSH se lleva a cabo en el citosol de las células por la acción secuencial de dos enzimas la glutamil-cisteína sintetasa y la glutatión sintetasa. Ocurre principalmente en el hígado, que constituye el 90% del GSH en condiciones fisiológicas normales. En los mamíferos, la concentración de glutatión en el hígado está entre 7-10 mM (Hammond y cols., 2007), mientras que en el plasma la concentración es del rango de μM (Pastore y cols., 2003).

Muchas de las propiedades biológicas del glutatión se deben a dos de sus características estructurales: por una parte la presencia de un enlace gamma-glutamilo, lo cual le confiere resistencia frente a las peptidasas presentes en las células con la excepción de la gamma-glutamiltanspeptidasa (enzima que cataliza el primer paso de la degradación del glutatión). La segunda característica estructural importante es la presencia del grupo tiol de la cisteína (Figura 2.9), el cual se puede oxidar con otra molécula de GSH dando lugar al glutatión disulfuro u oxidado (GSSG), o con otros grupos tiólicos como los residuos de cisteína de las proteínas (Pastore y cols., 2003).

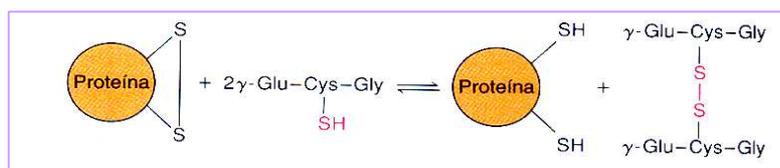


Figura 2.9. Mecanismo de acción del glutatión.

La presencia del grupo tiólico reducido de la cisteína promueve su estabilidad intracelular al actuar como protector frente a las radiaciones y el estrés oxidativo (Masella y cols., 2005; Sies, 1997). Además, interviene en la regulación de la síntesis y degradación de las proteínas y en la conversión de ribonucleótidos a deoxiribonucleótidos, síntesis y reparación del DNA; participa en la detoxificación de xenobióticos; en la integridad de la membrana celular; interviene en la captación de aminoácidos de algunos tejidos y en la modulación de actividades enzimáticas, actúa

como reservorio de cisteína, interviene en la homeostasis del calcio y participa en la regulación de la proliferación celular (Nagahara, 2010; Yuan y Kaplowitz, 2009; Pallardo y cols., 2009).

En la defensa celular contra intermediarios reactivos tiene un papel importante como antioxidante (Masella y cols., 2005) en reacciones enzimáticas catalizadas por la glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa y peroxitiorredoxina, o no enzimáticas protegiendo de la oxidación a grupos –SH esenciales de las proteínas, reaccionando con radicales libres como el O_2^{\bullet} , OH^{\bullet} , H_2O_2 y peróxidos lipídicos actuando como agente quelante, y en diversos procesos metabólicos como la señalización celular o la degradación de proteínas (Ghezzi, 2005) o actuando en la regeneración de otros antioxidantes como el α -tocoferol, o ácido ascórbico (Forman y cols., 2009). La capacidad de glutatión para regenerar los antioxidantes más importantes está relacionada con el estado redox dado por la relación GSSG/2GSH (Pastore y cols., 2003).

Al reaccionar con oxidantes, el GSH se oxida a GSSG, que presenta un puente disulfuro entre dos moléculas de glutatión.



Otro antioxidante no enzimático lo constituye el sistema de la *tiorredoxina* (Trx), que está compuesto por la tiorredoxina reductasa y la tiorredoxina (Holmgren y Bjornstedt, 1995). La tiorredoxina reductasa es una óxidoreductasa que cataliza la reducción de puentes disulfuro, con lo que juega un papel importante en la regulación del estado redox de los tioles de las proteínas (Nakamura y cols., 1997). La tiorredoxina (Trx), posee una secuencia de aminoácidos en el sitio catalítico que incluye dos residuos de cisteína (Cys-XX-Cys). Éstos pueden ser oxidados reversiblemente formando un puente disulfuro, el cual puede ser a su vez reducido por la tiorredoxina reductasa en presencia de NADPH (Berndt y cols., 2007).

La *ceruloplasmina*, la *ferritina*, el *urato* o la *bilirrubina* constituyen otro grupo de antioxidantes endógenos a nivel plasmático. La *ceruloplasmina* y la *ferritina* representan un papel importante como antioxidantes preventivos *in vivo* al unir metales de transición y evitar auto-oxidaciones y reacciones que conllevan a la formación de radicales hidroxilo. La ceruloplasmina es una proteína que actúa captando iones de

cobre libre, posee actividad ferroxidasa, y actividad ascorbato-oxidasa. La ferritina, proteína de almacenamiento de hierro y buen indicador de la cantidad de hierro disponible, como antioxidante además de impedir la reacción de Fenton, elimina el radical superóxido e inhibe la peroxidación lipídica. En la misma línea se encuentran otras moléculas como la haptoglobina, que secuestra hemoglobina o la albumina, que secuestra cobre.

El *urato* se obtiene del metabolismo de degradación de los nucleótidos xantina a ácido úrico (urato). Es el producto final del metabolismo de las purinas en humanos y funciona como el típico antioxidante suicida (reduciéndose a xantina e hipoxantina) o como quelante de metales de transición (disminuyendo la reacción de Fenton y Haber Weiss) inhibiendo reacciones catalizadas por metales sin modificar su estado de oxidación.

La *bilirrubina* es un tetrapirrol lineal (unido a la albúmina). Producto final de la degradación del grupo hemo. Es un antioxidante liposoluble y, por tanto, capaz de inhibir la lipoperoxidación rivalizando en la membrana con la vitamina E. Producto de su metabolización se oxida a biliverdina al captar radicales hidroperóxido y éste se reduce para dar la bilirrubina.

Además de los sistemas enzimáticos y no enzimáticos los seres vivos disponen de un tercer tipo de antioxidantes endógenos constituidos por los sistemas reparadores. En este grupo se encuentran los mecanismos defensivos enzimáticos coadyuvantes o de soporte de los anteriores, son los sistemas reparadores de moléculas previamente afectadas. Los sistemas reparadores pueden ser directos como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa que reducen los grupos disulfuro (S-S) de los aminoácidos azufrados (Koc y Gladyshev, 2007; Weissbach y cols., 2002), o indirectos como es el reconocimiento del daño molecular y la reparación de ese daño, que tiene lugar en las cadenas carbonadas peroxidadas, en las proteínas oxidadas y en las cadenas de DNA y RNA oxidadas (Willey y Harris, 1990). En este grupo de enzimas reparadoras, están las proteasas y las fosfolipasas que actúan sobre proteínas y fosfolípidos respectivamente una vez se produce el daño en la molécula y que deben ser reemplazadas vía síntesis de novo. Los ácidos nucleicos que han sido modificados por estrés oxidativo son reparados principalmente por el sistema BER (reparación por escisión de base) donde intervienen un grupo de enzimas como glicosilasas y endonucleasas AP, el nucleótido dañado es repuesto por polimerasas (Azqueta y cols., 2009).

2.1.4.2. Antioxidantes Exógenos.

Este grupo de antioxidantes lo constituyen aquellas moléculas con capacidad antioxidante que no se pueden sintetizar endógenamente y son obtenidos a partir de la dieta, como las vitaminas o los compuestos fenólicos.

2.1.4.2.1. Vitaminas y carotenoides

Vitamina C o Ácido Ascórbico

La vitamina C o el ácido ascórbico, está considerado uno de los antioxidantes naturales más efectivos y menos tóxicos, y es el antioxidante extracelular más importante (Kojo, 2004). Esta presente fundamentalmente en frutas como los cítricos, y verduras como tomates, pimientos verdes, brócoli, coliflor, espinacas, patatas...

El ácido ascórbico es un antioxidante hidrofílico que puede existir en tres estados redox: ascorbato (reducido), radical semidehidroascorbato (oxidación monoelectrónica del ascorbato) y dehidroascorbato (oxidación bielectrónica del ascorbato) (Levine y cols., 2006). Dos procesos oxidativos monovalentes consecutivos dan lugar al dihidroascorbato, con la formación del radical semihidroascorbato como intermediario. Estas características hacen de este compuesto un excelente antioxidante hidrosoluble.

Reacciona con diferentes especies oxigénicas reactivas como el $O_2^{\bullet -}$, OH^{\bullet} , ROO^{\bullet} y 1O_2 pero no es buen antioxidante frente al H_2O_2 , de hecho, potencia su generación mediante la inhibición de la catalasa (Halliwell y cols., 2008). Actúa sinérgicamente con otros antioxidantes como la vitamina E o el urato para regenerarlos volviéndolos a su estado activo (Aguirre y May, 2008). Además existe una interrelación entre el GSH y el ácido ascórbico (Linster y cols., 2007), ya que existen transhidrogenasas como la glutarredoxina, capaces de reducir el ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico con el consumo de GSH, permitiendo así su reciclado.

Entre sus funciones como antioxidante juega un papel importante protegiendo del daño oxidativo a los lípidos de membrana y a las proteínas (Asard, 2008), actúa como un modulador enzimático en la regulación de la sintasa endotelial (eNOS) y de la NADPH oxidasa en la pared vascular (Sönmez y cols., 2009; Wilson, 2009; Rodrigo y cols., 2007). Otras funciones de la vitamina C, es actuar como cofactor esencial para la formación de colágeno, contribuir a una mejora de la síntesis de carnitina y a la reducción de la concentración plasmática de triglicéridos (Okamoto y Ueno, 2006), participar en la biosíntesis de neurotransmisores (Bagga y cols., 2008; Rodrigo y cols.,

2007), además, estudios recientes muestran su capacidad para modular la proliferación celular (Ulrich-Merzenich y cols., 2009).

Estudios epidemiológicos, muestran una correlación negativa entre el consumo de alimentos con vitamina C y cáncer (Kim y cols., 2010; Nagel y cols., 2010;). Otros estudios, *in vitro* e *in vivo*, muestran los efectos de la vitamina C en la inhibición de la angiogénesis (Mikirova y cols., 2010), así como los efectos protectores frente al daño cerebral (Iwata y cols., 2010; Harrison y cols., 2009).

También puede actuar de prooxidante en presencia de metales de transición (Cu, Fe), generándose el radical hidroxilo. Este efecto prooxidante del ácido ascórbico no tiene lugar, normalmente, *in vivo* dado que en situaciones no patológicas no hay cobre ni hierro libres en los fluidos extracelulares (Gaetke y Chow, 2003; Chen y cols., 2000).

Vitamina E o Tocoferoles

La *vitamina E* está considerada como el principal antioxidante secuestrador de radicales lipofílicos *in vivo* (Pryor, 2000). Los tocoferoles son constituyentes minoritarios de todos los aceites vegetales y están entre los antioxidantes más conocidos y utilizados. Se conocen ocho homólogos, alfa, beta, gamma y delta-tocoferoles y los correspondientes tocotrienoles.

De ellos el α -tocoferol es el que muestra más actividad biológica (Rodrigo y cols., 2007) y su actividad antioxidante se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol. Previene el daño oxidativo a membranas (Traber, 2007; van Aalst y cols., 2004), impidiendo la reacción de propagación, que es la principal causante de la peroxidación lipídica, amortigua los efectos peroxidantes del ión superóxido, modula la cascada metabólica del ácido araquidónico y controla la fluidez de la membrana, ordenando su estructura.

Otra reacción importante es la reducción del radical del alfa-tocoferol por otros antioxidantes como la vitamina C, CoQ y glutathion (GSH) (Rodrigo y cols., 2007) y esto es muy importante ya que regenera o ahorra vitamina E y también reduce el carácter prooxidante del radical de vitamina E (Figura 2.10) (Abudu y cols., 2004).

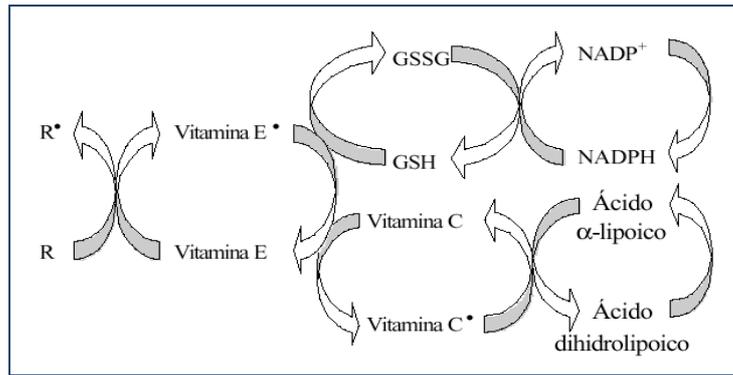


Figura 2.10. Mecanismo de acción de la vitamina E

Carotenoides

Los carotenoides son una familia de compuestos pigmentados que son sintetizados por las plantas y los microorganismos. Se dividen en dos grupos, los compuestos hidrocarbonados y las xantofilas. Aunque los carotenoides están presentes en muchos alimentos comunes, las frutas fuertemente pigmentadas, los zumos y las hortalizas constituyen las principales fuentes en la alimentación. Hortalizas y frutas con una tonalidad amarillo-naranja proporcionan la mayor parte de β -carotenos y α -carotenos, las frutas naranjas proporcionan α -criptoxantina, las verduras de color verde oscuro aportan luteína y los tomates así como los productos a base de tomate proporcionan licopeno.

Debido a la naturaleza insaturada de los carotenoides están sujetos a cambios debidos principalmente a la oxidación. Sin embargo, otros factores como la temperatura, la luz y el pH también pueden producir alteraciones que pueden influir en el color de los alimentos, así como en su valor nutricional (Meléndez-Martínez y cols., 2004). En general, el contenido de carotenoides de los alimentos no se ve alterado al cocinarlos, aunque temperaturas extremas darían lugar a su destrucción (Thane y cols., 1997).

Distintos estudios epidemiológicos relacionan de forma positiva una mayor ingesta alimentaria de carotenoides con un menor riesgo de enfermedades crónicas (Widome y cols., 2010; Hu y cols., 2009). El β -Caroteno y el licopeno han demostrado tener una relación inversa con el riesgo de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, mientras que la luteína y zeaxantina a los trastornos relacionados con la vista

(Mein y cols., 2008; Ma y cols., 2010). Las propiedades antioxidantes de los carotenoides es el mecanismo principal de sus efectos beneficiosos, pudiendo actuar como captadores de radicales libres debido a la presencia de múltiples enlaces conjugados. Son eficientes antioxidantes contra el oxígeno singlete y los radicales peróxido, contribuyendo de esta manera al sistema de defensa antioxidante lipofílico del organismo (Young y Lowe, 2001).

2.1.4.2.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, son los antioxidantes más abundantes en la dieta, siendo muy abundantes en frutas, verduras y bebidas derivadas de plantas como el té, vino, zumos, que poseen un alto contenido de estos compuestos. Se encuentran en todos los tejidos en estado libre o lo que es más común, unidos a hidroxiacidos o azúcares formando glicósidos. Desde el punto de vista químico los glicósidos se diferencian de las agliconas en dos propiedades, mayor solubilidad en agua y menor reactividad química (Rice-Evans y cols., 1997). En los tejidos de las plantas metabólicamente activos es muy raro encontrar fenoles libres puesto que son fitotóxicos y la conversión de fenoles conjugados en fenoles libres puede ocurrir durante la senescencia, la maduración de frutos o como mecanismo de defensa de la propia planta ante el ataque de hongos o insectos (Macheix y cols., 1990). Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer un anillo aromático con una sustitución hidroxilo y una cadena lateral funcional (Thomson, 1964). Los grupos hidroxilo suelen estar acilados o glicosilados, su presencia y número determinan su actividad antioxidante. Son moléculas muy reactivas debido a su carácter ácido, por los grupos hidroxilo, y a sus propiedades nucleófilicas, por los anillos bencénicos.

2.1.4.2.2.1. Clasificación

La clasificación de los compuestos fenólicos propuesta por Harborne y Simmonds (1964), según su esqueleto carbonado agrupa a estos compuestos en clases o familias, siendo las más importantes, los **ácidos fenólicos** (ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico), los **flavonoides** (flavonoles, flavonas, flavonoides, flavonoles, isoflavonas, las proantocianidinas) y los **compuestos fenólicos polimerizados** como

estilbenos, y los lignanos, que se distribuyen en las plantas y los alimentos de origen vegetal (Mañach y cols., 2005, 2004) (Figura 2.11).

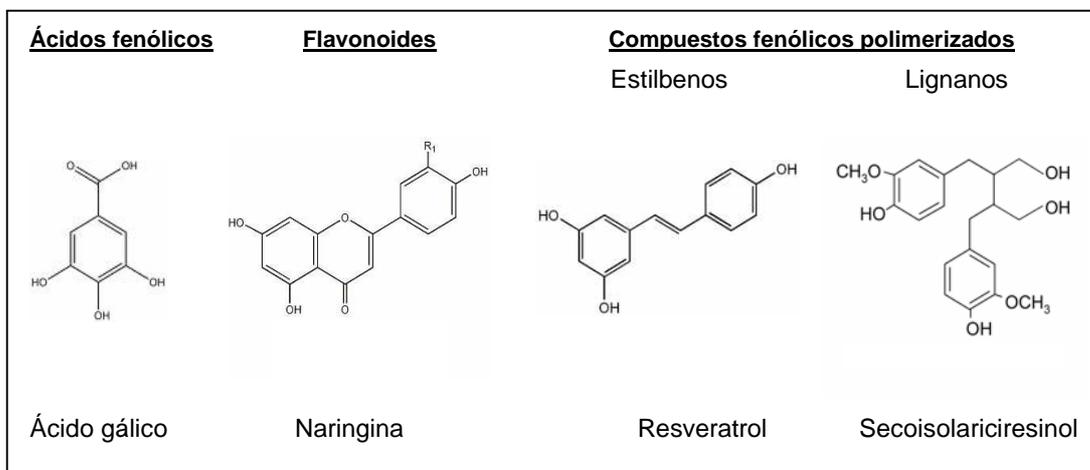


Figura 2.11. Estructura química de los polifenoles

Los **ácidos fenólicos**, también conocidos como compuestos fenólicos de bajo peso molecular, contienen un anillo bencénico que dependiendo de los sustituyentes, da lugar a distintas estructuras. En el caso de los ácidos benzoicos, sus combinaciones con otras moléculas son poco frecuentes, al contrario de lo que ocurre con los ácidos cinámicos, que se han encontrado unidos a hidroxiaácidos, azúcares, y otros compuestos fenólicos (como antocianos y otros flavonoides) formando heterósidos. Por lo general, representan aproximadamente un tercio de los fenoles totales, mientras que los flavonoides representan las dos terceras partes (Scalper y Williamson, 2000).

Los **flavonoides** constituyen el grupo más importante de polifenoles en la naturaleza (Robards y cols., 1999), son muy abundantes en la dieta ya que están presentes en una gran variedad de verduras y frutas, como los cítricos. Son moléculas con una estructura común de difenilpropano (C6-C3-C6), el esqueleto está formado por dos anillos aromáticos (A y B), unidos a través de un anillo pirona o hidropirona (C) (Figura 2.12), dando lugar a flavonas y flavonoles, respectivamente, (Gattuso y cols., 2007).

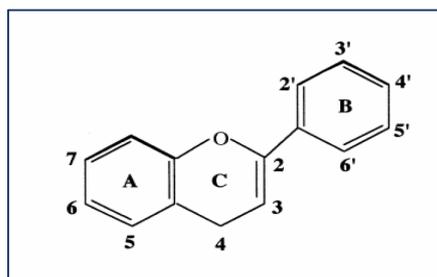


Figura 2.12. Estructura básica de los flavonoides

Las variaciones estructurales en el anillo C, subdividen a los flavonoides en seis importantes subclases, entre las que se encuentran las flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianos y flavanos (incluidas las catequinas, proantocianidinas y biflavanos o procianidinas) (Figura 2.13).

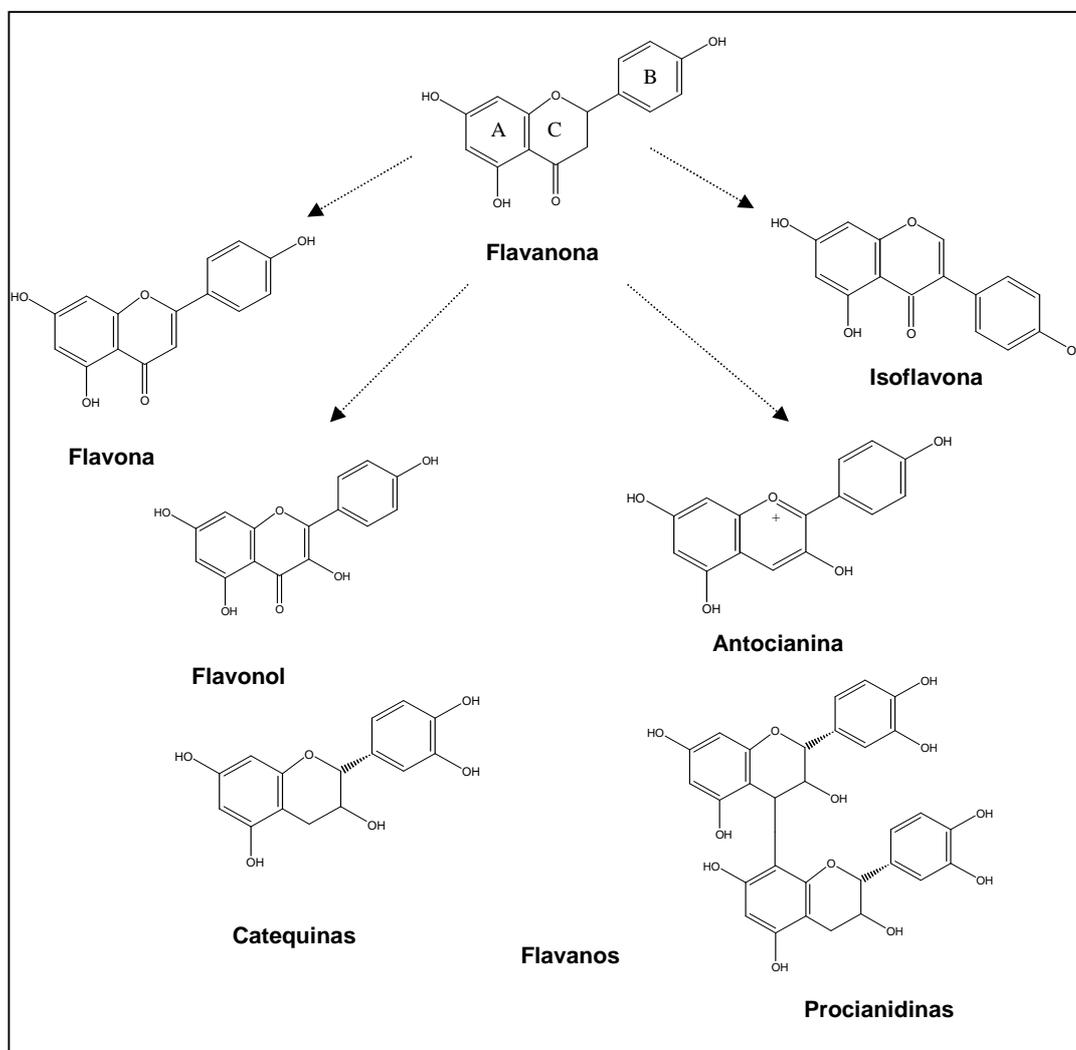


Figura 2.13. Estructura molecular de los flavonoides.

Se diferencian en el grado de oxidación y de sustitución del heterociclo, y a su vez, dentro de cada familia se diferencian por el número y localización de los grupos hidroxilo y metoxilo en los anillos A y B (Pietta, 2000; Rice-Evans y cols., 1996).

Su forma habitual en la naturaleza es en combinación con azúcares mediante uniones O-heterosídicas y con menor frecuencia C-heterosídicas. El azúcar unido normalmente es glucosa o ramnosa. El número de moléculas de azúcar es comúnmente uno, pero podrían ser dos o tres. Estos azúcares pueden estar esterificados o no. La solubilidad en agua de los flavonoides depende de la presencia en su estructura de una proporción suficiente de grupos polares. Tanto la presencia de glucósidos como de grupos hidroxilo aumentan la solubilidad en agua de los flavonoides (Crozier y cols., 2009), así, la solubilidad se incrementa en la medida que aumenta el número de grupos hidroxilos y decrece cuando estos están metilados. La presencia en posición 4 de un carbonilo que puede interaccionar con el grupo hidroxilo de la posición 5, disminuye la solubilidad en agua.

El tercer grupo lo constituyen los **compuestos fenólicos polimerizados** que incluyen los taninos y las ligninas. Los taninos son fenoles polimerizados que originan combinaciones estables con las proteínas y con los polisacáridos, favorecido por el gran número de grupos hidroxilo que poseen. Bate-Smith y Swain (1962) definen los taninos como compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 4000 Da, que además de dar las reacciones normales de los polifenoles, tienen propiedades especiales como la capacidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas; también se ha comprobado su capacidad para reaccionar con radicales libres e iones metálicos (Rivero y cols., 2008). Dentro de los taninos se encuadran dos tipos de compuestos estructuralmente distintos, que se han denominado taninos hidrolizables y taninos condensados. Los primeros son polímeros de los ácidos gálico (galotaninos) o elágico (elagitaninos) mientras que los segundos son polímeros de flavan-3-ol y se denominan proantocianidinas.

2.1.4.2.2.2. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son componentes importantes para la calidad de la fruta, debido a su contribución al sabor, color y propiedades nutricionales (Cheynier, 2005). Algunos polifenoles volátiles, como la vainillina y eugenol, dan lugar a olores muy característicos, y están asociados con el amargor y la astringencia, contribuyendo así al perfil sensorial de muchos alimentos (Lesschaeve y Noble, 2005). Además, sirven

como importantes reservorios de oxígeno y sustratos en procesos de tostado. Así, los extractos crudos de frutas, hierbas, hortalizas, cereales y otras materias vegetales ricas en compuestos fenólicos (Mañach y cols., 2004) son cada vez más de interés en la industria alimentaria ya que retardan la degradación oxidativa de los lípidos y mejoran así la calidad y valor nutritivo de los alimentos (Kahkonen y cols., 1999).

De las características más importantes de los polifenoles presentes en los alimentos, destacan sus propiedades antioxidantes (Frankel y Finley, 2008). Estas propiedades antioxidantes son una de las principales responsables de sus efectos saludables, previniendo enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos (Ramesh y cols., 2010; Butt y cols., 2009; García-Lafuente y cols., 2009; Weinreb y cols., 2009; Ramos, 2008).

El mecanismo de la actividad antioxidante de los flavonoides parece ser doble, por un lado actúan como *captadores de radicales libres*, y por otro lado, como *quelantes* (Figura 2.14).

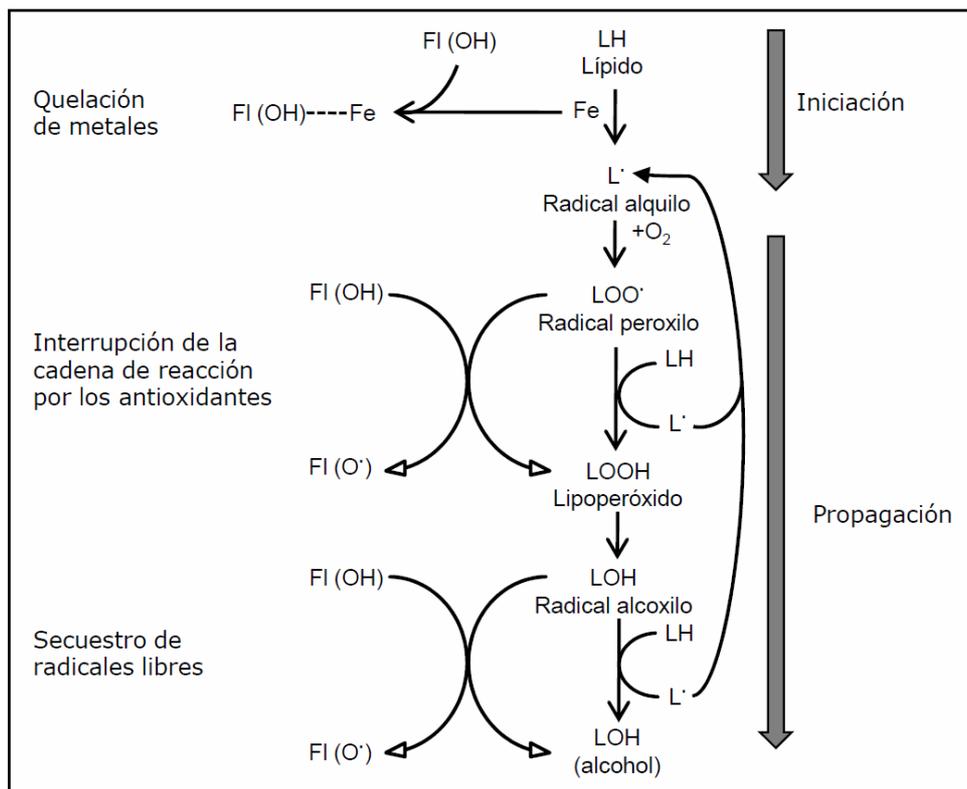


Figura 2.14. Mecanismos de la actividad antioxidante de los flavonoides.

La capacidad *captadora de radicales libres* se atribuye a su capacidad para donar átomos de hidrógeno o electrones. De hecho, los grupos fenólicos de los flavonoides sirven de fuente de átomos de "H" de forma que el radical producido puede deslocalizarse sobre su estructura (Di Majó y cols., 2005; Burda y Oleszek, 2001). La capacidad *quelante* la ejercen impidiendo la reacción de Fenton y evitando la generación de radicales.

Además de la estructura, el grado de hidroxilación, sustituciones, conjugaciones y el grado de polimerización determinan la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos (Di Majó y cols., 2005; Calabrò y cols., 2004; Benavente-García y cols., 1997; Rice Evans y cols., 1996). En este sentido Heim y cols. (2002) expusieron algunas evidencias al respecto: a) Los múltiples grupos hidroxilo confieren una capacidad antioxidante así como capacidad quelante, pero también confieren efecto prooxidante. b) Los grupos metoxi inducen efectos estéricos negativos e incrementan la lipofilidad y el daño a membranas. c) Un doble enlace y una función carbonilo en el heterociclo o la polimerización de la estructura básica incrementa la actividad antioxidante, por la formación de un flavonoide más estable mediante conjugación y deslocalización de electrones.

En general, hay tres grupos estructurales (Figura 2.15), que determinan la capacidad captadora de radicales libres de los compuestos fenólicos (Bors y cols., 1990a; Bors y cols., 1990b).

(A) *la presencia de un grupo catecol (orto-dihidroxi)* en el anillo B como rasgo estructural fundamental, lo que confiere mayor estabilidad a los radicales aroxil, posiblemente a través de enlaces de hidrógeno, y que participa en la deslocalización de electrones;

(B) *el doble enlace 2,3, en conjugación con una función 4-oxo* de un grupo carbonilo en el anillo C, responsables de la deslocalización de electrones desde el anillo B;

(C) *la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5.*

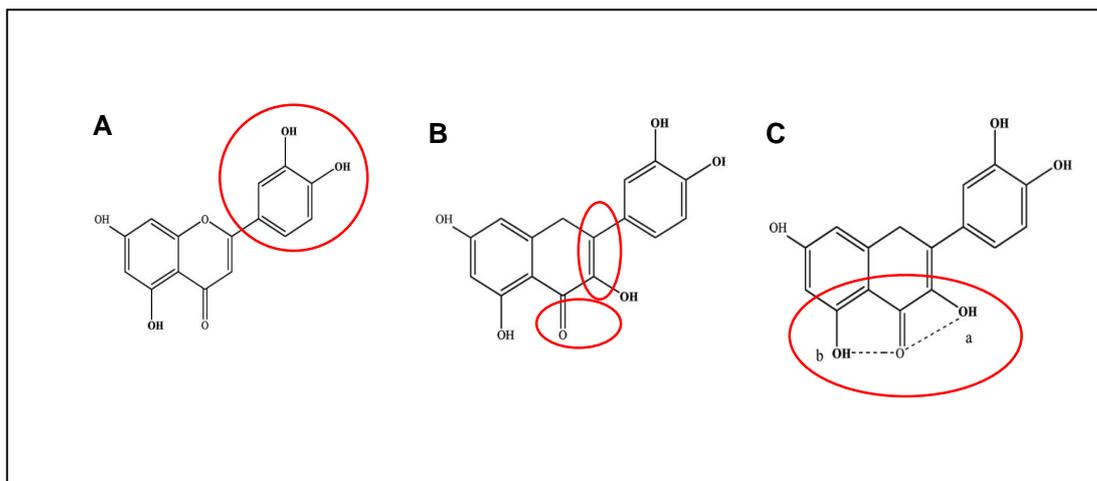


Figura 2.15. Grupos estructurales que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides

Distintos trabajos han demostrado que la presencia de un grupo hidroxilo en posición 5 y 7 incrementa significativamente la capacidad antioxidante (Yu y cols., 2005). La conjugación del anillo piránico con el resto de la molécula, lo cual es típico de las antocianidinas, incrementa la estabilización de los radicales formados y produce un aumento de la actividad antioxidante. Además, la presencia de grupos hidroxilo en posición 3 incrementa la actividad scavenger, mientras que la presencia adicional de grupos hidroxilo y metilo en posiciones 3, 5 y 7 en los anillos A y C parecen ser menos importantes (Yu y cols., 2005).

Estas características estructurales contribuyen a aumentar la estabilidad del radical aroxil. Así, los flavonoles y flavonas que contienen un grupo catecol en el anillo B son más activos que otros tipos de flavonoides, siendo los flavonoles más potentes que las flavonas debido a la presencia del grupo hidroxilo en posición 3. Sin embargo, alteraciones en la disposición de los grupos hidroxilo y la sustitución de un grupo hidroxilo por glicosilación disminuye la actividad antioxidante. La glicosilación de todas estas posiciones influye en la actividad antioxidante de los flavonoides. La glicosilación de este grupo hidroxilo disminuye la capacidad scavenger y un grupo hidroxilo adicional en el anillo B (grupo pirogalol) incrementa la capacidad antioxidante. Por el contrario, un solo grupo hidroxilo en el anillo B reduce esta actividad. Por otra parte, la ausencia de conjugación entre el doble enlace 2,3 y el grupo hidroxilo en posición 4 es la responsable de que flavonoles y flavanonas sean antioxidantes más débiles.

Como *quelantes de metales*, requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los *o*-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton, ya que esta estructura junto con los grupos 4-oxo-5-hidroxi así como 4-oxo, 3-hidroxi son los sitios de unión de los metales de transición (Rice-Evans y cols., 1996).

Además de las características estructurales, otro factor que afecta a la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos es el grado de polimerización. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros. Al ser compuestos fenólicos con un elevado número de grupos hidroxilo en sus estructuras moleculares muestran una mayor actividad antioxidante *in vitro* (Rice-Evans y cols., 1997). La presencia de sustituyentes voluminosos en los anillos, que inducen la donación de electrones, aumenta la efectividad como antioxidantes de los compuestos fenólicos al disminuir la fuerza de los enlaces O-H. Por otro lado, el impedimento estérico generado por los sustituyentes en la región del radical, disminuye la velocidad de las reacciones de propagación en la que está implicado el propio radical fenoxilo, contribuyendo a su estabilización (Robards y cols., 1999). Así la actividad para captar O₂ aumenta con el grado de polimerización y los dímeros de ácido ferúlico inhiben la peroxidación lipídica en mayor extensión que los monómeros.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos también va estar determinada por su solubilidad relativa en fase acuosa o lipofílica. La solubilidad dependen en gran medida de su estructura y de los sustituyentes asociados (grupos hidroxilo, azúcares, metoxilo, etc.). Así, la unión de azúcares hace que los compuestos fenólicos seán más hidrosolubles pero disminuye su actividad antioxidante (Rice-Evans y cols., 1997). La solubilidad determinará la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos así como su distribución en los organismos a ambientes más acuosos, compuestos hidrofílicos o ambientes lipídicos como las membranas celulares.

Otro mecanismo de acción, es actuar inhibiendo la acción de enzimas como la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa, evitando la generación de especies reactivas del oxígeno *in vivo* (Davalos y cols., 2009; Du y cols., 2009; Koeberle y cols., 2009; Lavelli V, 2008; Leifert y cols., 2008). Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2, al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (Aruna-Devi y cols., 2010; Fernandez-Pachon y cols., 2009). De esta forma los compuestos fenólicos interfieren tanto en las reacciones de propagación

de radicales libres como en la formación del radical en sí. Son distintos estudios los que obtienen una correlación lineal y positiva entre la capacidad antioxidante total de los alimentos y su contenido en polifenoles (Bellion y cols., 2010; Wolfe y cols., 2008; Rivero y cols., 2005).

2.1.4.2.2.3. Efecto prooxidante de los compuestos fenólicos

Paradójicamente, algunos compuestos fenólicos han sido directamente relacionados con una actividad prooxidante (Galati y cols., 2002). Las mismas propiedades que confieren la actividad antioxidante de los flavonoides determinan que tengan efectos prooxidantes, lo que puede implicar un potencial tóxico (Lambert y cols., 2007). La actividad prooxidante fue directamente relacionada con un incremento en el número de grupos hidroxilos (Cao y cols., 1997), sin embargo, otros estudios sugieren que la presencia de un grupo pirogalol, en el anillo A o en el anillo C de los flavonoides, es el factor clave capaz de inducir la formación de H₂O₂ (Hodnick y cols., 1986) y en algunos casos la presencia de RNOS, provocar incluso lesiones en el DNA (Ohshima y cols., 1998). Existen evidencias de que el enlace insaturado entre el carbono 2 y 3 junto con la función oxo del anillo C de las flavonas también puede promover la formación de ROS en medios en presencia de Cu⁺² (Cao y cols., 1997).

Los mecanismos en los que se basa este efecto son la formación de un radical aroxilo labil (Cadenas, 2008) (Figura 2.16). La reacción de autoxidación comporta la formación del radical superóxido que, por acción de la superóxido dismutasa (SOD), produce peróxido de hidrógeno que en la célula debe ser eliminado vía catalasa o glutatión peroxidasa. Si no se elimina, puede producir radicales hidroxilo. El carácter antioxidante y prooxidante viene determinado por la estabilidad del radical formado a partir del flavonoide original. Estos mecanismos pueden constituir la base de ciertas acciones mutagénicas y citotóxicas de los flavonoides. Muchos estudios ponen de manifiesto la dualidad de los flavonoides en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis.

Pueden actuar como antioxidantes/prooxidante y antimutagénicos/promutagénicos, dependiendo de los niveles consumidos y de las condiciones fisiológicas del organismo. Una exposición a niveles demasiado altos de flavonoides puede saturar el organismo provocando la formación de ROS, llegando incluso a dañar el DNA o enzimas asociadas a él (Skibola y Smith, 2000). Algunos de estos efectos prooxidantes son, entre otros la inducción de la apoptosis, citotoxicidad, reducción de

la activación de los factores de transcripción (como AP-1) y la expresión de moléculas de adhesión (como ICAM-1), suprimir la proliferación celular y la activación de la proteína quinasa e inhibir el crecimiento celular (Nameikaite-Cenieré y cols., 2005; Schmidt y cols., 2005;).

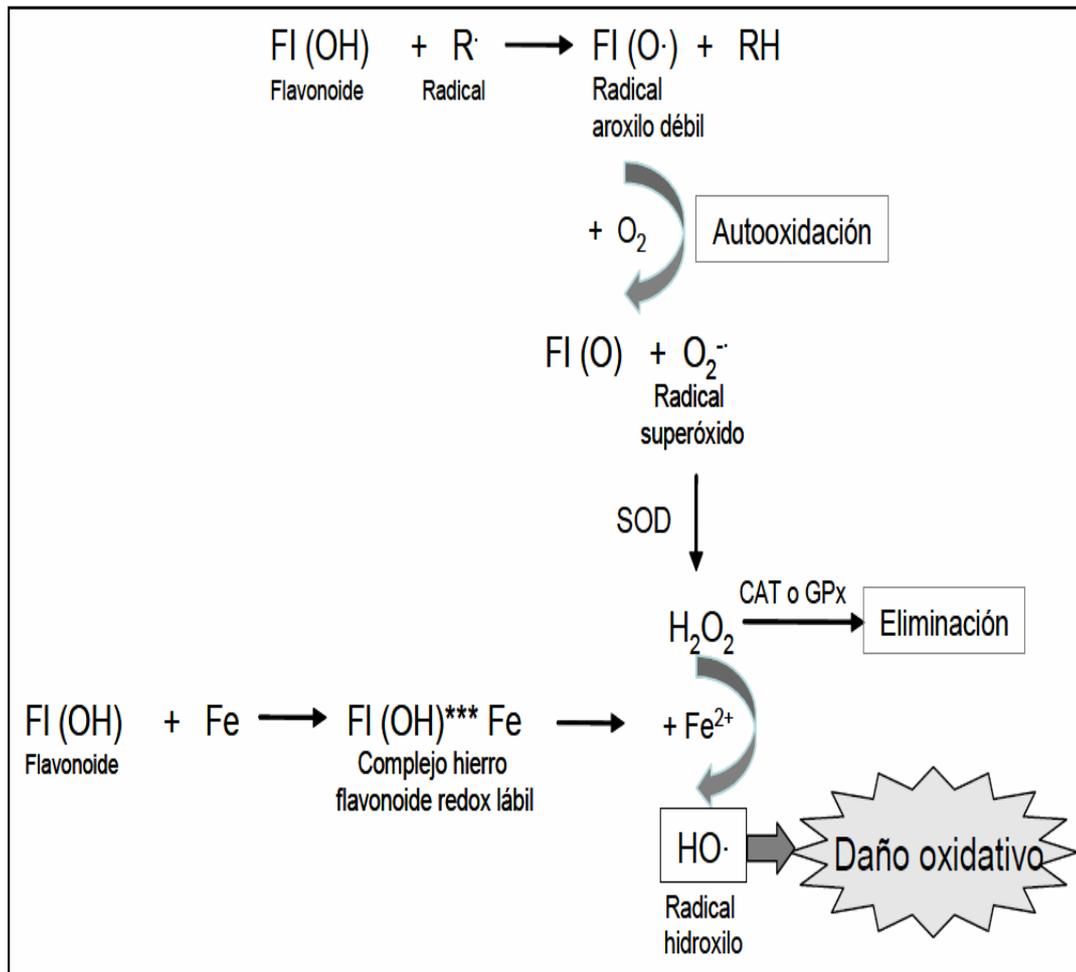


Figura 2.16. Mecanismos prooxidantes de los flavonoides

Generalmente son necesarias altas concentraciones de flavonoides para desarrollar mutagenidad y citotoxicidad. Estas concentraciones no pueden ser alcanzadas fisiológicamente a través de la dieta, pero el uso de suplementos, como antioxidantes y mezclas de hierbas pueden suponer un nivel de exposición potencialmente tóxico (Skibola y Smith, 2000). Por otro lado, la conjugación que sufren los grupos hidroxilos

in vivo atenúa el comportamiento prooxidante de los flavonoides (Zhu y cols., 1994) y se ha observado *in vitro* que la vitamina C atenúa la formación de ROS debida a los flavonoides (Ratty y cols., 1988), por lo que se podría pensar que la actividad prooxidante de algunos flavonoides observada *in vitro* quizás *in vivo* pueda ser modulada.

2.1.4.2.2.4. Efectos de los compuestos fenólicos sobre la salud

Los compuestos fenólicos han estado recibiendo cada vez mayor interés por parte de los consumidores y los fabricantes ya que numerosos estudios epidemiológicos y estudios *in vitro*, e *in vivo* han demostrado que el consumo de alimentos con capacidad antioxidante, muestran un efecto beneficioso para la salud y contribuyen a la prevención de procesos degenerativos, en particular, a reducir la tasa de incidencia y de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, obesidad, diabetes y cancer (Foschi y cols., 2010; Fung y cols., 2009; Martínez-González y cols., 2008; Duthie y cols., 2006; Méndez y cols., 2006;). Muchos de los beneficios asignados a la dieta pueden ser debidos a la actividad sinérgica entre los compuestos antioxidantes ingeridos (Rahman, 2009).

Son numerosos los trabajos que muestran una correlación positiva entre la actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales en distintos alimentos y bebidas como el zumo de pomelo (Igual y cols., 2010; Gorinstein y cols., 2004; Proteggente y cols., 2002). Además, algunos autores sugieren que la capacidad antioxidante esta relacionado con el tipo de compuestos fenólicos presente en dichos alimentos o bebidas. Frutas con una alta capacidad antioxidante generalmente muestran un alto contenido en sustancias antioxidantes, especialmente compuestos fenólicos y específicamente flavonoides (Tavirini y cols., 2008). Los flavonoides de las frutas cítricas parecen estar asociados con un menor riesgo de algunas enfermedades crónicas, con un aumento de la supervivencia.

Un gran número de estudios pone de manifiesto que los biomarcadores del riesgo cardiovascular están influenciados por el consumo de alimentos ricos en polifenoles. El consumo de bebidas como zumos, vino o té muestra efectos significativos en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Codoñer-Franch y cols., 2010; Vita, 2005). Entre los efectos antioxidantes más estudiados está su capacidad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas LDL, la agregación plaquetaria y el daño a eritrocitos (Cheynier, 2005), previniendo de esta forma las enfermedades cardiovasculares y

cerebrovasculares (Martínez Alvarez y cols., 2009; Codoñer-Franch y cols., 2008). Asimismo, el cacao y ciertos tipos de chocolates también reducen el riesgo de dichos procesos cardiovasculares (Keen y cols., 2005).

En relación a su actividad anticarcinogénica, actúan como inhibidores en procesos cancerígenos en los distintos niveles de la oncogénesis y progresión tumoral. En estudios epidemiológicos se ha demostrado que una ingesta elevada de frutas y hortalizas, ricas en polifenoles parece asociarse a una disminución de la incidencia de los cánceres humanos más frecuentes: pulmón, colón, próstata, mama y linfomas (Thompson y cols., 2010; Neuhouser, 2004). Además de los datos epidemiológicos, existen numerosos estudios de laboratorio, fundamentalmente *in vitro*, donde se demuestran efectos anticancerígenos potenciales de los compuestos fenólicos de la dieta. Un ejemplo lo tenemos en el té y sus derivados, que han demostrado efectos anticarcinogénicos, en distintos órganos como la piel, los pulmones, la cavidad oral, el esófago, el estómago, el hígado, el páncreas, el intestino delgado, el colon y la próstata (Sukhthankar y cols., 2010; Yang y cols., 2009; Butt y cols., 2009; Thangapazham y cols., 2007). Esta actividad anticarcinogénica es común a otros compuestos fenólicos, como la curcumina, genisteína y quercetina. Otros polifenoles como las isoflavonas son fitoestrogenos y se ha demostrado que juegan un importante papel en la prevención del cáncer de mama y en la osteoporosis (Adlercreutz y Mazur, 1997).

Los compuestos fenólicos del té son potentes antioxidantes *in vitro*, pero esta capacidad sólo se relaciona parcialmente con su efecto anticanceroso en algunos casos (Xu y cols., 1992; Frei y Higdon, 2003). Algunos estudios sugieren que el efecto de muerte celular inducida por estos compuestos es debido a que son prooxidantes, por ejemplo, la EGCG (Epigallocatequina-3-galato) induce la apoptosis, no la inhibición del crecimiento tumoral (Azam y cols., 2004). De hecho, cuando se añadió EGCG a los cultivos celulares, se observó la producción de H₂O₂ (Hong y cols., 2002).

Algunos compuestos fenólicos son considerados como agentes químicos que previenen el cáncer debido a que inhiben la activación de carcinógenos, un proceso normalmente catalizado por el sistema citocromo P450. Otros, son considerados agentes quimiopreventivos porque inducen las enzimas de Fase II, que facilita la eliminación de ciertos agentes carcinógenos o de intermediarios reactivos (Galli, 2007).

La investigación sobre los efectos neuroprotectores de los polifenoles procedentes de la dieta se ha desarrollado considerablemente. Estos compuestos son capaces de proteger las células neuronales en diversos ensayos *in vivo* e *in vitro* (Ramassamy, 2006). Muchos estudios epidemiológicos han documentado la influencia de los hábitos dietéticos y antioxidantes en la incidencia de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, otros estudios, indican que el consumo de frutas y verduras que contienen altas concentraciones de polifenoles, por lo menos tres veces por semana, puede desempeñar un importante papel en retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer, sobre todo en los portadores del alelo ApoE4 (Dai y cols., 2006). Se ha establecido una asociación entre la dieta mediterránea (MEDI) y menor riesgo de enfermedad de Alzheimer (Scarmeas y cols., 2006). Por otro lado, ha quedado claro que los mecanismos de acción de estos polifenoles van más allá de su actividad antioxidante y la atenuación del estrés oxidativo.

Gran parte del efecto protector de los flavonoides se ha atribuido a su actividad antioxidante por neutralización o secuestro de radicales libres; pero cada vez hay más estudios que evidencian los efectos saludables de los polifenoles pueden estar mediados por sus interacciones con proteínas específicas de las cascadas de señalización intracelular (Virgili y cols., 2008), las cuales inhiben la síntesis de moléculas inflamatorias, la formación de radicales libres, daño nuclear e inducen la expresión de enzimas antioxidantes (Tuñón y cols., 2009). Muchos de estos compuestos interfieren en la regulación de las señales de transducción a distintos niveles, modulando las actividades de los factores de crecimiento hormonal, inhibiendo oncogenes, y/o activando los genes supresores de tumores. Entre la vías de transducción de señales, que pueden regular los polifenoles se encuentran la NF- κ B, MAPKs, PI3K/Akt, β - catenina, y Nrf2 que son fundamentales para regular el sistema de defensa enzimático como la hemo oxigenasa-1 (HO-1), NADPH: quinona oxidoreductasa (NQO1), glutatión S-transferasa (GST), UDP glucuronosil transferasa, tiorredoxina, ferritina, metalotioneína e iNOS (Roy y cols., 2010; Romier-Crouzet, 2009; Oak y cols., 2003). Los flavonoides también inhiben el daño oxidativo al ADN, y favorecen su reparación, reduciendo de esta forma los marcadores de proliferación celular, la metástasis y la angiogénesis. Esta capacidad reguladora de los flavonoides sobre las vías de señalización celular está relacionada con diversas funciones celulares, implicadas en la defensa de la célula resultando en acciones neuroprotectoras, cardioprotectoras y quimiopreventivas.

Estos estudios justifican el creciente interés por los polifenoles, como compuestos bioactivos de los alimentos y la evidencia de su papel en la prevención de distintas enfermedades está emergiendo, así como su uso en el desarrollo de alimentos funcionales.

Numerosos factores genéticos, ambientales y tecnológicos pueden afectar a la concentración de los compuestos fenólicos en los alimentos, algunos de los cuales pueden ser controlados para optimizar el contenido en los alimentos. Estos efectos de los polifenoles sobre la salud, dependen tanto de la ingesta como de su biodisponibilidad, las cuales pueden variar enormemente (Manach y cols., 2004). Una de las posibilidades para aumentar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos se puede llevar a cabo mediante las aplicaciones de diferentes tecnologías que conserven o mejoren la biodisponibilidad de dichos compuestos durante los procesos de elaboración y procesado (Lima y cols., 2009).

2.1.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de un alimento está relacionada con su composición y mide los moles de radicales libres capturados por una solución de antioxidantes, independientemente de la actividad antioxidante de los componentes individualizados (Ghiselli y cols., 2000) a diferencia de la actividad antioxidante que mide la relación constante de un antioxidante sencillo frente a un radical libre. Debido a la variedad de agentes oxidantes y de los diferentes mecanismos antioxidantes, en la actualidad no existe un sólo método de medida para evaluar la capacidad antioxidante de un alimento o su efecto protector sobre las biomoléculas lo cual hace necesario el aplicar diferentes ensayos para generar un perfil sobre la capacidad antioxidante del compuesto o alimento (Rivero y cols., 2008; Schlesier y cols., 2002).

Los métodos que evalúan la capacidad antioxidante pueden estar basados en dos tipos de reacciones HAT (*hydrogen atom transfer*) que miden la habilidad de un antioxidante para estabilizar los radicales libres por transferencia de un átomo de hidrógeno y ensayos basados en reacciones SET (*single electron transfer*) que miden la capacidad potencial de un antioxidante de transferir un electrón para reducir un compuesto incluyendo metales, grupos carbonilo y radicales (Huang y cols., 2005).

Existen numerosos métodos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos (Prior y cols., 2005). Estos se pueden basar en **métodos químicos** que miden la

capacidad de un alimento de estabilizar un radical libre, donde se incluyen los métodos que evalúan la llamada capacidad antioxidante total frente a radicales estables generados químicamente y los que miden la capacidad *scavenger* frente a ROS y RNS y en **métodos biológicos** en los que se cuantifica la habilidad de los antioxidantes para inhibir el daño generado por un radical libre, incluyen los biomarcadores de estrés oxidativo, indicadores del daño oxidativo a biomoléculas.

2.1.5.1. Capacidad antioxidante expresada en equivalentes de Trolox

El ensayo ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid)) fue descrito por Miller y Rice-Evans (1993) y está basado en la capacidad antioxidante de la muestra problema para reducir el radical ABTS^{•+}. Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E.

Han sido varias las modificaciones realizadas sobre el método original que se han centrado en el modo de generar el radical, usándose reacciones enzimáticas con metamioglobina (Miller y cols., 1993), peroxidasa (Arnao y cols., 1996), hemoglobina (Cano y cols., 2002) o con dióxido de manganeso (Miller y Rice-Evans, 1997), con ABAP (Van den Berg y cols., 1999) o persulfato potásico (Re y cols., 1999).

Este método ha sido utilizado para medir antioxidantes hidrofílicos en un medio tamponado y lipofílicos en solventes orgánicos como diclorometano o acetona. Sin embargo las reacciones en agua aparentemente se ven favorecidas por este método y permiten medir ambos tipos de antioxidantes (Pulido y cols., 2003).

A parte del método descrito previamente, en la bibliografía se detallan otros, el método DPPH es un método sencillo que se basa en la reducción del radical DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidracil) por captación de un átomo de hidrógeno al añadir el antioxidante. Se emplea sobre todo para determinar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos (Magalhaes y cols., 2008). El DPPH es un buen método para medir la capacidad antioxidante en fracciones o alimentos. No obstante, algunos antioxidantes que presentan un espectro de absorción similar al del radical, como es el caso de los carotenoides, pueden causar interferencias (Prior y cols., 2005).

El ensayo ORAC (oxygen radical absorbance capacity) mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente como la fluoresceína sometida a un flujo

constante de radicales peroxilo generados por el AAPH. La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia (Magalhaes y cols., 2008). Este método se ha empleado en el análisis de plasma, sin embargo presenta el inconveniente de sobrevalorar a los antioxidantes más débiles (Huang y cols., 2005).

2.1.5.2. Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante. Ensayo FRAP

Este método fue desarrollado por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor del plasma, y posteriormente ha sido adaptado para el análisis de la capacidad antioxidante en alimentos. El mecanismo básico de reacción es la transferencia de electrones (SET) y es un método especialmente indicado para antioxidantes de naturaleza hidrofílica.

El método determina la capacidad de la muestra para reducir un complejo de hierro férrico con la molécula TPTZ (ferric 2,4,6-tripyridyl-S-triazine) a su forma ferrosa, dando un compuesto coloreado que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 595 nm y los resultados son expresados en equivalentes de Fe (II). El poder reductor de los compuestos fenólicos se asocia con el número de grupos hidroxilo y el grado de conjugación de la molécula.

Otro método es el CUPRAC (Cooper Reduction Antioxidant Capacity) similar a FRAP pero usando de base Cobre (II) (Gorinstein y cols., 2008; Apak y cols., 2007; 2004).

2.1.5.3. Evaluación de la capacidad estabilizadora de radicales

Capacidad estabilizadora del radical superóxido: El método más utilizado para evaluar la capacidad estabilizadora del radical superóxido de un alimento es el empleo de un sistema no enzimático que usa el complejo 5-metilfenacin metosulfato (PMS- β -NADH) (Liu y cols., 1997). En este método, el compuesto con capacidad antioxidante inhibe la producción de sal de formazan generada a partir de la reducción del nitro azul tetrazolio (NBT) por el radical superóxido, compuesto que es cuantificable espectrofotométricamente a 560 nm.

La actividad scavenger de un antioxidante frente al radical superóxido puede también puede ser medida en un sistema enzimático hipoxantina-xantina oxidasa (HX/XO) determinando la inhibición en la generación del radical (Robak y cols., 1988).

Capacidad estabilizadora del radical hidroxilo: Los métodos se basan en generar el radical hidroxilo a través de reacciones de Fenton o Haber-Weiss utilizando metales de transición como el Fe o el Cu. El método más utilizado es el ensayo de la desoxirribosa, que emplea el ácido ascórbico y metales de transición como el Fe o Cu para generar el radical hidroxilo en presencia de EDTA (Halliwell, 1990; Aruoma y cols., 1993). Este radical ataca al azúcar, desoxirribosa, que se degrada en una serie de fragmentos. Éstos reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBA) a 100°C en medio ácido, dando lugar a un cromóforo rosa, cuya formación es proporcional a la cantidad de azúcar degradado.

Muchos antioxidantes pueden actuar como estabilizadores o quelantes y para evaluar si actúan a través de uno u otro mecanismo se realizó el estudio en presencia y ausencia de un quelante como el EDTA (Aruoma, 1994) o generando el radical hidroxilo sin metales usando H₂O₂/NaOH/DMSO (Yamaguchi y cols., 1999).

2.1.5.4. Evaluación de Biomarcadores del daño oxidativo a biomoléculas

La capacidad de un alimento o compuesto de inhibir el daño oxidativo a proteínas, aminoácidos, lípidos o ácidos nucleicos se puede evaluar a través de la cuantificación de biomarcadores. Un biomarcador tiene que ser el principal producto de modificación oxidativa que pueda estar implicado directamente en el desarrollo de una enfermedad, un producto estable y no susceptible a modificaciones durante el ensayo. Además, tiene que ser medido por un ensayo que sea específico, sensible, reproducible y robusto (Zwart y cols., 1999).

El estudio de la peroxidación lipídica está relacionado con el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y otras enfermedades crónicas (Finsterer, 2007; Uchida, 2007; Tavidou y cols., 2006), el daño oxidativo a proteínas con diferentes enfermedades entre ellas las neurodegenerativas y los biomarcadores de daño oxidativo al DNA son marcadores de carcinogénesis (Bocchetti y cols., 2008; Buthbumrung y cols., 2008).

Biomarcadores de la oxidación a lípidos: El proceso de peroxidación lipídica engloba una serie de reacciones en cascada entre cuyos productos se encuentran hidroperóxidos y aldehídos, para los cuales existen diferentes ensayos para su cuantificación. De los diferentes métodos para evaluar el daño oxidativo a lípidos, el más ampliamente usado es el que mide el malondialdehído (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBARS). La medida puede realizarse espectrofotométricamente o

por fluorescencia (Draper y cols., 1993; Janero 1990).

Biomarcadores del daño al DNA: La oxidación del DNA da lugar a diferentes productos de oxidación bases nitrogenadas, así como a la escisión de las hebras que componen la doble hélice. Así, la capacidad de un compuesto de inhibir la rotura de las hebras de DNA se puede seguir “in vitro” mediante electroforesis en gel. El daño oxidativo se puede visualizar en función del desplazamiento de las hebras de DNA en el gel en presencia y ausencia del agente oxidante. Otro método también utilizado es el llamado ensayo cometa, que mide el daño oxidativo al DNA en células, siendo un método muy sensible para detectar la rotura de la cadena de DNA (Singh y cols., 1988).

Como biomarcador del daño oxidativo a las bases nitrogenadas del DNA se utiliza la base modificada, 8-hidroxi -2`-deoxiguanosina (8-OHdG) es una de las lesiones más críticas del daño oxidativo al DNA y sus niveles *in vivo* están relacionados con los procesos carcinogénicos.

Biomarcadores de la oxidación a proteínas: Las proteínas son también susceptibles al daño oxidativo por ROS o RNS, y los productos formados como consecuencia de su oxidación son químicamente muy diversos. Entre las modificaciones originadas resultado de su oxidación una de las más comunes es la aparición de grupos carbonilo (Levine y cols., 1990) siendo su acumulación considerado un marcador de daño oxidativo a proteínas en diferentes patologías (Shinall y cols., 2005; Berlett y Stadtman, 1997; Dean y cols., 1997). Estos grupos son producidos sobre las cadenas laterales de las proteínas cuando están oxidadas, dando lugar a grupos químicos estables que son fácilmente detectables. Otros métodos para cuantificar el daño a proteínas evalúan el daño oxidativo a grupos tiol, o la oxidación de aminoácidos como tirosina o triptófano, bien sea radiolítica o inducida por metales de transición (Huggins y cols., 1993).

2.2. ZUMO DE POMELO: COMPUESTOS BIOACTIVOS Y TÉCNICAS DE DESAMARGADO

2.2.1. ASPECTOS GENERALES

La producción mundial de frutas está liderada por los cítricos, con una producción anual de aproximadamente 102 millones de toneladas. No se conoce con exactitud el origen del pomelo, clasificado como *Citrus paradisi* Macf. (Citrus Pages, 2009), aunque

numerosas investigaciones señalan que se trata de una hibridación natural entre el naranjo dulce y el *pummelo* (una especie diferente), producido en el Caribe y que posteriormente su cultivo se extendió a los Estados Unidos, donde se comienza su producción a gran escala. A día de hoy, el cultivo de pomelo se lleva a cabo en numerosos países tropicales y subtropicales y representa el tercer lugar en importancia después de naranja y mandarina, donde el 26 % se destina al consumo procesado.

Todas las variedades de pomelo (Figura 2.17) surgieron a partir de numerosas hibridaciones, cada una de ellas se puede clasificar dependiendo de la tonalidad de su pulpa (Moore, 2001). De forma general, las variedades de pomelo pueden clasificarse en dos grupos, las variedades blancas o comunes que tienen la pulpa de color amarillo, entre ellas podemos distinguir las variedades Duncan y Marsh, siendo esta última la más importante. Un segundo grupo engloba las variedades pigmentadas, con una pulpa de un tono rojizo debido al licopeno, y que están adquiriendo mayor popularidad entre los consumidores, entre las que destacamos las variedades Burgundy, Ruby, Star Ruby, Thomson o Pink Marsh.

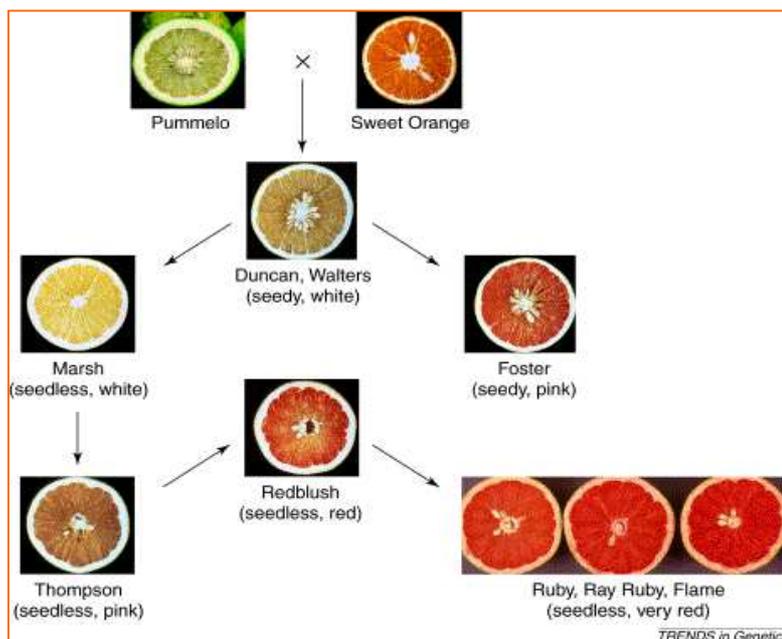


Figura 2.17. Variedades de pomelos (Moore, 2001)

La variedad seleccionada en este trabajo es la Star Ruby por ser la comercialmente disponible, que presenta una coloración tanto interior como exterior más oscura y por ello más atractiva.

2.2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL POMELO

El pomelo se caracteriza por la presencia de compuestos bioactivos como ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides, en particular, la naringina, que se encuentra en abundancia en el zumo (Hsia y cols., 2008; Yu y cols., 2005), y esteroides como el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol.

Sus propiedades y efectos beneficiosos sobre la salud han sido asociados a estos componentes, debido a sus características antioxidantes naturales (Marti y cols., 2009; Ribeiro y cols., 2008; Xu y cols., 2008). Muchos autores han constatado el papel de los cítricos en la prevención de enfermedades, tales como diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, y ciertos tipos de cáncer (Foschi y cols., 2010; Thompson y cols., 2010; Díaz-Juarez y cols., 2009; Benavente-García y cols., 2008; Poulouse y cols., 2005).

2.2.2.1. Compuestos fenólicos

La distribución cuantitativa de los compuestos fenólicos en los cítricos varía entre los diferentes órganos de la planta y las diferentes especies (Trípoli y cols., 2007). Esta variabilidad está condicionada por la genética y por otros factores como la climatología, el grado de madurez, la posición del árbol, el origen y las prácticas agrícolas. En el caso de los productos procesados, el contenido de flavonoides estará condicionado por el tipo de procesamiento tecnológico que se utilice (Robards y Antolovich, 1997).

Hasta la actualidad, en los cítricos *Citrus sp.*, han sido identificados más de 60 flavonoides y la mayoría pueden ser clasificados en tres grupos: flavanonas, flavonas y flavonoles (Tabla 2.2) (Benavente-García y cols., 1997), además de otros compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, etc) que también están presentes en los cítricos.

Los principales flavonoides presentes en el zumo de pomelo, variedad *grapefruit* (*Citrus paradisi Macf.*) son la naringina (Ting, 1958), narirutina, hesperidina, neohesperidina, didimina y poncirina (Hagen y cols., 1966; Versteeg y cols., 1977).

Las flavanonas son los flavonoides más abundantes de los cítricos, representan el 98% de los flavonoides en el pomelo (Peterson y cols., 2006). Las flavanonas son débilmente ácidas y pueden ser fácilmente convertidas a chalconas en medio alcalino o ácido (Tomás-Barberan y cols., 2000). Se encuentran como un par de

diastereoisómeros, debido a la presencia de un centro quiral en la aglicona (C-2) y un residuo de azúcar ópticamente activo.

Las flavanonas en los cítricos están presentes en forma de glucósidos o como agliconas. Sin embargo, en los zumos están presentes principalmente como sus derivados glicosílicos unidos a azúcares mediante uniones O-heterosídicas y con menor frecuencia C-heterosídicas (Justasen y cols., 1998).

Tabla 2.2 Características estructurales de los flavonoides de cítricos (Trípoli y cols., 2007).

Compounds	Structural formula	Molecular weight	Molecular formula
<i>Flavanone aglycone forms</i>			
Naringenin	R ₁ = OH; R ₅ = OH; R ₃ = H; R ₄ = OH	271 Da	C ₁₅ O ₅ H ₁₁
Hesperetin	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OCH ₃	288 Da	C ₁₅ O ₆ H ₁₃
Isosakuranetin	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = H; R ₄ = OCH ₃	285 Da	C ₁₆ O ₅ H ₁₃
Heridictyol	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OH	287 Da	C ₁₅ O ₆ H ₁₁
<i>Flavone and flavonol aglycone forms</i>			
Apigenin	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = H; R ₄ = OH; R ₅ = H	270 Da	C ₁₅ O ₅ H ₁₀
Luteolin	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OH; R ₅ = H	286 Da	C ₁₅ O ₆ H ₁₀
Diosmetin	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OCH ₃ ; R ₅ = H	288 Da	C ₁₅ O ₆ H ₁₂
Quercetin	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OH; R ₅ = OH	302 Da	C ₁₅ O ₇ H ₁₀
Kämpferol	R ₁ = OH; R ₂ = OH; R ₃ = H; R ₄ = OH; R ₅ = OH	286 Da	C ₁₅ O ₆ H ₁₀
<i>Flavanone neohesperidoside forms</i>			
Naringin	R ₂ = OH; R ₃ = H; R ₄ = OH	604 Da	C ₂₉ O ₁₄ H ₃₂
Neohesperidin	R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OCH ₃	634 Da	C ₃₀ O ₁₅ H ₃₄
Poncirin	R ₂ = OH; R ₃ = H; R ₄ = OCH ₃	588 Da	C ₂₉ O ₁₃ H ₃₂
Neocitricin	R ₂ = OH; R ₃ = OH; R ₄ = OH	620 Da	C ₂₉ O ₁₅ H ₃₂
<i>Flavanone rutinside forms</i>			
Narirutin	R ₃ = H; R ₄ = OH	551 Da	C ₂₉ O ₁₁ H ₂₇
Hesperidin	R ₃ = OH; R ₄ = OCH ₃	583 Da	C ₃₀ O ₁₂ H ₃₁
Didymin	R ₃ = H; R ₄ = OCH ₃	567 Da	C ₃₀ O ₁₁ H ₃₁
Eriocitrin	R ₃ = OH; R ₄ = OH	571 Da	C ₂₉ O ₁₂ H ₃₁
Diosmin	R ₃ = OH; R ₄ = OCH ₃	583 Da	C ₃₀ O ₁₂ H ₃₁

Las formas glicosiladas se clasifican en dos tipos de di-glucósidos: neohesperidósidos (ramnosa- α -1,2 glucosa) y rutinósidos (ramnosa- α -1,6 glucosa). En general, las distintas variedades de cítricos difieren en la presencia de rutinósidos o neohesperidósidos, así por ejemplo el limón (*Citrus limón*) y la naranja dulce (*Citrus sinensis*) contiene rutinósidos, la naranja agria (*Citrus aurantium*) neohesperidósidos mientras que en el pomelo (*Citrus paradisi*) se encuentran presentes tanto rutinósidos como neohesperidósidos, entre ellos, narirutina, naringina, hesperidina, neohesperidina son las principales flavanonas glicosiladas en el zumo de pomelo. La naringina es la más abundante y está presente en concentraciones muy altas, que varían dependiendo de la zona del pomelo, en concreto en la variedad Marsh el contenido es de 2700, 1270, 1130 y 994 mg/100g fruta en el albedo, vesículas de zumo, segmento de la epidermis y en el flavedo, respectivamente (Nogata y cols., 2006) a diferencia de los demás frutos cítricos que tienen pequeñas cantidades de naringina glicosilada (Bocco y cols., 1997; Yusof y cols., 1990).

Por otra parte, los zumos de cítricos también contienen pequeñas cantidades de flavonas C-heterósidos, con sustituciones en C-6 o C-8, o en ambas posiciones (Gattuso y cols., 2007; Trípoli y cols., 2007). Estos azúcares determinan un comportamiento organoléptico diferente en las frutas, así como en sus zumos, de forma tal que los β -neohesperidósidos, presentes en los pomelos, son intensamente amargos (Garg y cols., 2001), mientras que β -rutinósidos, presentes en los limones, son insípidos (Peterson y cols., 2006). La estabilidad frente a soluciones alcalinas calientes también depende de los glicósidos pues los β -neohesperidósidos son estables, mientras que sus isómeros no lo son.

En relación a la solubilidad en medio acuoso de los flavonoides depende de la presencia en su estructura de una proporción suficiente de grupos polares. Así, la solubilidad se incrementa en la medida que aumenta el número de grupos hidroxilos y disminuye cuando estos están metilados. La presencia en posición 4 de un carbonilo que puede interaccionar con el grupo hidroxilo de la posición 5, disminuye la solubilidad en agua. Sin embargo, la adición de glucósidos en los flavonoides incrementa su solubilidad en agua (Pino, 1997).

Además, de las flavanonas, en el pomelo están presentes flavonoles como la quercitina y polimetoxiflavonas (nobiletina, heptametoxiflavona y tangeretina), aunque la presencia de estos compuestos en el pomelo es minoritaria y se encuentran en concentraciones muy inferiores a las de las flavanonas (Ortuño y cols., 2006).

En cuanto a los compuestos fenólicos simples, los ácidos fenólicos están presentes en concentraciones muy bajas (Rapisarda y cols., 2003), entre ellos se han detectado ácidos hidroxicinámicos (cafeico, p-cumárico, ferúlico, y sinápico) (Wang y cols., 2008; 2007; Robbins y cols., 2003; Manthey y cols., 2001) y ácidos benzoicos (protocatéuico, p-hidroxibenzoico y vainílico) (Xu y cols., 2008).

Otros compuestos fenólicos que forman parte del zumo de pomelo son las furanocumarinas (bergamotina, 6',7'-dihidroxi-bergamotina, 6'7'-epoxi-bergamotina y 7-geraniloxi-coumarina) (Manthey y cols., 2005) y la limonina que es una furanolactona presente en todos los zumos de cítricos (Rousseff y cols., 2009), aunque se encuentran en concentraciones por debajo de los umbrales del sabor para las variedades de cítricos maduros, de mayor interés comercial.

2.2.2.2. Vitaminas y carotenoides en el pomelo

En relación a la vitamina C, Vinson y Bose (1988) subrayaron la importancia del ácido ascórbico como componente natural en el zumo de cítricos, donde otros compuestos naturales presentes en el zumo, como los flavonoides, potencian la biodisponibilidad de este ácido. Otras vitaminas A y B (B1, B2, B3, B6 y B9) también están presentes en el zumo de pomelo, pero en cantidades menores.

Los pomelos (*Citrus paradisi*) son los cítricos con el mayor número de híbridos de color rojo (más de 10), debido a la presencia de carotenoides como el licopeno y β -caroteno, que fueron identificados entre los años 1930 y 1950. Lee (2000) identificó la presencia de otros carotenoides como el fitoflueno y ζ -caroteno en el zumo de pomelo rojo. Estos compuestos no están distribuidos uniformemente, su composición en los cítricos varía mucho dependiendo de las distintas variedades y del tejido (Xu y cols., 2006). Por ejemplo, la luteína se observó en la piel de las toronjas y pomelos pero no en los tejidos de naranja. Además el contenido de carotenoides en pomelos de la variedad Marsh es muy escaso, mientras que en los híbridos de color rojo su contenido es casi 800 veces mayor.

2.2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL POMELO

La capacidad antioxidante de los cítricos se atribuye principalmente al ácido ascórbico y a los compuestos fenólicos. Xu y cols. (2008), señalaron que la contribución del ácido ascórbico a la capacidad antioxidante total de los zumos de cítricos era del 50% en concordancia con estudios realizados anteriormente (Del Caro

y cols., 2004; Yoo y cols., 2004; Arena y cols., 2001; Gardner y cols., 2000). Sin embargo, otros estudios sugieren que son los compuestos fenólicos los que más contribuyen a la capacidad antioxidante total de los cítricos (Iguar y cols., 2010; Tripoli y cols., 2007). Parece que algunos factores tales como las diferentes variedades de cítricos, el grado de madurez, la elaboración del zumo y los métodos de análisis pueden hacer que existan estas divergencias (Amarowicz y cols., 2009; Lester y cols. 2007).

La estructura de los flavonoides, que puede verse modificada durante la elaboración de los zumos, puede determinar sus características antioxidantes:

Influencia de los grupos hidroxilo: La configuración y el número total de grupos hidroxilo puede influir en varios mecanismos de la actividad antioxidante. Las flavanonas (Figura 2.18) con una sustitución en la posición 7 del grupo hidroxilo por un neohesperidosido muestran menor capacidad antioxidante (Heim y cols., 2002), debido a que la glicosilación reduce el número de grupos hidroxilo libres o destruye la estructura orto-hidroxilo (Cai y cols., 2006). El incremento de grupos hidroxilo en posición 3' y 4' en las flavanonas agliconas parece influir poco en la actividad antioxidante. Sin embargo, en las flavanonas glicosiladas, la presencia de una estructura 3',4'-catecol incrementa significativamente la actividad antioxidante. Por otra parte, el ángulo de torsión del anillo B con respecto al resto de la molécula también influye en la capacidad "scavenger" frente a los radicales libres. Flavonoles y flavanoles con 3-OH son planos, mientras que flavonas y flavanonas están ligeramente distorsionadas (Van Acker y cols., 1996).

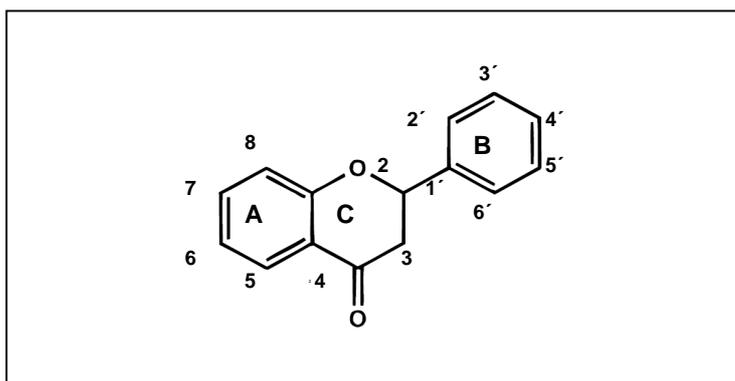


Figura 2.18. Estructura química de las flavanonas

Los flavonoides pueden influir tanto en las reacciones de propagación de los radicales libres, como el superóxido y el hidroxilo, como en su formación, ya sea inhibiendo las enzimas que intervienen en la reacción de iniciación o por sus

propiedades quelantes de metales de transición (Russo y cols., 2000). La configuración del anillo C con un grupo hidroxilo en posición 3, que activa el doble enlace en la posición 2, 3, determina esta capacidad estabilizadora, por tanto, la ausencia de este doble enlace en las flavanonas explica que la apigenina (flavona) presente mayor actividad scavenger frente al radical superóxido que la naringenina (flavanona). Cook y Samman (1996) indicaron que los grupos hidroxilo y carbonilo en flavonoides contribuyen estabilizando los radicales hidroxilo al formar complejos con hierro impidiendo su formación a través de la reacción de Fenton.

Influencia de la O-metilación: La influencia de la metilación en la capacidad antioxidante se debe a las diferencias tanto en la hidrofobicidad como en la planaridad molecular. La O-metilación en las flavanonas glicosiladas disminuye su capacidad antioxidante, siendo insignificante en las agliconas. Así, se ha observado que en las flavanonas glicosiladas la sustitución de un grupo hidroxilo en posición 4 por un grupo metilo disminuye notablemente la capacidad antioxidante, como consecuencia de un menor número de hidroxilos o por la falta de la estructura 3',4'-di-OH. Por otro lado, la presencia de grupos donadores de electrones en el anillo aromático y la glicosilación con neohesperidósido en la posición 7 ejercen una fuerte influencia en el potencial redox de los fenoles (Di Majo y cols., 2005). Además, estos autores sugieren que la molécula de azúcar en posición 7 es capaz de interactuar con el grupo metoxilo en la posición 4' y reducir el poder antioxidante. El descenso en la actividad antioxidante por la O-metilación también puede deberse a efectos estéricos que perturban la planaridad (Dugas y cols., 2000; Arora y cols., 1998; Mathiesen y cols., 1997). Así, el anillo B es particularmente sensible a los grupos metoxi. Sin embargo, la O-metilación mejora la actividad antioxidante en sistemas microsomales (Cholbi y cols., 1991).

Influencia de la O-glicosilación: La glicosilación se produce comúnmente en el metabolismo de los flavonoides, y aumenta sus propiedades hidrofílicas por adición de restos de azúcar en la estructura (Chen y cols., 2003). Algunas experiencias han demostrado que la glicosilación limita la actividad antioxidante de flavonoides *in vitro* y esto podría ser causado por el efecto estérico que perturba la planaridad y la capacidad de deslocalizar los electrones (Van Acker y cols., 1996). Al igual que con la O-metilación el efecto estérico de la 4'-glicosilación ejerce una influencia bloqueando el anillo B-catecol ya que el azúcar interfiere en la coplanaridad del anillo B con el resto y la habilidad de deslocalizar electrones (Mora y cols., 1990). Aunque los glicósidos son antioxidantes más débiles que las agliconas, sin embargo, su biodisponibilidad suele ser mayor (Passamonti y cols., 2002) siendo este hecho

favorable para los efectos sobre la salud. El tipo de de azúcar así como la posición respecto a grupos metoxilo influyen en la capacidad antioxidante. Para las flavanonas glicosiladas con un rutinósido (hesperidina vs hesperitin) son insignificantes las diferencias en su capacidad antioxidante.

La naringina, principal flavanona del pomelo tiene algunos de estos componentes estructurales que contribuyen a sus propiedades antioxidantes. Posee un grupo carbonilo en C-4 del anillo C, y grupos hidroxilo en C-5 del anillo A y en C-4 del anillo B. La presencia de un grupo carbonilo en C-4 y grupos hidroxilo en C-3 o C-5 en los flavonoides hace que formen quelatos con los iones de hierro y esta capacidad para secuestrar iones metálicos pueden contribuir a su capacidad antilipoperoxidativa, impidiendo la formación de radicales libres (Rajadurai y cols., 2006).

Todos los flavonoides de los cítricos poseen actividad antioxidante en medios hidrofílicos sin embargo, en medios lipofílicos flavanonas como la neohesperidina y hesperidina muestran una capacidad antioxidante reducida mientras que otras como la naringina, narirutina y naringenina se comportan como prooxidantes (Finotti y Di Majo, 2003).

Además de la estructura de los compuestos, hay que tener en cuenta que el contenido de vitaminas, carotenoides y polifenoles se puede ver modificado durante los procesos de almacenamiento y de procesado, lo cual puede afectar a su capacidad antioxidante. Comparando la elaboración de los zumos de forma manual e industrial, diferentes autores observaron que las composiciones de los zumos industriales se vieron enriquecidos en flavonoides como resultado de las técnicas aplicadas debido a la liberación de componentes del albedo y del flavedo (por ejemplo polimetoxiflavonas principalmente presentes en las cáscaras de fruta) (Gattuso y cols., 2007; Aturki y cols., 2004; Desiderio y cols., 2005; Leuzzi y cols., 2000). Estudios sobre el efecto de la radiación, muestran un aumento en el contenido en flavonoides, en concreto en naringina y narirutina, mientras que el contenido en d-limoneno se veía reducido (Vanamala y cols., 2005).

La pasteurización de los zumos de cítricos es un proceso necesario para destruir los microorganismos y reducir la actividad enzimática de la pectina metilesterasa (PME) para evitar la pérdida de la turbidez, porque esta enzima cataliza la degradación de la pectina y resta calidad al zumo. Sin embargo, la pasteurización puede producir la degradación térmica de distintos compuestos, disminuyendo por lo tanto la capacidad antioxidante de los zumos. Es sabido que como resultado del tratamiento térmico se

produce una disminución en el contenido de ácido ascórbico (Igual y cols., 2010; Sánchez-Moreno y cols., 2005). En relación a los polifenoles, distintos autores observan incrementos en algún tipo de compuesto fenólico como resultado del tratamiento térmico (Xu y cols., 2008; Lo Scalzo y cols., 2004) o incluso la aparición de nuevos compuestos con actividad antioxidante resultado de las reacciones de Maillard (Sun y cols., 2007).

2.2.4. EFECTOS SALUDABLES DEL POMELO

Los zumos de pomelo, se caracterizan por sus propiedades antioxidantes, antimutagénica, antiinflamatorias, antiproliferativas (Hsia y cols., 2008; Ribeiro y cols., 2008; Yu y cols., 2005; Chen y cols., 2003) y algunos estudios sugieren su uso como agente quimio protector (Jagetia, y cols., 2007). Estas propiedades se deben principalmente a su capacidad antioxidante y estabilizadora de radicales libres a la cual contribuye de forma significativa la naringina (flavanona mayoritaria) y naringenina (su aglicona) con actividades incluso superiores a las encontradas en otros zumos de cítricos (Franke y cols., 2004; Lichtenthaler, 2005).

Entre sus efectos saludables se ha observado que tienen capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias (Mink y cols., 2007; Gorinstein y cols., 2006), inhibiendo la agregación plaquetaria (Hubbard y cols., 2003) y protegiendo al DNA del daño oxidativo (Kanno y cols., 2004). Un estudio realizado en células musculares mostraron la capacidad de la naringina presente en el zumo de pomelo para inhibir e interrumpir el ciclo celular al inducir la p53 independiente por activación de las vías de señalización Ras/Raf/ERK (Lee y cols., 2008). Diferentes estudios (Ekambaram y cols., 2008; Jagetia y cols., 2004) han demostrado además la capacidad de estos compuestos para reducir la incidencia de la peroxidación lipídica.

Los componentes del zumo de pomelo también muestran efectos beneficiosos en la respuesta inmunitaria y en la regulación del proceso inflamatorio, al ser capaces de inhibir las enzimas implicadas en dichos procesos (proteína quinasa C, la fosfodiesterasa, fosfolipasa, lipoxigenasa, y la ciclooxigenasa). De hecho, los flavonoides de cítricos son capaces de inhibir las quinasas y fosfodiesterasas esenciales para la transducción y la activación de señales celulares. También afectan a la activación de un número de células que participan en la respuesta inmune, como

los linfocitos T y los linfocitos B (Du y cols., 2009; Manthey y cols., 2001). Estudios *in vitro* mostrarón que la naringina y naringenina puede influir en el proceso inflamatorio a través de sus efectos en la expresión y actividad de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Vafeiadon y cols., 2009; Hämäläinen y cols., 2007; Vanamala y cols., 2006).

El efecto hipocolesterolémico de la dieta con zumos de pomelo también es conocido, actuando a través de la disminución de los niveles de colesterol, triacilglicéridos y de los niveles de LDL-colesterol en pacientes hiperlipidémicos (Gorinstein y cols., 2006). Otros estudios señalan la capacidad de la naringenina para inhibir la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (CoA) reductasa y acil-CoA: colesterol aciltransferasa (Nahmias y cols., 2008).

Diferentes estudios relacionan un efecto preventivo de los cítricos en el inicio y desarrollo de diversos tipos de cáncer, y que sus compuestos bioactivos ejercen estos efectos mediante diferentes mecanismos de acción (Manthey y cols., 2001). Así la naringina, principal flavanona del pomelo, muestra un efecto protector frente al daño a ácidos nucleicos al inhibir su oxidación (Jagetia y cols., 2004; Russo, 2000). Otro mecanismo de acción de los compuestos bioactivos del pomelo es modulando las vías de señalización celular, en particular regulando proteínas implicadas en los procesos carcinogénicos, p53, Bcl y caspasa (Jin y cols., 2009; Lee y cols., 2008; Park y cols., 2008). Los flavonoides de los cítricos, además, pueden potenciar los efectos de los citostáticos empleados contra el cáncer. Estudios recientes (Ali y cols., 2009; Zhang y cols., 2009) muestran la capacidad de la naringina y naringenina para incrementar la sensibilidad de las células tumorales a determinados citostáticos como la doxorubicina a través de la modulación de la expresión y función de la p-glicoproteína y de las vías de detoxificación del fármaco.

Sin embargo, se ha demostrado que el zumo de pomelo, a diferencia de otros zumos cítricos, interactúa con algunos medicamentos. Su consumo con algunos medicamentos, como felodipina, nicardipina, halofantrina, tacrolimus y dextrometorfano, se ha asociado con un aumento de la frecuencia de efectos adversos (Liu y cols., 2009; Strauch y cols., 2009; Bailey y cols., 2004). El principal mecanismo de la interacción entre el pomelo y los medicamentos es debido a la inhibición del citocromo P-450 3A4 (CYP450 3A4) al metabolizar el fármaco en el intestino delgado, lo que resulta en una reducción significativa del metabolismo presistémico de los fármacos (Bailey y cols., 1998).

2.2.5. DESAMARGADO DE ZUMO DE POMELO

2.2.5.1. Procesado de zumos cítricos

El creciente interés de la industria alimentaria por los zumos cítricos, y en concreto por el zumo de pomelo, se debe a sus componentes bioactivos, y los cambios que en los mismos pueden tener lugar durante el procesado. Por tanto, en las industrias procesadoras de cítricos mantener las propiedades antioxidantes y la calidad del zumo depende en gran medida del conocimiento de las estructuras, composición, variedad, madurez y condición del fruto (Figura 2.19) junto con el método de extracción, concentración, mezcla, homogenización y almacenamiento (Cook, 1983).

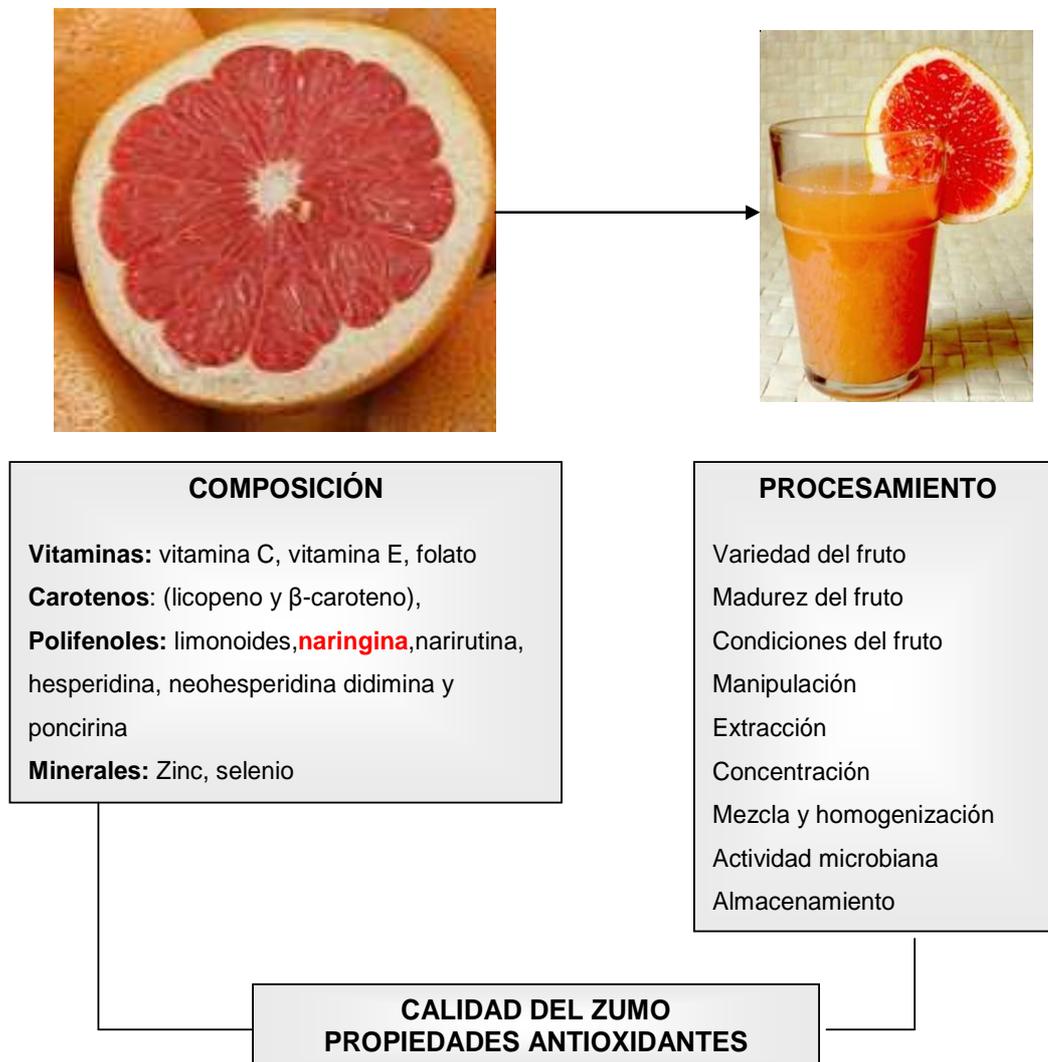


Figura 2.19. Factores determinantes en la calidad y propiedades antioxidantes del zumo de pomelo.

El Boletín Oficial del Estado (BOE del 20-11-91) define el zumo o jugo de fruta como *“el obtenido a partir de frutas por procedimientos mecánicos, susceptibles de fermentación pero sin fermentar, que posea el color, el aroma y el sabor característico de los zumos de frutas de las que proviene”*. Asimismo, *“por zumo de frutas, o jugo se entenderá igualmente el producto obtenido a partir de zumos de frutas concentrados, restituyendo la proporción de agua extraída al zumo en el proceso de concentración y/o el aroma por medio de sustancias aromatizantes recuperadas al concentrar el zumo de fruta”*. Esta definición general del zumo ha permitido el desarrollo de varios métodos de procesado de los cítricos tomando en cuenta el criterio de calidad del consumidor que percibe que un buen zumo de naranja posee un atractivo aroma, sabor, color, una turbidez (nube) estable y una acidez, viscosidad, grado de amargor y dulzor determinado (Cook, 1983).

La elaboración industrial del zumo de cítricos (Figura 2.20) se inicia con el lavado y clasificación de la fruta (operación que permite eliminar las impurezas que llegan con los frutos del campo), procediéndose a continuación a la extracción del zumo con una prensa, a la separación posterior de los residuos sólidos homogeneizando la concentración de pulpa, eliminando los aceites y ceras y filtrando posteriormente para homogenizar el zumo. Por último, se pasteuriza y se almacena a baja temperatura. En algunos casos la pulpa puede ser separada por completo, añadida posteriormente y homogenizada o puede ser utilizada como base para purés de cítricos. Además, en otros flujos después de la extracción, se somete el zumo a una evaporación para la recuperación de aromas y en otros casos después de la pasteurización se concentra para obtener zumo concentrado que sirve de base para la reconstitución del zumo natural o para la elaboración de bebidas cítricas (Cook, 1983; Rothschild y Karsenty, 1974).

Por otra parte, la pasteurización juega un papel importante en la obtención del zumo de cítricos, porque permite mantener estable la turbidez (nube) propia del zumo ya que evita que la enzima pectina esterasa hidrolice la pectina, produciendo ácido poligalacturónico que combinado con el calcio del medio precipitan y produce una separación de fases en el zumo (Körner y cols., 1980; Navarro y cols., 1979; Rothschild y Karsenty, 1974).

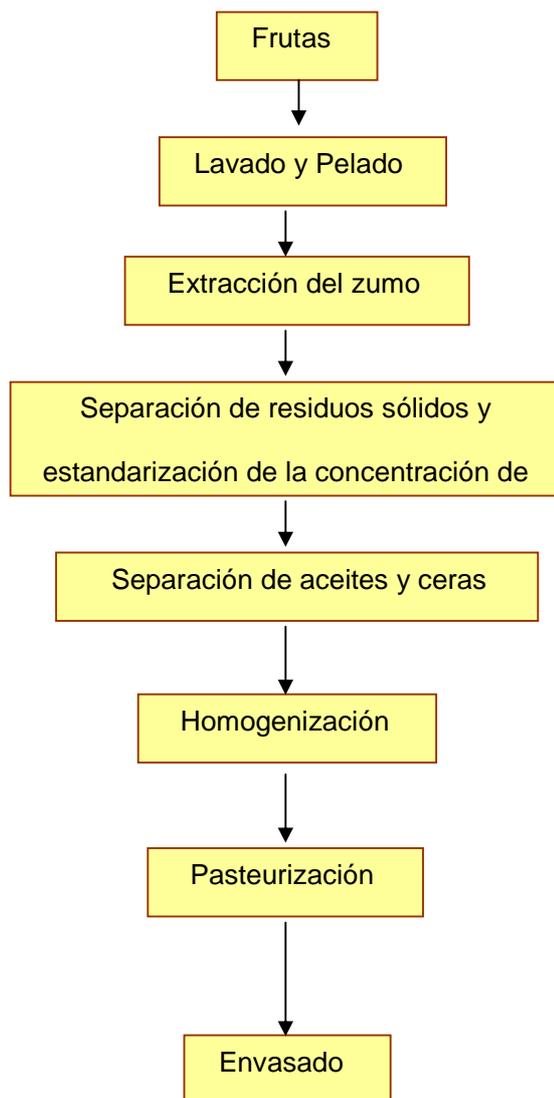


Figura 2.20. Esquema del proceso de elaboración de zumo.

Las flavanonas naringina y la hesperidina han sido reconocidas como responsables de la calidad y de los efectos saludables del zumo fresco, sin embargo, la naringina también puede ocasionar problemas de sabor, siendo la principal responsable del sabor amargo de los zumos, lo que hace necesario un tratamiento de desamargado. Por otro lado, las técnicas de procesado y elaboración de zumos modifican la composición fenólica del zumo mientras que las técnicas de concentración, no parecen afectar a los principales compuestos bioactivos de los cítricos (Vanamala y cols., 2006). Entre los métodos de procesado, la eliminación del amargor puede afectar tanto

a las propiedades sensoriales como a los efectos saludables al modificar factores como su capacidad antioxidante (Puri y cols., 2000).

2.2.5.2. Fundamento del sabor amargo del pomelo

El zumo de pomelo posee un sabor único debido a la combinación de sabores agridulce y ligeramente amargo con un aroma característico que diferencia a esta fruta de otros cítricos. Una menor relación Brix / ácido, especialmente en la temporada temprana, está relacionada con una mayor acidez y disminución de la aceptabilidad por el consumidor (Rouseff y cols., 2009). Sin embargo, esta relación parece tener poca importancia en la calidad total del sabor del zumo de pomelo (Fellers y cols., 1991) aunque parece ser importante para su aceptación por el consumidor.

Se han realizado numerosos estudios para aislar, identificar y cuantificar los principios amargos del zumo de pomelo. La naringina, una flavanona neohesperidosido, y limonoides como limonina y nomilina son los responsables del sabor amargo en el zumo de pomelo y, por lo tanto, tienen un impacto negativo en la industria de los cítricos. Desde un punto de vista estricto, la naringina no es un constituyente indeseable del zumo pero a altas concentraciones el amargor es tan intenso que conduce a una pérdida de la calidad del producto. Buffa y Bellenot (1962) recomendaron contenidos de naringina entre 300 y 700 ppm para un zumo de pomelo de buena calidad mientras que Lime (1977) señaló un máximo de 600 ppm. Estos valores están muy relacionados con la relación Brix/acidez, pues mientras mayor sea esta relación menos importante será el efecto de concentraciones altas de naringina (Guadagni y cols., 1974).

2.2.5.3. Técnicas para el desamargado del zumo de pomelo

Los distintos estudios para reducir el amargor de los cítricos han sido revisados por Singh y cols. (2003) y por Puri y cols. (2008). Estos estudios se basan tanto en tratamientos precosecha como en procesos para reducir el amargor del zumo, con el fin de mejorar el sabor y aumentar el valor comercial del zumo.

Factores de precosecha, tales como la especie, el uso de fertilizantes (Mansell y cols., 1983), portainjertos y otros factores hortícolas, como el tratamiento con etileno (Hasegawa y Maier, 1983), son algunos de los métodos empleados para controlar el

amargor de los cítricos. El procedimiento más simple para lograr bajos niveles de flavonoides en el zumo de cítricos consiste en emplear frutos poco maduros y presiones de extracción de zumo reducidas, ya que una presión excesiva libera compuestos amargos de la cáscara (Pino, 1997). Así, Attaway (1977) encontró valores medios de naringina de 546 ppm para extracciones fuertes de zumo de pomelo. Esta diferencia se hace más drástica si se procesa fruta menos madura, pues con la extracción ligera se logra un zumo con 577 ppm de naringina frente a 898 ppm con extracción fuerte. Evidentemente disminuir la presión de extracción conduce a mayor calidad del producto, pero, como es lógico, reduce el rendimiento del zumo (Pino, 1997).

Se han planteado infinidad de soluciones para disminuir el amargor basadas en las propiedades de los flavonoides. De manera general, estas soluciones pueden clasificarse en **métodos químicos, físicos o enzimáticos**.

Los **métodos químicos** incluyen la regulación del pH, la adición de azúcares para elevar la relación Brix/acidez (Guadagni y cols., 1974). Otros métodos hidrolizan la naringina mediante ácidos. Sin embargo, estos procedimientos suelen generar problemas de contaminación o generación de productos secundarios no deseados (Ellenrieder y cols., 1998; Puri, 2000).

Los **métodos físicos** son los más empleados en el ámbito industrial, como el uso de técnicas de dióxido de carbono supercrítico (Miyake y cols., 2000), ultrafiltración (Tallarico y cols., 1998; Hernández y cols., 1992), diafiltración (Liotus y Chu, 2000), extracción por solvente y adsorción (Singh y cols., 2006; Ribeiro y cols., 2002; Shaw y cols., 2000). Este último proceso se basa en la capacidad de adsorción específica de la naringina a polímeros sintéticos de diversa naturaleza, tales como poliamidas (Griffiths, 1969), acetato de celulosa, tierra de diatomeas, resinas de intercambio iónico, polímeros porosos del tipo Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-16, Amberlite IR-400, Amberlite IR-120, NPA-1 o Duolite S-861 (Singh y cols., 2008; Lee y Kim, 2003; Mishra y Kar, 2003; Ribeiro y cols., 2002), siendo especialmente eficaces las resinas S861 y amberlite XAD-7 (Ribeiro y cols., 2002; Johnson y Chandler, 1982, 1985, 1988). Por otra parte, se ha planteado el uso de β -ciclodextrinas, habiéndose determinado que la adición de 0,2 a 0,5% de esta sustancia al jugo de pomelo reduce aproximadamente un 50% del amargor del producto (Konno y cols., 1982). De manera similar, Shaw y cols. (1984) proponen el uso de estas moléculas en un proceso de flujo continuo.

Aunque se han empleado muchos métodos diferentes desde la década de los 70, la tecnología actual emplea convencionalmente procesos de adsorción en acetato de celulosa, resinas macroporosas o resinas de estireno-divinilbenceno.

Sin embargo, aunque son técnicas de gran aceptación por la industria alimentaria tienen una serie de limitaciones intrínsecas: (i) se requiere el uso de equipos costosos debido a que el zumo necesita estar libre de aceites, ceras, pulpa y posteriormente debe mezclarse con zumo clarificado para recuperar sus cualidades antes de ser bombeado a través de la columna de resina, (ii) las columnas de adsorción suelen ser regeneradas con soluciones alcalinas diluidas y esto puede afectar a las propiedades organolépticas y a la calidad final de zumo; (iii) los adsorbentes pueden alterar la composición del zumo por reacciones químicas directas con alguno de los compuestos presentes en el zumo o por la eliminación de nutrientes, aromas, color, etc; (iv) los métodos son inespecíficos, no solo se adhieren compuestos amargos sino también otros componentes que suponen un detrimento de la calidad del zumo. Por otro lado, la eliminación de estos flavonoides y otros compuestos (carotenoides, vitamina C) supone una pérdida de las propiedades beneficiosas para la salud que aportan los zumos de cítricos.

Por todo ello, la búsqueda de nuevas tecnologías como la tecnología enzimática que causen el mínimo daño a las características nutricionales y a los efectos beneficiosos para la salud de las frutas cítricas puede ser considerado como una interesante alternativa a los procesos convencionales por adsorción física. El empleo de naringinasa para reducir el sabor amargo ha sido estudiado por distintos autores (Sekeroglu y cols., 2006; Puri y cols., 2005a), su principal aplicación en la industria alimentaria se centra en la estabilización del sabor, en el aumento de la vida media comercial y en el rendimiento final de zumo en frutas cítricas.

La naringinasa, es un complejo enzimático formado por la α -ramnosidasa (CE 3.2.1.40) responsable de la hidrólisis de naringina (flavanona amarga y principal componente del zumo de pomelo) a prunina (4,5,7-trihidroxi flavovone-7-glucósido) y ramnosa, y por la β -glucosidasa (CE 3.2.1.21) que hidroliza la prunina en naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) y glucosa (Figura 2.21). La prunina, es un 33% menos amarga que la naringina, y la naringenina es insípida (Puri y cols., 1996). Debido a la especificidad por el sustrato, el tratamiento enzimático parece causar mínimos cambios en la calidad del zumo y es una interesante opción frente a los procedimientos tradicionales.

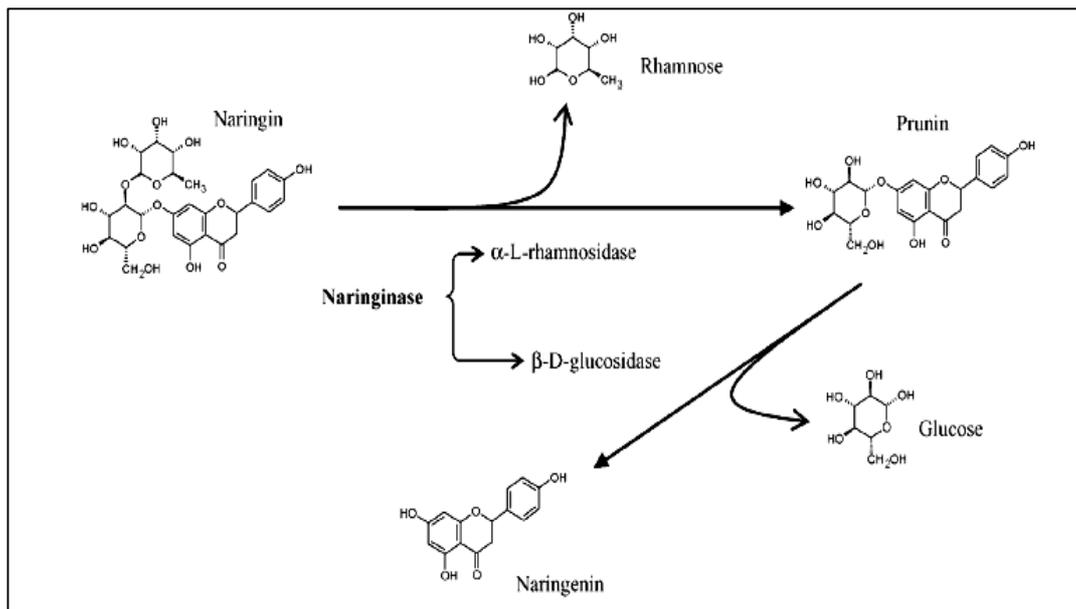


Figura 2.21. Mecanismo de acción de la naringinasa (Puri y cols., 2008)

La α -ramnosidasa (EC 3.2.1.40) escinde las moléculas α -l-ramnosas terminales de polisacáridos y glucósidos (Yanai y Sato, 2000), catalizando el desdoblamiento de la naringina en ramnosa y prunina (naringenina 7-O-glucósido). La prunina es un tercio menos amarga que la naringina, influyendo de manera notable en el sabor final del zumo (Puri y cols., 2000). Algunas de sus aplicaciones son el desamargado y la clarificación de los zumos de frutas (Soria y Ellenrieder, 2002; Chien y cols., 2001; Yadav y Yadav, 2000) y la aromatización de los vinos (Rajal y cols., 2009; Gallego y cols., 2001).

Las propiedades de la α -ramnosidasa difieren dependiendo del microorganismo empleado en su producción. Así, por ejemplo, la actividad α -ramnosidasa de *Penicillium sp.* y *Aspergillus niger* se inhibe frente a glucosa, fructosa y ramnosa, siendo esta última uno de los inhibidores más potentes (Martearena y cols., 2008). Sin embargo, la inhibición de la α -ramnosidasa de *Penicillium sp.* con glucosa, fructosa y ramnosa era competitiva mientras que en *A. niger* estos azúcares generan una inhibición no competitiva (Tsen y Tsai, 1988). Por otro lado, actúa en un amplio rango de acción de pH entre 3 y 7 y la temperatura óptima está entre 37 y 57°C (Puri y cols., 2000).

La **β -glucosidasa** (EC 3.2.1.21) es una enzima de amplia distribución en la naturaleza ya que la sintetizan bacterias, levaduras, hongos filamentosos y plantas. En zumo de cítricos desdobla la prunina en glucosa y naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-glucósido), compuesto no amargo. Además, muestra ser activa frente a disacáridos como celobiosa, gentibiosa, soforosa y hesperitina-7-glucósido, salicina, mandelonitrilo- β -D-glucósido y sinigrina (Puri y cols., 2000; Cameron y cols., 2001; Han y cols., 2008) y participa en la degradación de antocianinas durante la etapa final de maduración de la fruta (Barbagallo y cols., 2007). Se ha detectado su presencia en el suelo y es de gran importancia en la descomposición de residuos de plantas (Sarithchandra y Perrot, 1984; Busto y Pérez-Mateos, 2000) y de frutos así como en la descomposición de los residuos de la cascara de pomelo que luego pueden ser utilizados por los microorganismos para producir etanol y otros productos de fermentación (Wilkins y cols., 2007).

La temperatura óptima de la mayoría de las β -glucosidasas está entre 40 y 65°C (Montero y Romeu, 1992; Puri y cols., 2000; Cameron y cols., 2001) y su punto óptimo de pH varía entre 4 y 6 (Puri y cols., 2000), ó 3,5 y 5,5 en algunos cítricos (Cameron y cols., 2001).

Las características de la **naringinasa**, por tanto, varían dependiendo del origen microbiano, de los nutrientes y compuestos empleados como inductores de su biosíntesis y de las condiciones externas de pH y temperatura que se utilizan para su producción. Versteeg y cols. (1977) señalan que las preparaciones enzimáticas de cada microorganismo son diferentes ya que una preparación enzimática puede contener más actividad β -glucosidasa o más actividad α -ramnosidasa.

El interés biotecnológico de la naringinasa reside, principalmente en la aplicación para el desamargado de zumos cítricos (Prakash y cols., 2002; Puri y cols., 2000). No obstante, tiene importancia en otros procesos industriales como la obtención de prunina (Ellenrieder y cols., 1998), ramnosa (Hagedorn y Kaphammer, 1994), antibióticos (Puri y cols., 2000), envases inteligentes (Del Nobile y cols., 2003; Soares y Hotchkiss, 1998), incremento del aroma de vinos (Gallego y cols., 2001; Caldini y cols., 1994) y transformación de esteroides (Thirkette, 2000), que hace todavía más interesante cualquier estudio relacionado con su producción y estabilización.

A pesar de las muchas características atractivas, el proceso de desamargado enzimático de zumo de cítricos está limitado en la actualidad debido a distintos factores como el precio para la adquisición de las enzimas para el procesamiento de

grandes volúmenes de zumo, la elevada disponibilidad de resinas de intercambio iónico neutras para reducir el amargor y la desacidificación del zumo de pomelo, además el contenido de limonina no se modifica por el tratamiento con naringinasa y por último la incapacidad de la naringinasa para hidrolizar completamente la naringina.

2.2.6. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS PARA EL DESAMARGADO DEL ZUMO DE POMELO

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado un gran desarrollo y, paralelamente sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, su aplicación ha ido extendiéndose gradualmente a una gran variedad de campos, tales como la industria alimentaria, la biología molecular, la síntesis orgánica, los análisis clínicos, la industria farmacéutica, los detergentes, la producción de alimentos, la industria textil, las fermentaciones, etc.

El uso de enzimas presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, poseen gran actividad catalítica, gran especificidad de sustrato y son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo y su solubilidad en agua dificulta la separación entre los sustratos y productos, y por tanto, no se pueden reutilizar. Para superar estos inconvenientes y conseguir catalizadores con actividad, estabilidad y especificidad elevadas, se han orientado las investigaciones hacia dos líneas principales: (i) la síntesis de polímeros bioquímicos que posean una actividad similar a las enzimas y (ii) la modificación de las enzimas mediante procesos de inmovilización. Esta última línea es la que se utiliza en el presente trabajo de investigación con el fin de reducir el amargor en el zumo de pomelo.

La inmovilización de enzimas o células es una de las herramientas de la biotecnología más eficaces para facilitar los procesos industriales, generar una tecnología limpia e incrementar la mayor especificidad analítica derivada del uso de biocatalizadores. La inmovilización es importante para mantener constante las condiciones ambientales a fin de proteger a la enzima contra los cambios del pH, la temperatura y la fuerza iónica. La estabilidad operacional y de almacenamiento de las enzimas inmovilizadas sin una pérdida apreciable de actividad enzimática son importantes para la viabilidad económica de los procesos biotecnológicos (Luckarift,

2004). Por otra parte, el uso de enzimas en muchos procesos industriales no resulta aún económicamente rentable.

Una de las definiciones clásicas de *enzimas inmovilizadas* es la acordada en 1971 en la primera Conferencia de Tecnología Enzimática celebrada en Henniker (New Hampshire, USA), como “*enzimas que están físicamente confinadas o localizadas en un espacio definido con retención de sus actividades catalíticas, y que pueden ser usadas repetida y continuamente*” (Chibata, 1978).

La inmovilización tiene muchas ventajas a gran escala (Swaisgood, 2003; 2004), entre ellas, podemos destacar que incrementa la estabilidad de la enzima, aumenta la recuperación y purificación de los productos, pueden llevarse a cabo varias reacciones simultáneas en reactores multienzimáticos, admite el procesado en continuo, facilita la conclusión rápida de las reacciones al separar la fase móvil de la enzima inmovilizada y el bajo coste. Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes como son, la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte, pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización y en algunos casos el biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

En la aplicación de la naringinasa a la industria de cítricos, la inmovilización enzimática resulta especialmente interesante para la estabilización del sabor, así como para el incremento del rendimiento de los zumos por hidrólisis de compuestos amargos, y el mantenimiento de las propiedades beneficiosas para la salud (Ribeiro y cols., 2008; Sekeroglu y cols., 2006).

El uso de enzimas inmovilizadas en la industria alimentaria exige la disponibilidad de soportes y procedimientos baratos inmovilización. Esto significa que el soporte debe ser fácilmente accesible para los grupos reactivos, de fácil activación, y también deben ser totalmente no tóxicos, con una estabilidad adecuada y con un bajo coste. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte (Ribeiro y cols., 2010a; Amaro y cols., 2009; Ferreira y cols., 2008; Puri y cols., 2008; Pedro y cols., 2007; Vila Real y cols., 2007; Sekeroglu y cols., 2006) hace que muchos estudios se dirijan a buscar y optimizar métodos de inmovilización y soportes adecuados para diferentes tipos de enzimas. La importancia del soporte y del método de inmovilización, determinan el microambiente que se genera en torno a las enzimas y su efectividad.

2.2.6.1. Métodos de inmovilización

Los métodos de inmovilización de enzimas se han clasificado de múltiples formas. Una de ellas tiene en cuenta el tipo de relación que se establece entre la enzima y el soporte.

En cualquier caso, las principales técnicas de inmovilización de enzimas pueden agruparse en tres categorías básicas:

- Unión a soportes
- Entrecruzamiento
- Atrapamiento

La **unión a soportes** supone enlazar las enzimas a soportes sólidos insolubles en agua. Los soportes pueden ser clasificados en inorgánicos, pueden ser naturales o materiales manufacturados y soportes orgánicos que pueden ser polímeros naturales (polisacáridos y proteínas fibrosas) o polímeros sintéticos (poliolefinas, polímeros acrílicos u otros). Dependiendo del tipo de unión de la enzima al soporte se puede establecer una unión por adsorción física, iónica, enlace covalente o quelación (unión metálica). Los más utilizados industrialmente son los *métodos de inmovilización por adsorción física y por enlace covalente* (Kennedy y Cabral, 1983).

La inmovilización por **adsorción física** es más común que la inmovilización química ya que la enzima puede ser eliminada de la matriz y reutilizada, además este procedimiento de inmovilización implica menos pasos que la inmovilización covalente (Swaisgood, 2003). Es un método simple que se basa en la adsorción de las moléculas de enzima sobre la superficie de una matriz porosa, poniendo en contacto una solución de la enzima con el soporte. Para ello, pueden utilizarse diversos procedimientos tales como la inmovilización estática, la electrodeposición, la inmovilización en reactor o la adsorción en baño con agitación. Los soportes empleados son del tipo de bentonita, alúmina, carbonato cálcico, carbón, silica gel, vidrio poroso, almidón, gluten, colágeno, celulosa, alginato, etc. (Woodward, 1985). Una variante dentro de la técnica de adsorción es el empleo de resinas de intercambio iónico, las cuales contienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble. Las ventajas de este método son el mantenimiento de tasas de bioconversión óptima, y la posibilidad de regular el intercambio entre la proteína y la matriz, mediante variaciones del pH.

Además, la reversibilidad del enlace es una valiosa ventaja en los procesos donde las enzimas tienen que ser aisladas y purificadas a partir de mezclas complejas. Entre los soportes, los de sílice con modificaciones químicas superficiales son probablemente los más ampliamente utilizados para la adsorción de la enzima.

La inmovilización por **enlace covalente** implica la unión de grupos funcionales no esenciales de la enzima con el soporte. Las crecientes necesidades de la industria están expandiendo el número de tecnologías desarrolladas para la unión covalente de los componentes activos, como ha sido revisado por Goddard y Hotchkiss (2007). Como la superficie de la mayoría de los polímeros en contacto con los alimentos utilizados en la actualidad es inerte, su funcionalización se convierte en necesaria en la mayoría de los casos. En la unión, el sitio activo debe ser protegido, lo que normalmente se hace mediante la fijación de una molécula de sustrato o un inhibidor competitivo.

Las reacciones entre distintos soportes y grupos reactivos de la enzima incluyen diazotación, formación de enlaces amida, alquilación, arilación, formación de bases de Schiff, amidinación, intercambio tiol-disulfuro, o acoplamiento inducido mediante radiación gamma, entre otros. La agarosa, dextranos, celulosa, polímeros sintéticos, vidrio y bentonita se han utilizado como soportes para la unión covalente, normalmente tras un proceso de activación (Adlercreutz, 1993).

El **entrecruzamiento** ("cross-linking") se basa en la insolubilización de la enzima mediante el establecimiento de enlaces entre múltiples moléculas de enzima a través de puentes formados por reactivos bifuncionales o multifuncionales. El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a los efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina. Un procedimiento mixto de inmovilización, muy común, consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional. Constituye una prolongación de las técnicas de unión covalente presentando sus mismas ventajas e inconvenientes (Trevan, 1990). El glutaraldehído es el reactivo más empleado para formar el entrecruzamiento y, una vez establecido, es irreversible porque forma enlaces estables frente a cambios de pH y temperatura.

El **atrapamiento** consiste en la retención física de la enzima en el interior de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o

polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en el interior de una membrana o microcápsula de fibra o geles, de forma tal que se evite la liberación de la enzima sin impedir la entrada del sustrato. Es un procedimiento experimentalmente sencillo, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, y la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. El atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Arroyo, 1999).

En la inmovilización **por membrana** la enzima queda físicamente retenida en una membrana semipermeable selectiva que permite el paso de los productos de reacción. La enzima puede estar en forma soluble o insoluble sobre la superficie de la membrana. Si la enzima se encuentra en forma soluble, la inmovilización debe conseguir su confinamiento por exclusión molecular (López-Ulibarri y Hall, 1997; Alkorta y cols., 1995) o repulsión electrostática (Röthing y cols., 1990; Kulbe y cols., 1984). La retención de la enzima insolubilizada puede ser directa o a través de un enlace químico por adsorción o atracción electrostática. Las membranas de ultrafiltración, debido a su naturaleza y sus límites de exclusión molecular (1-100 μm o 500-100.000 NMWCO), suelen ser adecuadas para la retención de la mayoría de las enzimas (10-100 kDa) (Cheryan, 1986).

En la **microencapsulación** se atrapa a las enzimas en membranas poliméricas semipermeables esféricas con diámetros entre 1 y 100 μm . Se puede regular el tamaño de las microcápsulas modificando las condiciones utilizadas durante la emulsión. Entre los polímeros utilizados se incluyen poliamidas, poliuretanos y poliésteres (Adlercreutz, 1993). Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes también llamadas "micelas reversas"). Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos (Klei y cols., 1985).

El **atrapamiento en fibras** consiste en inmovilizar enzimas en las microcavidades de fibras sintéticas. Para ello se disuelve el polímero formador de fibra en un disolvente orgánico inmiscible en agua para formar una emulsión con la solución

acuosa de la enzima. Esta emulsión se estrusiona en un líquido de coagulación (tolueno o éter de petróleo), con lo que precipita el polímero en forma de filamentos con microgotas de la enzima atrapada en las microcavidades del polímero (Dinelli y cols., 1978).

El **atrapamiento en geles** es una de las técnicas más empleadas en la inmovilización de enzimas. Por ser el método de inmovilización empleado en este trabajo, se trata con mayor detalle en el próximo apartado.

En relación a la naringinasa, se han descrito distintos soportes y métodos de inmovilización (Tabla 2.3) con resultados alentadores. Por ejemplo, la naringinasa ha sido inmovilizada en distintos soportes insolubles, como fibra hueca, perlas de vidrio poroso, DEAE-Sephadex A-25, celulosa DEAE, celulosa aminohexil tanino, copolímeros de estireno y anhídrido maleico. Sin embargo, entre los inconvenientes de estos procesos destacamos la estabilidad de la enzima y el alto coste de la mayoría de los soportes para aplicaciones industriales (Tsen, 1984).

Tabla 2.3. Revisión de soportes empleados en la inmovilización de naringinasa

Soporte	Fuente
XAD-16N y XAD-1600	Amaro y cols. (2009)
Polivinilalcohol	Busto y cols. (2007)
Alginato	Norouzian y cols. (1999); Puri y cols. (1996)
Cascara de huevo	Norouzian y cols. (1999)
Gelatina	Norouzian y cols. (1999)
Películas de acetato de celulosa	Soares y Hotchkiss (1998)
Carragenato	Puri y cols. (1996)
Poliacrilamida	Puri y cols. (1996)
Fibra de seda de <i>Bómbix mori</i>	Ellenrieder y Daz (1996)
Fibra de triacetato de celulosa	Tsen y Yu (1991)
Quitina del caparazón del cangrejo	Tsen y Tsai (1988)
Queratina de cuerno de bovino	Manjón y cols.(1985)
Fibra de madera	Gray y Olson (1981)
Vidrio poroso	Park y Chang 1979)
DEAE-Sephadex A-25	Ono y cols. (1977)

La naringinasa producida por *Penicillium decombens* ha sido inmovilizada en perlas de alginato, cascara de huevo utilizando glutaraldehido como agente de

entrecruzamiento, gelatina y mediante uniones covalentes a las semillas de *Ocimum basilicum* a través de etilendiamina (Norouzzian y cols., 1999). De los tres métodos la unión covalente fue el más efectivo, reteniendo el 57% de la actividad enzimática total. Puri y Marwaha (1996) mostraron que la eficiencia de la inmovilización de naringinasa de *Penicillium sp.* en alginato de calcio, alrededor de un 85% y 140% al inmovilizar la enzima por unión covalente en cascara de huevo mediante entrecruzamiento con glutaraldehído al 1% (Puri y cols., 2001). El uso de soportes de inmovilización naturales como la madera también han sido estudiados, se ha utilizado la unión covalente de naringinasa mediante glutaraldehído a la madera para desamargado de zumo de mandarina (Puri y cols., 2005). Con este tratamiento, fue observado el 71% de la enzima inmovilizada con un 1% de glutaraldehído y se lograba una eficiencia de inmovilización del 120%. Sin embargo, los autores señalaron que la alta concentración de reactivo bifuncional inhibe y reduce la actividad de la naringinasa, incrementando el coste del proceso de inmovilización y aparentemente también se plantean algunos efectos tóxicos. Recientemente Amaro y cols. (2009), realizan un estudio de los parámetros cinéticos para optimizar la inmovilización de la naringinasa en microestructuras poliméricas no iónicas como XAD-16N y XAD-1600, activadas con glutaraldehído. Los resultados muestran una eficiencia de carga del 80% a una temperatura óptima de 308K y fue reutilizada durante 5 ciclos.

En otro sistema, la hidrólisis de naringina se logró mediante naringinasa inmovilizada en k-carragenato en función de la temperatura (9-51°C) y de la concentración de naringinasa (0,29-1,7g L⁻¹) en el zumo de pomelo. Se obtuvo la hidrólisis del 95% de la naringina con concentraciones de naringinasa superiores a 800 mg L⁻¹ y temperaturas superiores a 30°C (Ribeiro y cols., 2008). Más recientemente, estos autores estudian el efecto conjugado de la presión y la temperatura en la hidrólisis enzimática del zumo de pomelo con el fin de reducir el amargor de estos zumos (Ribeiro y cols., 2010b). Los resultados muestran la hidrólisis del 81% de la naringina usando naringinasa (250mg L⁻¹) inmovilizada en perlas de alginato de calcio (2%) a 205 MPa y 52°C, durante 30 minutos. Estos resultados son prometedores para optimizar la hidrólisis enzimática de naringina para una futura aplicación de los inmovilizados en la industria del zumo de pomelo. Por otra parte, nada se sabe del efecto de los inmovilizados sobre las propiedades saludables de los zumos cítricos.

La inmovilización de naringinasa ha hecho posible aplicabilidad de naringinasa en el procesamiento de zumos de frutas cítricas, permitiendo una mayor estabilidad durante el almacenamiento, un mayor rango de temperatura óptima, mayor facilidad de

recuperación en operaciones repetidas, mayor resistencia mecánica a través de las uniones covalentes, reciclaje continuo y menor duración de los períodos de desamargado.

2.2.6.2. Inmovilización de naringinasa por atrapamiento en criogeles de alcohol polivinílico

En términos generales, los hidrogeles son adecuados para la inmovilización de enzimas y células, debido a su biocompatibilidad, bajos coeficientes de fricción y, con un alto contenido de agua, proporcionan entornos adecuados para la actividad enzimática y las enzimas son generalmente atrapadas entre el polímero (Panesar y cols., 2006; Lozinsky y cols., 2003; Navratil y cols., 2002). La polimerización es inducida por la incorporación de sustancias químicas (es decir cationes bivalentes para polimerizar alginatos), por cambios de temperatura, o por la exposición a la luz. Para establecer una red entre las moléculas de la enzima y los polímeros se utilizan compuestos como glicoxal, glutaraldehído, formaldehído o transglutaminasa.

Los métodos de inmovilización en geles presentan algunos problemas derivados de los soportes. Así por ejemplo, los geles de poliacrilamida son tóxicos, lo que determina la exclusión de este tipo de inmovilizados en la industria alimentaria. Además, el mantenimiento en los geles de un tamaño medio de poro, que no limite excesivamente la difusión de solutos, causa gran variabilidad que puede ocasionar la pérdida de las enzimas, especialmente las de bajo peso molecular. Sin embargo, la sencillez y la suavidad de la preparación de la enzima permiten maximizar su empleo en diversos procesos industriales (Trevan, 1990).

Un tipo de polímero sintético utilizado como soporte de inmovilización lo constituye el alcohol polivinílico (PVA). Es reconocido como un típico polímero cristalino (Hong y cols., 2001; Shapiro, 2000) que carece de toxicidad, es muy estable y tiene un tamaño de poro fácilmente controlable (Lozinsky y Pliega, 1998; Ariga y cols., 1993). El alcohol polivinílico es un polímero sintético descrito por primera vez a comienzos de los años 70 es de naturaleza hidrófila y en soluciones acuosas concentradas es capaz de gelificar formando una red espacial no covalente. Los enlaces se forman entre los hidrógenos y los grupos hidroxilo de cadenas vecinas. Estos polímeros contienen dominios sindiotácticos (secuencias de 6 a 8 unidades responsables de la formación de puentes de hidrógeno) y dominios isotácticos (que participan principalmente en interacciones intramoleculares) (Figura 2.22) (Lozinsky y Plieva, 1998). Los geles ricos

en centros sindiotáticos presentan mayor elasticidad y un elevado punto de fusión (Shapiro, 2000).

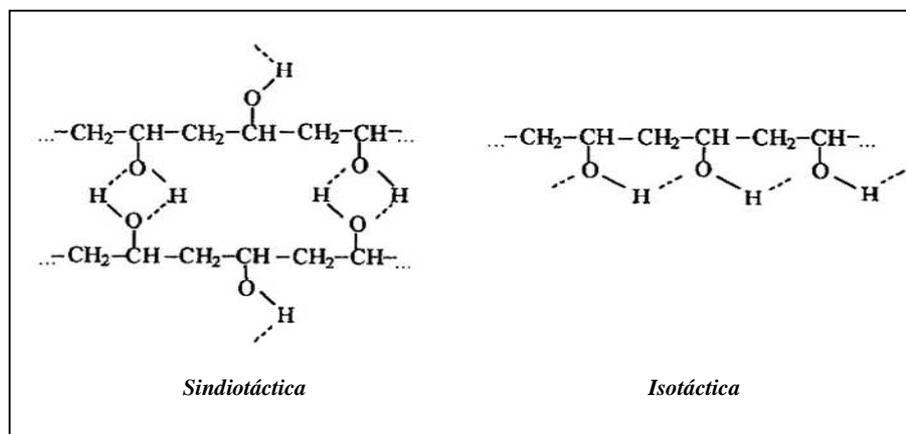


Figura 2.22. Estructura sindiotáctica e isotáctica en geles de PVA

La gelificación del alcohol polivinílico se consigue de tres formas diferentes: por radiación ultravioleta con un PVA fotosensible (El-Hadi, 2003), por incorporación de sustancias químicas como el ácido bórico o el sulfato de sodio (Nunes y cols., 2009; Idris y cols., 2008; Zhang y cols., 2007; Dave y cols., 2006) y por congelación y descongelación del polímero (Busto y cols., 2007; Lozinsky y cols., 2003).

El método de congelación y descongelación es el que presenta mayores ventajas porque no utiliza ningún compuesto químico para generar la polimerización. A la matriz polimérica se le denomina criogel o hidrogel de PVA. La polimerización del gel se puede realizar por un enfriamiento lento con metanol (-15 a -55°C) o por un enfriamiento rápido con nitrógeno líquido (Lozinsky y Plieva, 1998; Ariga y cols., 1993).

Su uso se ha propuesto en diversas actividades biológicas por ser inocuo para el organismo humano. Así por ejemplo, puede usarse en medicina como soporte para transportar y liberar fármacos y como prótesis de tejidos cartilagosos; en microbiología, para la formulación de medios de cultivo sólidos (Bodugoz-Senturk y cols., 2009; Huber y cols., 2009). Sin embargo, la mayoría de publicaciones y patentes de aplicación de los criogeles está relacionada con la inmovilización de biocatalizadores y de células para diferentes procesos biotecnológicos (Lozinsky y Plieva, 1998; Ariga y cols., 1993). Su uso en el procesado de zumos de pomelo fue descrito por Del Nobile (2003) para mejorar las propiedades sensoriales de estos zumos.

Las principales ventajas del criogel de alcohol polivinílico como matriz de inmovilización son las siguientes: a) el método de inmovilización es sencillo y relativamente barato; b) presenta una elevada macro y microporosidad que mejora la difusión del sustrato y productos; c) sus características reológicas permiten su uso en diferentes tipos de biorreactores; d) su termoestabilidad es mayor que otros geles comúnmente usados como soportes de inmovilización; e) es altamente resistente a la degradación biológica; f) es biológicamente compatible y no es tóxico; g) su estructura química puede estabilizar la proteína enzimática; h) su carácter hidrófilo y sus grupos hidroxilos superficiales están disponibles para diferentes reacciones químicas; i) puede ser reutilizado.

Físicamente, el criogel es una red tridimensional de cadenas de polímeros entrecruzados por asociaciones físicas y químicas de manera que factores tales como la concentración inicial del polímero en la solución acuosa, el tipo de solvente usado, la temperatura y tiempo de congelación-descongelación, su peso molecular y el número de ciclos de congelación-descongelación pueden afectar el comportamiento de la gelificación (Hong y cols., 2001; Shapiro, 2000; Lozinsky y Plieva, 1998).

Por otra parte, el criogel presenta una estructura porosa muy heterogénea, que se debe a que el proceso de gelificación se desarrolla en un medio de dos fases. Una fase que consiste en policristales de hielo y otra fase líquida. En el sistema, el alcohol polivinílico gelifica alrededor de los cristales de hielo que actúan como agentes formadores de poros y les confieren una arquitectura variada. Los poros son de diferentes dimensiones (de 0,1 a 1,0 μm) y se encuentran interconectados formando galerías tridimensionales. Se ha determinado que todos los factores que influyen en la variación de la geometría de las partículas de hielo (dinámica de la cristalización, fenómenos de recristalización, condiciones del punto de fusión, presencia de solutos, entre otros) afectan directamente en las características de porosidad del criogel (Lozinsky y Plieva, 1998).

Se han propuesto tres modelos que inducen la densificación y el entrecruzamiento físico en los criogeles de alcohol polivinílico: (i) formación de enlaces por puentes de hidrógeno, (ii) formación de pequeños cristales poliméricos y (iii) separación de la fase líquido-líquido (Shapiro, 2000).

En el tratamiento criogénico de soluciones acuosas de PVA, inicialmente se forman microcristales de hielo puro y zonas no congeladas con una alta concentración de macromoléculas disueltas. Estas zonas permanecen en estado líquido el tiempo

suficiente que se requiere para establecer los puentes de hidrógeno generando la formación del criogel. A estas zonas no congeladas se les denomina microfase líquida en ellas las cadenas de PVA se ordenan y forman microcristales. Cuando se produce la descongelación se da la separación de la fase líquido-líquido en donde se asegura una suficiente cantidad de agua libre para seguir estableciendo puentes de hidrógeno entre cadenas de PVA. Temperaturas de -5 a -1°C favorecen la formación del criogel en la etapa de descongelación (Lozinsky y Plieva, 1998).

El alcohol polivinílico forma geles elásticos y el material resultante de tales tratamientos es un gel estable, que puede soportar hasta 70 a 80°C y retener su forma normal, aunque se puede modificar su tamaño original. También es un soporte de buenas características mecánicas, ya que el criogel no es quebradizo y muestra una mínima erosión abrasiva bajo condiciones de intensa agitación (Shapiro, 2000; Pascandola y cols., 2006). Además, para potenciar sus características se puede mezclar con otros polímeros como el quitosano (Minoura y cols., 1998) o el alginato. La combinación con alginato no solo previene la aglomeración sino que mejora la resistencia física del PVA y confiere mayor protección frente a la inactivación por ácido bórico (Nunes y cols., 2009).

Para la inmovilización enzimática se mezcla la enzima con una solución acuosa neutra de alcohol polivinílico mantenida a temperatura ambiente, se homogeniza, se deja caer gota a gota sobre nitrógeno líquido o se lleva a un congelador a una temperatura de -20°C para que el criogel precipite y se endurezca. Luego se elimina el nitrógeno o se retira de la criocongeladora y se deja en reposo durante 24 horas para la descongelación. Posteriormente, se lava y se evalúan sus propiedades. Se pueden usar crioprotectores como el glicerol, etilenglicol, propilenglicol o nata de leche, aunque pueden alterar la arquitectura de los poros y las propiedades del criogel (Lozinsky y Plieva, 1998; Ariga y cols., 1993).

Siguiendo estos principios, Appendini y Hotchkiss (1997) trabajaron por primera vez con películas antimicrobianas de lisozima inmovilizadas en diferentes polímeros, como alcohol polivinílico (PVA), fibras de nylon y películas de triacetato de celulosa. La lisozima también se ha inmovilizado en películas de PVA utilizando glioxal y glutaraldehído como enlaces transversales (Conte y cols., 2006). Estos autores señalan que una adecuada relación enzima / glutaraldehído, da lugar a rendimientos satisfactorios de inmovilización e inapreciables pérdidas de enzima. Más recientemente, Fernández y cols. (2009) establecen un método simple para inmovilizar inulinasa en perlas de PVA obteniendo una considerable estabilidad operacional. El

polivinil alcohol también ha sido utilizado como soporte para inmovilizar naringinasa. Del Nobile y cols. (2003) inmovilizan naringinasa en PVA con enlaces cruzados con glutaraldehído con una alta carga de actividad de la enzima. Los resultados indican el uso potencial de las películas activas para mejorar las propiedades sensoriales de los zumos de pomelo, sin embargo se puso de manifiesto algunas limitaciones debido a la constitución de la película, ya que la enzima es sólo capaz de hidrolizar la naringina difundida en la película. De hecho, esta es la principal limitación en el desarrollo de películas bioactivas aplicadas a procesos de transformación de alimentos. Posteriormente, otros estudios establecen las condiciones óptimas de trabajo de la naringinasa inmovilizada en PVA (Nunes y cols., 2009; Busto y cols., 2007). Por ejemplo, Busto y cols. (2007) muestran que entre un 95%-108% de la naringinasa de *A. niger* añadida al criogel de PVA al 8% es inmovilizada a un pH de 4.5 y una temperatura de 60-70°C. Con este tratamiento la enzima podía ser reutilizada durante 6 ciclos reteniendo un 36% de la eficacia para la hidrólisis de naringina en soluciones modelo. Más recientemente, Nunes (2009) muestran una eficiencia del 80% con naringinasa de *Penicillium decumbens* inmovilizada en PVA 10%. Estos autores establecen las condiciones de inmovilización (tamaño de poro y la concentración de enzima), así como las condiciones óptimas de trabajo (pH 4 y 70°C). Además, el enzima inmovilizado tras 8 ciclos de utilización retenía un 70% de la actividad.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los efectos beneficiosos derivados del consumo de dietas ricas en alimentos vegetales se han atribuido principalmente a compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos, vitaminas, carotenoides, etc. Los cítricos, y entre ellos el pomelo, son alimentos que se consumen fundamentalmente en forma de zumos y que presentan una elevada capacidad antioxidante.

El sabor amargo del zumo de pomelo, debido a la flavanona naringina, hace que sea rechazado por gran parte de los consumidores a pesar de que sus efectos beneficiosos para la salud, por sus propiedades antioxidantes, sean superiores a los de otros cítricos.

El desmargado de zumos se ha realizado tradicionalmente en el ámbito industrial mediante métodos físicos que se basan en la capacidad de adsorción de la naringina a polímeros sintéticos de diversa naturaleza, tales como resinas de intercambio iónico, pero al no ser selectivos interaccionan también con otros componentes bioactivos del zumo provocando una reducción de su capacidad antioxidante y por lo tanto de sus propiedades saludables. El tratamiento biotecnológico del zumo de pomelo con enzimas, como la naringinasa, presenta una buena alternativa al actuar de manera específica sobre el componente amargo naringina y rindiendo como producto de la hidrólisis enzimática la flavanona no glicosilada naringenina, compuesto no amargo. Por otro lado, el uso de la enzima inmovilizada presenta la ventaja, frente a su contrapartida soluble, de una mayor estabilidad operativa y de posibilidad de reutilización sin variaciones importantes en la eficacia catalítica.

En base a lo expuesto, la **hipótesis de trabajo**, planteada, ha consistido en suponer que el tratamiento de los zumos de pomelo con la enzima naringinasa libre o inmovilizada no afectaría o afectaría en menor grado que el método de desamargado convencional con resinas de intercambio a la capacidad antioxidante de los zumos y, por lo tanto, al efecto protector sobre el daño oxidativo a biomoléculas, cuyo incremento *in vivo* está asociado a diferentes alteraciones fisiopatológicas. Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar se evaluó, mediante un estudio *in vitro*, la capacidad antioxidante de la naringina y de la naringenina (producto de la enzima naringinasa) y su contribución a la inhibición oxidativa a proteínas, lípidos y DNA. Posteriormente, se evaluó la capacidad antioxidante total y el efecto sobre biomarcadores de daño oxidativo en zumos tratados con enzima libre e inmovilizada y

se comparó con el método de desamargado tradicional por adsorción con resinas de intercambio.

Los **objetivos** concretos del presente trabajo han sido, por tanto:

1. Analizar las diferencias en la capacidad antioxidante, estabilizadora de radicales superóxido e hidroxilo y el efecto protector sobre el daño oxidativo a lípidos y DNA de la flavanona naringina y de su aglicona naringenina.
2. Establecer la contribución del tratamiento de desamargado del zumo con la enzima naringinasa o con la resina de intercambio iónico Amberlite®IRA-400 a la capacidad antioxidante y al efecto inhibidor del daño oxidativo a biomoléculas
3. Evaluar los posibles efectos del tratamiento de zumo de pomelo con la enzima naringinasa inmovilizada por atrapamiento en un criogel de polivinilalcohol (PVA) sobre sus características antioxidantes y efecto protector a biomoléculas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Los diferentes reactivos utilizados en las determinaciones analíticas, así como su procedencia, serán reseñados en el apartado correspondiente a cada uno de los métodos.

Aparatos

- ✓ **Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters compuesto por:**
 - Sistema de bombeo de solventes e inyector automático modelo Alliance 2695
 - Detector electroquímico Coulochem II ESA y detector ultravioleta Waters 2487

- ✓ **Espectrofotómetros:**
 - ULTROSPEC 1100 (Pharmacia Biotech)
 - HITACHI modelo U-2000
 - UNICAM modelo 5625 UV/VIS
 - HP8453 con baño termostatzado LTD6G

- ✓ **Centrífugas:**
 - Centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-HC (Beckman)
 - Centrífuga refrigerada modelo Kubota 2010 (Kubota Corporation)
 - Centrífuga de mesa Biofuge, modelo 13 (HERAUS)

- ✓ **Otros aparatos:**
 - Baños termostatzados de temperatura regulable Precistern modelo S-387 y Unitronic 100
 - Molecular Imager Gel Doc TM (Bio Rad)
 - Sistema de electroforesis Bio-Rad power-Pac 1000 (Hercules, CA)
 - pHmetro Crison, modelo 2001 (CRISON)
 - Balanzas y microbalanza electrónica Sartorius.
 - Sistema Millipore de filtración bajo vacío, equipados con filtros para solventes y soluciones acuosas

- Agitador orbital, modelo G2FC (NewBrunswick)
- Agitadores magnéticos con calefacción
- Agitadores manuales de tubos Vórtex
- Material habitual de laboratorio

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. PROCESADO DEL ZUMO Y TRATAMIENTOS DE DESAMARGADO

La fruta se obtuvo en el comercio en estado maduro, en condiciones asépticas, se cortaba por la mitad y se procedía a la extracción del zumo con un exprimidor (Braun Citromatic). El zumo se filtró utilizando lana de vidrio (tipo A/E, Gelman Sciences) con el objetivo de separar la pulpa de las semillas. Posteriormente 25 mL de zumo se utilizaron como control (*zumo fresco FJ*) y la otra fracción se sometió a pasteurización siguiendo el método de Tatum y Berry (1973).

Tratamiento enzimático con naringinasa (N-PJ): A 25 mL de zumo pasteurizado se añadieron 200 μ L de naringinasa (Sigma Chemical Co.) para obtener una concentración final de la enzima de 0.4U/mL (Prakash y cols., 2002). A continuación se incubaron a 20°C durante 24 horas a 150 rpm, transcurrido este tiempo se para la reacción enzimática manteniendo las muestras a 4°C.

Tratamiento con Amberlite IR 400 (R-PJ): A 25 mL de zumo pasteurizado se añadieron 5 g de Amberlite IR 400 (Sigma Aldrich), agitando constantemente durante 3 minutos a temperatura ambiente (Mishra y Kar, 2003). La Amberlite IR 400 se eliminó por centrifugación y filtración del zumo.

Tratamiento con enzima naringinasa inmovilizada en PVA (IN-PJ): Se aplicó el método de inmovilización desarrollado por Busto y cols. (2007). La solución de alcohol polivinílico (PVA), se preparó disolviendo 0,04 g de hidróxido sódico en 18 mL de agua destilada y se añadieron 1,6 g de PVA. Esta solución alcalina de PVA (25mg de NaOH /g PVA), contenida en un frasco de cristal herméticamente cerrado, se calentó bajo agitación magnética hasta obtener la disolución total del PVA, se enfrió y se neutralizó con unas gotas de HCl. Posteriormente se preparó una disolución de PVA al 8% con naringinasa (5U/mL). Las perlas de PVA se formaron por el método de congelación-descongelación (Ting y Sun, 2000): se extruía la solución de PVA sobre el N₂ líquido, contenido en un vaso Dewar de 1.5 litros, gota a gota con ayuda de una bomba

peristáltica situada a unos 60 cm de altura del vaso. Una vez formadas se lavaron las perlas con agua destilada bajo agitación magnética durante 1h. Posteriormente, se eliminó la mayor cantidad de agua (con papel de filtro estéril y libre de humedad), y se almacenaba a 4°C hasta su utilización. Para el tratamiento del zumo, se añadieron 2 g de perlas de PVA con naringinasa inmovilizada (5 U/g perlas) a 25 mL de zumo pasteurizado. Se incubaron a 20°C durante 24 horas a 150 rpm, transcurrido este tiempo se eliminan las perlas por filtración del zumo.

4.2.2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE POLIFENOLES TOTALES

Fundamento teórico

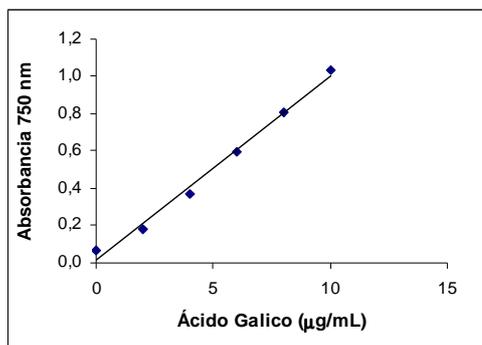
La cantidad total de polifenoles en los zumos de pomelo se determinaron de acuerdo con el procedimiento de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). La reacción de Folin-Ciocalteu se basa en la oxidación de los polifenoles con el reactivo de Folin formando un complejo azul que mide espectrofotométricamente a 750 nm.

Procedimiento

Reactivos: Reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido gálico fueron suministrados por Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA). Carbonato de sodio (Na_2CO_3) fue de Panreac (Barcelona, España).

Metodología: 10 μL de zumo se llevaron a un volumen final de 100 μL , se añadieron 500 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10, y 400 μL de la solución de carbonato de sodio al 7,5%, y se dejaron incubando durante 40 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia fue evaluada en un espectrofotómetro (Hitachi U-2000) a 750 nm frente a un blanco. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de equivalentes de ácido gálico.

La recta de calibrado se preparaba a partir de la solución estándar de ácido gálico, en un rango de 0-100 μg ácido gálico mL^{-1} . La figura 4.1. muestra un ejemplo representativo de recta patrón para polifenoles obtenida en las condiciones descritas.



$$\mu\text{g Ac. Gálico mL}^{-1} = a + b \cdot \text{Absorbancia}$$

$$a = 0,0139 \quad b = 0,0991 \quad R^2 = 0,9976$$

Figura 4.1. Ejemplo ilustrativo de recta patrón para polifenoles totales.

4.2.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE NARINGINA

Fundamento teórico

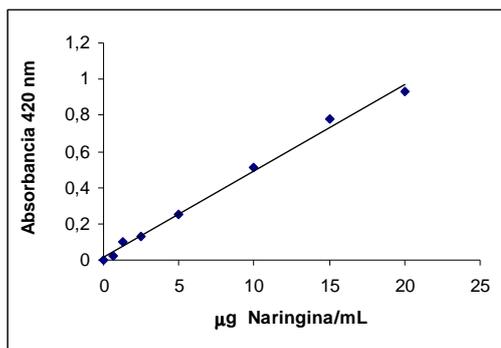
Para la evaluación del contenido en naringina en el zumo de pomelo y en las muestras estándar preparadas en el laboratorio se utilizó el procedimiento espectrofotométrico descrito por Davis (1947). Aunque no es un método específico, en la actualidad es el único reconocido para la determinación cuantitativa espectrofotométrica de naringina en zumo de pomelo (Johnson y Chandler, 1982). Se fundamenta en la reacción entre flavanonas y dietilenglicol en medio básico generando un cambio de color cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de flavanonas.

Procedimiento

Reactivos: Dietilenglicol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$) fue suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Hidróxido de sodio (NaOH), ácido acético ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) y acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

Metodología: Para las determinaciones se mezclaron 20 μL zumo de pomelo con la solución de NaOH 4 M, se completó con dietilenglicol al 90% hasta un volumen final de 1 mL, y se incubaron durante 15 minutos. Finalmente se evaluó la absorbancia en un espectrofotómetro a 420 nm. Los resultados de concentración se expresaron en μg de naringina mL^{-1} .

La curva patrón se preparaba a partir de una solución estándar de naringina.



$$\mu\text{g naringina mL}^{-1} = a + b \cdot \text{Abs}$$

$$a = 0,0161 \quad b = 0,0479 \quad R^2 = 0,9934$$

Figura 4.2. Ejemplo ilustrativo de la recta patrón para la cuantificación de naringina

4.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

4.2.4.1. Método del ABTS^{•+}

Fundamento teórico

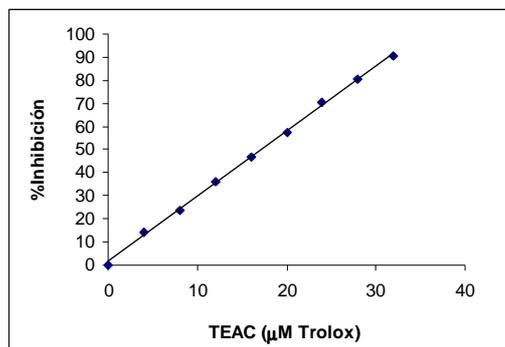
Para la determinación de la capacidad antioxidante total se siguió el método del ABTS^{•+} de Miller & Rice-Evans (1997) modificado por Pellegrini y cols. (1999) y Rivero y cols. (2007), basado en la oxidación del ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico)) por el persulfato potásico para formar el radical ABTS^{•+}, que es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno.

Procedimiento

Reactivos: PBS, ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico)), persulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), TROLOX (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), naringina y naringenina suministrados por Sigma-Aldrich y Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Metodología: La generación del reactivo ABTS^{•+}, se realizó mezclando ABTS 7 mM con la solución de persulfato potásico 2,45 mM en la proporción (1:1). La determinación de la actividad antioxidante total se realizó espectrofotométricamente a 734 nm añadiendo naringina o naringenina a diferentes concentraciones (0-40 μM) y para el ensayo de los zumos de pomelo se añadió un alícuota (5-30 μL , diluidos 1/4) al reactivo del ABTS^{•+}. Los resultados se expresan como TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity). La recta de calibrado con trolox se realizó a partir de una

solución estándar de trolox. El ajuste de la recta calibrado se muestra a continuación:



$$\mu\text{M Trolox} = a + b \cdot \text{Abs}$$

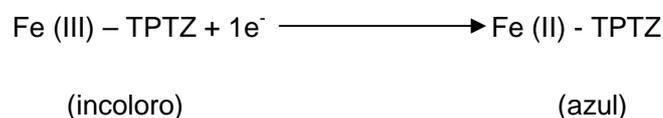
$$a = 1,5311 \quad b = 2,8196 \quad R^2 = 0,9993$$

Figura 4.3. Ejemplo ilustrativo de la recta patrón de trolox

4.2.4.2. Determinación de la capacidad reductora. Método del FRAP

Fundamento teórico

Para la determinación de la capacidad reductora se siguió el método del FRAP de Benzie & Strain (1999). Se fundamenta en la capacidad de reducir el Fe (III) hasta Fe (II), mediante la siguiente reacción:



Mediante un donante de electrones (antioxidante) se forma un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm. La medida espectrofotométrica a esa longitud de onda es proporcional a la capacidad reductora de la muestra.

Procedimiento

Reactivos: Acetato sódico ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), ácido acético ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), ácido clorhídrico (HCl), tricloruro de hierro (FeCl_3), sulfato de hierro (FeSO_4) suministrados por Panreac (Barcelona, España). TPTZ (2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$)) por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Metodología: La generación del reactivo TPTZ, se realizó mezclando 25 mL de tampón acetato sódico 0,3 M pH 3,6, 2,5 mL FeCl_3 20 mM, 2,5 mL TPTZ 10 mM y 3 mL de agua miliQ. Distintos volúmenes de naringina y naringinina (0,1; 0,2; 0,3; 0,5

mg/mL) o de zumo (5-30 μ L) se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 970 μ L del reactivo TPTZ. La determinación de la capacidad reductora se realizó espectrofotométricamente a 593 nm. Los resultados se expresan como μ M FeSO₄. La recta de calibrado se realizó a partir de una solución estándar de FeSO₄. El ajuste de la recta de calibrado se muestra a continuación:

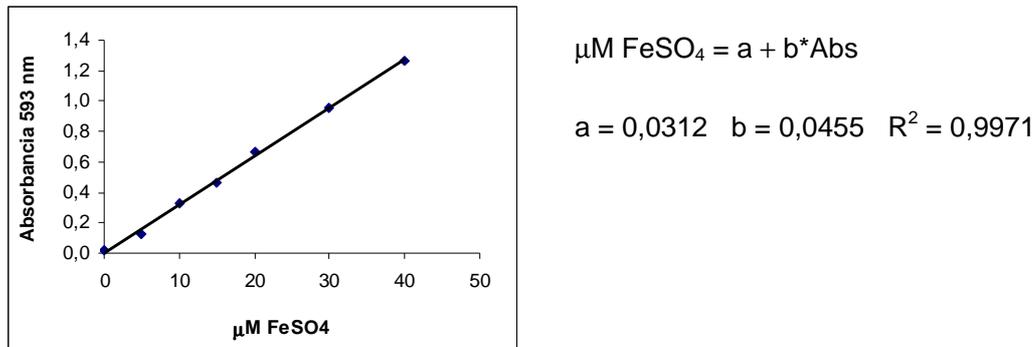


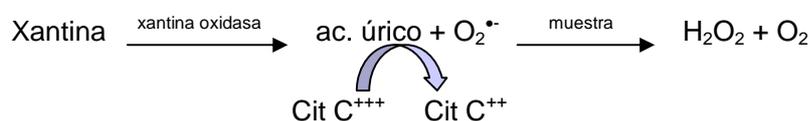
Figura 4.4. Ejemplo ilustrativo de la recta patrón de FeSO₄.

4.2.5. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ESTABILIZADORA DEL RADICAL SUPERÓXIDO

4.2.5.1. Método enzimático

Fundamento teórico

Para el estudio de la capacidad estabilizadora del radical superóxido mediante el método enzimático se siguió el método de Mc. Cord y Fridovich (1969). El radical superóxido se genera por el sistema xantina/xantina oxidasa que reduce el citocromo C oxidado. La capacidad estabilizadora de la muestra se mide por la inhibición de esta reacción según el siguiente esquema,



La reacción se sigue midiendo la disminución de la reducción del citocromo C espectrofotométricamente a 546 nm.

Procedimiento

Reactivos: Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) suministrados por Panreac (Barcelona, España). Citocromo C, xantina y xantina oxidasa fueron suministrados por Roche (Madrid, España).

Metodología: En una cubeta se mezclaron tampón fosfato potásico 50 mM, EDTA 0,1 mM, xantina 0,5 mM, citocromo C^{+++} 0,3 mM, se agitó y se añadió xantina oxidasa. La lectura se realizó a 546 nm durante 2 minutos. El resultado se consideró el 100 % de la actividad. A continuación, se añadió la muestra cuyo valor de absorbancia debe de estar entre el 40-60 % de inhibición del valor obtenido en ausencia de muestra. En el estudio de las muestras de flavanonas se ensayaron diferentes concentraciones de naringina (100-500 μM) o de naringenina (1-20 μM), y distintos volúmenes de zumo (50-200 μL).

4.2.5.2. Método no enzimático

Fundamento teórico

La actividad "scavenger" frente al radical superóxido se ensayaba mediante un método espectrofotométrico basado en la inhibición del radical generado en la oxidación de NADH (Liu y cols., 1997). El radical superóxido se genera mediante la oxidación del fenacín metasulfato-b-nicotinamida adenina dinucleótido por el NADH y determinado por la reducción del nitroazul tetrazolio (NBT).

Procedimiento

Reactivos: Trizma base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), ácido clorhídrico (HCl) fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). NADH por Roche. Nitro azul tetrazolio (NBT) y 5-metilfenacín metosulfato (PMS) suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

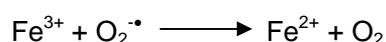
Procedimiento: En este experimento, el radical superóxido se genera en 3 mL de tampón Tris/ClH 16 mM a pH 8,0 que contiene 78 μM de NADH, 50 μM de NBT y 10 μM PMS. Las muestras de naringina fueron ensayadas en el rango de concentración de 0,05-0,5 μM y de naringenina de 0,01 a 1 μM . Los zumos fueron ensayados a diferentes volúmenes (5-30 μL). Al reaccionar el radical superóxido y el NBT se

produce una coloración que es cuantificada espectrofotométricamente a una longitud de onda 560 nm.

4.2.6. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL RADICAL HIDROXILO

Fundamento teórico

El peróxido de hidrógeno es el principal intermediario en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno, puede ser formado a partir del anión superóxido por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) y es metabolizado bien por Fe(II) para dar radicales hidroxilo o bien por la catalasa para dar H₂O y O₂, de acuerdo con la reacción de Haber-Weiss (Hageman y cols., 1992).



El radical hidroxilo formado en la reacción entre el Fe(III)-EDTA y H₂O₂ en presencia de ácido ascórbico (que acelera la reacción de Haber-Weiss por generación de la forma reducida del complejo de hierro) oxidan la desoxirribosa para formar productos oxidados que por calentamiento con el ácido tiobarbitúrico, a bajo pH, dan lugar a un cromógeno de color rosa. Este procedimiento se llevo a cabo según Halliwell y Gutteridge (1981).

Procedimiento

Reactivos: Fosfato monosódico (NaH₂PO₄), fosfato disódico (Na₂HPO₄), ácido ascórbico (C₆H₈O₆), cloruro de hierro (FeCl₃), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ácido tricloroacético (CCl₃CO₂H) fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). Desoxirribosa (C₅H₁₀O₄), EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈•2H₂O) y ácido tiobarbitúrico (C₄H₁₀O₄) fue por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Metodología: Para las determinaciones, 100 mM de desoxirribosa en presencia y ausencia de muestra se mezclaron con ácido ascórbico 60 mM, H₂O₂ 100 mM, FeCl₃ 10 mM y EDTA 10 mM en tampón fosfato de sodio 24 mM pH 7,4. Se incubaron a 37°C durante 1 hora, la reacción se paró con ácido tricloroacético al 2,8 % y se incubó con ácido tiobarbitúrico al 1 % a 100°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo la absorbancia se determinó a 532 nm. Las muestras de naringina y naringenina fueron ensayadas a las concentraciones de 0-10 µM ó 0,25-6 µM respectivamente y el resultado fue expresado como IC₅₀. Los zumos fueron ensayados a diferentes

volúmenes (5-30 μL) y los resultados fueron expresados como % inhibición frente a la oxidación de la desoxirribosa.

4.2.7. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas Wistar de tres meses de edad y peso comprendido entre 250-300 g, alimentadas con una dieta estandar (Luceso Trading S.L. (Madrid, España)), y fueron mantenidas en jaulas individuales bajo condiciones controladas de luz y oscuridad (12h) y a temperatura de 22°C. Los experimentos se llevaron a cabo bajo los principios internacionales del cuidado y manejo de animales. Se sacrificaron bajo condiciones de anestesia y los hígados fueron lavados con NaCl 0,9 % y utilizados para obtener los homogenizados y los microsomas utilizados en los ensayos de glutatión (GSH) e inhibición de la peroxidación lipídica.

4.2.8. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE GSH

Fundamento teórico

El contenido de glutatión reducido (GSH) fue determinado por el método descrito por Brigelius (Brigelius y cols., 1983), basado en la cuantificación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro 2,4-dinitrobenceno (CDNB) ($\epsilon = 9,6 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Esta reacción está catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GST).



El aducto formado, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (GS-DNB), presenta un máximo de absorción a 340 nm, se mide a punto final, cuando la absorbancia se estabiliza.

Procedimiento

Reactivos: Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato dipotásico (K_2HPO_4), ácido etilen-diaminotetracético (EDTA), fosfato monosódico (NaH_2PO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4) fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). Ácido metafosfórico (HPO_3), terc-butil-hidropéroxido (t-BOOH), Cloro 2,4-dinitrobenceno (CDNB), Glutatión-S-transferasa (GST) por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Metodología: Los hígados se homogenizaron en 5 volúmenes (p/v) de tampón fosfato de sodio 0,1 M a pH 8, EDTA 5 mM y se centrifugaron a 1600 rpm durante 15

minutos a 4°C. El homogenizado se incubó en presencia y en ausencia de las distintas muestras a 37°C durante 120 minutos con 500 µM de t-BOOH, transcurrido este tiempo se añadió HPO₃ al 25%, se centrifugó a 8700 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó para determinar la concentración de GSH. 50 µL de muestra se mezclaron con tampón fosfato potásico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0, CDNB 10 mM y glutatión transferasa. Posteriormente se sigue la reacción espectrofotométricamente a 340 nm. La concentración de GSH se expresa en nmol/mg proteína.

La concentración de flavanonas utilizadas en el ensayo fue de 0,05-2 mM y de zumo fue de 10-40 µL.

4.2.9. ENSAYO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

4.2.9.1 Peroxidación lipídica inducida por Fe(II)/H₂O₂

El homogenizado de hígado fue incubado con 0,3 mM de sulfato férrico y 2,65 mM de peróxido de hidrógeno durante 1h a 57°C en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de naringina (0,5-4 mM) y de naringenina (0,05-0,5 mM). Posteriormente los niveles de TBARs fueron evaluados espectrofotométricamente.

4.2.9.2. Inducción de peroxidación lipídica con ABAP

Los microsomas fueron obtenidos del hígado de rata usando el método de Ubeaud (Ubeaud y cols., 2005). 1 mg/mL de microsomas preparado en 50 mM Tris-ClH pH 7,0 fueron incubados en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de naringina (0,1-5 mM) y naringenina (0,05-2 mM) o de distintos volúmenes de zumo de pomelo (10-40 µL) y en presencia de 10 mM de 2,2'- azobis(2-amidinopropano) (ABAP). Se incubaron durante 90 minutos a 37°C y posteriormente se evaluarón los niveles de TBARs espectrofotométricamente.

4.2.9.3. Evaluación de los niveles de TBARs

Fundamento teórico

Para cuantificar la cantidad de TBARs se siguió el método de Buege y Aust, (1978). El procedimiento utilizado se basa en la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido generando un complejo coloreado formado por condensación de dos moléculas de TBA y MDA y la posterior determinación del

complejo por espectrofotometría a 532 nm ($\epsilon=1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}$). Otros compuestos como grupos aldehído pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico en estas condiciones y, por tanto, el procedimiento no es específico para el MDA. La concentración de TBARS se calculó como equivalentes de malondialdehído usando el coeficiente de extinción indicado para el complejo MDA-TBA.

Procedimiento

Reactivos: Trizma base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), fosfato monosódico (NaH_2PO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4), ácido tricloroacético (TCA) y ácido clorhídrico (HCl) fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). El ácido tiobarbitúrico (TBA) fue suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Metodología: Las muestras de homogenizado y microsomas incubadas con flavanonas o zumos se les añadió la mezcla de TBA/TCA/HCl (0,375 % / 15 % / 0,25 M), y se incubaron a 100°C durante 15 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 532 nm (Hitachi U-2000). La concentración de TBARS generados en la mezcla se calculaba usando el coeficiente de absorción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{L}^{-1}$ y se expresaba como nmol de malondialdehído/mg de proteína o mediante % de inhibición con respecto al control oxidado.

4.2.10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Fundamento teórico

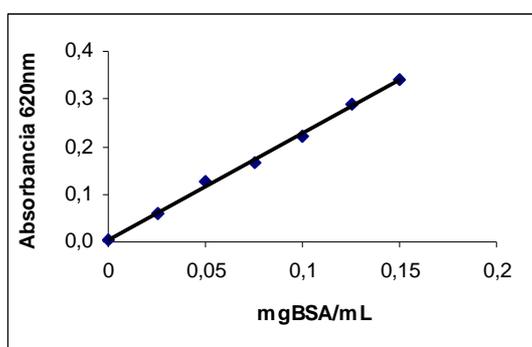
La concentración de proteínas existentes en las muestras de homogenizado de hígado se realizó por el procedimiento de Lowry y cols. (1951). El método se basa en la propiedad que presentan los compuestos con enlaces peptídicos de reaccionar en medio alcalino con sales de cobre para dar una coloración violeta en una primera reacción. En una segunda reacción, el reactivo de Folin para fenoles permite incrementar la sensibilidad del procedimiento.

Procedimiento

Reactivos: Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) fue suministrado por Probus. El carbonato de sodio (Na_2CO_3), hidróxido de sodio (NaOH), y tartrato sodio-potasio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$) fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España).

Albúmina de suero bovino (BSA) y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Metodología: Se utilizaron 10 µL de homogenizado convenientemente diluido en agua que se mezclaron con 5 mL de Na₂CO₃ 3% en NaOH 0,1 M, CuSO₄.5H₂O 2%, tartrato Na-K 4% (98:1:1). Tras incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente se añadieron 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, y se prosiguió con la incubación otros 10 minutos, transcurrido este tiempo se cuantificó la absorbancia a 620 nm. La concentración de proteínas se realizó por interpolación de las absorbancias en una curva de BSA (seroalbúmina bovina) a diferentes concentraciones (0-0,15 mg/mL) tal y como se muestra en la figura 4.5.



$$\text{mg BSA/mL} = a + b \cdot \text{Abs}$$

$$a = 0,0628 \quad b = 58.795 \quad R^2 = 0,9941$$

Figura 4.5. Ejemplo ilustrativo de la recta patrón para cuantificar proteínas.

4.2.11 EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO AL DNA

4.2.11.1. Daño oxidativo al DNA de timo de ternera

Procedimiento

Reactivos: Ácido desoxirribonucleico (DNA), 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG), 2-desoxiguanosina (dG) suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA), sulfato de cobre pentahidratado CuSO₄.5H₂O, ácido ascórbico(C₆H₈O₆), fosfato monosódico(NaH₂PO₄), fosfato disódico (Na₂HPO₄), cloruro de sodio (NaCl) y trizma base (NH₂C(CH₂OH)₃) fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España).

Metodología: La oxidación del DNA fue inducida con el radical hidroxilo, siguiendo el método de Muñiz y cols. (1995). Las muestras se incubaron en presencia de DNA (1

mg/mL), ácido ascórbico 100 mM, CuSO₄ 10 mM y tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,4 a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente se realizó la digestión del ADN y cuantificación de los niveles de la base modificada 8-OHdG, así como la electroforesis en gel de agarosa. La concentración de naringina y naringenina fue ensayada a diferentes concentraciones (0,001; 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 20; 30; 40 y 50 µM) y los zumos de pomelo fueron ensayados a diferentes volúmenes (25; 50; 100 y 200µL).

4.2.11.2. Electroforesis en gel de agarosa

Fundamento teórico

La electroforesis en gel de agarosa es un método simple y rápido para determinar el tamaño, calidad y cantidad de DNA. Las moléculas de ácidos nucleicos, debido a la carga negativa proporcionada por los fosfatos, se mueven cuando están expuestas a un campo eléctrico. La velocidad de migración de los fragmentos de DNA es proporcional a la carga de las macromoléculas e inversamente proporcional a su masa y conformación. Como los ácidos nucleicos tienen un esqueleto fosfato de carga negativa la razón carga/masa es constante para todos los tamaños lo que hace que migren en un campo eléctrico en función de su tamaño.

Para revelar la posición de los fragmentos de DNA se corre el gel en presencia de bromuro de etidio que se intercala entre pares de bases adyacentes del DNA que absorbe entre 302 y 366 nm, emitiendo fluorescencia a 590 nm que corresponde al naranja en el espectro visible. La ventaja del bromuro de etidio es que su fluorescencia se ve incrementada 25 veces cuando se intercala en ácidos nucleicos bicatenarios mientras que no varía cuando está libre o asociado a ácidos nucleicos monocatenarios.

Procedimiento

Reactivos: Bromuro de etidio (C₂₁H₂₀BrN₃), trizma base (NH₂C(CH₂OH)₃), borato, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), azul de bromofenol (C₁₉H₁₀O₅SBr₄) y glicerol (C₃H₈O₃) suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Agarosa por Promega (Madison, Wi, USA). Marcadores de peso molecular (λDNA/Hind III, 100bp DNA ladder) suministrados por Invitrogen (Carlsbad, Ca, USA).

Metodología: Las alícuotas de DNA (50µL) y los marcadores de peso molecular se mezclaron con 10 µL del buffer de carga (20% glicerol, 0,1% azul de bromofenol y 80% tampón fosfato de sodio 0,1M pH 7,4). La electroforesis se realizó usando un sistema de electroforesis Bio-Rad power-Pac 1000 (Hercules, CA), a 400 mA. Las bandas de DNA se visualizan bajo luz ultravioleta y se fotografían con una cámara digital.

4.2.11.3. Cuantificación de los niveles de 8-OHDG

Fundamento teórico

Para el análisis de la base modificada se siguió el método propuesto por Floyd y cols. (1988) y modificado por Muñiz y cols (1995). La determinación se realizó por HPLC utilizando la combinación de dos detectores, ultravioleta-visible (UV) y electroquímico (EC) que permite discriminar entre bases no modificadas y las modificadas, ya que las primeras no son activas electroquímicamente mientras que las modificadas si lo son. La muestra de DNA debe ser previamente digerida por la acción combinada de nucleasas y fosfatasas.

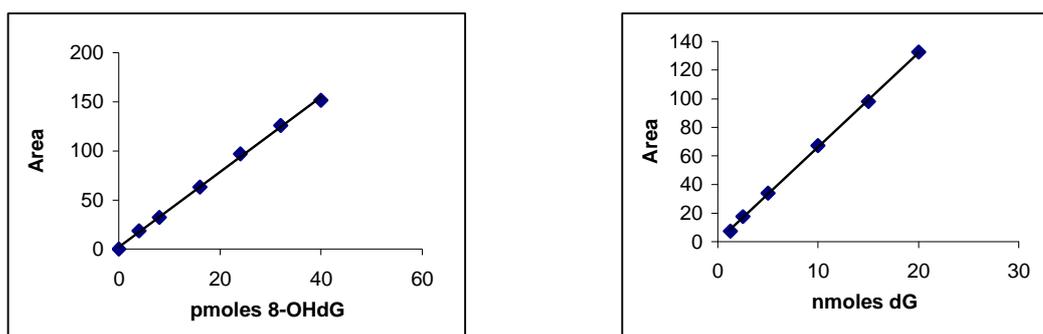
Procedimiento

Reactivos: Acetato sódico ($C_2H_3NaO_2$), fosfato monosódico (NaH_2PO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4), fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). Ácido acético (CH_3CO_2H), acetonitrilo (grado HPLC) por Merck (Darmstadt, Alemania). Nucleasa P1 por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) y fosfatasa alcalina por Invitrogen (Carlsbad, Ca, USA).

Metodología: La digestión se realizó incubando 200 µg de DNA con 100 U de DNAasa I en Tris-HCl 10 mM a 37°C durante 60 minutos. En el siguiente paso el pH de la reacción se bajo a 5,1 mediante la adición de acetato sódico 0,5 M pH 5,1 y 5 U de Nucleasa P1 a 37 °C durante 60 minutos. Después de neutralizar el pH de la mezcla de reacción tampón Tris-HCl 0,4 M pH 7,4, se incubó con fosfatasa alcalina (100 U) durante 1 hora a 37°C (Muñiz y cols., 1995). En la determinación cromatográfica (HPLC) de la base modificada se utilizo una columna de fase reversa Spherisorb ODS 2,5µm (0.46x25cm). Se aplicó un flujo en isocrático de 1mL/min utilizando como fase móvil tampón fosfato 50 mM pH 5,5-acetonitrilo 4%.

La base modificada se detectó electroquímicamente y se identificó por sus tiempos de retención, determinados en la muestra patrón procesada paralelamente. Los niveles de base modificada se expresan en relación de la base no modificada 2-desoxiguanosina (dG) determinada paralelamente mediante un detector U.V. acoplado en serie con el electroquímico. Para la cuantificación se utilizó el área de los picos, relativa al patrón de 8OHdG y al de la base dG.

La cuantificación se realizó utilizando las rectas de calibrado que se preparaban con 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) y 2-desoxiguanosina (dG).



$$\text{pmoles 8OHdG} = a + b \cdot \text{Area}$$

$$a = 2,2763 \quad b = 3,8146 \quad R^2 = 0,9985$$

$$\text{nmoles dG} = a + b \cdot \text{Area}$$

$$a = 0,417 \quad b = 6,5899 \quad R^2 = 0,9996$$

Figura 4.6. Ejemplo ilustrativo de las rectas patrón para cuantificar 8OHdG y dG.

4.2.12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los resultados de este trabajo han sido procesados con el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows. Se realizó un tratamiento estadístico de los datos para su mejor manejo y presentación en tablas y figuras a partir del cálculo de medias, rangos y desviaciones estándar.

Se llevaron a cabo análisis comparativos ANOVA, test LSD y t de Student, con el fin de determinar las diferencias significativas entre las muestras a un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Para el análisis de las correlaciones entre las variables estudiadas se aplicaron los modelos de regresión simple.

Letras minúsculas y símbolos del test de LSD (en forma de superíndices) que se incluyen en las tablas y los gráficos del apartado de Resultados. Dichas letras y símbolos indican los resultados de test de Tukey después de realizar una comparación

múltiple de medias de los tres valores ensayados en una misma muestra para una variable determinada. Si dichos superíndices son distintos para una misma columna en caso de las tablas y en el caso de los gráficos para una misma serie de columnas, los valores correspondientes serán estadísticamente diferentes entre sí a un nivel de significación de $p < 0,005$. La secuencia en orden alfabético de letras como superíndice corresponde al ordenamiento de menor a mayor del valor promedio de las muestras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio 1

Antioxidant properties, radical-scavenging activity and biomolecules protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study

Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study

Monica Cavia-Saiz, Maria D Busto, Maria Concepción Pilar-Izquierdo, Natividad Ortega, Manuel Perez-Mateos and Pilar Muñiz*

Abstract

BACKGROUND: This study was designed to evaluate and compare antioxidant capacity and radical scavenging activity of naringin and its aglycone by different *in vitro* assays. The effects of flavanones on lipid peroxidation, glutathione (GSH) oxidation and DNA cleavage were also assessed.

RESULTS: The results showed that naringenin exhibited higher antioxidant capacity and hydroxyl and superoxide radical scavenger efficiency than naringin. Our results evidenced that glycosylation attenuated the efficiency in inhibiting the enzyme xanthine oxidase and the aglycone could act like a more active chelator of metallic ions than the glycoside. Additionally, naringenin showed a greater effectiveness in the protection against oxidative damage to lipids in a dose-dependent manner. Both flavanones were equally effective in reducing DNA damage. However, they show no protective effect on oxidation of GSH.

CONCLUSION: The data obtained support the importance of characterizing the ratio naringin/naringenin in foods when they are evaluated for their health benefits.

© 2010 Society of Chemical Industry

Keywords: antioxidant activity; lipid peroxidation; naringenin; naringin; radical scavenger

INTRODUCTION

Flavonoids are a large group of low-molecular-weight polyphenolic compounds present in many plant-based foods regularly consumed by humans. These natural compounds have shown a wide range of biological and pharmacological activities¹ that have been attributed to their ability to inhibit or modulate certain enzymes and to their antioxidant properties.^{2,3} Scavenging of free radicals seems to play a considerable role in the antioxidant activity of flavonoids, which in turn is ascribed to the phenolic hydroxyl groups attached to flavonoid structure.^{4,5} A relation between the chemical nature of flavonoids and their antioxidant activity has been established.⁶ The chemical nature of flavonoids depends on structural class, degree of hydroxylation, other substitutions and conjugations, and degree of polymerization.⁷ Glycosylation commonly occurs in the metabolism of flavonoids, and increases their hydrophilic properties by addition of sugar moieties into the structure.⁸ Some experiments have shown that glycosylation limits the antioxidant activity of flavonoids *in vitro*.⁹

Among the various types of flavonoids, naringenin (4',5,7-trihydroxyflavanone), found especially in many citrus fruits, has been shown to possess antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimutagenic properties,^{3,10} and recent studies suggest that it could be a useful chemoprotective agent.¹¹ Naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside), a glycoside of naringenin, is a main cause of bitterness in some citrus juices, it

is rapidly transformed into naringenin by the action of enzymes such as α -rhamnosidase and β -glucosidase.¹² This flavanone was reported to possess anti-inflammatory, anti-ulcer, and antioxidant activities.⁸ In addition, Jagetia¹¹ indicated that naringin protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow, and results of *in vitro* anticarcinogenesis assay showed that naringenin, but not naringin, inhibited aflatoxin B1-induced carcinogenesis.¹³ These and other similar data suggest that naringenin and naringin possess several different biological functions and properties. In fact, Chen *et al.*⁸ provided the first evidence to suggest that rutinoides in flavonoids prevented the induction of apoptosis.

In this context, the aim of this study was to evaluate and compare the protective effect of naringin and its aglycone on DNA oxidative damage, and the inhibitory effect on glutathione (GSH) oxidation and lipid peroxidation. In addition, total antioxidant capacity and superoxide and hydroxyl scavenging activity of both flavanones were studied by applying different *in vitro* assay systems.

* Correspondence to: Pilar Muñiz, Department of Biotechnology and Food Science, Area of Biochemistry and Molecular Biology, University of Burgos, Plaza Misael Bañuelos, s/n, E-09001 Burgos, Spain. E-mail: pmuniz@ubu.es

Department of Biotechnology and Food Science, Area of Biochemistry and Molecular Biology, University of Burgos, E-09001 Burgos, Spain

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside), naringenin (4',5,7-trihydroxyflavanone), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2'-diazobis(2-aminodipropane) dihydrochloride (ABAP), 6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), 2-deoxy-D-ribose, *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH), phenazine methosulfate (PMS), xanthine, cytochrome c and calf thymus DNA were from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). Potassium persulfate ($K_2O_8S_2$), ferric chloride acid ($FeCl_3$), ferrous sulfate ($FeSO_4$), cupric sulfate ($CuSO_4$), hydrogen peroxide (H_2O_2), L-ascorbic acid, and trichloroacetic acid (TCA) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Thiobarbituric acid (TBA) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Bovine serum albumin, NADH disodium salt, xanthine oxidase and 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) were from Roche (Madrid, Spain). Tris, ethidium bromide, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tetrasodium salt were from Amresco (Solon, OH, USA).

Determination of total antioxidant capacity

ABTS method

Total antioxidant capacity was determined by ABTS assay according to Pellegrini *et al.*¹⁴ This technique measures the relative ability of antioxidant substances to scavenge the $ABTS^{*+}$ cation radical generated in the aqueous phase by adding potassium persulfate and keeping the solution in the dark at room temperature. The reaction mixture contained 3.36 mmol L^{-1} ABTS, $0-40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ flavanone and phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 in a total volume of 1 mL. The decrease in absorbance was measured at 734 nm. The antioxidant activity was expressed as IC_{50} . The IC_{50} values – concentration giving 50% inhibition of radical production – were determined by regression analysis.

FRAP method

This assay is based on increase in the absorbance at 593 nm due to formation of TPTZ-Fe(II) complexes according to the method described by Benzie and Strain.¹⁵ The reaction mixture was prepared by mixing 25 mL of 0.3 mol L^{-1} sodium acetate buffer solution (pH 3.6), 2.5 mL of 10 mmol L^{-1} TPTZ, 2.5 mL of 20 mmol L^{-1} $FeCl_3$, and 3 mL water. Different concentrations of naringin and naringenin ($0.1, 0.2, 0.3, 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$) were mixed with the reaction mixture in a total volume of 1 mL and incubated at 37°C for 30 min. The results were expressed as $mmol L^{-1}$ Fe(II), using linear calibration obtained with different concentrations of $FeSO_4$.

Determination of superoxide radical scavenger activity

NBT method

The superoxide radical scavenging effect of naringin and naringenin was determined by monitoring the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) as described Liu *et al.*¹⁶ The reaction mixture contained various concentrations of naringin ($0.05-0.5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) or naringenin ($0.01-1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), $78 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form), $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ NBT and $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ PMS (5-methylphenazinium methosulfate) in Tris-HCl buffer ($16 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, pH 8.0) in a total volume of 2.5 mL. The samples were incubated at room temperature for 5 min and the absorbance was read at 560 nm. The results were expressed as IC_{50} .

Xanthine oxidase/cytochrome c method

The enzymatic system to produce superoxide radicals was essentially that described by McCord and Fridovich.¹⁷ The reaction begins with a mixture of 0.3 mmol L^{-1} xanthine, cytochrome c, 0.3 mmol L^{-1} xanthine oxidase in a pH 7.8 buffer containing 50 mmol L^{-1} potassium phosphate and 0.1 mmol L^{-1} EDTA and different concentrations of naringin ($100-500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) or naringenin ($1-20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). The absorbance of the resulting solution was measured at 546 nm for 2 min at room temperature. The results were expressed as IC_{50} .

Determination of hydroxyl radical scavenger activity

The hydroxyl scavenger activity was measured by the method described by Halliwell *et al.*¹⁸ The reaction mixture containing 10 mmol L^{-1} deoxyribose, 50 mmol L^{-1} phosphate buffer, pH 7.4, 1 mmol L^{-1} ascorbic acid, 100 mmol L^{-1} ferric chloride, 1 mmol L^{-1} hydrogen peroxide, 10 mmol L^{-1} EDTA and $0-10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ naringin or $0.25-6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ naringin was incubated for 60 min at 37°C . Afterwards, 1 mL of the incubated sample was mixed with 0.5 mL trichloroacetic acid (2.8% w/v) and 0.5 mL thiobarbituric acid reagent (1% w/v, in 0.05 mol L^{-1} NaOH), followed by heating at 100°C for 15 min and subsequent cooling to room temperature. The absorbance was recorded at 532 nm in a UV-visible double-beam spectrophotometer. The results were expressed as IC_{50} .

Experimental animals

Six Wistar male rats of 3 months of age weighing between 250 and 300 g were housed in individual cages; maintained under controlled conditions of light cycle (12 h–12 h, light–dark) and temperature (22°C) and fed a standard diet and had access to water *ad libitum*. Experiments were conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care. Animals were sacrificed under ether anesthesia and the livers were removed to obtain the homogenates and microsomes.

Preparation of liver homogenates

Homogenates from liver rat were obtained using a tissue homogenator Ultraturrax Polytron (Heildoph, Germany) at 4°C . The homogenate (1/20, w/v) for GSH determination was prepared by using 100 mmol L^{-1} sodium phosphate buffer (pH 7) containing 5 mmol L^{-1} EDTA. The homogenate (1/20, w/v) for lipid peroxidation with $FeII/H_2O_2$ was prepared by using 20 mmol L^{-1} Tris-HCl buffer (pH 7.4). All homogenates were centrifuged at $600 \times g$ for 60 min at 4°C and the supernatants were used for biochemical assays.

Microsomal preparation

The microsomal fraction was obtained from rat liver using the method of Ubeaud *et al.*¹⁹ The total microsomal protein content was determined using the method of Lowry *et al.*²⁰

GSH concentration

The liver homogenate was incubated with $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ t-BOOH at 37°C for 120 min in the presence or absence of different concentrations of flavanones ($0.05-2 \text{ mmol L}^{-1}$). After incubation, 25% (w/v) HPO_3 was added to the supernatant (1/4, v/v) and the resulting mixture centrifuged at $10\,000 \times g$ at 4°C for 30 min.²¹ The GSH concentration in the sample was measured by the method of Brigelius *et al.*²²

Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation induced by Fel/ H_2O_2

The liver homogenate was incubated with 0.3 mmol L^{-1} ferric sulfate and 2.65 mmol L^{-1} hydrogen peroxide for 1 h at 37°C in the absence or presence of different concentrations of naringin ($0.5\text{--}4 \text{ mmol L}^{-1}$) and naringenin ($0.05\text{--}0.5 \text{ mmol L}^{-1}$). After incubation the amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined.

Lipid peroxidation induced by ABAP

The microsomal fraction (1 mg mL^{-1} of protein) was incubated in a solution of ABAP (10 mmol L^{-1}), prepared in 50 mmol L^{-1} Tris-HCl buffer solution at pH 7 immediately prior to use, in the presence of flavonoids at different concentrations, $0.1\text{--}5 \text{ mmol L}^{-1}$ naringin and $0.05\text{--}2 \text{ mmol L}^{-1}$ naringenin. The incubation temperature was set at 37°C for a period of 90 min and the absorbance measured at 532 nm. The lipid peroxidation was determined measuring the TBARS levels.

TBARs assay

The evaluation of the lipid peroxidation was carried out by the TBARS method. The liver homogenate or microsome samples were treated with TCA (15% w/v) and TBA (0.375% w/v) in a boiling water bath for 60 min and cooled down by tap water. Then, 2 mL n-butanol was added, mixed vigorously for 30 s, centrifuged and the supernatant was recorded at 532 nm. TBARS values were calculated from the molar extinction coefficient ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ L mol}^{-1}$) of MDA-TBA complex. The result is expressed as IC_{50} (concentration of flavanone to inhibit lipid peroxidation 50% in relation to a control test).

DNA oxidative damage

DNA oxidative damage was measured by the method described by Saez et al.²³ The reaction mixture contained calf thymus DNA ($200 \mu\text{g}$), ascorbic acid (10 mmol L^{-1}), cupric sulfate ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) and the samples to be tested at different concentrations ($0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40$ and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$). The mixture was incubated in a shaking water bath at 37°C for 1 h. Electrophoresis was performed after incubation of DNA samples in 1% agarose gels prepared in electrophoresis buffer (45 mmol L^{-1} Tris-boric acid with 1 mmol L^{-1} EDTA, pH 8.0) using a Bio-Rad power-Pac 1000 (Hercules, CA) electrophoresis system. Aliquots ($50 \mu\text{L}$) of DNA test solutions and molecular weight markers were premixed with $10 \mu\text{L}$ of a loading buffer solution containing 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue and 80% buffer solution at pH 7.4 (0.1 mol L^{-1} sodium phosphate). The resulting mixtures were run at 400 mA. The DNA bands were viewed under UV light and photographed with a digital camera. Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to obtain the molecular weight of the DNA band gels.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA). Furthermore, the least significant difference (LSD) test was applied in order to determine the statistical significance between various groups. A minimum significance level of 95% ($P < 0.05$) was considered. Linear regression was used in order to study the possible correlations between studied parameters.

RESULTS

In this study the total antioxidant capacity of naringin and its aglycone (naringenin) were evaluated by the ABTS and FRAP methods. The results obtained by ABTS assay showed that naringin exhibited a lower capacity to inhibit 50% of ABTS radical cation generation ($27.1 \pm 0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$) than naringenin ($7.9 \pm 0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$). Figure 1 illustrates the ferric ion reduction potential of both flavanones at different concentrations by the FRAP assay. Both flavanones reduced ferric ion in a dose-dependent manner, but the aglycone showed higher antioxidant efficiency than the glycoside.

The superoxide and hydroxyl radical scavenging activity of naringin and naringenin was also tested by different procedures. In fact, superoxide scavenging capacity was evaluated measuring the ability of the samples to scavenge the free radicals produced by an enzymatic (xanthine oxidase/cytochrome c system) and a non-enzymatic (NBT method) assay. According to the IC_{50} values reported in Table 1, the most potent compound was the aglycone. Furthermore, naringenin showed higher scavenger efficiency ($4.4 \mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of xanthine oxidase when compared with the NBT method ($94.7 \mu\text{mol L}^{-1}$).

On the other hand, it is well known that the hydroxyl radical scavenging capacity of flavonoids can be due to radical stabilization or metal chelating action; therefore, in this experiment hydroxyl radical scavenger was tested in presence and absence of

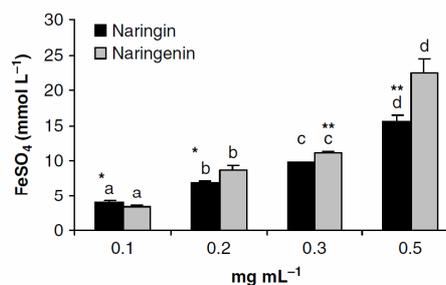


Figure 1. Total antioxidant capacity of naringin and naringenin by FRAP method. Results are the mean \pm SD of six experiments. Values for the same flavonoid with different letters are significantly different ($P < 0.005$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$ as compared with naringin and naringenin at the same concentration.

Table 1. Scavenger effect of naringin and naringenin on superoxide and hydroxyl radical

Radical generation method	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Naringin	Naringenin
Superoxide anion		
NBT	169 ± 2.9	$94.7^* \pm 0.9$
Xanthine oxidase	230 ± 4.6	$4.4^* \pm 0.2$
Hydroxyl radical		
With EDTA	1.36 ± 0.03	$1.06^* \pm 0.004$
Without EDTA	2.66 ± 0.07	$1.55^* \pm 0.1$

Each value is presented as the mean \pm SD of at least six independent experiments.
* Values significantly different ($P < 0.001$).
 IC_{50} : concentration giving 50% inhibition of radical production.

EDTA. The results in Table 1 show that naringenin had a higher capacity to scavenge the hydroxyl radical than naringin; thus the lower concentration to reach 50% inhibition was obtained with the aglycone. Furthermore, as shown in Table 1, hydroxyl scavenging capacity of both flavonoids was reduced by omitting EDTA, especially for the glycoside.

GSH levels in rat liver homogenate were studied, using t-BOOH as inductor of oxidative stress, as an indicator of the intracellular redox state. Results in Fig. 2 show that GSH levels in liver homogenate treated with t-BOOH decreased significantly compared with the control group (C). The addition of naringin and naringenin to the incubation medium did not show any significant effect at tested concentrations (0.05–2 mmol L⁻¹). Nevertheless, it was observed that the aglycone slightly increased thiol group loss in a dose-dependent manner.

The inhibition of lipid peroxidation by naringin and naringenin in rat liver homogenate and microsomes was carried out using two potent oxidants: hydroxyl radical and peroxy radical. Hydroxyl radical was generated by Fenton reaction and peroxy radical by thermal homolysis of 2,2'-azobis(2-methylpropanamide)-dihydrochloride (ABAP). Based on their IC₅₀ values (Table 2), the most active compound was that having free hydroxyl in C7. Moreover, both flavonoids inhibited the action of peroxy more efficiently than hydroxyl radicals.

The oxidative degradation of calf thymus DNA was carried out with hydroxyl radicals generated by Fenton reaction and the damaged fragments were visualized by the electrophoretic separation on agarose gel. Figure 3 shows the electrophoretic pattern of DNA after incubation with hydroxyl radicals in the absence or presence of naringin and naringenin at different concentrations. DNA was partially protected by both flavanones, as demonstrated by the presence of fragments with higher molecular weight than those obtained by treatment with hydroxyl radical alone (7930 bp). In fact, results showed some protective effect at 1 μmol L⁻¹ flavanone concentration (8328 and 8373 bp fragments with naringin and naringenin, respectively) and we clearly observed protection of the integrity of DNA at 10 μmol L⁻¹ (fragments of 9054 and 9894 bp in the presence of naringin and naringenin, respectively). However, no protection against DNA

fragmentation was observed at the lowest concentrations of both flavanones (0.001–0.1 μmol L⁻¹).

DISCUSSION

This study was carried out applying multiple *in vitro* assay systems to assess and compare the antioxidant and antiradical capacity of the flavanone naringin and its aglycone and their protective effect on oxidative stress in biomolecules (GSH, lipids and DNA).

The antioxidant activity measured by ABTS method is based on the capacity of flavonoids to stabilize the radical ABTS^{•+}. Another method commonly used for measuring the total antioxidant capacity is the 'ferric reducing antioxidant power' (FRAP) assay. This method is based on the ability of the antioxidant to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺. While the major part of the methods applied to evaluate the structure-antioxidant activity of flavonoids measure their capacity against an oxidant, the FRAP assay measures directly the reducing capacity of the substance, which is an important parameter for a compound to be a good antioxidant.²⁴ The results from these experiments indicated, in agreement with other authors, that the hydroxyl group in position 7 significantly increased the antioxidant capacity of the flavanone towards the stable radical ABTS^{•+}.²⁵ This indicated that glycosylation of the hydroxyl groups diminished the antiradical capacity of the flavonoid, perhaps since this reduces the number of free hydroxyl groups or destroys the *ortho*-hydroxyl structure, and also the linkage of sugar may hinder access of the free radical scavengers to the radical center of ABTS^{•+}.⁹ On the other hand, our results demonstrated that both flavanones reduced ferric ion in a dose-dependent manner, with naringenin showing the highest antioxidant efficiency (Fig. 1). Although this method (FRAP) has proved to be simple and reliable without significant interference, it had not been used to study the antioxidant activity relationships of naringin and naringenin.

Radicals can be generated either enzymatically (e.g. by the xanthine/xanthine oxidase system) or non-enzymatically (e.g. by a transition metal) or in combination with a reducing agent such as ascorbate. In these assays, flavonoids can influence not only the propagation reactions of free radicals but also their formation, either by inhibiting the enzymes involved in the initiation reaction or by chelating transition metals.²⁶ Therefore, in this study to investigate the radical scavenging capacity of naringin and naringenin we used a non-enzymatic method and the xanthine oxidase system for superoxide radical, and the Fenton-type reaction with or without EDTA for hydroxyl radical. Our results showed that although both flavonoids stabilized the superoxide anion, naringenin was much more effective than naringin (Table 1). These results indicated, in agreement with other authors,³ that the presence of both 7- and 5-hydroxyl groups in the aglycone makes it an excellent candidate for the superoxide scavenging reaction. Furthermore, our results also showed that naringenin was much more effective using the enzyme assay, in contrast with naringin, which reduced its radical scavenging action with the enzymatic method. Therefore, naringenin could be considered as an inhibitor of the primary function of the enzyme (xanthine oxidase). Russo *et al.*²⁶ suggested that, because of the 4-oxo function, some flavonoids can compete with the xanthine for the active site of enzyme. Nevertheless, the results obtained in the present work provide evidence that the *o*-glycosylation decreased the efficiency in inhibiting enzyme superoxide radical generation. This experimental result suggests that naringenin but not naringin could be suitable for inhibition of xanthine oxidase in the treatment

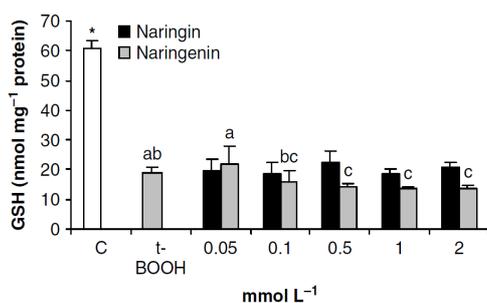


Figure 2. Effect of naringin and naringenin concentration on GSH in rat liver homogenate exposed to oxidative stress in the presence of t-BOOH. All values represent the mean ± SD of six independent experiments. *Values significantly different ($P < 0.005$) versus t-BOOH. Values of naringenin with different letters are significantly different ($P < 0.005$) with respect to t-BOOH. C: hepatocytes in the absence of t-BOOH; t-BOOH: hepatocytes in the presence of t-BOOH; (0.05–2 mmol L⁻¹): hepatocytes preincubated with naringin and naringenin before adding t-BOOH to induce depletion of GSH.

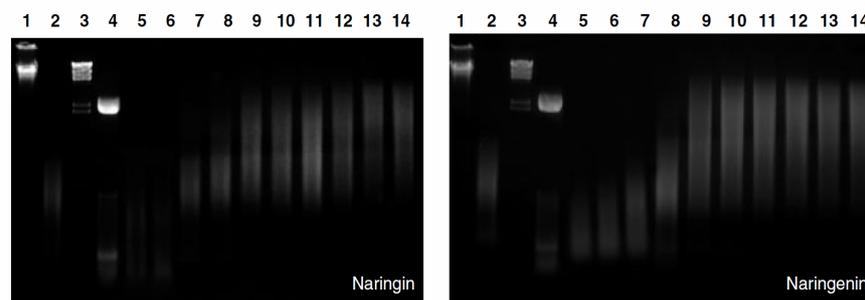


Figure 3. Effects of naringin and naringenin at different concentrations on the protection on DNA against Cu(II)-ascorbic acid. The numbered lanes represent: (1) DNA alone; (2) DNA exposed to Cu(II) ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) and ascorbic acid (1 mmol L^{-1}); (3) λ DNA/Hind III fragments molecular weight standard; (4) 100 bp DNA ladder molecular weight standard; (5–14) DNA and Cu(II)-ascorbic acid + flavonoid at the follows different concentrations: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40 and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Table 2. Effect of naringin and naringenin on lipoperoxidation in the presence of peroxy or hydroxyl radical

Radical	IC ₅₀ (mmol L ⁻¹)	
	Naringin	Naringenin
Peroxy (ABAP) ^a	2.71 ± 0.044	$1.21^* \pm 0.016$
Hydroxyl ^b	1.99 ± 0.044	$0.23^* \pm 0.003$

^a Microsomes.
^b liver homogenate.
 All values represent the mean \pm SD of at least six independent experiments.
 * Values significantly different ($P < 0.005$).
 IC₅₀: concentration giving 50% inhibition of lipoperoxidation.

of diseases where there is an overproduction of superoxide anion, such as ischemia.²⁷

The hydroxyl radical is the most toxic of the reactive oxygen species responsible for cellular damage.²⁸ In recent years, several studies have been conducted on the hydroxyl scavenging activity of natural flavonoids but some results are quite contradictory. The results on hydroxyl scavenger capacity evaluated by means of the deoxyribose test showed that naringenin exhibited a higher quenching efficiency than naringin. Nevertheless, the presence of EDTA in the deoxyribose test showed that both flavanones presented similar effectiveness in acting like hydrogen donors. These results suggest that the aglycone, besides stabilizing the radical, could act like a more active chelator of metallic ions such as iron than naringin. Cook and Samman²⁹ indicated that carbonyl and hydroxyl groups in flavonoids form complexes with iron ions and this may contribute to their property by preventing the formation of free radicals in the Fenton system. However, it has also been suggested that iron complexation with EDTA may alter the redox potential of iron ions and so facilitate the oxidation of flavonoids. The hydroxyl scavenging rate constant would then appear lower than it should be, whereas without EDTA no pro-oxidant activity would occur and free radical scavenging activity would be favored.³

The GSH tripeptide is the most abundant cellular non-protein thiol and is widely distributed in nature. It plays an important role in the defense of the cellular system; therefore, depletion of GSH increases vulnerability to the damage caused by free radicals.³⁰ t-BOOH, when metabolized to *tert*-butyl radical (t-BOO^{*}), can cause

the peroxidation of cellular membranes,³¹ rapid oxidation of GSH, and loss of cellular viability. The results obtained in this study indicate that pre-treatment with naringin or naringenin did not prevent the reduction in GSH levels. Furthermore, a potential pro-oxidant effect of naringenin *in vitro* might be suggested by the observed GSH depletion in the presence of the highest aglycone concentrations ($0.5\text{--}2 \text{ mmol L}^{-1}$). These results are in agreement with those from studies performed by Jagetia *et al.*³² to test the effects of naringin on depletion of glutathione in HepG2 cells induced by ferric iron and, by Galati *et al.*,³³ who reported a pro-oxidant effect of naringenin *in vitro* following the oxidation of water-soluble antioxidants independent of the presence of transition metals.

Peroxidation of lipids could dramatically change the properties of biological membranes, resulting in severe cell damage and playing a significant role in the pathogenesis of disease. Additionally, it has been shown that certain lipid peroxidation products induce genetic over-expression of proteins such as cytokines. In this context, different studies^{4,34} have shown that naringenin and naringin reduced the incidence of lipid peroxidation. Nevertheless, in these experiences flavanones were applied in different systems and conditions and a comparative study of both flavonoids was not provided. On the other hand, it is known that the capacity to inhibit lipid peroxidation varies with the oxidant applied; therefore, in the present study, two different oxidant generating systems to study the capacity of naringin and naringenin as protectors towards lipid oxidative damage were employed. The results showed that the presence of -OH in C-7 provided a greater effectiveness in the inhibition of lipid peroxidation. In fact, the concentration of naringenin required to reach 50% inhibition using as inductor peroxy or hydroxyl radical was 2.3- and 8.7-fold lower, respectively, as compared to the glycoside. In contrast, Yu *et al.*³ reported similar antioxidant activity for both flavanones in a hamster LDL model.

Free radicals induce oxidative DNA damage that results in functional or structural alterations in this biomolecule. Oxygen free radicals like hydroxyl radicals induce a variety of lesions in DNA, including oxidized bases, basic sites, and DNA strand breaks.³⁵ With the analysis of DNA integrity by agarose electrophoresis, naringenin and naringin treatment caused protective action on DNA in a concentration-dependent way. Both flavanones decreased oxidant-induced DNA strand breakage at concentrations above $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Naringin has been reported to inhibit DNA damage and ferric iron DNA oxidation^{25,32} and to reduce radiation-induced

DNA damage in mouse bone marrow.³³ However, Sahu and Gray³⁶ demonstrated that naringenin induced a concentration-dependent peroxidation of nuclear membrane lipids concurrent with DNA strand breaks in a model system of isolated rat liver nuclei. In contrast, Gao *et al.*³⁷ supported the finding that citrus flavonoid naringenin stimulated DNA repair in prostate cancer cells.

From these results, it seems that induced oxidative reaction in biomolecules, such as lipid peroxidation, GSH oxidation and DNA damage, may occur through different pathways. Naringenin and naringin, which were shown to be effective on free radical scavenging, however, caused a decrease in GSH levels. Zhao *et al.*³⁸ reported that antioxidants which protect lipids and DNA against oxidative stress may actually accelerate damage to other molecules, such as GSH; under these circumstances, flavonoids act as pro-oxidants.

Summarizing, our investigation provides scientific evidence to support the idea that elimination of rutinoid at C7 in flavanone naringin increases the antioxidant and antiradical capacities. This study also reveals that naringenin acts like a more active chelator of metallic ions and inhibitor of the enzyme xanthine oxidase than the glycoside.

CONCLUSION

Our results confirm that naringin and naringenin show *in vitro* different modulator capacity of oxidative stress toward lipids, DNA and GSH. The findings suggest that it may be important to characterize the ratio of naringin/naringenin in foods when they are being evaluated for their potential health benefits.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by MCyT and FEDER (AGL2003-08006/ALI).

REFERENCES

- Benavente-García O and Castillo J, Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* **56**:6185–6205 (2008).
- Kessler M, Ubeaud G and Jung L, Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol* **55**:131–142 (2003).
- Yu J, Wang LM, Walzem RL, Miller EG, Pike LM and Patil BS, Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *J Agric Food Chem* **53**:2009–2014 (2005).
- Ekambaram G, Rajendran P, Magesh V and Sakthisekaran D, Naringenin reduces tumor size and weight lost in *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutr Res* **28**:106–112 (2008).
- Kandaswami C and Middleton E, Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* **366**:351–376 (1994).
- Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G, Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic-acids. *Free Radic Biol Med* **20**:933–956 (1996).
- Di Majo D, Giammanco M, La Guardia M, Tripoli E, Giammanco S and Finotti E, Flavonones in citrus fruit: structure–antioxidant activity relationships. *Food Res Int* **38**:1161–1166 (2005).
- Chen YC, Shen SC and Lin HY, Rutinoid at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* **66**:1139–1150 (2003).
- Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q and Corke H, Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci* **25**:2872–2888 (2006).
- Hsia SM, Kuo YH, Chiang W and Wang PS, Effects of adlay hull extracts on uterine contraction and Ca²⁺ mobilization in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**:719–726 (2008).
- Jagetia A, Jagetia GC and Jha S, Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *J Applied Toxicol* **27**:122–132 (2007).
- Busto MD, Meza V, Ortega N and Pérez-Mateos M, Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chem* **104**:1177–1182 (2007).
- Guengerich FP and Kim DH, *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids. *Carcinogenesis* **11**:2275–2279 (1990).
- Pellegrini N, Proteggente A, Pannala AS and Rice-Evans CA, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**:1231–1237 (1999).
- Benzie IFF and Strain JJ, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal Biochem* **239**:70–76 (1996).
- Liu F, Ooi VEC and Chang ST, Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* **60**:763–771 (1997).
- McCord JM and Fridovich I, Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**:6049–6055 (1969).
- Halliwel B, Gutteridge JMC and Aruoma OI, The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* **165**:215–219 (1987).
- Ubeaud G, Schmitt C, Jaek D, Lave T and Coassolo P, Bosentan, a new endothelin receptor antagonist: prediction of the systemic plasma clearance in man from combine *in vivo* and *in vitro* data. *Xenobiotica* **25**:1381–1390 (1995).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275 (1991).
- Sugiyama T and Sadzuka Y, Theanine, a specific glutamate derivative in green tea, reduces the adverse reactions of doxorubicin by changing the glutathione level. *Cancer Lett* **212**:177–184 (2004).
- Brigelius R, Muckel C and Akerboom TPM, Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* **32**:2529–2534 (1983).
- Saez GT, Valls V, Muñoz P, Perez-Broseta C, Iradi A, Oliva MR, *et al*, The role of glutathione in protection against DNA damage induced by rifamycin SV and copper (II) ions. *Free Radic Res Commun* **19**:81–92 (1993).
- Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G and Saso L, Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by 'ferric reducing antioxidant power' assay and cyclic voltametry. *Biochem Biophys Acta* **1721**:174–184 (2005).
- Heim KE, Tagliafero AR and Bobyla DJ, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem* **13**:572–584 (2002).
- Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Giacomo CD, Virgata G, *et al*, Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* **16**:91–98 (2000).
- Singh D and Chopra K, The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia induced reperfusion renal injury in rats. *Pharmacol Res* **50**:187–193 (2004).
- Halliwel B and Gutteridge JMC, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford (1989).
- Cook NC and Samman S, Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* **7**:66–76 (1996).
- Shan XQ, Aw TY and Jones DP, Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* **47**:61–71 (1990).
- Masaki N, Kyle ME and Farber J, Tert-butyl hydroperoxide kills cultured-hepatocytes by peroxidizing membrane-lipids. *Arch Biochem Biophys* **269**:390–399 (1989).
- Jagetia GC, Venkatesha VA and Reddy TK, Naringin, a citrus flavanone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis* **18**:337–343 (2003).
- Galati G, Chan T, Wu B and O'Brien PJ, Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem Res Toxicol* **12**:521–525 (1999).
- Jagetia GC, Reddy TK and Kedlaya R, Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage *in vitro*. *Clin Chem Acta* **347**:189–197 (2004).

- 35 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:44–84 (2007).
- 36 Sahu SC and Gray C, Lipid peroxidation and DNA damage induced by Morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol* **35**:443–447 (1997).
- 37 Gao K, Henning S, Niu Y, Youssefian A, Seeram N, Xu A, *et al*, The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* **17**:89–95 (2006).
- 38 Zhao Y, Gao Z, Li H and Xu H, Hemin/nitrite/H₂O₂ induces brain homogenate oxidation and nitration: effects of some flavonoids. *Biochem Biophys Acta* **1675**:105–112 (2004).

Estudio 2

Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin

M. Cavia-Saiz, P. Muñiz, N. Ortega, M.D. Busto*

Department of Biotechnology and Food Science, Area of Biochemistry and Molecular Biology, University of Burgos, Plaza Misael Bañuelos, s/n, E-09001 Burgos, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2010

Received in revised form 27 June 2010

Accepted 24 August 2010

Available online xxxx

Keywords:

Antioxidant activity

Debitting

DNA damage

Exchange resin

Grapefruit juice

Liperoxidation

Naringinase

Radical scavenger

ABSTRACT

Antioxidant capacity, radical scavenging activity, as well as protective effect on liperoxidation, glutathione oxidation and DNA damage, were evaluated in grapefruit juice subjected to bitterness removal by naringinase or by physical adsorption with Amberlite®IRA-400. The results showed a reduction in naringin content for the naringinase-treated juice (N-PJ) and those processed with the exchange resin (R-PJ), which made both juices acceptable to consumers. Total antioxidant capacity, measured by ABTS and FRAP assays, was lower in R-PJ samples. The highest superoxide and hydroxyl radical scavenger activity was observed in N-PJ. With regard to inhibitory effect of juice samples on liperoxidation, N-PJ also provided the greatest effectiveness. In addition, R-PJ showed the lowest levels of GSH. The results showed a protective effect on DNA oxidative damage for all juice samples tested. In summary, enzymatic technology was more effective than physical adsorption in preserving the antioxidant and biomolecule protection capacity of fresh grapefruit juice.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The health benefits of citrus fruit juices have mainly been attributed to the presence of bioactive compounds, such as ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, limonoids and coumarins (Yu et al., 2005). Beneficial activities of the components of citrus juices for human health are primarily ascribed to its antioxidant capacity (Xu et al., 2008). Indeed, naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside) is the major flavonoid present in grapefruit juice and has been described to have antioxidant, anti-ulcer, and anti-inflammatory activity (Chen, Shen, & Lin, 2003). However, this flavanone is also the most dominant bitter principle in grapefruit.

The studies to overcome the bitterness in citrus juices have been reviewed by Singh, Gupta, Jain, and Dhatt (2003), and more recently by Puri, Kaur, Kanwar, and Singh (2008). To reduce/remove bitterness in citrus juices below the threshold level for consumer acceptability, a number of chemical treatments, physical separation processes, blending with non-bitter citrus juice and sugars and enzyme treatments have been described. Although many different methods have been used since the early 1970s the current debittering technology uses adsorption onto cellulose

acetate or macroporous resin beads or cross-linked styrene divinylbenzene resins (Shaw, Baines, Mitnes, & Agmon, 2000).

Nowadays, consumers demand the maximum preservation of the endogenous sensory, nutritional and health related qualities of fruit products. The search for new technologies that cause minimum damage to the nutritional characteristics and health-promoting effects of grapefruit may be considered as an alternative to conventional debittering process by physical adsorption. Debitting using the enzyme naringinase has been reported by several authors (Puri, Kaur, & Kennedy, 2005; Sekeroglu, Sibel, & Fahrettin, 2006). Commercial enzyme preparations labelled as naringinase contain α -rhamnosidase and β -glucosidase. Naringin is first hydrolysed to prunin and rhamnose by the α -rhamnosidase. Orally administered naringin can be metabolised into naringenin and naringenin glucuronide. Naringenin is a metabolite of naringin with a bioactive effect on human health. In the second step, prunin is broken down into naringenin and glucose by the β -glucosidase. Due to its substrate specificity, the enzyme treatment seems to cause minimum changes in the fruit juice quality attributes and makes it an interesting option against traditional procedures.

To our knowledge, up to now, no direct comparison is published for the antioxidant capacities of grapefruit juice debittered with naringinase and by physical adsorption with exchange resin. Furthermore, research about the effects of enzymatic treatment on

* Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831.
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto).

functional value of grapefruit juice is very scarce (Ribeiro, Rocha, Sepodes, Mota-Filipe, & Ribeiro, 2008).

In this context, the aim of this study was to evaluate the impact of the emerging enzyme technology in comparison with traditional adsorption technology (exchange resin) on the protective role of grapefruit juice on DNA oxidative damage, glutathione (GSH) oxidation and lipid peroxidation. In addition, total antioxidant capacity and superoxide and hydroxyl scavenging of debittered grapefruit juice by both procedures were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2'-diazobis(2-aminodipropane) dihydrochloride (ABAP), 6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox), gallic acid, naringin, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-5-triazine (TPTZ), 2-deoxy-D-ribose, *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), phenazin methosulphate (PMS), nuclease P1 and calf thymus DNA were from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide (NaOH), aluminium chloride 6-hydrate (AlCl₃·6H₂O), sodium nitrite (NaNO₂), diethylene glycol, Folin-Ciocalteu's reagent, potassium persulphate (K₂O₈S₂), ferric chloride (FeCl₃), ferrous sulphate (FeSO₄), copper sulphate (CuSO₄), L-ascorbic acid, and trichloroacetic acid (TCA) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Thiobarbituric acid (TBA) and acetonitrile was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Bovine serum albumin, NADH disodium salt, DNase I, phosphatase alkaline, and 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) were from Roche (Madrid, Spain). Tris, ethidium bromide, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tetrasodium salt were from Amresco (Solon, OH, USA). Amberlite®IRA-400 ion exchange resin was from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Naringinase from *Penicillium decumbens*, containing α -rhamnosidase and β -glucosidase activity was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Preparation of grapefruit samples

Grapefruits were purchased from a local supermarket and kept at 4 °C before being processed. Fresh grapefruit juice (FJ) was obtained by extraction through a domestic squeezer (Braun Citromatic Pulp Control MPZ6) and filtered using a sieve (light of mesh diameter 1 mm).

Samples of fresh juice (FJ) were pasteurised (P) according to Tatum and Berry (1973) just before debittering process. Thus, treatment of juice by Amberlite®IRA-400, was carried out in a 250 ml beaker containing 25 ml of pasteurised juice and 5 g of exchange resin with constant stirring for 3 min at room temperature (Mishra & Kar, 2003). Resin was removed by centrifugation and by filtering the juice.

Treatment of juice by naringinase was carried out according to Busto, Meza, Ortega, and Perez-Mateos (2007). Samples of 25 ml of pasteurised juice were treated with naringinase (0.4 U/ml) in a 250 ml beaker and incubated at 20 °C for 24 h.

2.3. Determination of total phenols and naringin

Total phenol content was evaluated by the Folin-Ciocalteu's reaction (Singleton & Rossi, 1965) using gallic acid (GAE) as the standard. The results are expressed in milligrammes of gallic acid equivalent per litre of juice sample.

Naringin was quantified according to Davis (1947) by adding 20 μ l of grapefruit juice and 20 μ l of 4 M NaOH to 1 ml of 90% diethylene glycol. The reaction sample was mixed well and al-

lowed to stand for 15 min to develop the yellow colour. The optical density was then read at 420 nm against a blank without juice in a Hitachi U-2000 UV-visible spectrophotometer (Tokyo, Japan). The naringin concentration (μ g/ml) was determined from a standard graph of naringin drawn in the same manner.

The total phenol content and naringin values were expressed as the mean \pm SD of six different experiments repeated three times.

2.4. Assessment of total antioxidant capacity

The antioxidant capacity of the grapefruit juices was evaluated by ABTS method and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.

The ABTS assay was carried out according to the procedure of Pellegrini, Proteggente, Pannala, and Rice-Evans (1999). The reaction mixture contained 3.36 mM ABTS, different aliquots of juice (5, 10, 20 or 30 μ l at a dilution of 1:4), and phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 in a total volume of 1 ml. The decrease in the absorbance was measured at 734 nm. The results were expressed as the millimolar concentration of Trolox equivalents, using a linear calibration obtained with different concentrations of Trolox.

The FRAP assay is based on increase in the absorbance at 593 nm due to formation of TPTZ-Fe(II) complexes according to the method described by Benzie and Strain (1999). The reaction mixture was prepared by mixing 25 ml of 0.3 M sodium acetate buffer solution (pH 3.6), 2.5 ml of 10 mM TPTZ, 2.5 ml of 20 mM FeCl₃, and 3 ml of water. Aliquots (5–30 μ l) of the juice samples were added to the reaction mixture in a total volume of 1 ml and incubated at 37 °C for 30 min. The results were expressed as mM Fe(II), using linear calibration obtained with different concentrations of FeSO₄.

2.5. Determination of superoxide and hydroxyl radical scavenger activity

The superoxide radical scavenging activity of grapefruit juice samples was determined by monitoring the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). The reaction mixture contained 20 μ l of the juice sample, 78 μ M NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form), 50 μ M NBT and 10 μ M PMS in Tris-HCl buffer (16 μ M, pH 8.0) in a total volume of 2.5 ml. The samples were incubated at room temperature for 5 min and the absorbance was read at 560 nm.

The hydroxyl scavenger activity was measured by the method described by Halliwell, Gutteridge, and Aruoma (1987). The reaction mixture containing 10 mM deoxyribose, 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 1 mM ascorbic acid, 100 mM ferric chloride, 1 mM hydrogen peroxide, 10 mM EDTA and 20 μ l of the juice samples was incubated for 60 min at 37 °C. Afterwards, 1 ml of the incubated sample was mixed with 0.5 ml of trichloroacetic acid (2.8%, w/v) and 0.5 ml of thiobarbituric acid reagent (1% w/v, in 0.05 M NaOH), followed by heating at 100 °C for 15 min and subsequent cooling to room temperature. The absorbance was recorded at 532 nm in a Hitachi U-2000 UV-visible spectrophotometer (Tokyo, Japan).

The results were expressed as inhibition percentage referred to a control test, in the absence of juice sample.

2.6. Reduced glutathione concentration

Homogenates from liver rat were obtained using a tissue homogenator Ultraturax Polytron at 4 °C. The homogenate (1/20, w/v) for GSH determination was prepared by using 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7) containing 5 mM EDTA. The liver homogenate was incubated with 500 mM *t*-BOOH at 37 °C for 120 min in the presence or absence of different aliquots of the

Please cite this article in press as: Cavia-Saiz, M., et al. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin. *Food Chemistry* (2010), doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.054

grapefruit juice (10–40 μ l). After incubation, 25% (w/v) HPO_3 was added to the supernatant (1/4, v/v) and the resulting mixture centrifuged at $10,000\times g$ at 4°C for 30 min. The GSH concentration (nmol/mg protein) in the sample was measured by the method of Brigelius, Muckel, and Akerboom (1983).

2.7. Lipid peroxidation inhibition

The experiments were carried out in rat liver microsomal preparations (Ubeaud, Schmitt, Jaeck, Lave, & Coassolo, 1995) using peroxyl radicals as oxidant. The total microsomal protein content was determined using the Lowry method. The microsomal fraction (1 mg/ml of protein) was incubated in a solution of ABAP (10 mM), prepared in 50 mM Tris-HCl buffer solution at pH 7 immediately prior to use, in the presence of juice at different volumes, 10–40 μ l. The incubation temperature was set at 37°C for a period of 90 min. Lipid peroxidation was evaluated in the incubated samples by the TBARs assay (Mitsuru & Midori, 1978). Absorbance measured at 532 nm ($\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was proportional to the quantity of peroxyl radicals generated, and the results were expressed as nmol/mg protein referred to a control test, in the absence of juice sample.

2.8. DNA oxidative damage

The DNA oxidative damage was measured by the method described by Saez et al. (1993). The reaction mixture contained calf thymus DNA (200 μ g), ascorbic acid (10 mM), cupric sulphate (100 μ M) and the samples to be tested at different volumes (25, 50, 100 and 200 μ l). The mixture was incubated in a shaking water bath at 37°C for 1 h. Electrophoresis was performed after incubation of DNA samples in 1% agarose gels prepared in electrophoresis buffer (45 mM Tris-boric acid with 1 mM EDTA, pH 8.0) using a Bio-Rad power-Pac 1000 (Hercules, CA) electrophoresis system. Aliquots (50 μ l) of DNA test solutions and molecular weight markers were premixed with 10 μ l of a loading buffer solution containing 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue and 80% buffer solution at pH 7.4 (0.1 M sodium phosphate). The resulting mixtures were run at 400 mA. The DNA bands were viewed under UV light and photographed with a digital camera.

2.9. Enzymatic DNA hydrolysis and 8-OH-dG determination

DNA digestion was performed as described by Muñiz et al. (1995). In brief, 200 μ g/ml DNA after lowering the pH to 5.1 with sodium acetate (0.5 M), 5 units of nuclease P1 followed by the addition of 10 μ l alkaline phosphate (3 units). The DNA hydrolysates were dissolved in HPLC-grade water and filtered through a 0.22- μ m syringe filter before their analysis by HPLC. The amount of 8-OH-dG in the DNA digest was measured by electrochemical detection. The results were expressed as inhibition percentage referred to a control test, in the absence of juice sample. Elution conditions were those described by Ritcher, Park, and Ames (1988), 50 mM phosphate buffer solution, pH 5.5, containing 10% acetonitrile and a Waters ODS HPLC column (25 cm \times 0.46 cm i.d. 5 μ m particle size).

2.10. Statistical procedure

Statistical analysis of the data was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA). Furthermore, the least significant difference (LSD) test was applied in order to determine the statistical significance between various groups. A minimum significance level of 95% ($p < 0.05$) was considered. Linear regression was used in order to study the possible correlations between studied parameters.

3. Results and discussion

Traditional heat pasteurisation of citrus juices is necessary in order to preserve their quality, especially by minimising pectin methyltransferase (PME) enzymatic activity and microbial growth. PME inactivation is important because this enzyme catalyses pectin degradation and alters the colloid stabilizing power of the pectin, which imparts the favourable appearance. In this work, the fresh grapefruit juice (FJ) was first pasteurised and then processed with the exchange resin or the enzyme naringinase for debittering.

Table 1 shows the content of naringin and total phenols of freshly squeezed and debittered grapefruit juice samples. The reduction in bitterness was evaluated based on the amount of residual naringin (Ribeiro et al., 2008). From the amount of residual naringin the percentage reduction in bitterness was evaluated. In comparison with fresh juice, a reduction of 64.5% and 46.8% in naringin was observed in R-PJ and N-PJ, respectively, which makes both juices acceptable to the consumers.

The total phenol content of grapefruit juice samples is shown in Table 1. The highest total phenol content was detected in the juice subjected to naringinase treatment. By contrast, the exchange resin process led to a decrease in the total concentration of phenols (21%) compared with samples of fresh juice.

The high increase in total phenols (78%) detected in juice samples treated with naringinase can be due to the hydroxyl groups of naringenin, a metabolite from naringin. The product of enzymatic catalysis (naringenin) has a hydroxyl group rather than naringin. Moreover, there is evidence that the spectrophotometric method overestimates the polyphenol content by the lack of selectivity of Folin-Ciocalteu's reagent (Escarpa & González, 2001), which reacts not only with phenols but also with other reducing compounds such as sugars (e.g. glucose) (Singleton et al., 1965). However, this method has been shown to be a useful analytical tool for the routine analysis of polyphenols and it is widely used in many laboratories for the determination of differences among fruits and vegetables and their products.

On the other hand, the effect of resin treatment on the total phenols was in agreement with literature data for red grapefruit juice concentrate (Lee & Kim, 2003). These authors reported that the debittering process, utilizing XAD-16 adsorption column, significantly reduced total phenol content and completely removed some of the non-bitter flavonoids, such as narirutin and hesperidin.

In our study the total antioxidant capacity of grapefruit juice was evaluated using ABTS and FRAP assays. The antioxidant activity measured by ABTS method is based on the capacity of a substance to stabilize the radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, while the FRAP assay measures directly its reducing capacity. Both methods are used and recommended by many authors as easy and accurate assays of measuring the antioxidant activity of fruit juices (Abeyasinghe et al., 2007; Rapisarda et al., 1999).

Fig. 1 illustrates the results of the antioxidant activity obtained for grapefruit juices tested in the present study. All grapefruit juice samples (FJ, N-PJ and R-PJ) stabilized the radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ and reduced ferric ion in a dose-dependent manner.

Table 1

Contents of total phenols and naringin in grapefruit juice samples. FJ, fresh juice; N-PJ, pasteurised and naringinase-treated juice; R-PJ, pasteurised and resin-treated juice.

Grape juice sample	Phenols (mg GAE/l)	Naringin (μ g/ml)
FJ	689 \pm 50.2 ^b	676 \pm 26.4 ^c
N-PJ	1227 \pm 44.1 ^c	359 \pm 50.9 ^b
R-PJ	545 \pm 56.0 ^a	240 \pm 16.4 ^a

Results are the mean \pm SD of eighteen experiments. Different letters for each column correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

Please cite this article in press as: Cavia-Saiz, M., et al. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin. *Food Chemistry* (2010), doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.054

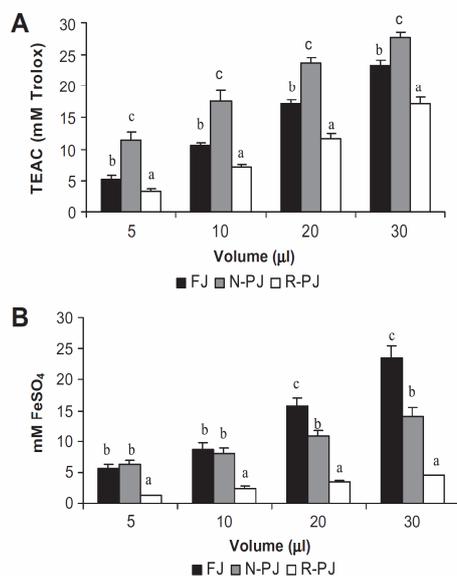


Fig. 1. Total antioxidant capacity of grapefruit juice samples by ABTS (A) and FRAP (B) methods. FJ, fresh juice; N-PJ, pasteurised and naringinase-treated juice; R-PJ, pasteurised and resin-treated juice. Results are the mean \pm SD of 10 experiments. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

In the ABTS assay, N-PJ showed the highest TEAC values whereas R-PJ showed the lowest for all volumes of studied sample (Fig. 1A). These results are consistent with those reported in our previous study (Cavia-Saiz et al., 2010) in which naringin exhibited lower capacity to inhibit 50% of ABTS radical cation than naringenin. Heim, Tagliaferro, and Bobilya (2002) also indicated that the hydroxyl group in position 7 of naringenin significantly increased the antioxidant capacity of the flavanone towards the stable radical ABTS^{•+}.

The antioxidant activity of the juice samples determined using FRAP assay are represented in Fig. 1B. All juices analysed in this study had ability to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ but with significant differences. The FRAP values of juice samples were 5.5–23.6 mM FeSO₄ for FJ, 6.3–14.0 mM for N-PJ and 1.2–4.5 mM for R-PJ. In contrast to the ABTS method, samples of fresh juice had the highest reducing capacity. The grapefruit juice treated with the exchange resin also showed lower levels of antioxidant activity with the FRAP method. These results can be explained bearing in mind that vitamin C is typically a heat-sensitive compound (Yeom, Streaker, Zhang, & Min, 2000) so it can produce losses during pasteurisation in N-PJ and R-PJ samples. Furthermore, vitamin C is also one of the components of the citrus juices with antioxidant activity that most contributes to reducing capacity (Abeyasinghe et al., 2007).

Xu et al. (2008) found that ascorbic acid contribution to total antioxidant capacity of citrus juices was more than 50% (by FRAP assay). These results were in agreement with previous reports (Arena, Fallico, & Maccarone, 2001), which suggested ascorbic acid, not phenolic compounds, was the major contributor of total antioxidant capacity of citrus juices. However, some studies suggested phenolic compounds dominated total antioxidant capacity of citrus fruits (Rapisarda et al., 1999). It seemed that some factors such as the maturity, material preparation and analysing methods might cause the divergence (Xu et al., 2008).

Most free radical reactions involve the reduction of molecular oxygen, leading to the formation of reactive oxygen species (ROS), including superoxide anion and hydroxyl radical, these ROS are of physiological and technological relevance and cover a broad range of reactivity. Natural antioxidants present in citrus juice can neutralise free radicals, due to their ability to act as free radical scavengers and/or as metal chelators (Franke et al., 2004). As shown in Fig. 2B, all juice samples inhibited the hydroxyl radical-caused degradation of desoxyribose in dose-dependent manner. The N-PJ gave the highest protection (42–74.3% inhibition) against oxidative damage to desoxyribose when compared to R-PJ (38.4–69.9%) and FJ (47.3–68.3%). For the NBT reduction assay, which evaluates the O₂^{•-} scavenging ability, our results show that all tested juices inhibited NBT reduction (Fig. 2A). The juice processed with naringinase exhibited the highest superoxide scavenging activity (20.4–78.3%) in a dose-dependent manner, while juices treated with the exchange resin showed the lowest inhibition percentage (25–34%). No significant differences were observed between fresh and enzyme treated juice at the highest volume tested.

In general, the phenolic compounds are able to scavenge radicals and to chelate metals. However, it depends on the concentration and the type of the phenolic compounds (Galato et al., 2001). In this sense, quantitative and qualitative variations of these compounds (e.g. alteration of one or more hydroxyls or oxidation) may have occurred during the pasteurisation and debittering treatment, thus leading to differences in the scavenger activity of the juice samples (Franke et al., 2004). Previous results (Cavia-Saiz et al., 2010) indicated, in agreement with other authors (Yu et al., 2005), that the presence of both 7- and 5-hydroxyl groups in the aglycone (naringenin) makes it an excellent candidate for superoxide scavenging reaction and also showed that naringenin exhibited a higher quenching efficiency for hydroxyl radicals than naringin.

GSH levels in rat liver homogenate were studied, using *t*-BOOH as inducer of oxidative stress, as an indicator of the intracellular

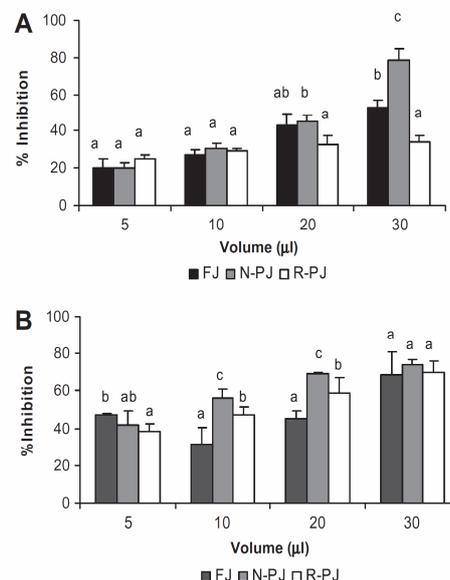


Fig. 2. Scavenger effect of grapefruit juice samples on superoxide (A) and hydroxyl radical (B). FJ, fresh juice; N-PJ, pasteurised and naringinase-treated juice; R-PJ, pasteurised and resin-treated juice. Results are the mean \pm SD of 10 experiments. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

Please cite this article in press as: Cavia-Saiz, M., et al. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin. *Food Chemistry* (2010), doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.054

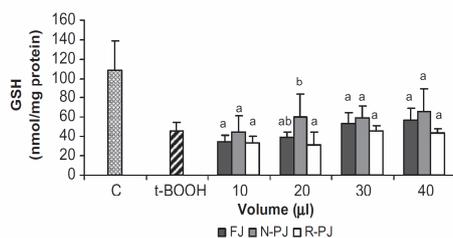


Fig. 3. Effect of grapefruit juice samples on GSH in rat liver homogenate exposed to oxidative stress in the presence of *t*-BOOH. FJ, fresh juice; N-PJ, pasteurised naringinase-treated juice; R-PJ, pasteurised and resin-treated juice. C, Hepatocytes in the absence of *t*-BOOH; *t*-BOOH: hepatocytes in the presence of *t*-BOOH; (10–40 µl): hepatocytes preincubated with grapefruit juice samples before adding *t*-BOOH to induce depletion of GSH. Results are the mean \pm SD of 10 experiments. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

redox state. Results in Fig. 3 show that GSH levels in liver homogenate treated with *t*-BOOH decreased significantly compared with the control (C). The enzyme treatment slightly reduced thiol group; compared with the fresh juice, no significant differences were detected at higher doses. In contrast, juice treated with the exchange resin showed the lowest levels of GSH. Previous reports (Cavia, 2010) indicated that pre-treatment with naringin or naringenin did not prevent the reduction in GSH levels, and a potential pro-oxidant effect of both flavonoids *in vitro* was also suggested (Jagetia, Reddy, & Kedlaya, 2004). Nevertheless, several researches have demonstrated the ability of other phenolic compounds and vitamins present in citrus juices to restore GSH (Weisel et al., 2006).

Another parameter evaluated was the inhibitory effect of juice samples tested on lipid peroxidation in rat liver microsomes exposed to oxidative stress in the presence of peroxy radical. Free radicals initiate and cause lipid peroxidation particularly those that make up cell membranes, so it is important that the inhibitory activity of lipid damage characteristic of citrus is not affected during the treatment of debittering. Our results showed (Fig. 4) that all juice samples studied provided a protective effect towards lipid oxidative damage in a dose-dependent manner. It is noticeable, that the naringinase-treated juice provided the greatest effectiveness in the inhibition of lipoperoxidation. Some authors have determined the anti-lipoperoxidation activities of the polyphenols, the flavonoids, anthocyanins, hydroxycinnamic acids and ascorbic acid contained in citrus juices. In particular, Rapisarda et al. (1999) argued that the antioxidant capacity of all examined orange

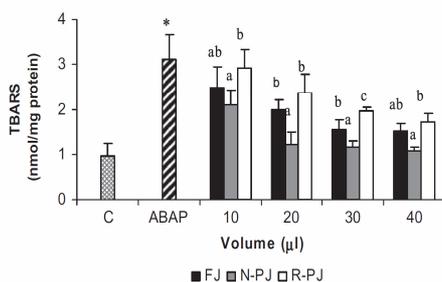


Fig. 4. Effect of grapefruit juice samples on lipoperoxidation in rat liver microsomes exposed to oxidative stress in the presence of peroxy radical. FJ, fresh juice; N-PJ, pasteurised naringinase-treated juice; R-PJ, pasteurised and resin-treated juice. C, Microsomes in the absence of ABAP; ABAP: microsomes in the presence of ABAP; (10–40 µl): microsomes preincubated with grapefruit juice samples before adding ABAP to induce lipid peroxidation. Results are the mean \pm SD of 10 independent experiments. Values significantly different ($p < 0.005$) versus C. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

juices was due to total phenol amounts and to their ability to interact with the biomembrane. Consequently, the highest total phenol content of fresh juice in comparison with the juice treated with resin, may explain the differences in TBARS values obtained in both juices. In addition, it has been showed that the O-glycosylation (naringin) decreased the efficiency in the inhibition of lipoperoxidation (Cavia et al., 2010). In fact, the concentration of naringenin required to reach 50% inhibition using as inductor peroxy radical was 2.3 lower as compared to the naringin. In contrast, Yu et al. (2005) reported similar antioxidant activity for both flavanones but in a hamster LDL model.

The oxidative damage to the DNA generates a series of injuries as breakage of connections phosphate, or oxidation of puric and pyrimidinic bases. Some of these modifications have been considered potentially harmful and responsible for mutations in the integrity of the genome. In this work the DNA breakage induced by Cu(II)-ascorbic acid was analysed by agarose gel electrophoresis and base oxidation measurement by the levels of 8-OH-dG. Fig. 5 shows the electrophoretic pattern of DNA after incubation with hydroxyl radicals in the absence or presence of the grapefruit juice samples. The results showed a protective effect for all juice samples tested at 100 µl of volume, and it was clearly observable protection of the integrity of DNA at 200 µl. A slight protection against DNA fragmentation was also observed at the lower volumes (25 µl and 50 µl). The suggestion that grapefruit juice plays a protective effect against DNA damage under the reported experimental conditions is consistent with a number of previous observations in which the preventive effect by naringin and naringenin has been shown (Jagetia et al., 2004).

Another method used to test the capacity of the grapefruit juice samples to protect DNA from oxidation consisted in quantifying their capacity to inhibit the level of modified base 8-OH-dG formed during attack of the OH \cdot on the DNA. It is known that the oxygen free radical attacks DNA, resulting in production of oxidised bases such as 8-OH-dG which contribute to mutations and tumour promotion (Shen, Deininger, Hunt, & Zhao, 2007). DNA was treated in solution with ascorbic acid and copper in the absence and presence of different volumes of grapefruit juice samples (Table 2). 8-OH-dG was not detected after incubation of DNA alone or in the presence of 25, 50, 100 µl of grapefruit (data not shown), so the juices did not induce any DNA damage. The presence of grapefruit juice in the co-incubated DNA system significantly inhibited oxida-

C OH \cdot 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

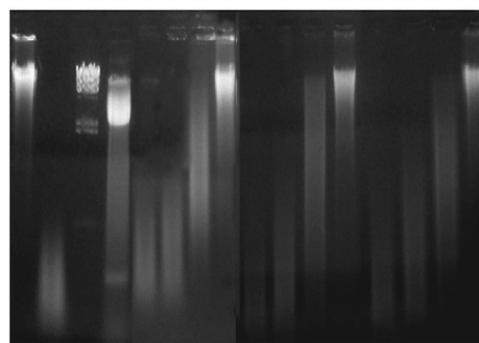


Fig. 5. Effects of grapefruit juice samples at different concentrations on the protection on DNA against Cu(II)-ascorbic acid. The numbered lanes represent: DNA alone (C); DNA exposed to Cu(II) (100 µM) and ascorbic acid (1 mM) (OH \cdot); λ DNA/Hind III fragments molecular weight standard (1); 100 bp DNA ladder molecular weight standard (2); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + fresh juice at 25 µl (3), 50 µl (4), 100 µl (5) and 200 µl (6); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + naringinase processed juice at 25 µl (7), 50 µl (8), 100 µl (9) and 200 µl (10); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + resin-treated juice at 25 µl (11), 50 µl (12), 100 µl (13) and 200 µl (14).

Please cite this article in press as: Cavia-Saiz, M., et al. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin. *Food Chemistry* (2010), doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.054

Table 2

Effect of grapefruit juice samples on the formation of 8-OH-dG in calf thymus DNA induced by ascorbic acid and copper(II) at different doses. FJ, fresh juice; N-PJ, pasteurised and naringinase-treated juice; R-PJ, pasteurised and resin-treated juice.

Sample	Inhibition (%)		
	25 µl	50 µl	100 µl
FJ	56.8 ± 7.8 ^b	64.0 ± 12.5 ^a	90.0 ± 0.1 ^a
N-PJ	59.4 ± 11.2 ^{a,b}	53.6 ± 0.2 ^a	82.8 ± 6.4 ^a
R-PJ	39.0 ± 0.1 ^a	60.1 ± 0.6 ^a	85.0 ± 10.5 ^a

Results are the mean ± SD of six experiments. Different letters for each column correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

tive DNA damage induced by copper(II)-ascorbic acid, and the strongest inhibition effect was shown by the fresh juice. Nevertheless, no significant differences were observed between fresh and debittered juices at 100 µl of sample.

Finally, among all grapefruit juice tested, a correlation was found between the percentage of inhibition of modified base and total phenol content ($r = 0.5405$, $p = 0.0307$), whereas any correlation was found for naringin content. Based on these results, the total phenol content in the grapefruit juice seem to play a role in the protection of DNA against oxidative stress.

In summary, the grapefruit juice debittered with naringinase showed significantly higher total antioxidant capacity, radical scavenging ability and effectiveness in the protection to GSH oxidation and lipid peroxidation than the juice processed with the exchange resin. Moreover, both juices were equally effective in reducing DNA damage induced by hydroxyl radical in a dose-dependent manner. Therefore, enzymatic debittering with naringinase was more effective than physical adsorption with Amberlite®IRA-400 in order to preserve the antioxidant and biomolecule protection capacity of freshly squeezed grapefruit juice.

References

- Abeyasinghe, D. C., Li, X., Sun, C. D., Zhang, W. S., Zhou, C. H., & Chen, K. S. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, *104*(4), 1338–1344.
- Arena, E., Fallico, B., & Maccarone, E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, *74*, 423–427.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, *299*, 15–27.
- Brigelius, R., Muckel, C., & Akerboom, T. P. M. (1983). Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochemical Pharmacology*, *32*, 2529–2534.
- Busto, M. D., Meza, V., Ortega, N., & Perez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, *104*(3), 1177–1182.
- Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., & Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*, 1238–1244.
- Chen, Y. C., Shen, S. C., & Lin, H. Y. (2003). Rutinoid at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, *66*, 1139–1150.
- Davis, W. (1947). Determination of flavanones in citrus. *Analytical Chemistry*, *19*, 476–478.
- Escarpa, A., & González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, *427*, 119–127.
- Franke, S. I. R., Ckless, K., Silveira, J. D., Rubensam, G., Brendel, M., Erdtmann, B., et al. (2004). Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chemistry*, *88*, 45–55.
- Galato, D., Ckless, K., Susin, F. M., Giacomelli, C., Ribeiro-do-Vale, R. M., & Spinelli, A. (2001). Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: Correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure – Antioxidant activity. *Redox Reporter*, *6*, 243–250.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: A simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, *165*, 215–219.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572–584.
- Jagetia, G. C., Reddy, T. K., & Kedlaya, R. (2004). Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clinical Chimica Acta*, *347*, 189–197.
- Lee, H. S., & Kim, J. G. (2003). Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *Food Chemistry*, *82*, 177–180.
- Mishra, P., & Kar, R. (2003). Treatment of grapefruit juice for bitterness removal by Amberlite IR 120 and Amberlite IR 400 and alginate entrapped naringinase enzyme. *Food Chemistry and Toxicology*, *68*(4), 1229–1233.
- Mitsuru, U., & Midori, M. (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, *86*, 271–278.
- Muñiz, P., Valls, V., Perez-Broseta, C., Iradi, A., Climent, J. V., Oliva, M., et al. (1995). The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Rifamycin-induced DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, *18*, 747–755.
- Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A. S., & Rice-Evans, C. A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237.
- Puri, M., Kaur, S., & Kennedy, J. F. (2005). Studies on the improvement in the catalytic activity of enzymes for the transformation of flavonoids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *80*, 1160–1165.
- Puri, M., Kaur, A., Kanwar, J. R., & Singh, R. S. (2008). Immobilized enzymes for debittering citrus juices. In M. D. Busto & N. Ortega (Eds.), *Food enzymes: Application of new technologies* (pp. 91–103). Trivandrum: Trasworld Research Network.
- Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A., & Saija, A. (1999). Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 4718–4723.
- Ribeiro, I. A., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Filipe, H., & Ribeiro, M. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *52*(3), 13–18.
- Ritcher, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of National Academic Science*, *85*, 6465–6467.
- Saez, G. T., Valls, V., Muñiz, P., Perez-Broseta, C., Iradi, A., Oliva, M. R., et al. (1993). The role of glutathione in protection against DNA damage induced by Rifamycin SV and copper(II) ions. *Free Radical Research Communications*, *19*(2), 81–92.
- Sekeroglu, G., Sibel, F., & Fahrettin, G. (2006). Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, *22*(1), 55–60.
- Shaw, P. E., Baines, L., Mitnes, B. A., & Agmon, G. (2000). Commercial debittering processes to upgrade quality of citrus juice products. *ACS Symposium Series Citrus Limonoids*, *758*, 120–131.
- Shen, J., Deininger, P., Hunt, J. D., & Zhao, H. (2007). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*, *109*(3), 574–580.
- Singh, S. V., Gupta, A. K., Jain, R. K., & Dhath, A. S. (2003). Debittering of citrus juices – A review. *Journal of Food Science of Technology*, *40*(3), 247–253.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.
- Tatum, J. H., & Berry, R. E. (1973). Method for determining naringin content in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, *38*(2), 340–341.
- Ubeaud, G., Schmitt, C., Jaecq, D., Lave, T., & Coassolo, P. (1995). Bosentan, a new endothelin receptor antagonist: Prediction of the systemic plasma clearance in man from combine in vivo and in vitro data. *Xenobiotica*, *25*(12), 1381–1390.
- Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.-P., et al. (2006). An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduce oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology Journal*, *1*, 388–397.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., & Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, *106*, 545–551.
- Yeom, H. W., Streaker, C. B., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (2000). Effects of pulsed electric field on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *48*, 4597–4605.
- Yu, J., Wang, L. M., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M., & Patil, B. S. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Science*, *53*(6), 2009–2014.

Please cite this article in press as: Cavia-Saiz, M., et al. Effect of enzymatic debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin. *Food Chemistry* (2010), doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.054

Estudio 3

Evaluation of antioxidant properties of grapefruit juice as influenced by debittering with naringinase immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel

1 **Evaluation of Antioxidant Properties of Grapefruit Juice as Influenced**
2 **by Debittering with Naringinase Immobilized in Poly(vinyl alcohol)**
3 **Cryogels**

4 Monica Cavia-Saiz, Pilar Muñiz, María D. Busto*

5

6 *Department of Biotechnology and Food Science, Area of Biochemistry and Molecular Biology, University*
7 *of Burgos, Plaza Misael Bañuelos, s/n, E-09001 Burgos, Spain*

8

9

10

11 *Correspondence to: María D. Busto, *Department of Biotechnology and Food Science, Area of*

12 *Biochemistry and Molecular Biology, University of Burgos, Plaza Misael Bañuelos, s/n, E-09001*

13 *Burgos, Spain.*

14 *E-mail: dbusto@ubu.es*

15 *Tel.: +34947258800; fax: +34947258831*

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

40 **ABSTRACT**

41 The effect of debittering with naringinase immobilized in poly(vinyl alcohol)
42 cryogels on antioxidant capacity, radical scavenging activity and biomolecule protective
43 role against oxidative stress of grapefruit juice was evaluated. The results showed that
44 total antioxidant capacity, measured by ABTS assay, was higher in juices treated with
45 immobilized naringinase (IN-PJ) than fresh juice (FJ). With regard to radical
46 scavenging activity the juice samples debittered with the enzyme provided a greater
47 effectiveness in neutralizing the superoxide radical when comparing with FJ.
48 Furthermore, the volume of grapefruit juice debittered with free or immobilized
49 naringinase required to reach 50% inhibition of hydroxyl radical production was 2.8 and
50 1.8 fold lower, respectively, as compared to fresh juice. In addition, free naringinase-
51 treated juice (N-PJ) gave the highest protection (56.8%) against lipoperoxidation when
52 compared to IN-PJ (42.3%) and FJ (40%). Finally, the debittering with IN-PJ did not
53 reduce the protective effect of grapefruit juice on DNA damage.

54

55 **KEYWORDS:** antioxidant properties; debittering; DNA damage; grapefruit juice;
56 immobilized naringinase; lipoperoxidation; PVA cryogel

57

58

59

60

61

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

62

63 **INTRODUCTION**

64 The antioxidant activity of citrus fruits is assumed to be of greatest importance in
65 combating a number of degenerative diseases (1, 2, 3). It must be borne in mind that
66 processing can be responsible for depleting naturally occurring antioxidants in citrus
67 fruit juice, with a subsequent decrease in their health protecting capacity. In fact, the
68 citrus fruit juice industry routinely removes bioactive compounds, such as ascorbic acid,
69 phenolics, flavonoids, isoflavonoids, isoflavones and terpenes, from fruit juices by the
70 different of debittering processes (4, 5).

71 Naringin, a flavonoid, is the main bittering component in grapefruit juices.
72 Naringinase, an enzyme complex containing α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase,
73 catalyses the hydrolysis of naringin into rhamnose and pruning (responsible for one
74 third of the bitterness of naringin) afterwards to the tasteless naringenin (4',5,7-
75 trihydroxyflavanone) and to glucose. In later years different types of immobilized
76 naringinase suitable for industrial applications were used for debittering processes (6, 7,
77 8). Immobilizing the enzyme on solid supports allows the re-use of catalytic activity,
78 higher enzyme concentrations, higher superficial area to reaction, permits better control
79 reactions and the design of bioreactors that can be easily incorporated into a continuous
80 processing line (9).

81 In order to reduce grapefruit juice bitterness, naringin hydrolysis was carried out by
82 immobilized naringinase into a polymeric matrix consisting of poly(vinyl alcohol)
83 hydrogel (PVA) (10). It is worth mentioning that the PVA itself is biologically
84 compatible, non-toxic to organisms and a readily available, low-cost polymer (11).

85 The aim of this study was to determinate the influence of debittering with
86 immobilized naringinase in PVA cryogels on total antioxidant capacity and superoxide

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

87 and hydroxyl scavenging activity of grapefruit juice and the protective effect of
88 debittered juice on DNA oxidative damage and their inhibitory effect on glutathione
89 (GSH) oxidation and lipid peroxidation. Also comparability studies between
90 immobilized naringinase and its soluble counterpart were carried out.

91

92 MATERIAL AND METHODS

93 **Chemicals.** 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
94 diammonium salt (ABTS), 2,2'-diazobis(2-aminodinopropane) dihydrochloride
95 (ABAP), 6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox), gallic acid,
96 naringin, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), 2-deoxy-D-ribose, poly(vinyl alcohol)
97 (PVA), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), phenazin methosulphate (PMS), xanthine,
98 xanthine oxidase, cytochrome c, nuclease PI and calf thymus DNA were from Sigma-
99 Aldrich Co. (St. Louis, MO. USA). Sodium hydroxide (NaOH), aluminium chloride 6-
100 hydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sodium nitrite (NaNO_2), diethylene glycol, Folin-Ciocalteu's
101 reagent, potassium persulphate ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$), ferric chloride (FeCl_3), ferrous sulphate
102 (FeSO_4), copper sulphate (CuSO_4), L-ascorbic acid, and trichloroacetic acid (TCA) were
103 obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Thiobarbituric acid (TBA) and acetonitrile
104 was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Bovine serum albumin, NADH
105 disodium salt, DNase I, phosphatase alkaline and 4-nitroblue tetrazolium chloride
106 (NBT) were from Roche (Madrid, Spain). Tris, ethidium bromide, and
107 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tetrasodium salt were from Amresco (Solon,
108 OH, USA). Naringinase from *Penicillium decumbens*, containing α -rhamnosidase and
109 β -glucosidase activity was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

110 **Preparation of grapefruit samples.** Grapefruits were purchased from a local
111 supermarket and keep at 4 °C before being processed. Fresh grapefruit juice (FJ) was

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

112 obtained by extraction to through a domestic squeezer (Braun Citromatic Pulp Control
113 MPZ6), filtered using a sieve (light of mesh diameter 1 mm).

114 Samples of fresh juice (FJ) were pasteurized (P) according to Tatum and Berry (12)
115 just before debittering process. Thus, treatment of juice by free or immobilized
116 naringinase was carried out according to Busto et al. (10). Samples of 25 ml of
117 pasteurized juice were treated with free or PVA-naringinase (0.4 U /ml) in a 250 ml
118 beaker and incubated to 20 °C for 24 h.

119 **Immobilization of naringinase in PVA cryogels.** According to Busto et al.
120 (10) poly(vinyl alcohol) and NaOH (1:0.025, w:w) were dissolved in 17 ml of deionised
121 water by autoclaving for 15 min at 121 °C, cooled to room temperature and neutralised
122 with HCl (35%, w/w) before mixing with 2 ml of naringinase (50 U/ml). The mixture
123 (total volume 20 ml) was dropped into liquid nitrogen, where upon beads were formed
124 instantly. The beads, frozen and thawed (4 °C) thrice, were shaken with deionised water
125 for 2 h to remove the loosely entrapped enzyme, dried with sterile filter paper and stored
126 at 4 °C until used.

127 **Determination of naringin.** Naringin was quantified according to Davis (13) by
128 adding 20 µl of grapefruit juice and 20 µl of 4 M NaOH to 1 ml of 90% diethylene
129 glycol. The reaction sample was mixed well and allowed to stand for 15 min to develop
130 the yellow colour. The optical density was then read at 420 nm against a blank without
131 juice in a Hitachi U-200 UV-Visible spectrophotometer (Tokyo, Japan). The naringin
132 concentration was determined from a standard graph of naringin drawn in the same
133 manner.

134 **Assessment of total antioxidant capacity.** The antioxidant capacity of the
135 grapefruit juices was evaluated by ABTS method and ferric reducing antioxidant power
136 (FRAP) assay.

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

137 The ABTS assay was carried out according to the procedure of Pellegrini et al. (14).
138 The reaction mixture contained 3.36 mM ABTS, different aliquots of juice (5, 10, 20 or
139 30 μ l at a dilution of 1:4), and phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 in a total
140 volume of 1 ml. The decrease in the absorbance was measured at 734 nm. The results
141 were expressed in IL_{50} . The IL_{50} values -volume giving 50% inhibition of radical
142 production- were determined by regression analysis.

143 The FRAP assay is based on increase in the absorbance at 593 nm due to formation
144 of TPTZ-Fe(II) complexes according to the method described by Benzie and Strain
145 (15). The reaction mixture was prepared by mixing 25 ml of 0.3 M sodium acetate
146 buffer solution (pH 3.6), 2.5 ml of 10 mM TPTZ, 2.5 ml of 20 mM $FeCl_3$, and 3 ml of
147 water. Aliquots (5-30 μ l) of juice were added to the reaction mixture in a total volume
148 of 1 ml and incubated at 37 °C for 30 min. The results were expressed as mM Fe(II),
149 using linear calibration obtained with different concentrations of $FeSO_4$.

150 **Determination of superoxide radical scavenger activity.** *NBT method.* The
151 superoxide radical scavenging activity of grapefruit juice samples was determined by
152 monitoring the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) as described Liuet al. (16). The
153 reaction mixture contained different aliquots of juice (5, 10, 20 or 30 μ l), 78 μ M NADH
154 (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form), 50 μ M NBT and 10 μ M PMS in
155 Tris-HCl buffer (16 μ M, pH 8.0) in a total volume of 2.5 ml. The samples were
156 incubated at room temperature for 5 min and the absorbance was read at 560 nm.

157 *Xanthine oxidase/cytochrome c method.* The method used to study the inhibition
158 of xanthine oxidase as a generator of superoxide radical, with slight modifications, was
159 described by McCord and Fridovich (17). As a source of superoxide anions used
160 catalytic decomposition of xanthine by the enzyme xanthine oxidase. The reaction

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

161 begins with a mixture of 50 mM potassium phosphate buffer, 0.1 mM EDTA at pH 7.8,
162 0.3 mM xanthine, cytochrome C and 0.3 mM xanthine oxidase. The reading will take
163 place at 546 nm for 2 min.

164 **Determination of hydroxyl radical scavenger activity.** The hydroxyl
165 scavenger activity was measured by the method described by Halliwell et al. (18). The
166 reaction mixture containing 10 mM deoxyribose, 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 1
167 mM ascorbic acid, 100 mM ferric chloride, 1mM hydrogen peroxide, 10 mM EDTA
168 and different aliquots of juice (5, 10, 20 or 30 μ l) was incubated for 60 min at 37 °C.
169 Afterwards, 1 ml of the incubated sample was mixed with 0.5 ml of trichloroacetic acid
170 (2.8%, w/v) and 0.5 ml of thiobarbituric acid reagent (1% w/v, in 0.05 M NaOH),
171 followed by heating at 100 °C for 15 min and subsequent cooling to room temperature.
172 The absorbance was recorded at 532 nm in a UV-visible double beam
173 spectrophotometer.

174 The results were expressed as IL_{50} . The IL_{50} values, volume giving 50% inhibition of
175 radical production, were determined by regression analysis.

176 **Reduced glutathione concentration.** Homogenates from liver rat were obtained
177 using a tissue homogenator Ultraturrax Polytron at 4 °C. The homogenate (1/20, w/v)
178 for GSH determination was prepared by using 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7)
179 containing 5 mM EDTA. The liver homogenate was incubated with 500 mM *t*-BOOH at
180 37 °C for 120 min in the presence or absence of different aliquots of the grapefruit juice
181 (10-40 μ l). After incubation, 25% (w/v) HPO_3 was added to the supernatant (1/4, v/v)
182 and the resulting mixture centrifuged at 10,000xg at 4 °C for 30 min. The GSH
183 concentration in the sample was measured by the method of Brigelius et al. (19).

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

184 **Lipid peroxidation inhibition.** The experiments were carried out in rat liver
185 microsomal preparations (20) using peroxy radicals as oxidant. The total microsomal
186 protein content was determined using the Lowry method. The microsomal fraction
187 (1mg/ml of protein) was incubated in a solution of ABAP (10 mM), prepared in 50 mM
188 Tris-HCl buffer solution at pH 7 immediately prior to use, in the presence of juice at
189 different volumes, 10 – 40 µl. The incubation temperature was set at 37 °C for a period
190 of 90 min. Lipid peroxidation was evaluated in the incubated samples by the TBARS
191 assay (21). Absorbance measured at 532 nm was proportional to the quantity of peroxy
192 radicals generated, and the results were expressed as inhibition percentage referred to a
193 control test, in the absence of juice sample.

194 **DNA oxidative damage.** The DNA oxidative damage was measured by the
195 method described by Saez et al. (22). The reaction mixture contained calf thymus DNA
196 (200 µg), ascorbic acid (10 mM), copper sulphate (100 µM) and the samples to be
197 tested at different volumes (25, 50, 100 and 200 µl). The mixture was incubated in a
198 shaking water bath at 37 °C for 1 h. Electrophoresis was performed after incubation of
199 DNA samples in 1% agarose gels prepared in electrophoresis buffer (45 mM Tris-boric
200 acid with 1 mM EDTA, pH 8.0) using a Bio-Rad power-Pac 1000 (Hercules, CA)
201 electrophoresis system. Aliquots (50 µl) of DNA test solutions and molecular weight
202 markers were premixed with 10 µl of a loading buffer solution containing 20% glycerol,
203 0.1% bromophenol blue and 80% buffer solution at pH 7.4 (0.1 M sodium phosphate).
204 The resulting mixtures were run at 400 mA. The DNA bands were viewed under UV
205 light and photographed with a digital camera.

206 **Enzymatic DNA hydrolysis and 8-OH-dG determination.** DNA digestion was
207 performed as described (23). In brief, 200 µg/ml DNA after lowering the pH to 5.1 with

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

208 sodium acetate (0.5 M), 5 units of nuclease P1 followed by the addition of 10 μ l
209 alkaline phosphate (3 units). The DNA hydrolysates were dissolved in HPLC-grade
210 water and filtered through a 0.22- μ m syringe filter before their analysis by HPLC. The
211 amount of 8-OH-dG in the DNA digest was measured by electrochemical detection.
212 Elution conditions were those described by Ritcher, Park and Ames (24), 50 mM
213 phosphate buffer solution, pH 5.5, containing 10% acetonitrile and a Waters ODS
214 HPLC column (25 cm x 0.46 cm i.d. 5 μ m particle size).

215 **Statistical procedure.** Statistical analysis of the data was carried out using one-way
216 analysis of variance (ANOVA). Furthermore, the least significant difference (LSD) test
217 was applied in order to determine the statistical significance between various groups. A
218 minimum significance level of 95% ($p < 0.05$) was considered. Linear regression was
219 used in order to study the possible correlations between studied parameters.

220

221 RESULTS AND DISCUSSION

222 The naringin concentrations of the juice samples treated with free naringinase
223 ($359.8 \pm 50.9 \mu\text{g ml}^{-1}$) and immobilized naringinase ($398.8 \pm 59.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) were nearly
224 50% lower than that found in the control of fresh juice ($676.1 \pm 26.4 \mu\text{g ml}^{-1}$) which
225 makes them juices acceptable to consumers (25, 26). Similar results were found by
226 Ribero et al. (8) with naringinase immobilized in k-carragenan beads.

227 Total antioxidant capacity of juice samples were determined by the ABTS and FRAP
228 assays. The results obtained by ABTS method showed (**Figure 1A**) that juices treated
229 with free or immobilized naringinase exhibited a higher capacity than fresh juice sample
230 to inhibit 50% of ABTS radical cation generation; no significant differences ($p < 0.005$)
231 being detected between the debittered juices. These results are in agreement with those
232 reported in our previous study (27), in which the bitter flavanone naringin exhibited

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

233 lower capacity to scavenge ABTS^{•+} than naringenin. The antioxidant activity of the
234 grapefruit juices tested was also determined using FRAP assay. All juices analyzed in
235 this study had the ability to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ (**Figure 1B**). The FRAP values of juice
236 samples were 4.73±1.09 mM of FeSO₄ for FJ and 3.41±1.10 mM and 2.70±1.07 mM for
237 N-PJ and IN-PJ, respectively. These data showed that the juice debittered with the
238 immobilized enzyme had the lowest levels of antioxidant activity by FRAP method. The
239 making of a control test with fresh juice and the immobilization matrix (PVA beads)
240 without enzyme effectively removed 12.5% of total phenolic content based on
241 Folin–Ciocalteu reaction (28). Therefore, the cryogel of PVA partly retains some of
242 the compounds responsible for reducing capacity of the sample. In this respect, a recent
243 study by Xu, Huang and Zhang (29) reported the intermolecular hydrogen bonded
244 interaction between PVA polymer and plant polyphenolic compounds. On the other
245 hand, vitamin C is also one of the components of the citrus juices with antioxidant
246 activity that most contributes to reducing capacity (30) and it is also a typically heat-
247 sensitive compound (31) so it can produce losses during pasteurisation of debittering
248 samples.

249 Oxygen free radicals or, more generally, reactive oxygen species (ROS), e.g.
250 hydroxyl and superoxide radical, represent the most important class of radical species
251 generated in living systems. The unpaired electron(s) usually gives a considerable
252 degree of reactivity to the free radicals, making them highly toxic (32). Therefore, the
253 study of the radical scavenger capacity of different juice samples may be of interest
254 when testing their antioxidant status.

255 Radicals can be generated either enzymatically or non-enzymatically (e.g. by a
256 transition metal), or in combination with a reducing agent such as ascorbate. Superoxide
257 scavenging capacity was evaluated in this study measuring the ability of the samples to

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

258 scavenge the free radicals produced by an enzymatic (xanthine oxidase/cytochrome c
259 system) and a no-enzymatic (NBT method) assay. In these assays, the components of
260 the juices can influence not only the propagation reactions of the free-radicals but also
261 their formation, either by inhibiting the enzymes involved in the initiation reaction or by
262 chelating the transition metals (33).

263 According to the IL_{50} values reported in **Table 1**, the juice samples debittered with
264 free or immobilized naringinase showed higher scavenger efficiency, by NBT method,
265 when comparing with the fresh juice sample. Previous researchers reported that
266 presence of both 7- and 5-hydroxyl groups in the aglycone (naringenin) makes it an
267 excellent candidate for the superoxide scavenging reaction compared to the bitter
268 compound naringin (2). On the other hand, a previous study (27) provided evidence that
269 the o-glycosilation in naringin decreased the efficiency in inhibiting superoxide radical
270 generation by xanthine oxidase system. However, no significant differences were
271 observed between juice samples under study when using the enzymatic method. It may
272 be attributed to the presence in the juice of other components besides the flavanones
273 naringin or naringenin.

274 The hydroxyl radical is the most toxic of the ROS responsible of the cellular
275 damage. The capacity of the citrus juices to inhibit the hydroxyl radical is largely
276 attributed to the action of flavonoids, by their high scavenger capacity against these
277 radicals, their ability to chelate transition metals, and by the synergistic action with
278 other antioxidant (34, 35). The results show (**Table 1**) that the debittered juices
279 provided a greater effectiveness in neutralizing the hydroxyl radical. In fact, the volume
280 of grapefruit juice samples debittered with free or immobilized naringinase required to
281 reach 50% inhibition of radical production was 2.8 and 1.8 fold lower, respectively, as
282 compared to fresh juice sample. These results are in agreement with those reported in

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

283 previous study (27), in which flavanone naringenin had a higher capacity to scavenge
284 the hydroxyl radical than naringin. Furthermore, the differences between juice samples
285 treated with free and entrapped enzyme could be explained by the lowest polyphenol
286 content of the second one. According to studies performed by Cook and Samman (36),
287 hydroxyl and carbonyl groups in flavonoids form complexes with iron ions and this may
288 contribute to prevent the formation of free radicals in the Fenton system.

289 When the level of reactive oxygen species (ROS) exceeds the antioxidant capacity of
290 the cell, the intracellular redox homeostasis is altered, and the resulting oxidative stress
291 may destroy all major classes of biomolecules in the vicinity of their source, including
292 lipids, protein and DNA, with concomitant changes in structure and function (37).

293 Glutathione is one of the most abundant intracellular antioxidant and plays an
294 important role in controlling the cellular redox balance. The effect of grapefruit juice
295 samples on glutathione levels is illustrated in **Figure 2**. As can be seen from this figure,
296 the pre-treatment of liver homogenate with grapefruit juice debittered with immobilized
297 enzyme prevented the depletion of GSH significantly, except for a volume of 10 μ l.
298 Nevertheless, no significant differences between grapefruit juice debittered with free or
299 immobilized naringinase were observed. Previous reports showed that pre-treatment
300 with naringin or naringenin did not prevent the reduction in GSH levels, even a
301 potential pro-oxidant effect of both flavanones in vitro was also suggested (27). In
302 contrast, several researches have demonstrated the ability of other phenolic compounds
303 and vitamins present in citrus juices to restore GSH (38).

304 The capacity of the grapefruit juice samples to inhibit lipid peroxidation in rat liver
305 microsomes was evaluated by TBARS assay, using ABAP as oxidant agent (**Figure 3**).
306 All juice samples analysed had ability to reduce the levels of TBARS in a dose-
307 dependent manner. The N-PJ gave the highest protection (56.8%) against oxidative

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

308 damage when compared to I-PJ (42.3%) and FJ (40%). Fresh juice produced the lower
309 levels of TBARS and also had the highest content of naringin. In this regard, it has been
310 showed that the O-glycosilation (e.g. naringin), decreased the efficiency in the
311 inhibition of lipoperoxidation (39). On the other hand, studies performed on other citrus
312 juices, for example orange juices (40) demonstrated that the lipid protection was due to
313 total phenol amounts and their ability to interact with the biomembrane. Therefore, the
314 lowest total phenol content of juice debittered with the immobilized naringinase may
315 also explain the differences in TBARS values obtained in naringinase-treated juices. For
316 instance, Cavia-Saiz et al. (41) reported that grapefruit juice subjected to bitterness
317 removal by physical adsorption with Amberlite®IRA-400 led to a decrease in the total
318 concentration of phenols (21%) compared with the sample of fresh juice and also
319 provided the lowest effectiveness on lipoperoxidation.

320 Some of the modifications by oxidative stress have been considered potentially
321 harmful and responsible for mutations in the integrity of the genome (37). In this work
322 the DNA breakage was measured by electrophoresis and the modified base by
323 oxidativon was evaluated measuring the levels of 8-OH-dG. The modified base 8-
324 hidroxi-deoxiguanosine, is one of the most harmful injuries being able to cause
325 transversion TA to GC, person in charge of the presence of mutations and associated to
326 different physiological a processes like cancer and aging.

327 The oxidative degradation of calf thymus DNA was carried out with hydroxyl
328 radicals generated by Fenton reaction and the damaged fragments visualized by the
329 electrophoretic separation on agarose gel. **Figure 4** shows the electrophoretic pattern of
330 DNA after incubation with hydroxyl radicals in the absence or presence of different
331 grapefruit juices at different volume. DNA was partially protected by all samples of
332 juice and all volumes, such as demonstrated by the presence of fragments with higher

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

333 molecular weight than those obtained by treatment with hydroxyl radical (second band
334 in the gel). In fact, results showed some protective effect to 25 µl of grapefruit juice and
335 it was clearly observable protection of the integrity of DNA at 100 µl. There were no
336 significant differences between all juice samples tested. In this way, Jagetia, et al. (42)
337 and Cavia-Saiz et al. (27) reported similar preventive effect against DNA damage of
338 naringin and naringenin.

339 Another method used to test the capacity of the grapefruit juice to protect DNA from
340 oxidation consisted in quantifying their capacity to inhibit the level of modified base 8-
341 OH-dG formed during attack of the $\cdot\text{OH}$ on the DNA. As can be observed in **Figure 5**
342 fresh juices showed the highest inhibition percentage. Nevertheless, naringinase
343 debittered juice samples also inhibited oxidative DNA damage induced by copper(II)-
344 ascorbic acid in a dose-dependent manner. No significant difference was observed
345 between both debittered juices.

346 In conclusion the debittering of grapefruit juice with naringinase immobilized by
347 entrapment in PVA cryogels, preserved the antioxidant status of the juice. Therefore,
348 the use of immobilized enzyme offers a good alternative to conventional physico-
349 chemical processes.

350 LITERATURE CITED

- 351 (1) Chen, Y. C.; Shen, S. C.; Lin, H. Y. Rutinoid at C7 attenuates the
352 apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*,
353 1139-1150.
- 354 (2) Yu, J.; Wang, L. M.; Walzem, R. L.; Miller, E. G.; Pike, L. M.; Patil, B. S.
355 Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *J.*
356 *Agric. Food Sci.* **2005**, *53*(6), 2009-2014.

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

- 357 (3) Amaro, M. I.; Rocha, J.; Vila-Real, H.; Eduardo-Figueira, M.; Mota-Filipe,
358 Sepodes, B.; Ribeiro, M. H. Anti-inflammatory activity of naringin and the
359 biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured
360 materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Res. Int.* **2009**,
361 *42*, 1010-1017.
- 362 (4) Lee, H. S.; Kim, G. J. Effects of debittering on red grape fruit concentrate.
363 *Food Chem.* **2003**, *82*, 177-180.
- 364 (5) Puri, M.; Kaur, A.; Kanwar, J. R.; Singhs, R. S. Immobilized enzymes for
365 debittering citrus juices. In *Food enzymes: Application of New*
366 *Technologies*; Busto, M.D., Ortega, N. Eds.; Trasworld Research Network:
367 Trivandrum (India), 2008; pp. 91-103.
- 368 (6) Puri, M.; Seth, M.; Marwaha, S. S.; Kothari, R. M. Debittering of kinnow
369 mandarin juice by covalently bound naringinase on hen egg white. *Food*
370 *Biotechnol.* **2001**, *15*(1), 13-23.
- 371 (7) Sekeroglu, G.; Fadiloglu, S.; Gogus, F. Immobilization and characterization
372 of naringinase for the hydrolysis of naringin. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**,
373 *224*(1), 55-60.
- 374 (8) Ribeiro, I. A.; Rocha, J.; Sepodes, B.; Mota-Filipe, H.; Ribeiro, M. Effect of
375 naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory
376 activity of both compounds. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2008**, *52*(3), 13-18.
- 377 (9) Vaillant, F.; Millan, A.; Millan, P.; Dornier, M.; Decloux, M.; Reynes, M.
378 Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chiton and nylon
379 supports. *Process Biochem.* **2000**, *35*(9), 989-996.

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

- 380 (10) Busto, M. D.; Meza, V.; Ortega, N.; Perez-Mateos M. Immobilization of
381 naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol)
382 cryogels for the debittering of juices. *Food Chem.* **2007**, *104*(3), 1177-1182.
- 383 (11) Chen, K. C.; Lin, Y. F. Immobilization of microorganisms with
384 phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Enzyme Microb. Tech.* **1994**,
385 *16*, 79-83.
- 386 (12) Tatum, J. H.; Berry, R. E. Method for determining naringin content in
387 grapefruit juice. *J. Food Sci.* **1973**, *38*(2), 340-341.
- 388 (13) Davis W. Determination of flavonones in citrus. *Anal. Chem.* **1947**, *19*, 476-
389 478.
- 390 (14) Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, AS.; Rice-Evans, C. A. Antioxidant
391 activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.
392 *Free Radical Bio. Med.* **1999**, *26*(9-10), 1231-1237.
- 393 (15) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. Ferric reducing/ antioxidant power assay:
394 Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and
395 modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power
396 and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol.* **1999**, *299*, 15-27.
- 397 (16) Liu, F.; Ooi, V. E. C.; Chang, S. T. Free radical scavenging activities of
398 mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* **1997**, *60*, 763-771.
- 399 (17) McCord, J. M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for
400 erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049-6055.
- 401 (18) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Aruoma, O. I. The deoxyribose method:
402 A simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of
403 hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 215-219.

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

- 404 (19) Brigelius, R.; Muckel, C.; Akerboom, T. P. M.; Sies H. Identification and
405 quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its
406 relationship to glutathione disulfide. *Biochem. Pharm.* **1983**, *32*(17), 2529-
407 2534.
- 408 (20) Ubeaud, G.; Schmitt, C.; Jaeck, D.; Lave, T.; Coassolo, P. Bosentan, a new
409 endothelin receptor antagonist: prediction of the systemic plasma clearance
410 in man from combine in vivo and in vitro data. *Xenobiotica.* **1995**, *25*(12),
411 1381-90.
- 412 (21) Mitsuru, U.; Midori, M. Determination of malondialdehyde precursor in
413 tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **1978**, *86*, 271-278.
- 414 (22) Saez, G. T.; Valls, V.; Muñiz, P.; Perez-Broseta, C.; Iradi A.; Oliva, M. R.;
415 Bannister, J. V.; Bannister, W. H. The role of glutathione in protection
416 against DNA damage induced by Rifamycin SV and Copper (II) ions. *Free*
417 *Radical Res. Commun.* **1993**, *19*(2), 81-92.
- 418 (23) Muñiz, P.; Valls, V.; Perez-Broseta, C.; Iradi, A.; Climent, J. V.; Oliva, M.;
419 Sáez, G. T. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Rifamycin-induced
420 DNA damage. *Free Radical Bio. Med.* **1995**, *18*, 747-755.
- 421 (24) Ritcher, C.; Park, J. W.; Ames, B. Normal oxidative damage to
422 mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *P. Natl. A. Sci. U.S.A.*, **1988**,
423 *85*, 6465-6467.
- 424 (25) Guadagni, D. G.; Maier, V. P.; Turnbaugh, J. G. Effect of some citrus juice
425 constituents on taste threshold for limonin and naringin bitterness. *J. Sci.*
426 *Food Agr.* **1973**, *24*, 1277-1288.
- 427 (26) Shing, S. V.; Jain, R. K.; Gupta, A. K.; Dhatt, A. S. Debittering of citrus
428 juices – A review. *J. Food Sci. Tech.* **2003**, *40* (3), 247-253.

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

- 429 (27) Cavia-Saiz, M.; Busto, M. D.; Pilar-Izquierdo, M. C.; Ortega, N.; Perez-
430 Mateos, M.; Muñiz, P. Antioxidant properties, radical scavenging activity
431 and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its
432 glycoside naringin: a comparative study. *J. Sci. Food Agr.* **2010**, *90*, 1238-
433 1244.
- 434 (28) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetric of total phenolics with
435 phosphomolibdic-phosphtungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Viticult.* **1965**,
436 *16*, 144-158.
- 437 (29) Xu, X. J.; Huang, S. M.; Zhang, L. H. Biodegradability, antibacterial
438 properties, and ultraviolet protection of polyvinyl alcohol-natural polyphenol
439 blends. *Polymer Composites* **2009**, *30* (11), 1611-1617.
- 440 (30) Abeysinghe, D. C.; Li, X.; Sun, C. D.; Zhang, W. S.; Zhou, C. H.; Chen, K.
441 S. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues
442 of citrus fruit of four species. *Food Chem.* **2007**, *104*(4), 1338-1344.
- 443 (31) Yeom, H. W.; Streaker, C. B.; Zhang, Q. H.; Min, D. B. Effects of pulsed
444 electric field on the quality of orange juice and comparison with heat
445 pasteurization. *J. Agr. Food Chem.* **2000**, *48*, 4597-4605.
- 446 (32) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J.
447 Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human
448 disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*(1), 44-84.
- 449 (33) Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Sorrenti, V.; Giacomo, C. D.;
450 Virgata, G.; Barcellona, M. L.; Vanella, A. Bioflavonoids as antiradicals,
451 antioxidants cleavage protectors. *Cell Biol. Toxicol.* **2000**, *16*, 91-98.

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

- 452 (34) Jayaprakasha, G. K.; Girenavar, B.; Patil, B. S. Radical scavenging
453 activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in
454 vitro model systems. *Bioresource Technol.* **2008**, *99*, 4484–4494.
- 455 (35) Marti, N.; Mena, P.; Canovas, J. A.; Micol, V.; Saura D. Vitamin C and the
456 role of citrus juices as functional food. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*(5), 677-
457 700.
- 458 (36) Cook, N. C.; Samman, S. Flavonoids-chemistry, metabolism,
459 cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66-
460 76.
- 461 (37) Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J.; Telser J. Role of oxygen
462 radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**,
463 *266*, 37–56.
- 464 (38) Weisel, T.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Dietrich, H.; Will, F.; Stockis, J. P.;
465 Kulling, S.; Rüfer, C.; Johannes, C.; Janzowski, C. An anthocyanin/
466 polyphenolic-rich fruit juice reduce oxidative DNA damage and increases
467 glutathione level in healthy probands. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 388-397.
- 468 (39) Ekambaram, G.; Rajendran, P.; Magesh, V.; Sakthisekaran, D. Naringenin
469 reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-
470 induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutr. Res.* **2008**, *28*, 106-112.
- 471 (40) Rapisarda, P.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Bonina, F.; De Pascuale, A.;
472 Saija, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of
473 fresh orange juices. *J. Agr. Food Chem.* **1999**, *47*, 4718-4723.
- 474 (41) Cavia-Saiz, M.; Muñoz, P.; Ortega, N.; Busto, M. D. Effect of enzymatic
475 debittering on antioxidant capacity and protective role against oxidative

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

- 476 stress of grapefruit juice in comparison with adsorption on exchange resin.
477 *Food Chem.* **2011**, 125,158-163.
478 (42) Jagetia, G. C.; Reddy, T. K.; Kedlaya, R. Influence of naringin on ferric iron
479 induced oxidative damage in vitro. *Clin. Chim. Acta* **2004**, 347, 189-197.
480

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

481 **Figure Captions**

482 **Figure 1.** Total antioxidant capacity of grapefruit juice by ABTS (A) and FRAP(B)
483 methods. FJ (fresh juice); N-PJ (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ
484 (pasteurized and immobilized naringinase-treated juice). Results are the mean \pm SD of
485 ten experiments. Different letters for each column correspond to statistically different
486 values ($p < 0.005$).

487

488 **Figure 2.** Effect of grapefruit juice samples on GSH in rat liver homogenate exposed to
489 oxidative stress in the presence of t-BOOH. FJ (fresh juice); N-PJ (pasteurized and
490 naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and naringinase immobilized-treated
491 juice). C: hepatocytes in the absence of t-BOOH; t-BOOH: hepatocytes in the presence
492 of t-BOOH; (10-40 ml): hepatocytes preincubated with grapefruit juice samples before
493 adding t-BOOH to induce depletion of GSH. Results are the mean \pm SD of ten
494 experiments. Different letters for each volume correspond to statistically different
495 values ($p < 0.005$). * Values are significantly different ($p < 0.05$) *versus* t-BOOH.

496

497 **Figure 3.** Effect of grapefruit juice samples on lipoperoxidation in rat liver microsomes
498 exposed to oxidative stress in the presence of peroxy radical. FJ (fresh juice); N-PJ
499 (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and immobilized
500 naringinase-treated juice); C: microsomes in the absence of ABAP; ABAP: microsomes
501 in the presence of ABAP; (10-40 μ l): microsomes preincubated with grapefruit juice
502 samples before adding ABAP to induce lipid peroxidation. Results are the mean \pm SD
503 of ten independent experiments. *Values significantly different ($p < 0.005$) *versus* C.
504 Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

505

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

506 **Figure 4.** Effects of grapefruit juice samples at different concentrations on the
507 protection on DNA against Cu(II)-ascorbic acid. The numbered lanes represent DNA
508 alone (C); DNA exposed to Cu(II) (100 μ M) and ascorbic acid (1 mM) (OH•);
509 DNA/Hind III Fragments molecular weight standard (1); 100 bp DNA ladder molecular
510 weight standard (2); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + fresh juice at 25 μ l (3), 50 μ l (4),
511 100 μ l (5), 200 μ M (6); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + naringinase processed juice at
512 25 μ l (7), 50 μ l (8), 100 μ l (9), 200 μ l (10); DNA and Cu(II)-ascorbic acid +
513 immobilized naringinase processed juice at 25 μ l (11), 50 μ l (12), 100 μ l (13), 200 μ l
514 (14).

515 **Figure 5.** Effect of grapefruit juice samples on the formation of 8-OH-dG/10⁵dG in calf
516 thymus DNA induced by ascorbic acid and copper(II) at different doses. FJ (fresh
517 juice); N-PJ (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and
518 immobilized naringinase-treated juice). Results are the mean \pm SD of six experiments.
519 Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

520

521

522

Table 1

Scavenger effect of grapefruit samples. FJ, fresh juice; N-PJ, pasteurized and naringinase-treated juice; IN-PJ, pasteurized and immobilized naringinase-treated juice

Radical generation method	IL ₅₀ (μ l)		
	FJ	N-PJ	IN-PJ
<i>Superoxide anion</i>			
NBT	27 \pm 0.5 ^b	19.1 \pm 2.8 ^a	21 \pm 6.3 ^{ab}
Xanthine oxidase	120 \pm 18 ^a	146 \pm 46.8 ^a	139 \pm 55 ^a
<i>Hydroxyl radical</i>			
with EDTA	21.9 \pm 1.9 ^c	7.8 \pm 1.1 ^a	11.6 \pm 3.9 ^b

Each value is presented as the mean \pm SD of ten independent experiments

Different letters for each row correspond to statistically different values ($p < 0.005$)

IL₅₀: volume giving 50% inhibition of radical production

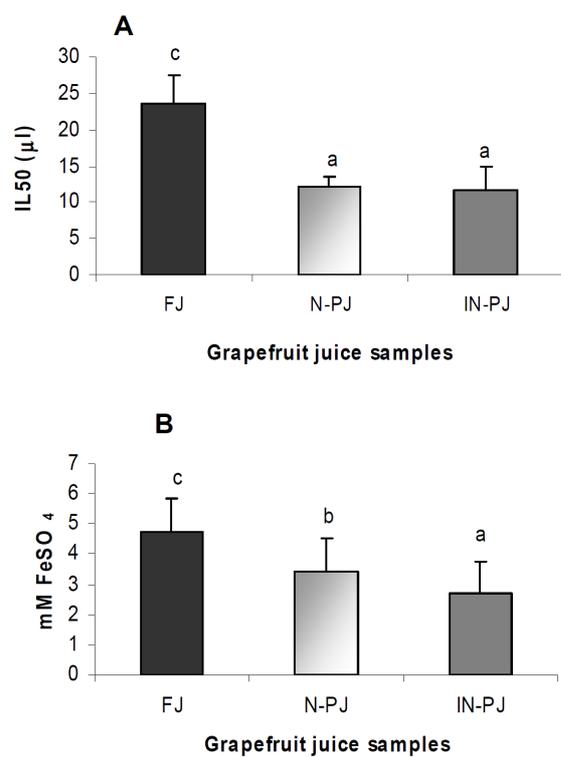


Figure 1. Total antioxidant capacity of grapefruit juice by ABTS (A) and FRAP(B) methods. FJ (fresh juice); N-PJ (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and immobilized naringinase-treated juice). Results are the mean \pm SD of ten experiments. Different letters for each column correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

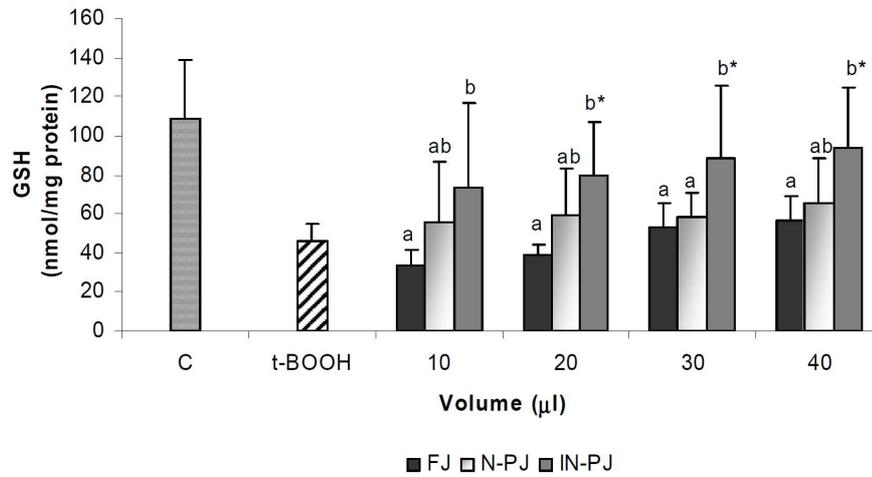


Figure 2. Effect of grapefruit juice samples on GSH in rat liver homogenate exposed to oxidative stress in the presence of *t*-BOOH. FJ (fresh juice); N-PJ (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and naringinase immobilized-treated juice). C: hepatocytes in the absence of *t*-BOOH; *t*-BOOH: hepatocytes in the presence of *t*-BOOH; (10-40 ml): hepatocytes preincubated with grapefruit juice samples before adding *t*-BOOH to induce depletion of GSH. Results are the mean \pm SD of ten experiments. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$). * Values are significantly different ($p < 0.05$) versus *t*-BOOH.

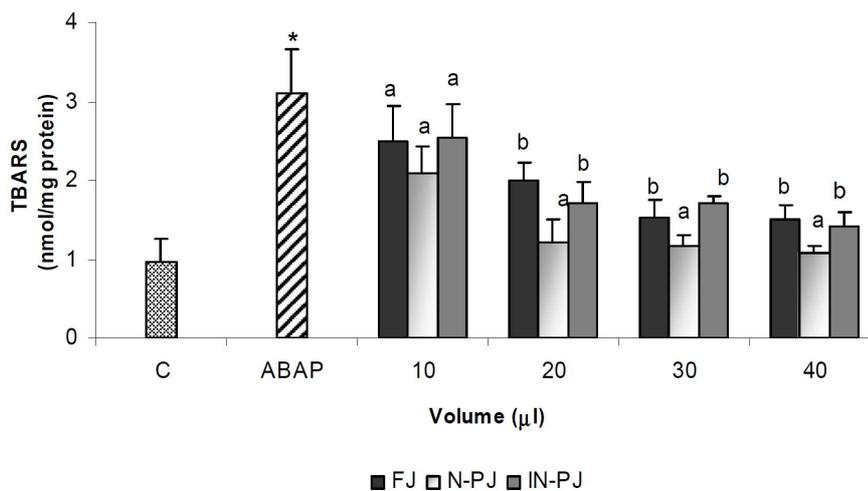


Figure 3. Effect of grapefruit juice samples on lipoperoxidation in rat liver microsomes exposed to oxidative stress in the presence of peroxy radical. FJ (fresh juice); N-PJ (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and immobilized naringinase-treated juice); C: microsomes in the absence of ABAP; ABAP: microsomes in the presence of ABAP; (10-40µl): microsomes preincubated with grapefruit juice samples before adding ABAP to induce lipid peroxidation. Results are the mean \pm SD of ten independent experiments. *Values significantly different ($p < 0.005$) versus C. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

*Corresponding author. Tel.: +34 947 258800; fax: +34 947 258831
E-mail address: dbusto@ubu.es (M.D. Busto)

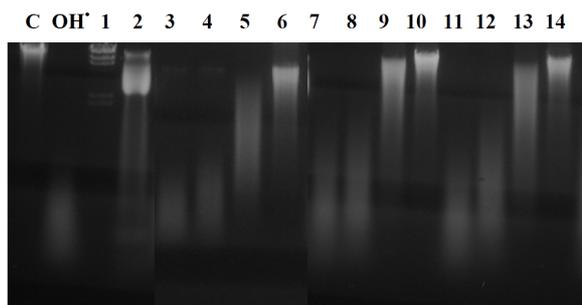


Figure 4. Effects of grapefruit juice samples at different concentrations on the protection on DNA against Cu(II)-ascorbic acid. The numbered lanes represent DNA alone (C); DNA exposed to Cu(II) (100 μ M) and ascorbic acid (1 mM) (OH•); λ DNA/Hind III Fragments molecular weight standard (1); 100 bp DNA ladder molecular weight standard (2); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + fresh juice at 25 μ l (3), 50 μ l (4), 100 μ l (5), 200 μ M (6); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + naringinase processed juice at 25 μ l (7), 50 μ l (8), 100 μ l (9), 200 μ l (10); DNA and Cu(II)-ascorbic acid + immobilized naringinase processed juice at 25 μ l (11), 50 μ l (12), 100 μ l (13), 200 μ l (14).

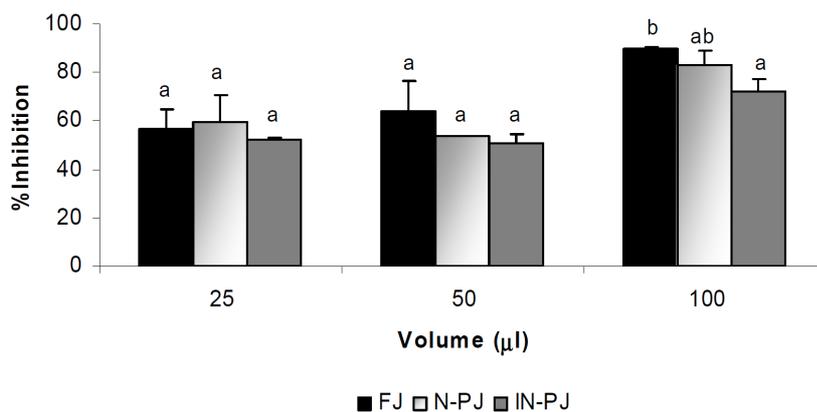


Figure 5. Effect of grapefruit juice samples on the formation of 8-OH-dG/10⁵dG in calf thymus DNA induced by ascorbic acid and copper(II) at different doses. FJ (fresh juice); N-PJ (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and immobilized naringinase-treated juice). Results are the mean \pm SD of six experiments. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

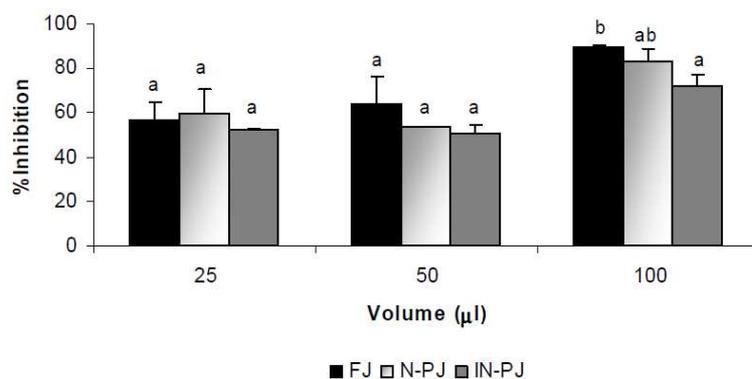


Figure 5. Effect of grapefruit juice samples on the formation of 8-OH-dG/10⁵dG in calf thymus DNA induced by ascorbic acid and copper(II) at different doses. FJ (fresh juice); N-PJ (pasteurized and naringinase-treated juice); IN-PJ (pasteurized and immobilized naringinase-treated juice). Results are the mean \pm SD of six experiments. Different letters for each volume correspond to statistically different values ($p < 0.005$).

Estudio 4

Análisis comparativo de la capacidad antioxidante y efecto protector frente al estrés oxidativo del zumo de pomelo en base al proceso de desamargado aplicado

En este apartado se presenta un análisis global de cómo los tratamientos de desamargado de zumo de pomelo, con resina de intercambio iónico (Amberlite IR 400) y con naringinasa libre e inmovilizada en criogeles de PVA, afectan a las características antioxidantes del zumo y a su efecto protector sobre biomarcadores de estrés oxidativo.

Este estudio se ha estructurado en los siguientes puntos:

- I. Capacidad antioxidante total de los zumos procesados
- II. Capacidad estabilizadora de los radicales superóxido e hidroxilo
- III. Efecto del zumo tratado sobre los niveles de GSH intracelular
- IV. Efecto del zumo sobre los biomarcadores de daño oxidativo a lípidos y DNA.
- V. Correlaciones entre el contenido de polifenoles, de naringina, capacidad antioxidante y biomarcadores de estrés oxidativo.

I. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LOS ZUMOS PROCESADOS

La naringina es el principal flavonoide responsable del sabor amargo en el zumo de pomelo y la disminución en su contenido está correlacionada con la reducción del sabor amargo. Los diferentes procesos aplicados en este estudio reducen los niveles iniciales de naringina del zumo de pomelo (tabla 5.1) hasta concentraciones finales aceptables desde el punto de vista del consumidor. En relación a este punto, y a pesar del amplio rango de sensibilidad entre individuos y que el umbral de detección de naringina en solución acuosa se cifra en $20 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, (Guadagni y cols., 1974), concentraciones inferiores a $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ se consideran como valores aceptables por parte del consumidor (Ribeiro y cols., 2008).

Tabla 5.1. Contenido de naringina en los zumos de pomelo fresco y procesado.

Muestras de zumo	Tratamiento de desamargado	Naringina ($\mu\text{g/mL}$)
FJ	-----	$676 \pm 26,4^{\text{d}}$
N-PJ	Naringinasa libre	$359 \pm 50,9^{\text{b}}$
IN-PJ	Naringinasa Inmovilizada PVA	$398 \pm 59,5^{\text{b}}$
R-PJ	Amberlite IR 400	$240 \pm 16,4^{\text{a}}$

Los valores están expresados como media \pm SD $n=18$. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$). FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA; R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400.

Al comparar los procesos de desamargado observamos que la resina disminuye significativamente la concentración de naringina en un 64,5%, y el tratamiento enzimático resulta en una reducción del 46,8 % en el tratamiento con enzima libre y en un 41% cuando se trata con la inmovilizada en PVA. En relación al efecto soporte, observamos que el alcohol polivinílico no adsorbía naringina (Tabla 8.2, anexo). Otros autores muestran que otros polímeros sintéticos tales como el acetato de celulosa, el nylon o resinas de intercambio iónico, tampoco retienen de manera específica los compuestos amargos del zumo (naringina y limonina) (Johnson y Chandler, 1982). Si se compara con otros autores, los porcentajes de reducción de naringina en los zumos tratados con naringinasa inmovilizada en PVA obtenidos en este trabajo son menores a las obtenidas con otros soportes. Así, Soares y Hotchkiss (1998) obtuvieron una reducción del 60% al tratar los zumos con naringinasa inmovilizada en películas de triacetato de celulosa. Valores similares fueron obtenidos por Puri y cols. (1996) en zumos de mandarina procesados con naringinasa inmovilizada en alginato de calcio, y reducciones de un 76%, al inmovilizar la enzima por unión covalente en "woodchips" mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (Puri y cols., 2005). Estudios más recientes con soportes de k-carragenato (Ribeiro y cols., 2008) y alginato de calcio (Ribeiro y cols., 2010b) muestran reducciones del 95% y 81% en los niveles de naringina en el zumo de pomelo.

Con el objetivo de valorar como los tratamientos de desamargado afectan a la capacidad antioxidante de los zumos, se ha procedido a su evaluación mediante dos ensayos, el ensayo ABTS que mide la capacidad para estabilizar un radical y el método FRAP que mide la capacidad reductora (ver apdo. 2.1.5.1. y 2.1.5.2.). Ambos métodos son usados y recomendados por distintos autores como ensayos exactos y fáciles para la determinación de la capacidad antioxidante en zumos de frutas (Abeysinghe y cols., 2007; Saura-Calixto y cols., 2006).

Los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS se muestran en la Figura 5.1 dónde se han representado los valores medios para distintos volúmenes de muestra de zumo.

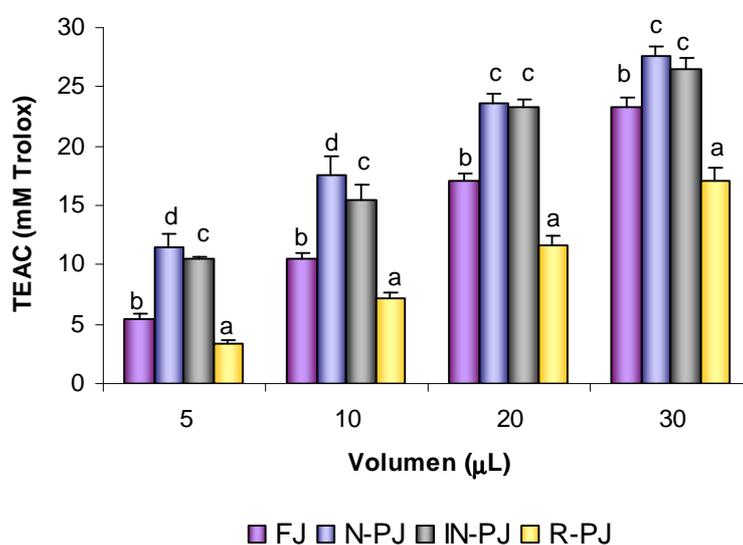


Figura 5.1. Actividad antioxidante de los zumos de pomelo, expresados como TEAC (equivalentes de Trolox). FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400. Los valores están expresados como media \pm SD, n=18. Columnas con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

En general, los zumos de pomelo tratados enzimáticamente, N-PJ e IN-PJ, presentan mayor capacidad antioxidante que el zumo fresco, mientras que el tratamiento con resina resultó en una disminución significativa, tanto con respecto al control como a los zumos tratados enzimáticamente (Estudio 2 y 3). Por lo tanto, parece razonable decir que existe un efecto resultado del tratamiento de desamargado sobre la capacidad antioxidante de los zumos. De hecho, el análisis de la varianza

mostró un efecto "tratamiento de desamargado" y el test LSD detectó diferencias entre los distintos tratamientos. Además, se observa un efecto volumen ya que existen diferencias significativas ($p < 0,005$) a los distintos volúmenes estudiados en todos los zumos ensayados.

Este incremento de la capacidad antioxidante ABTS en los zumos tratados enzimáticamente puede ser resultado directo de la acción catalítica de la enzima. De hecho, la naringenina, aglicona de la naringina y producto de la acción enzimática, presenta un grupo hidroxilo libre adicional en posición 7, que según diversos autores está relacionado con una mayor capacidad antioxidante en los flavonoides (ver apdo. 2.2.3.). De forma específica, en el presente trabajo de tesis, se ha demostrado (ver Estudio 1) que la naringenina presentaba una capacidad antioxidante, evaluada por el método ABTS, 3,4 veces superior a la naringina, lo que apoya los resultados obtenidos de la acción de la enzima.

La capacidad antioxidante de las muestras de zumo evaluadas mediante el ensayo FRAP se representa en la Figura 5.2. Todos los zumos evaluados presentan capacidad para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , mostrando un efecto dependiente de la concentración, y diferencias significativas entre ellos.

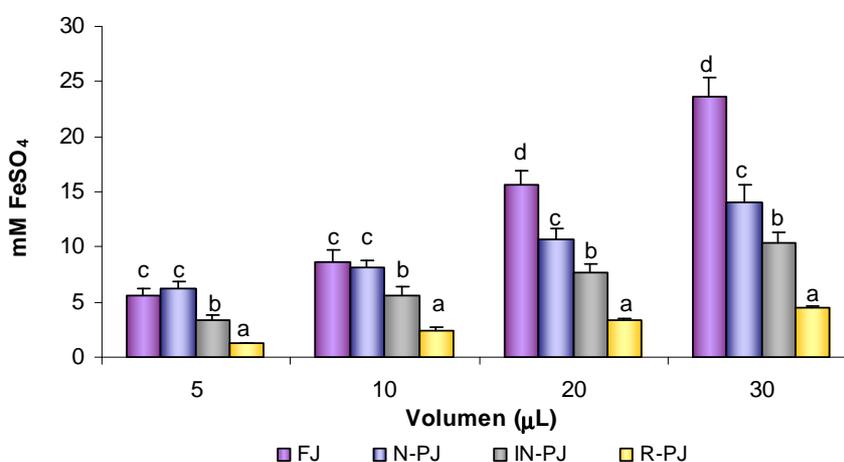


Figura 5.2. Actividad antioxidante FRAP de los zumos de pomelo. FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con amberlite IR400. Los valores están expresados como media \pm SD n=18. Columnas con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Los resultados muestran que el procesado de los zumos disminuye significativamente su capacidad reductora, posiblemente como consecuencia de los procesos de pasteurización previa al desamargado al que se ven sometidos los zumos, donde se ven afectados aquellos compuestos bioactivos como el ácido ascórbico que contribuyen de manera significativa a la actividad reductora (Estudio 2). Además del efecto pasteurización, es de destacar la menor actividad FRAP observada especialmente en las muestras de zumo tratadas con la resina de intercambio y, en menor medida, en las tratadas con la enzima inmovilizada en PVA. En ambos casos, se comprobó retención de compuestos fenólicos por acción de las resinas o por interacción con el soporte de inmovilización (Estudio 2 y 3).

En la Tabla 5.2 se presentan los valores medios, por grupos, de los resultados obtenidos en el estudio cuantitativo del contenido en polifenoles en los zumos estudiados. Los resultados muestran un mayor contenido en polifenoles en los zumos sometidos a tratamiento con naringinasa. Por el contrario, en el zumo procesado con la resina se observó una disminución en el contenido de polifenoles del 21% comparado con el zumo fresco, debido a que el mecanismo a través del cual reducen el amargor las resinas es reteniendo polifenoles. Esta reducción en el contenido de polifenoles en el zumo procesado con resina, también fue observado por otros autores para el zumo de pomelo (Lee y Kim, 2003).

Tabla 5.2. Contenido de polifenoles totales en los zumos de pomelo fresco y procesado.

Muestra de zumo	Tratamiento de desamargado	Polifenoles totales(mg/L GAE)
FJ	-----	689 ± 50,2 ^b
N-PJ	Naringinasa libre	1227 ± 44,1 ^d
IN-PJ	Naringinasa Inmovilizada PVA	963 ± 21,6 ^c
R-PJ	Amberlite IR 400	545 ± 56,0 ^a

Los valores están expresados como media ± SD n=18. Valores con distinta letra son significativamente distintos (p<0,005). FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA; R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con amberlite IR400.

La mayor concentración de polifenoles totales observada en los zumos de pomelo tratados con naringinasa, y tal como se argumentó previamente (Estudio 2), posiblemente sea resultado de la hidrólisis enzimática que lleva a incrementos de la flavanona naringenina, que al tener un grupo hidroxilo más que la naringina da lugar a una sobreestimación del contenido en polifenoles totales en el ensayo de Folin-Ciocalteu. Los niveles significativamente inferiores obtenidos en el zumo tratado con la enzima inmovilizada (IN-PJ) comparado con los obtenidos con la enzima en solución (N-PJ) puede ser consecuencia de la retención de polifenoles en la matriz de PVA (15 %), resultado de su interacción con el polivinil alcohol (Estudio 3).

Los estudios de correlación entre los niveles de polifenoles y la capacidad antioxidante total (Figura 5.3) mostraron que el método ABTS se correlaciona positivamente con la cantidad de polifenoles totales ($R=0,9395$; $p=0,0000$), lo que nos indica que una parte importante de la capacidad antioxidante total del zumo de pomelo está asociada a su componente fenólico y, por lo tanto, debe de tenerse en cuenta en los procesos de desamargado.

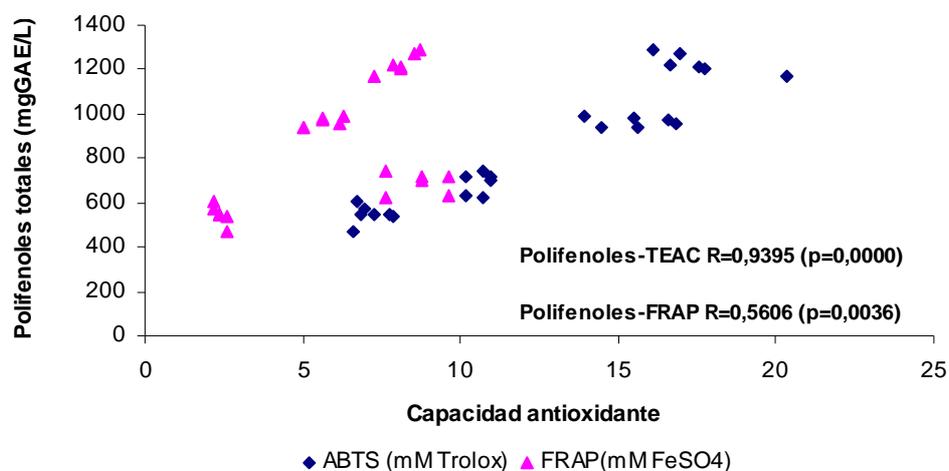


Figura 5.3. Correlaciones entre polifenoles y capacidad antioxidante

El mayor contenido de polifenoles en los zumos procesados enzimáticamente indica que estos métodos son adecuados para mantener su capacidad antioxidante. Los resultados muestran también una correlación positiva entre polifenoles y FRAP, aunque menor que la obtenida con el ABTS, posiblemente debido al peso que tienen otros compuestos bioactivos, tal y como se ha comentado previamente.

A la vista de los resultados obtenidos en este punto sobre la capacidad antioxidante total de los zumos de pomelo, se puede concluir que existe un efecto resultado del proceso de desamargado empleado, de manera que se produce una mejora en la capacidad antioxidante total del zumo con los tratamientos enzimáticos y disminuye de modo muy significativo con la aplicación de la resina. Así mismo, se observó un efecto dependiente del método de análisis empleado para la determinación de la capacidad antioxidante total. Mientras el tratamiento enzimático de desamargado mejora la capacidad antioxidante de los zumos de estabilización del radical ABTS, afecta negativamente a la capacidad reductora de los zumos tratados, medida por el método del FRAP, en comparación con el zumo fresco, no sometido a ningún tratamiento previo de pasteurización.

II. CAPACIDAD ESTABILIZADORA DE LOS RADICALES SUPERÓXIDO E HIDROXILO DE LOS ZUMOS PROCESADOS

La estabilización del radical superóxido puede ser de acción directa o por inhibición de las enzimas generadoras del mismo (apdo. 4.2.5.). Por eso, en este trabajo se evaluó la capacidad estabilizadora o “scavenger” de los zumos utilizando un método enzimático y uno no enzimático (Tabla 5.3).

Los resultados muestran que todos los zumos reducen la formación del azul de formazan, indicando su capacidad “scavenger” no enzimática frente al radical superóxido. El procesado de los zumos con naringinasa libre o inmovilizada mejora la capacidad estabilizadora del radical superóxido, posiblemente como resultado del incremento en el contenido de naringenina ya que al poseer características estructurales (-OH libre en posición 5 y 7) frente a su glicona naringina mejora su papel estabilizador frente al radical (Estudio 1). Sin embargo, el procesado del zumo con la resina de intercambio, al reducir considerablemente el contenido de polifenoles disminuye esta capacidad estabilizadora de radical (Estudio 2). Los resultados obtenidos del método enzimático (xantina oxidasa), indican que los zumos procesados con naringinasa aunque no mejoran esta propiedad, la mantienen ya que no se obtienen diferencias significativas con el zumo fresco. Sin embargo, el procesado con la resina al retener significativamente compuestos fenólicos, reduce esta propiedad en los zumos así procesados.

Tabla 5.3. Capacidad estabilizadora frente a radicales libres de los zumos de pomelo.

Método de generación del radical superóxido	IL ₅₀ (μL)			
	FJ	N-PJ	IN-PJ	R-PJ
No enzimático (NBT)	27 ± 0,5 ^b	19,1 ± 2,8 ^a	21 ± 6,3 ^{ab}	74 ± 9,3 ^c
Enzimático	120 ± 18 ^a	146 ± 47 ^{ab}	139 ± 55 ^{ab}	180 ± 17,7 ^b

FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA y R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con amberlite IR400. Los valores están expresados como la media ± SD n=10. Valores de la misma fila con distintas letras son significativamente distintos (p<0,005). IL₅₀: volumen de zumo necesario para alcanzar una inhibición del 50%.

La actividad “scavenger” de los zumos frente al radical hidroxilo se determinó mediante el ensayo de degradación de la desoxirribosa, usando la reacción de Fenton (Fe³⁺/H₂O₂) como generador del radical hidroxilo (ver apdo. 4.2.6). Los resultados de las diferentes muestras de zumo de pomelo se muestran en la Figura 5.4.

Comparando el efecto del procesado para eliminar el amargor del pomelo, se observa que los zumos desamargados tanto enzimáticamente como con la resina mejoran significativamente la capacidad *scavenger* del radical hidroxilo. El efecto inhibitor del radical hidroxilo fue volumen dependiente, no observándose diferencias significativas a volúmenes de 30 μL. En general, el zumo tratado con la enzima naringinasa, es el que exhibía una mayor actividad estabilizadora del radical hidroxilo, no observándose diferencias significativas entre las muestras tratadas con la enzima libre o inmovilizada. Esta mayor actividad inhibitora de los zumos tratados enzimáticamente podría explicarse en base al mayor contenido de naringenina (Estudio 3). Adicionalmente, los resultados obtenidos con las muestras de zumo desamargado, pueden deberse a la variedad y diversidad de modificaciones tanto cuantitativas como cualitativas del componente fenólico como consecuencia del proceso de pasteurización y desamargado a los que se someten estas muestras de zumo (Estudio 2).

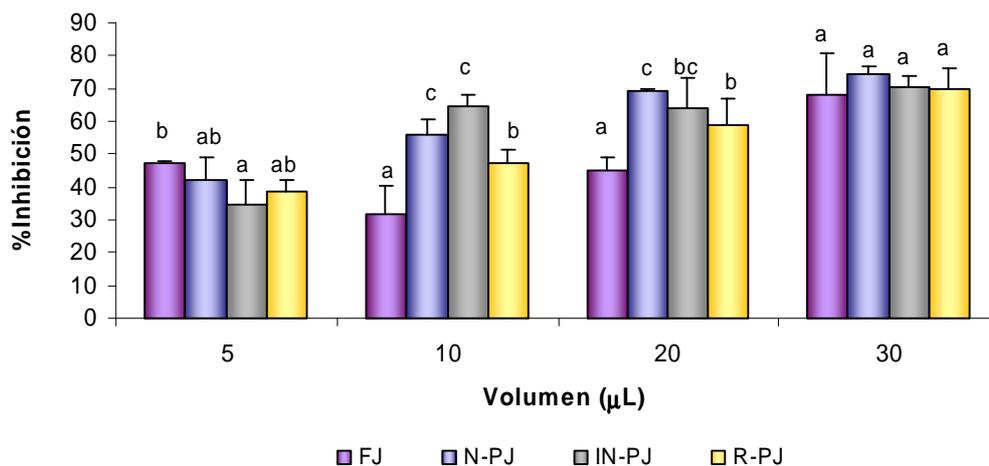


Figura 5.4. Capacidad de los zumos de estabilizar el radical hidroxilo. FJ: zumo fresco, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con amberlite IR400, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA. Columnas con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Los resultados de este apartado, nos permiten concluir que los procesos aplicados para el desamargado del zumo modifican las propiedades estabilizadoras de radicales oxigénicos. Las resinas al disminuir significativamente los polifenoles disminuyen la capacidad del zumo para estabilizar los radicales superóxido aunque mantiene la capacidad de los zumos de estabilizar el radical hidroxilo. Sin embargo, el tratamiento de desamargado enzimático, que conlleva la hidrólisis de la naringina a naringenina, mejora las características estabilizadoras del zumo frente al radical superóxido e hidroxilo.

III. EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE GSH INTRACELULAR

El glutatión, es uno de los antioxidantes intracelulares más abundantes, juega un papel importante como regulador del estado redox celular (Circu y cols., 2010), y su depleción incrementa la vulnerabilidad al daño causado por los radicales libres. En la defensa celular contra los radicales libres tiene un papel importante como antioxidante al ser capaz de interaccionar y estabilizar radicales hidroxilo, superóxido, y peróxidos, además de participar en la reducción de otros antioxidantes tales como el α -tocoferol y donar hidrógenos para reparar el ADN dañado.

El efecto protector de los zumos objeto de estudio sobre los niveles de glutatión en homogenizado de hígado de rata (apdo. 4.2.8.) se muestra en la Figura 5.5.

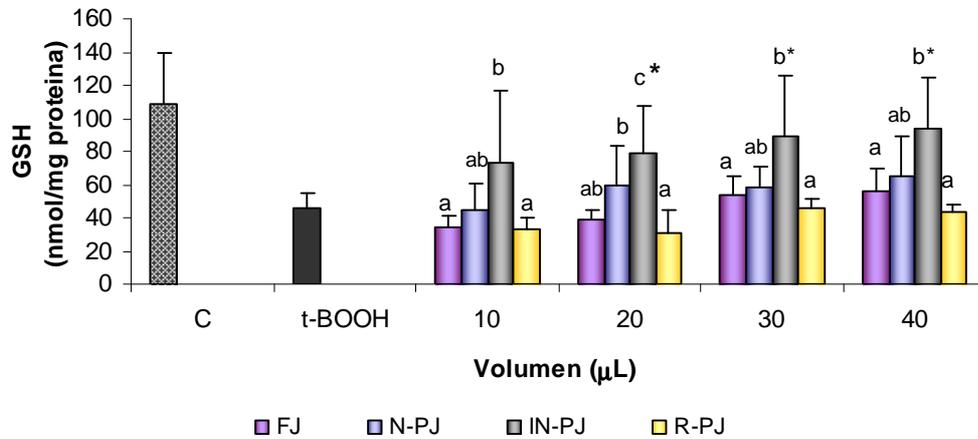


Figura 5.5. Niveles de GSH en homogenado de hígado de rata tratada con t-BOOH. (C) control; (t-BOOH) homogenado tratado con t-BOOH. FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con amberlite IR400. Los valores están expresados como la media \pm SD n=10. Columnas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). *Valores significativamente distintos ($p < 0,05$) con respecto a t-BOOH.

El tratamiento del homogenizado de hígado con t-BOOH produce la depleción de los niveles de glutatión de forma significativa ($p < 0.005$). La presencia de zumo en el medio de incubación, resulta solo en un incremento significativo en los niveles de GSH en el zumo tratado con la enzima inmovilizada. La presencia de zumo fresco y tratado con naringinasa libre en el medio, aunque también resulta en un incremento en los niveles de GSH a los volúmenes de 30 y 40 μ L, no es significativo, posiblemente debido a las altas desviaciones obtenidas. Nuevamente, si comparamos entre los diferentes tratamientos, los zumos tratados con resina fueron los que mostraron menor efecto protector sobre el GSH y un mejor efecto se observó en los tratados enzimáticamente.

El tratamiento enzimático incrementa los niveles de naringenina en el zumo, sin embargo tal y como observamos en el primer estudio (Cavia y cols., 2010), su presencia en el medio de incubación resulta en una depleción de los niveles de GSH, mostrando un efecto prooxidante ya propuesto por otros autores para compuestos con anillos fenólicos (Jagetia y cols., 2004; Galati y cols., 1999). Por lo tanto, este efecto protector sobre la depleción del GSH de los zumos tratados con la enzima

inmovilizada es independiente del contenido de naringenina, posiblemente otros compuestos no fenólicos sean los que estabilizan el GSH, actuando directamente sobre el radical o regenerando el tripéptido. Otra de las posibles hipótesis acerca de este comportamiento podría ser una acción selectiva del soporte de inmovilización (PVA) para la retención de componentes del zumo con acción oxidante específica para el glutatión, con lo que el tratamiento con la enzima inmovilizada mejoraría el efecto protector del zumo de pomelo.

Estos resultados nos indican que de los procesos aplicados para eliminar el amargor el zumo de pomelo, el procesado con naringinasa mostró mejores resultados que el procesado con resina de intercambio, mejorando dicha estabilización cuando se utiliza la enzima inmovilizada en PVA. Aunque en ninguno de los procesos utilizados se observó la recuperación de los niveles de GSH a niveles del grupo control.

IV. EFECTO SOBRE LOS BIOMARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS Y DNA

El mecanismo del efecto beneficioso de los cítricos como el pomelo parece depender de la presencia de diferentes clases de flavonoides, que muestran una elevada capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica y del daño oxidativo al DNA presentando un papel preventivo en las enfermedades cardiovasculares y cáncer (Nijveldt y cols., 2001).

El efecto protector de los zumos frente al daño oxidativo a biomoléculas se estudio evaluando los biomarcadores de daño oxidativo a lípidos y a DNA.

Daño a lípidos: peroxidación lipídica

La inhibición de la peroxidación lipídica de los zumos fue evaluada en microsomas de hígado de rata por el método de los TBARs (apdo 4.2.9.3.), utilizando como agente oxidante el ABAP (apdo 4.2.9.2.). El tratamiento con ABAP resulta en un incremento significativo en los niveles de TBARs ($0,97 \pm 0,28$ vs. $3,19 \pm 0,56$ nmol/mg proteína) frente al control sin tratar, C, (Figura 5.6). La presencia de zumo de pomelo en el medio de incubación evitó la oxidación lipídica de forma significativa existiendo un efecto volumen dependiente para todas las muestras de zumo. Por lo tanto, se puede afirmar

que los compuestos presentes en dichos zumos están ejerciendo un efecto protector frente al daño oxidativo a lípidos.

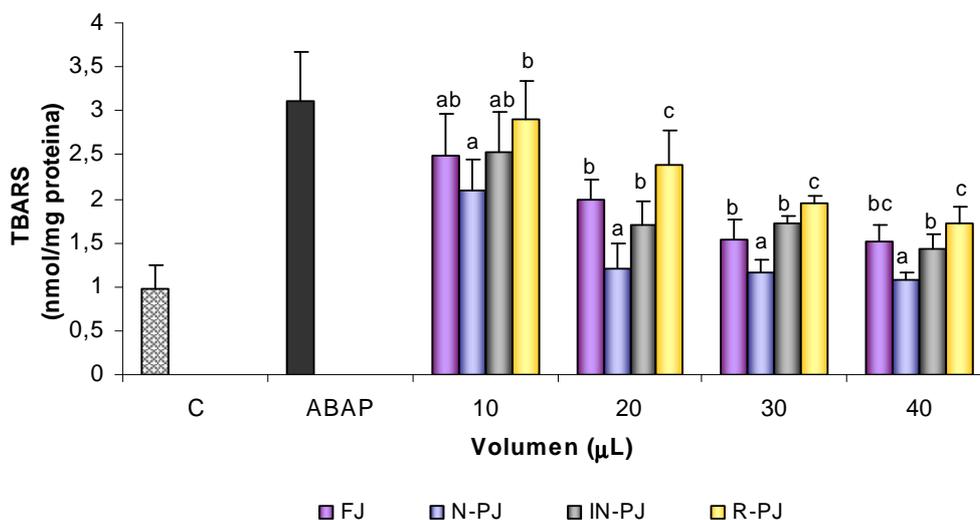


Figura 5.6. Efectos de los zumos de pomelo sobre la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata inducida por ABAP. (C) microsomas control; (ABAP) microsomas sometidos a estrés oxidativo con ABAP. Valores presentados como la media \pm SD $n=10$. Columnas con letras distintas indican que cada zumo son significativamente distintos ($p < 0,05$). FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400.

El mayor contenido en polifenoles totales en el zumo fresco y el zumo tratado con la enzima libre en comparación con el zumo desamargado con la enzima inmovilizada y la resina de intercambio, explica las diferencias en la inhibición lipídica obtenidas entre estas muestras (Estudio 2 y 3). Además, la mayor inhibición lipídica observada en los zumos procesados con naringinasa libre, con respecto a las muestras de zumo fresco posiblemente sea resultado del mayor contenido de naringenina que se produce por el tratamiento enzimático y la mayor capacidad de este compuesto flavonoide para prevenir la peroxidación lipídica debido a la presencia de un grupo 4-hidroxilo en anillo B, de forma que puede donar electrones y estabilizar los radicales peroxil, evitando de ese modo el daño a la membrana microsomal e inhibiendo la peroxidación lipídica (Amic y cols., 2003). De hecho, se ha constatado en esta tesis (Estudio 1) que la concentración de naringenina necesaria para inhibir un 50% la peroxidación lipídica es 2,3 veces menor comparada con su glicósido. Este efecto protector de la naringenina sobre la peroxidación lipídica también es descrito por otros autores, que observaron que la administración de naringenina reduce la peroxidación lipídica y restauraba los niveles

de antioxidantes en el hígado de ratas tratadas con cadmio como inductor de estrés oxidativo (Renugadevi y Prabu, 2009).

Efecto sobre biomarcadores de daño oxidativo al DNA

La degradación oxidativa del DNA de timo de ternera se llevo a cabo con radicales hidroxilos generados mediante la reacción de Fenton por incubación con sulfato de cobre y ácido ascórbico y los fragmentos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa (apdo. 4.2.11.1. y 4.2.11.2.). Los resultados muestran un efecto protector de los zumos sobre el daño inducido al DNA a todos los volúmenes estudiados como indica la presencia de fragmentos de mayor peso molecular que los obtenidos por tratamiento con el radical hidroxilo (Figura 5.7, Columna 2). De hecho, los resultados muestran mayor efecto protector a un volumen de 100 μL , y este efecto se observa más claramente a un volumen de 200 μL .

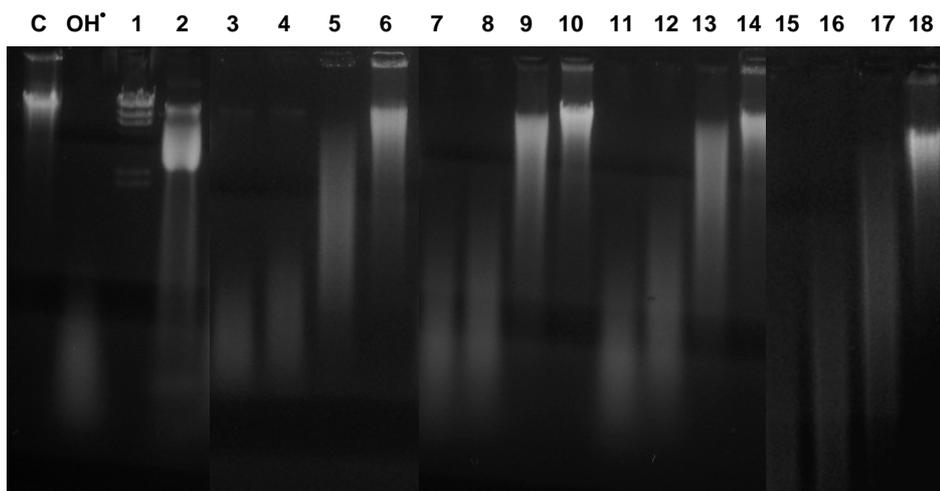


Figura 5.7. Electroforesis en gel de agarosa del daño oxidativo al DNA inducido por Cu(II)-ácido ascórbico y el efecto del zumo de pomelo. (C) Control, DNA sin tratar; (OH•) DNA incubado con Cu(II) (100 μM) and ácido ascórbico (1mM); (1) Patrón de pesos moleculares $\lambda\text{DNA}/\text{Hind}$; (2) Patrón de pesos moleculares de 100 bp. (3-6) DNA incubado con ácido ascórbico-Cu(II) y 25 μL , 50 μL , 100 μL , 200 μL de zumo fresco (FJ); (7-10) con 25 μL , 50 μL , 100 μL y 200 μL de zumo tratado con naringinasa en solución (N-PJ); (11-14) con 25 μL , 50 μL , 100 μL y 200 μL de zumo tratado con naringinasa inmovilizada en PVA (IN-PJ);(15-18) con 25 μL , 50 μL , 100 μL , 200 μL de zumo tratado con Amberlite IR 400 (R-PJ).

La cuantificación de los niveles de 8-OHdG/10⁵dG, se evaluó en DNA de timo de ternera sometido a estrés oxidativo con sulfato de cobre y ácido ascórbico en presencia y ausencia de los distintos zumos de pomelo (apdo. 4.2.11.3.) y los resultados se expresan como IL₅₀ (Tabla 5.4).

Todos los zumos mostraron una disminución significativa en los niveles de base modificada a los distintos volúmenes ensayados, lo cual nos indica el efecto preventivo de los zumos sobre el daño oxidativo al DNA (Estudio 2 y 3). Los valores de IL₅₀ más bajos se obtuvieron para el zumo recién exprimido (FJ), mientras que los procesos de desamargado reducen la capacidad protectora de estos zumos tal y como se observa como resultado del análisis de los valores de IL₅₀. El zumo tratado con resina es el que presenta menor efecto protector sobre el daño oxidativo al DNA, y de los zumos desamargados enzimáticamente, el zumo procesado con naringinasa inmovilizada en PVA mostraba los mejores resultados.

Tabla 5.4. Efecto de los zumos sobre el daño oxidativo al DNA inducido por Cu²⁺/Ascórbico.

Muestra de zumo	IL ₅₀ (μL)
FJ	7,1 ± 0,5 ^a
N-PJ	31,4 ± 0,4 ^c
IN-PJ	20,7 ± 1,8 ^b
R-PJ	38,1 ± 1,2 ^d

FJ: zumo fresco, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA; R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con amberlite IR400. Los valores están expresados como media ± SD n=10. Valores con distinta letra son significativamente distintos (p<0,005). IL₅₀: volumen de zumo necesario para alcanzar una inhibición del 50%.

Los resultados de este apartado, corroboran los estudios que muestran que el zumo de pomelo tiene una elevada capacidad protectora sobre el daño oxidativo a lípidos y al DNA. Por otro lado, también muestran que el desamargado enzimático con naringinasa libre o inmovilizada es un método más adecuado para conservar la capacidad del zumo pomelo para inhibir la peroxidación lipídica y el daño oxidativo al DNA que el procesado con la resina de intercambio.

V. CORRELACIONES ENTRE CONTENIDO DE POLIFENOLES, NARINGINA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Se realizaron estudios de correlación para los zumos entre los niveles de polifenoles y de naringina y los distintos métodos utilizados para evaluar el estado antioxidante y el efecto protector sobre los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo.

En la Tabla 5.5 se muestran las correlaciones entre los niveles de polifenoles y naringina con los métodos de evaluación de capacidad antioxidante y estabilizadoras de radicales oxigénicos. En relación a la naringina, se obtuvieron correlaciones positiva con el FRAP y negativa con el radical hidroxilo. En relación, a esta correlación positiva entre la naringina y el FRAP hay que señalar que, previo al desamargado los zumos se someten a un proceso de pasteurización, y tal como se discutió previamente (Estudio 2), afectan a otros compuestos bioactivos con alta capacidad reductora, como el ácido ascórbico.

En relación a la actividad estabilizadora de radicales oxigénicos se observó una correlación negativa del contenido de naringina con el radical hidroxilo. Estos resultados nos indican que los zumos procesados enzimáticamente con menor contenido en naringina, presentan mayor capacidad estabilizadora del radical hidroxilo, ya que como se constata en estudios previos (Estudio 1 y 2) la presencia de los grupos hidroxilo en C-5 y C-7 de la aglicona (naringenina) le proporciona mayor capacidad estabilizadora de este radical que su glucósido naringina.

Tabla 5.5. Coeficientes de correlación entre los niveles de polifenoles, naringina y la capacidad antioxidante total y actividad estabilizadora de radicales superóxido e hidroxilo de los zumos.

	ABTS	FRAP	SRSA No-Enzimático	SRSA Enzimático	HRSA
Polifenoles	0,9395 (0,0000)	0,5606 (0,0036)	0,4020 (0,0464)	ns	0,6132 (0,0011)
Naringina	ns	0,8090 (0,0000)	ns	ns	-0,5575 (0,0038)

Las correlaciones fueron evaluadas por regresión lineal utilizando el software Statgraphics Plus. Solo se muestran los coeficientes lineales con $p \leq 0,05$ ($n=59$). SRSA, capacidad estabilizadora frente al radical superóxido; HRSA, capacidad estabilizadora frente al radical hidroxilo.

El estudio de correlaciones entre los niveles de polifenoles y de naringina de los zumos y los biomarcadores de daño oxidativo a lípidos y DNA se presentan en la tabla 5.6. Los resultados obtenidos muestran una correlación negativa entre polifenoles y daño a lípidos, lo que nos indica un mayor efecto protector del daño a lípidos inducido por ABAP, en aquellos zumos con mayor contenido en polifenoles.

En relación al DNA se observó una correlación negativa con la naringina, por lo tanto los zumos procesados al tener menor contenido en esta flavanona ejercerán menor efecto protector que el zumo fresco. Aunque tal y como observamos en los resultados, el efecto protector en los zumos de pomelo es dependiente del proceso de desamargado aplicado. Por lo tanto, este resultado nos indica que puede ser importante, dependiendo del procedimiento utilizado llegar a un equilibrio entre desamargado y los niveles de naringina.

Tabla 5.6. Coeficientes de correlación lineal entre polifenoles, naringina y biomarcadores de estrés oxidativo.

	Biomarcador de la peroxidación lipídica	Biomarcador del daño oxidativo al DNA (8OHdG/10⁵dG)
Polifenoles	-0,6199 (0,0024)	ns
Naringina	ns	-0,9665 (0,0000)

Las correlaciones fueron evaluadas por regresión lineal utilizando el software Statgraphics Plus. Solo se muestran los coeficientes lineales con $p \leq 0,05$ (n=59).

Con el fin de evaluar la posible correspondencia entre los resultados obtenidos para los distintos métodos empleados, se realizó el análisis de correlaciones de la capacidad antioxidante total, medida por el ABTS y el FRAP con la actividad estabilizadora de radicales oxigénicos y el efecto protector sobre lípidos y DNA (Tabla 5.7).

Los métodos estudiados para evaluar la capacidad antioxidante muestran correlaciones significativas con los métodos de estudio de la capacidad estabilizadora del radical superóxido y de biomarcadores de estrés oxidativo (Tabla 5.7), indicando la posible correspondencia entre los resultados obtenidos para los distintos métodos. De

los dos métodos el FRAP, indicador de la capacidad reductora, cuyos niveles eran más altos en el zumo fresco, mostró mejores correlaciones con la estabilización del radical superóxido así como con los biomarcadores del daño oxidativo a lípidos y DNA.

Tabla 5.7.- Coeficientes de correlación lineal entre la capacidad antioxidante, actividad scavenger, y biomarcadores de estres oxidativo

	SRSA No Enzimática	SRSA Enzimática	HRSA	Peroxidación lipídica	8OHdG/10 ⁵ dG
ABTS	ns	0,8503 (0,0000)	ns	-0,6092 (0,0012)	ns
FRAP	0,5807 (0,0145)	0,7010 (0,0008)	ns	-0,7555 (0,0000)	-0,8471 (0,0005)

Las correlaciones fueron evaluadas por regresión lineal utilizando el software Statgraphics Plus. Solo se muestran los coeficientes lineales con $p \leq 0,05$ (n=59). SRSA, capacidad estabilizadora frente al radical superóxido; HRSA, capacidad estabilizadora frente al radical hidroxilo.

Estos resultados indican que el tratamiento con naringinasa bajo las condiciones de ensayo aplicadas resulta ser un método adecuado para el desamargado de zumos de pomelo, ya que además de reducir los niveles de naringina dentro del rango de aceptación para el consumo, mantiene los compuestos bioactivos necesarios sin modificar las propiedades antioxidantes de los zumos, evaluadas a través de metodologías diversas.

6. CONCLUSIONES

El análisis global de los resultados expuestos en esta tesis doctoral permite establecer las siguientes conclusiones:

1. En relación al estudio comparativo de las flavanonas naringina y naringenina sobre su capacidad antioxidante y protectora del daño oxidativo a biomoléculas se puede concluir que:
 - La naringenina presenta mayor capacidad antioxidante y antiradicalaria, y es, además, mejor quelante de iones metálicos e inhibidor de la xantina oxidasa que su glucósido naringina.
 - La naringina y naringenina muestran distinta capacidad moduladora del estrés oxidativo frente a los lípidos, DNA y GSH. Estos resultados sugieren que puede ser interesante caracterizar la relación naringina/naringenina en los alimentos en los que se pretende evaluar sus efectos saludables.
2. El análisis de los resultados obtenidos en este estudio sobre la actividad antioxidante total, capacidad estabilizadora del radical hidroxilo y del radical superóxido, y la acción protectora a biomoléculas frente al estrés oxidativo de zumo de pomelo sometido a diferentes procesos de desamargado, permite establecer que:
 - El procesado del zumo de pomelo con naringinasa libre o inmovilizada además de reducir los niveles de naringina a niveles óptimos para el consumo, incrementa la capacidad antioxidante total del zumo, medida por el método del ABTS, y mejora sus características estabilizadoras de radicales superóxido e hidroxilo. Sin embargo, la capacidad reductora de estos zumos, niveles de FRAP, se ve disminuida en comparación con las muestras de zumo fresco, si bien este efecto puede ser más consecuencia del proceso de pasteurización previo, al que se someten las muestras de zumo, que de la acción de desamargado de la enzima naringinasa.
 - La disminución de los niveles de naringina en los zumos de pomelo procesados con naringinasa en solución, mejora el efecto protector sobre la inhibición de la peroxidación lipídica. Cuando la enzima se

inmoviliza se mantiene esta acción protectora de los zumos a niveles equiparables al zumo fresco.

- La inmovilización de la enzima naringinasa en PVA no modifica el efecto positivo del zumo sobre los biomarcadores de GSH comparado con el tratamiento con naringinasa libre.
- Los zumos procesados enzimáticamente mostraron un efecto protector sobre los biomarcadores de daño oxidativo al DNA (8-OHdG y ruptura de cadena). Sin embargo, la correlación obtenida entre los niveles de naringina de los zumos y su efecto protector sobre la base modificada indica un mayor efecto protector del zumo fresco, lo que indica la necesidad de mantener un equilibrio entre los niveles de la flavanona naringina como protectora del DNA y el sabor amargo.
- El tratamiento de desamargado con resinas de intercambio iónico (Amberlite®IRA-400), reduce significativamente los niveles del compuesto amargo naringina, pero resulta ser mucho menos efectivo que el método enzimático en preservar las características antioxidantes y el efecto sobre los biomarcadores de estrés oxidativo, disminuyendo, por tanto, las características saludables del zumo de pomelo.

De los resultados obtenidos en esta tesis se puede confirmar que la tecnología enzimática de desamargado, bien con el biocatalizador libre en solución o inmovilizado en un criogel de PVA, es más efectiva que la adsorción tradicional con resinas de intercambio ya que, además de reducir el amargor de los zumos a niveles aceptables, preserva e incluso en algunos aspectos mejora la capacidad antioxidante y de protección a biomoléculas de los zumos de pomelo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeyasinghe, D.C.; Li, X.; Sun, C.D.; Zhang, W.S.; Zhou, C.H.; Chen, K.S. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4): 1338-1344.
- Abudu, N.; Miller, J.J.; Attaelmannan, M.; Levinson, S.S. (2004). Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clinical Chimica Acta*, 339(1-2): 11-25.
- Adlercreutz, P. (1993). Immobilized enzymes. En: *Enzymes in Food Processing*. Eds. Nagodawthana, T., Reed, G. Academic Press, New York, pp. 103-119.
- Adlercreutz, H.; Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, 29(2): 95-120.
- Aguirre, R.; May, J.M. (2008). Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacology Therapy*, 119(1): 96-103.
- Aki, H.S.; Fujita, M.; Yamashita, S.; Fujimoto, K.; Kumagai, K.; Tsuruta, R.; Kasaoka, S.; Aoki, T.; Nanba, M.; Murata, H.; Yuasa, M.; Maruyama, I.; Maekawa, T. (2009). Elevation of jugular venous superoxide anion radical is associated with early inflammation, oxidative stress, and endothelial injury in forebrain ischemia-reperfusion rats. *Brain Research*, 1292: 180-190.
- Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M.J.; Serra, J. (1995). Beta-transelimination of citrus pectin catalyzed by *Penicillium italicum* pectin lyase in a membrane reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55(3): 249-259.
- Amic, D.; Davidovic-Amic, D.; Beslo, D.; Trinajstic, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76(1): 55-61.
- Andreyev, A.Y.; Kushnareva, Y.E.; Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70: 200-214.
- Ali, M.M.; Agha, F.G.; El-Sammad, N.M.; Hassan, S.K. (2009). Modulation of anticancer drug-Induced P-glycoprotein expression by naringin. *Journal of Biosciences*, 64(1-2): 109-116.
- Aliev, G.; Palacios, H.H.; Walrafen, B.; Lipsitt, A.E.; Obrenovich, M.E.; Morales, L. (2009). Brain mitochondria as a primary target in the development of treatment strategies for Alzheimer disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(10): 1989-2004.
- Amaro, M.I.; Rocha, J.; Vila-Real, H.; Eduardo-Figueira, M.; Mota-Filipe, H.; Repodes, B.; Ribeiro, M.H. (2009). Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Research International*, 42(8): 1010-1017.
- Amarowicz, R.; Carle, R.; Dongowski, G.; Durazzo, A.; Galensa, R.; Kammerer, D.; Maiani, G.; Piskula, M.K. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(S2): S151-S183.

- Apak, R.; Güçlü, K.; Ozyürek, M.; Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7970-7981.
- Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Ozyürek, M.; Celik, S.E.; Bektaşoğlu, B.; Berker, K.I.; Ozyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7): 1496-1547.
- Appendini, P.; Hotchkiss, J.H. (1997). Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. *Packaging Technology and Science*, 10(5): 271-279.
- Arena, E.; Fallico, B.; Maccarone, E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, 74(4): 423-427.
- Ariga, O.; Kato, M.; Sano, T.; Nakazawa, Y.; Sano Y. (1993). Mechanical and kinetic properties of immobilizing β -galactosidase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(3): 203-206.
- Arnao, M.B.; Cano, A.; Hernández-Ruiz, J.; García-Cánovas, F.; Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry*, 236(2): 255-261.
- Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9): 1355-1363.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. *ARS Pharmaceutica*, 39(2): 23-39.
- Aruna Devi, R.; Lata, S.; Bhadoria, B.K.; Ramteke, V.D.; Kumar, S.; Sankar, P.; Kumar, D.; Tandan, S.K. (2010). Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2''-O-galloyl)-beta-D-glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat. *European Journal of Pharmacology*, 626(2-3): 205-212.
- Aruoma, O.I.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B. (1993). Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11): 1880-1885.
- Aruoma, O.I. (1994). Deoxyribose assay of detection hydroxyl radicals. *Methods of Enzymology*, 233(5): 57-66.
- Asard, N. (2008). Ascorbate. En: *Redox Biochemistry*. Ed. Banerjee, R. Hoboken: A John Wiley and Sons, pp. 22-27.
- Attaway, J.A. (1977). Factors influencing the flavour of grapefruit juice. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, 3: 816-820.

- Aturki, Z.; Brandi, V.; Sinibaldi, M. (2004). Separation of flavanone-7-O-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17): 5303-5308.
- Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N.U.; Hadi, S.M. (2004). Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology In Vitro*, 18(5): 555-561.
- Azqueta, A.; Shaposhnikov, S.; Collins, A.R. (2009). DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research*, 674(1-2): 101-108.
- Bagga, V.; Bagga, V.; Fricker-Gates, R.A. (2008). Ascorbic acid increases the number of dopamine neurons in vitro and in transplants to the 6-OHDA-lesioned rat brain. *Cell Transplantation*, 17(7): 763-773.
- Bailey, D.G.; Malcolm, J.; Arnold, O.; Spence, J.D. (1998). Grapefruit juice-drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46(2):101-110.
- Bailey, D.G.; Dresser, G.K. (2004). Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 4(5): 281-297.
- Barbagallo, R.N.; Palmeri, R.; Fabiano, S.; Rapisarda, P.; Spagna, G. (2007). Characteristic of beta-glucosidase from sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5): 570-575.
- Bartsch, H.; Nair, J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Archives of Surgery*, 391(5): 499-510.
- Bate-Smith, E.C.; Swain, T. (1962). Flavonoid compounds. En: *Comparative biochemistry*. Eds. Florkin, M.; Mason, H.S. Academic Press, New-York, vol 3, pp. 75-809.
- Baynes, J.W.; Thorpe, S.R. (2000). Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(12): 1708-1716.
- Bedard, K.; Krause, K.H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1): 245-313.
- Bellion, P.; Will, D.F.; Dietrich, H.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Janzowski C. (2010). Polyphenolic Apple Extracts: Effects of Raw Material and Production Method on Antioxidant Effectiveness and Reduction of DNA Damage in Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11): 6636-6642.
- Benavente-García, O.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuño, A.; Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12): 4505-4515.
- Benavente-García O.; Castillo J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56(15): 6185-6205.

- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. (1996). Ferric reducing/ antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15-27.
- Berlett, B.S.; Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal Biological Chemistry*, 272(33): 20313-20316.
- Berndt, C.; Lillig, C.H.; Holmgren, A. (2007). Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology*, 292(3): H1227-H1236.
- Blair, I.A. (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(23): 15545-15549.
- Bloomer, R.J. (2007). Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: impact of dietary intake, *Nutrition Journal*, 6: 39.
- Bocco, A.; Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. (1997). The antioxidant activity of phenolic compounds measured by an accelerated test based on citronellal oxidation. *Sciences des Aliments*, 18: 13-24.
- Bodugoz-Senturk, H.; Macias, C.E.; Kung, J.H.; Muratoglu, O.K. (2009). Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*, 30(4): 589-596.
- Bocchetti, R.; Lamberti, C.V.; Pisanelli, B.; Razzetti, E.M.; Maggi, C.; Catalano, B.; Sesta, G.; Martuccio, G.; Gabellini, M.; Regoli, F. (2008). Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine Environmental Research*, 66(1): 24-26.
- BOE (1991). "Reglamentación Técnica Sanitaria para la elaboración y venta de zumos de fruta y otros productos similares". (R.D. 1650 del BOE del 20-11-91), pp. 278.
- Bors, W.; Hellers, W.; Michel, C.; Saran, M. (1990a). Radical chemistry flavonoids antioxidant. En: *Antioxidants in therapy and preventive medicine*. Ed. Emerit. Plenum Press, vol.1, pp. 165-170.
- Bors, W.; Hellers, W.; Michel, C.; Saran, M. (1990b). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*, 186: 343-355.
- Brigelius, R.; Muckel, C.; Akerboom, T.P.M. (1983). Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochemical Pharmacology*, 32(17): 2529-2534.
- Buege, J.A.; Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 52: 302-310.
- Buffa, A.; Bellenot, P. (1962). Variation in the naringin content of grapefruit juice in relation to technology of manufacture. *Fruits*, 17: 479-483.

- Busto, M.D.; Perez-Mateos, M. (2000). Characterization of beta-D-glucosidase extracted from soil fractions. *European Journal of Soil Science*, 51(2): 193-200.
- Busto, M.D.; Meza, V.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, 104(3): 1177-1182.
- Burda, S.; Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6): 2774-2779.
- Butt, M.S.; Sultan, M.T. (2009). Green tea: nature's defense against malignancies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(5): 463-473.
- Buthbumrung, N.; Mahidol, C.; Navasumrit, P.; Promvijit, J.; Hunsonti, P.; Autrup, H.; Ruchirawat, M. (2008). Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. *Chemico-Biological Interactions*, 172(3): 185-194.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58: 79-110.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6(4): 391-397.
- Cadenas, E. (2008). Sustancias flavonoides. www.antioxidantes.com.ar/Art020.htm.
- Cai, Y.Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25): 2872-2888.
- Calabro, M. L.; Galtieri, V.; Cutroneo, P.; Tommasini, S.; Ficarra, P.; Ficarra, R. (2004). Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(2): 349-363.
- Caldini, C.; Bonomi, F.; Pifferi, P.G.; Lanzarini, G.; Galante, Y.M. (1994). Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(4): 286-291.
- Cameron, R.G.; Manthey, J.A.; Baker, R.A.; Grohmann, K. (2001). Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9): 4457-4462.
- Cano, A.; Alcaraz, O.; Acosta, M.; Arnao, M.B. (2002). On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS*+ assay. *Redox Report*, 7(2): 103-109.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5): 749-760.
- Cárdenas-León, M.; Díaz-Díaz, E.; Argüelles-Medina, R.; Sánchez-Canales, P.; Díaz-Sánchez, V.; Larrea, F. (2009). Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis. *Revista de Investigación Clínica*, 61(6): 505-520.

- Cavia, M.; Busto, M.D.; Pilar-Izquierdo, M.C.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M.; Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7): 1238-1244.
- Ceaser, E.K.; Moellering, D.R.; Shiva, A.; Ramachandran, A.; Lander, A.; Venkartraman, A.; Crawford, J.; Patel, R.; Dickinson, D.A.; Ulasova, E.; Ji, S.; Darley-Usmar, V.M. (2004). Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochemical Society Transactions*, 32(1): 151-155.
- Chen, Y.C.; Shen, S.C.; Lin, H.Y. (2003). Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 66(7): 1139-1150.
- Chen, K.; Suh, J.; Carr, A.C.; Morrow, J.D.; Zeind, J.; Frei, B. (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 279(6): E1406-E1412.
- Cheng, K.C.; Cahill, D.S.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A---C substitutions. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1): 166-172.
- Cheryan, M. (1986). Membrane bioreactors. En: *Ultrafiltration Handbook*. Lancaster-Basel. New York, pp. 295-322.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(S1): 223S-229S.
- Chia, T.; Hsu, C.Y.; Chen, H.L. (2008). Oxidative damage of workers in secondary metal recovery plants affected by smoking status and joining the smelting work. *Industrial Health*, 46(2): 174-182.
- Chibata, I. (1978). Industrial application of immobilized enzyme-systems. *Pure and Applied Chemistry*, 50(7): 667-675.
- Chien, P.; Sheu F.; Shyu, Y. (2001). Monitoring enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9: 115-120.
- Chinta, S.J.; Andersen, J.K. (2008). Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11): 1362-1367.
- Cholbi, M.R.; Paya, M.; Alcaraz, M.J. (1991). Inhibitory effects of phenolic-compounds on ccl4-induced microsomal lipid-peroxidation. *Experientia*, 47(2): 195-199.
- Circu M.L.; Rodriguez C.; Maloney R.; Moyer M.P.; Aw T.Y. (2008). Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5): 768-778.
- Circu, M.L.; Aw, T.Y. (2008). Glutathione and apoptosis. *Free Radical Research*, 42(8): 689-706.

- Circu, M.L.; Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6): 749-762.
- Citrus Pages. (2009). <http://users.kymp.net/citruspages/introduction.html>, last update March, 2009.
- Codoñer-Franch, P.; López-Jaén, A.B.; Muñiz, P.; Sentandreu, E.; Bellés, V.V. (2008). Mandarin juice improves the antioxidant status of hypercholesterolemic children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47(3): 349-355.
- Codoñer-Franch, P.; López-Jaén, A.B.; de la Mano-Hernández, A.; Sentandreu, E.; Simó-Jordá, R.; Valls-Bellés, V. (2010). Oxidative markers in children with severe obesity following low-calorie diets supplemented with mandarin juice. *Acta Paediatrica*, 99(12): 1841-1846.
- Conte, A.; Buonocore, G.G.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M.; Del Nobile, M.A. (2006). Immobilization of lysozyme on polyvinylalcohol films for active packaging applications. *Journal of Food Protection*, 69(4): 866-870.
- Cook, R. (1983). Quality of citrus juices as related to composition and processing practices. *Food Technology*, 37(6): 68-71.
- Cook, N.C.; Samman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2): 66-76.
- Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *Faseb Journal*, 17: 1195-1214.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*, 26(8): 1001-1043.
- Dai, Q.; Borenstein, A.R.; Wu, Y.; Jackson, J.C.; Larson, E.B. (2006). Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *The American Journal of Medicine*, 119(9): 751-759.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, R.; Gustarini, D.; Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52(4): 601-623.
- Davalos, A.; de la Pena, G.; Sanchez-Martin, C.C.; Sanchez-Martin, C.C.; Guerra, M.T.; Bartolome, B.; Lasuncion, M.A. (2009). Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. *British Journal of Nutrition*, 102(8): 1125-1135.
- Dave, R.; Madamwar, D. (2006). Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. *Process Biochemistry*, 41(4): 951-955.
- Davis, W. (1947). Determination of flavanones in citrus. *Analytical Chemistry*, 19(7): 476-478.
- Dean, R.T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1): 1-18.

- Del Caro, A.; Piga, A.; Vacca, V.; Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84(1): 99-105.
- Del Nobile M.A.; Piergiovanni, L.; Buonocore G.G.; Fava, P.; Puglisi, M.L.; Nicolais, L.; (2003). Naringinase immobilization in polymeric films intended for food packaging applications. *Journal of Food Science*, 68(6): 2046-2049.
- Desiderio, C.; De Rossi, A.; Sinibaldi, M. (2005). Analysis of flavanone-7-O-glycosides in citrus juices by short-end capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1081(1): 99-104.
- Diaz-Juarez, J.A.; Tenorio-Lopez, F.A.; Zarco-Olvera, G.; del Valle-Mondragon, L.; Torres-Narvaez, J.C.; Pastelin-Hernandez, G. (2009). Effect of citrus paradisi extract and juice on arterial pressure both in vitro and in vivo. *Phytotherapy Research*, 23(7): 948-957.
- Di Majo, D.; Giammanco, M.; La Guardia, M.; Tripoli, E.; Giammanco, S.; Finotti, E. (2005). Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidant activity relationships. *Food Research International*, 38(10): 1161-1166.
- Dinelli, D.; Marconi, W.; Morisi, F. (1978). Fiber-entrapped enzymes. *Methods of Enzymology*, 44: 227-243.
- Dizdroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H. (2002). Free-radical induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11): 1102-1115.
- Draper, H.H.; Squires, E.J.; Mahmoodi, H.; Wu, J.; Agarwal, S.; Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(4): 353-363.
- Du, G.; Jin, L.; Han, X.; Song, Z.; Zhang, H.; Liang, W. (2009). Naringenin: a potential immunomodulator for inhibiting lung fibrosis and metastasis. *Cancer Research*, 69(7): 3205-3212.
- Dugas, A.J.; Castaneda-Acosta, J.; Bonin, G.C.; Price, K.L.; Fischer, N.H.; Winston G.W. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, 63(3): 327-331.
- Duthie, S.J.; Jenkinson, A.M.; Crozier, A.; Mullen, W.; Pirie, L.; Kyle, J.; Yap, L.S.; Christen, P.; Duthie, G.G. (2006). The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition*, 45(2): 113-122.
- Ekambaram, G.; Rajendran, P.; Magesh, V.; Sakthisekaran, D. (2008). Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutrition Research*, 28(2): 106-112.
- Ekshyyan, O.; Aw, T.Y. (2005). Decreased susceptibility of differentiated PC12 cells to oxidative challenge: relationship to cellular redox and expression of apoptotic protease activator factor-1. *Cell Death and Differentiation*, 12(9): 1066–1077.

- El-Hadi, A.A. (2003). Factors affecting the production of prednisolone by immobilization of *Bacillus pumilus* E601 cells in poly(vinyl alcohol) cryogels produced by radiation polymerization. *Process Biochemistry*, 38(12): 1659-1664.
- Ellenrieder, G.; Daz, M. (1996). Thermostabilization of naringinase from *Penicillium decumbens* by proteins in solution and immobilization on insoluble proteins. *Biocatalysis and Biotransformation*, 14(2): 113-123.
- Ellenrieder, G.; Blanco, S.; Dax, M. (1998). Hydrolysis of supersaturated naringin solutions by free and immobilized naringinase. *Biotechnology Techniques*, 12(1): 63-65.
- Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1): 81-128.
- Evans, M.D.; Dizdarogly, M.; Cooke, M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567: 1-61.
- Fearon, I.M.; Faux, S.P. (2009). Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(3): 372-381.
- Fellers, P. J. (1991). The relationship between the ratio of degrees Brix to percent acid and sensory flavor in grapefruit juice. *Food Technology*, 45(7): 68-75.
- Fernandes, P.; Marques, M.P.C.; Carvalho, F.; Cabral, J.M.S. (2009). A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(4): 561-564.
- Fernandez-Pachon, M.S.; Berna, G.; Otaolauruchi, E. (2009). Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15): 6578-6583.
- Ferreira, L.; Afonso, C.; Vila-Real, H.; Alfaia, A.; Ribeiro, M.H.L. (2008). Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2): 146-150.
- Finotti, E.; Di Majo, D. (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung-Food*, 47(3): 186-187.
- Finsterer, J. (2007). Is atherosclerosis a mitochondrial disorder?. *Vasa-Journal of Vascular Diseases*, 36(4): 229-240.
- Floyd, R.A. (1990). The development of a sensitive analysis for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Free Radical Research Communications*, 8(3): 139-141.
- Forman, H.J.; Fukuto, J.M.; Miller, T.; Zhang, H.; Rinna, A.; Levt, S. (2008). The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 477(2): 183-195.

- Forman, H.J.; Zhang, H.; Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2): 1-12.
- Foschi, R.; Pelucchi, C.; Dal Maso, L.; Rossi, M.; Levi, F.; Talamini, R.; Bosetti, C.; Negri, E.; Serraino, D.; Giacosa, A.; Franceschi, S.; La Vecchia, C. (2010). Citrus fruit and cancer risk in a network of case-control studies. *Cancer Causes and Control*, 21(2): 237-242.
- Franke, S.I.R.; Ckless, K.; Silveira, J.D.; Rubensam, G.; Brendel, M.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P. (2004). Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chemistry*, 88(1): 45-55.
- Frankel, E.N.; Finley, J.W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13): 4901-4908.
- Frei, B.; Higdon, J.V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *Journal of Nutrition*, 133(10): 3275S-32784S.
- Fung, T.T.; Rexrode, K.M.; Mantzoros, C.S.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; Hu, F.B. (2009). Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*, 119(8): 1093-1100.
- Gaetke, L.M.; Chow, C.K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2): 147-163.
- Galati, G.; Chan, T.; Wu, B.; O'Brien, P.J. (1999). Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, 12(6): 521-525.
- Galati, G.; Sabzevari, O.; Wilson, J.X.; O'Brien P.J. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177(1): 91-104.
- Gallego, M.; Pinaga, F.; Ramon, D.; Valles, S. (2001). Purification and characterization of an alpha-l-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *Journal of Food Science*, 66(2): 204-209.
- Galli, F. (2007). Interactions of polyphenolic compounds with drug disposition and metabolism. *Current Drug Metabolism*, 8(8): 830-838.
- García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Rostagno, M.A.; Martínez, J.A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9): 537-552.
- Garg, A.; Garg, S.; Zaneveld, L.J.D.; Singla, A.K. (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8): 655-669.
- Gardner, P.T.; White, T.A.C.; McPhail, D.B. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68(4): 471-474.

- Gattuso, G.; Barreca, D.; Gargiulli, C.; Leuzzi, U.; Caristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12(8): 1641-1673.
- Ghezzi, P. (2005). Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochemical Society Transactions*, 33(6): 1378-1381.
- Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11): 1106-1114.
- Gilbert, D.L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academic of Sciences*, 899(1): 1-14.
- Goddard, J.M.; Hotchkiss, J.H. (2007). Polimer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polimer Science*, 32(7): 698-725.
- Gorinstein, S.; Caspi, A.; Libman, I.; Lerner, H.T.; Huang, D.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Tashma, Z.; Katrich, E.; Feng, S.; Trakhtenberg, S. (2006). Red grapefruit positively influences serum triglyceride level in patients suffering from coronary atherosclerosis: studies in vitro and in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5): 1887-1892.
- Gorinstein, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Krzeminski, R.; Gralak, M.; Martin-Belloso, O.; Delgado-Licon, E.; Haruenkit, R.; Katrich, E.; Park, Y.S.; Jung, S.T. (2004). Fresh Israeli Jaffa blond (Shamouti) orange and Israeli Jaffa red Star Ruby (Sunrise) grapefruit juices affect plasma lipid metabolism and antioxidant capacity in rats fed added cholesterol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15): 4853-4859.
- Gorinstein, S.; Lojek, A.; Ciz, M.; Pawelzik, E.; Delgado-Licon, E.; Medina, O.J.; Moreno, M.; Salas, I.A.; Goshev, I.I. (2008). Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(4): 629-637.
- Gray, G.M.; Olson, A.C. (1981). Hydrolysis of high levels of naringin in grapefruit juice using a hollow fibre naringinase reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6): 1298-1301.
- Greenberg, M.E.; Li, X-M.; Gugiu, B.G.; Gu, X.; Qin, J.; Salomon R.G., Hazen S.L. (2008). The lipid Whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(4): 2385-2396.
- Griffith, F.P. (1969). Process for reactivating polyamides resins used in debittering citrus juice. US Patent 3,463,763.
- Guadagni, D.G.; Maier, V.P.; Turnbaug, J.H. (1974). Some factors affecting sensory thresholds and relative bitterness of limonin and naringin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(10): 1199-1205.
- Gupta, M.; Dobashi, K.; Greene, E.L.; Orak, J.K.; Singh, I. (1997). Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 176(2): 337-347.

- Hagedorn, S.; Kaphammer, B. (1994). Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annual Review of Microbiology*, 48: 773-800.
- Hageman, J.J.; Bast, A.; Vermeulen, N.P. (1992). Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects. *Chemico Biological Interactions*, 82(3): 243-293.
- Hagen, R.E.; Dunlap, W.J.; Wender, S.H. (1966). Seasonal variation of naringin and certain other flavanone glycosides in juice sacs of texas ruby red grapefruit. *Journal of Food Science*, 31(4): 542-547
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (1981). Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Letters*, 128(2): 347-352.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free radical in biology and Medicine*. Oxford, Clarendon, 1,142.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communication*, 9(1): 1-32.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16: 33-50.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2): 107-112.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 1(2): 312-322.
- Hämäläinen, M.; Nieminen, R.; Vuorela, P.; Heinonen, M.; Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*, 45673-45682.
- Hammond, L.E.; Albright, C.D.; He, L.H.; Rusyn I.; Watkins SM.; Doughman SD.; Lemasters JJ.; Coleman RA. (2007). Increased oxidative stress is associated with balanced increases in hepatocyte apoptosis and proliferation in glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 deficient mice. *Experimental and Molecular Pathology*, 82(2): 210-219.
- Han, Y.J.; Chen, H.Z. (2008). Characterization of beta-glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 99(14): 6081-6087.
- Harborne, J.B.; Simmonds, N.W. (1964) En: *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Ed. Harborne, J.B. Academic Press, London, pp. 77-127.
- Harris, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *Journal of Nutrition*, 122(3S): 625-626.

- Harrison, F.E.; May, J.M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical in Biology and Medicine*, 46(6): 719-730.
- Hasegawa, S.; Maier, V.P. (1983). Solutions to the limonin bitterness problem of citrus juices. *Food Technology*, 37(6): 73-77.
- Heim, K.E.; Tagliafero, A.R.; Bobyla, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.
- Hernández, E.; Couture, R.; Rouseff, R.; Chen, C. S.; Barros, S. (1992). Evaluation of ultrafiltration and adsorption to debitter grapefruit juice and grapefruit pulp wash. *Journal of Food Science*, 57(3): 664-670.
- Hodnick, W.F.; Roettger, W.J.; Kung, F.S.; Bohmont, C.W.; Pardini, R.S. (1986). Inhibition of mitochondrial respiration and production of superoxide and hydrogen peroxide by flavonoids: a structure activity study. *Progress in Clinical Biological Research*, 213: 249-252.
- Holmgren, A.; Bjornstedt M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods of Enzymology*, 252: 199-208.
- Hong, P.; Chou, C.; He, C. (2001). Solvent effects on aggregation behaviour of polyvinyl alcohol solutions. *Polymer*, 42(14): 6105-6112.
- Hong, J.; Lu, H.; Meng, X.; Ryu, J.H.; Hara, Y.; Yang, C.S.(2002). Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, 62(24): 7241-7246.
- Hsia, S.M.; Kuo, Y.H.; Chiang, W.; Wang, P.S. (2008). Effects of adlay hull extracts on uterine contraction and Ca²⁺ mobilization in the rat. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 295(3): E719-726.
- Hu J.; La Vecchia, C.; Negri, E.; DesMeules, M.; Mery, L.; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. (2009). Dietary vitamin C, E, and carotenoid intake and risk of renal cell carcinoma. *Cancer Causes Control*. 20(8): 1451-1458.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-1856.
- Hubbard, G.P.; Wolfram, S.; Lovegrove, J.A.; Gibbins, J.M. (2003). The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2): 469-478.
- Huber, D.; Rudolf, J.; Ansari, P.; Galler, B.; Fuhrer, M.; Hasenhindl, C.; Baumgartner, S. (2009). Effectiveness of natural and synthetic blocking reagents and their application for detecting food allergens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(2): 539-548.
- Huggins, T.G.; Wells-Knecht, M.C.; Detorie, N.A.; Baynes, J.W.; Thorpe, S.R. (1993). Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17): 12341-12347.

- Idris, A.; Zain, N.A.M.; Suhaimi, M.S. (2008). Immobilization of Baker's yeast invertase in PVA-alginate matrix using innovative immobilization technique. *Process Biochemistry*, 43(4): 331-338.
- Igual, M.; García-Martínez, E.; Camacho, M.M.; Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 118(2): 291-299.
- Inoue, M.; Sato, E.F.; Nishikawa, M.; Park, A.M.; Kira, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10(23): 2495-2505.
- Iwata, N.; Okazaki, M.; Kamiuchi, S.; Hibino, Y. (2010). Protective effects of oral administrated ascorbic acid against oxidative stress and neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic rats. *Journal of Health Science*, 56(1): 20-30.
- Jagetia, G.C.; Reddy, T.K.; Kedlaya, R. (2004). Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage *in vitro*. *Clinical Chimical Acta*, 347(1-2): 189-197.
- Jagetia, A.; Jagetia, G.C.; Jha, S. (2007). Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *Journal applied of Toxicology*, 27(2): 122-132.
- Janero, D.R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6): 515-540.
- Jin, C.Y.; Park, C.; Lee, J.H.; Chung, K.T.; Kwon, T.K.; Kim, G.Y.; Choi, B.T.; Choi, Y.H. (2009). Naringenin-induced apoptosis is attenuated by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human leukemia U937 cells. *Toxicology in Vitro*. 23(2): 259-265.
- Johnson, R.; Chandler, B. (1982). Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(3): 287-293.
- Johnson, R.; Chandler, B. (1985) Ion exchange and adsorbent resins for removal of acids and bitter principles from citrus juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(6): 480-484.
- Johnson, R.; Chandler, B. (1988). Adsorptive removal of bitter principles and titratable acid from citrus juices. *Food Technology*, 42: 130-137.
- Jones, D.P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 295(4): 849-868.
- Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2): 101-110.

- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10): 3954-3962.
- Khan, N.; Afaq, F.; Mukhtar, H. (2008). Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: Progress and promise. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(3): 475-510.
- Kanno, S.; Shouji, A.; Hirata, R.; Asou, K.; Ishikawa, M. (2004). Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Life Science*, 75(3): 353-365.
- Katsiki, N.; Manes, C.H. (2009). Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis?. *Clinical Nutrition*, 28(1): 3-9.
- Keen, C.L.; Holt, R.R.; Oteiza, P.I.; Fraga, C.G.; Schmitz, H.H. (2005). Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(S1): 298S-303S.
- Kell, D.B. (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Medical Genomics*, 2: 2.
- Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S. (1983). En: *Solid Phase Biochemistry*. Ed. Schouten, W.H. Wiley Pub., New York.
- Khan, N.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H. (2008). Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 76(11): 1333-1339.
- Kim, J.; Kim, M.K.; Lee, J.K.; Kim, J.H. ; Son, S.K.; Song, E.S.; Lee, K.B.; Lee, J.P.; Lee, J.M.; Yun, Y.M. (2010). Intakes of vitamin A, C, and E, and beta-carotene are associated with risk of cervical cancer: a case-control study in Korea. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 62(2): 181-189.
- Kim, T.J.; Silva, J.L.; Jung, Y.S. (2010). Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chemistry*, 118(3): 740-746.
- Klei, H.E.; Sundstrom, D.W.; Shim, D. (1985). Immobilization of enzymes by microencapsulation. En: *Immobilized cells and enzymes: a practical approach*. Ed. Woodward, J. IRL Press, pp. 49-54.
- Koc, A.; Gladyshev, V.N. (2007). Methionine sulfoxide reduction and the aging process. *Annals of the New York Academic of Sciences*, 1100: 383-386.
- Koeberle, A.; Northoff, H.; Werz, O. (2009). Curcumin blocks prostaglandin E-2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E-2 synthase-1. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(8): 2348-2355.
- Kohen, R. (1999). Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 53(4): 181-192.

- Kojo, S. (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 11(8): 1041-1064.
- Konno, A.; Misaki, M.; Toda, J.; Wada, T.; Yasumatsec, K.; (1982). Bitterness reduction of citrus fruits by β -cyclodextrin. *Agricultural Biology and Chemistry*, 46(8): 2203-2208.
- Körner, B.; Zimmermann, G.; Berk, Z. (1980). Orange pectinesterase - purification, properties, and effect on cloud stability. *Journal of Food Science*, 45(5): 1203-1206.
- Kovacic, P.; Pozos, R.S.; Somanathan, R.; Shangari, N.; O'Brien, P.J. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 12(22): 2601-2623.
- Kulbe, K.; Howaldt, M.; Schmidt, K.; Röthing, T.; Chmiel, H. (1984). Rejection and continuous regeneration of native coenzyme NADPH in a charged ultrafiltration membrane enzyme reactor. *Annals of the New York Acadademic of Sciences*, 613: 820-826.
- Lambert, J.D.; Sang, S.; Yang, C.S. (2007). Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chemical Research in Toxicology*, 20(4): 583-585.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3): 181-189.
- Lavelli, V. (2008). Antioxidant activity of minimally processed red chicory (*Cichorium intybus* L.) evaluated in xanthine oxidase, myeloperoxidase, and diaphorase catalyzed reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16): 7194-7200.
- Lee, H.S. (2000). Objective measurement of red grapefruit juice color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5): 1507-1511.
- Lee, H. S.; Kim, J. G. (2003). Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *Food Chemistry*, 82(2): 177-180.
- Lee, E.J.; Moon, G.S.; Choi, W.S.; Kim, W.J.; Moon, S.K. (2008). Naringin-induced p21WAF1-mediated G(1)-phase cell cycle arrest via activation of the Ras/Raf/ERK signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12): 3800-3807.
- Leifert, W.R.; Abeywardena, M.Y. (2008). Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. *Nutrition Research*, 28(12): 842-850.
- Lesschaeve, I.; Noble, A.C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Nutrition Research*, 81(S1): 330S-335S.
- Lester, G.E.; Manthey, J.A; Buslig, B.S. (2007). Organic vs conventionally grown Rio Red whole grapefruit and juice: comparison of production inputs, market quality, consumer acceptance, and human health-bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11): 4474-4480.

- Leuzzi, U.; Caristi, C.; Panzera, V.; Licandro, G. (2000). Flavonoids in pigmented orange juice and second-pressure extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11): 5501-5506.
- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186: 464-478.
- Levine, R.L.; Stadtman, E.R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36(9): 1495-1502.
- Levine, M.; Padayatty, S.; Wang, Y. (2006). Vitamin C. En: *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. Ed. Stipanik, M.H. W B Saunders Company, St.Louis, pp. 760-796.
- Li, C.Y.; Jackson, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(2): C227-C241.
- Lichtenthaler, R.; Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(1): 103-110.
- Lima, G.P.P.; Cardoso Lopes, T.V.; Rossetto, M.R.M.; Vianello, F. (2009). Nutritional composition, phenolic compounds, nitrate content in eatable vegetables obtained by conventional and certified organic grown culture subject to thermal treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(6): 1118-1124.
- Lime, B. (1977). Grapefruit products. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, 3: 781-783.
- Limón-Pacheco, J.; Gonsebatt, M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2): 137-147.
- Linster, C.L.; Van Schaftingen, E. (2007). Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*, 274(1): 1-22.
- Liotus, T.S.; Chu, O. (2000). Citrus products in corporately pulp processing by diafiltration. US Patent US 6,054,168.
- Liu, Y.; Liang, C.; Liu, X.; Liao, B.; Pan, X.; Ren, Y.; Fan, M.; Li, M.; He, Z.; Wu, J.; Wu, Z. (2010). AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways. *Atherosclerosis*, 208(1): 34-42.
- Liu, C.; Shang, Y.F.; Zhang, X.F.; Zhang, X.G.; Wang, B.; Wu, Z.; Liu, X.M.; Yu, L.; Ma, F.; Lv, Y. (2009). Co-administration of grapefruit juice increases bioavailability of tacrolimus in liver transplant patients: a prospective study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(9): 881-885.

- Liu, F.; Ooi, V.E.C.; Chang, S.T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science*, 60(10): 763-771.
- López-Lázaro, M. (2007). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters*, 252(1): 1-8.
- Lopéz-Ulibarri, R.; Hall, G. (1997). Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(6): 398-404.
- Lo Scalzo, R.; Iannocari, T.; Summa, C.; Morelli, R.; Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Food Chemistry*, 85(1): 41-47.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Lozinsky, V.I.; Plieva, F.M. (1998). Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. Overview of recent research and developments. *Enzyme Microbiology and Technology*, 23(3-4): 227-242.
- Lozinsky, V.I.; Galaev, I.Y.; Plieva, F.M.; Savinal, I.N.; Jungvid, H.; Mattiasson, B. (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21(10): 445-451.
- Luckarift, H.R.; Spain, J.C.; Naik, R.R.; Stone, M.O. (2004). Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology*, 22(2): 211-213.
- Ma, L.; Lin, X.M. (2010). Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *Journal of Science and Food Agriculture*, 90(1): 2-12.
- Macheix, J.J.; Fleuriet, A.; Billot, J. (1990). En: *Fruit phenolics*. CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-4968-0 1.
- McCord, J.M.; Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
- Magalhaes, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1): 1-19.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5): 727-747.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 230S-242S.
- Manjón, A.; Bastida J.; Romero, C.; Jimeno, A.; Iborra, J.L. (1985). Immobilization of naringinase on glycophase coated porous glass. *Biotechnology Letters*, 7(7): 477-482.

- Mansell, R.L.; McIntosh, C.A.; Vest, S.E. (1983). An analysis of the limonin and naringin content of grapefruit juice samples collected from Florida state test houses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(1): 156-162.
- Manthey, J.A.; Guthrie, N.; Grohmann, K. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 135-153.
- Manthey, J.A.; Buslig, M.S. (2005). Distribution of furanocoumarins in grapefruit juice fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13): 5158-5163.
- Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3): 361-370.
- Martearena, M.R.; Daz, M.; Ellenrieder, G. (2008). Synthesis of rutinoides and rutinose by reverse hydrolysis catalyzed by fungal alpha-L-rhamnosidases. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(3): 177-185.
- Marti, N.; Mena, P.; Canovas, J.A.; Micol, V.; Saura, D. (2009). Vitamin C and the Role of Citrus Juices as Functional Food. *Natural Product Communications*, 4(5): 677-700.
- Martínez Alvarez, J.R.; Bellés, V.V.; López-Jaén, A.B.; Marín, A.V.; Codoñer-Franch P. (2009). Effects of alcohol-free beer on lipid profile and parameters of oxidative stress and inflammation in elderly women. *Nutrition*, 25(2): 182-187.
- Martínez-Gonzalez, M.A.; de la Fuente-Arrillaga, C.; Nunez-Cordoba, J.M.; Basterra-Gortari, F.J.; Beunza, J.J.; Vazquez, Z.; Benito, S.; Tortosa, A.; Bes-Rastrollo, M. (2008). Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. *British Medical Journal*, 336(7657): 1348-1351.
- Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10): 577-586.
- Mathiesen, L.; Malterud, K.E.; Sund, R.B. (1997). Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: A structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2): 307-311.
- Mein, J.R.; Lian, F.; Wang, X.D. (2008). Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. *Nutrition Reviews*, 66(12): 667-683.
- Meister, A.; Tate, S.S. (1976). Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annual Review of Biochemistry*, 45: 559-604.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2004). Stability of carotenoid pigments in foods. *Archivos Latinoamericano de Nutrición*, 54(2): 209-215.
- Mendez, M.A.; Popkin, B.M.; Jakszyn, P.; Berenguer, A.; Tormo, M.J.; Sánchez, M.J.; Quirós, J.R.; Pera, G.; Navarro, C.; Martínez, C.; Larrañaga, N.; Dorronsoro, M.; Chirlaque, M.D.; Barricarte, A.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; Agudo, A.; González, C.A.

- (2006). Adherence to a Mediterranean diet is associated with reduced 3-year incidence of obesity. *The Journal of Nutrition*, 136(11): 2934-2938.
- Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O.; Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3): 235-248.
- Mikirova, N.A.; Casciari, J.J.; Riordan, N.H. (2010). Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo. *Journal of Angiogenesis Research*, 2: 2.
- Miller, D.M.; Buettner, G.R.; Aust, S.D. (1990). Transition-metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1): 95-108.
- Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4): 407-412.
- Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay. *Free Radical Research*, 26(3): 195-199.
- Mink, P.J.; Scrafford, C.G.; Barraj, L.M.; Harnack, L.; Hong, C.P.; Nettleton, J.A.; Jacobs, D.R.Jr. (2007). Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3): 895-909.
- Minoura, N.; Koyano, T.; Koshizaki, N. (1998). Preparation, properties, and cell attachment/growth behavior of PVA/chitosan-blended hydrogels. *Materials Science and Engineering*, 6(4): 275-280.
- Mishra, P.; Kar, R. (2003). Treatment of grapefruit juice for bitterness removal by Amberlite IR 120 and Amberlite IR 400 and alginate entrapped naringinase enzyme. *Food Chemistry and Toxicology*, 68(4): 1229-1233.
- Miyake, M.; Shimata, M.; Osajima, Y.J.; Inaba, N.; Ayano, S.; Ozaki, Y.; (2000). Extraction and recovery of limonoids with super critical carbon dioxide micro bubble method. *ACS Symposium. Series. (citrus limonoids)*, 758: 96-106.
- Miyake, H.; Hara, I.; Kamidono, S.; Eto, H. (2004). Prognostic significance of oxidative DNA damage evaluated by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urology*, 64(5): 1057-1061.
- Montero, M.A.; Romeu, A. (1992). Kinetic-study on the beta-glucosidase-catalyzed reaction of trichoderma-viride cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(3): 350-353.
- Moore, G.A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of citrus from molecular markers. *Trends in Genetics*, 117(9): 536-540.
- Mora, A.; Payá, M.; Rios, J.L.; Alcaraz, M.J. (1990). Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 40(4): 793-797.

- Muller, F.L.; Song, W.; Jang, Y.C.; Liu, Y.; Sabia, M.; Richardson, A.; Van Remmen, H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 293(3): R1159-1168.
- Muñiz, P.; Sáez, G.; Valls, V. (2000). Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato. En: *Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina*. Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, pp: 63-70.
- Muñiz, P.; Valls, V.; Perez-Broseta, C.; Iradi, A.; Climent, J.V., Oliva, M.; Sáez, G. T. (1995). The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Rifamycin-induced DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(4): 747-755.
- Mutlu-Türkoğlu, U.; İlhan, E.; Öztezcan, S.; Kuru, A.; Aykaç-Toker, G.; Uysal, M. (2003). Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clinical Biochemistry*, 36(5): 397-400.
- Nagahara, N. (2010). Intermolecular disulfide bond to modulate protein function as a redox-sensing switch. *Amino Acids*. In press.
- Nagel, G.; Linseisen, J.; van Gils, C.H.; Peeters, P.H.; Boutron-Ruault, M.C.; Clavel-Chapelon, F.; Romieu, I.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Roswall, N.; Witt, P.M.; Overvad, K.; Rohrmann, S.; Kaaks, R.; Drogan, D.; Boeing, H.; Trichopoulou, A.; Stratigakou, V.; Zylis, D.; Engeset, D.; Lund, E.; Skeie, G.; Berrino, F.; Grioni, S.; Mattiello, A.; Masala, G.; Tumino, R.; Zanetti, R.; Ros, M.M.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Ardanaz, E.; Sánchez, M.J.; Huerta, J.M.; Amiano, P.; Rodríguez, L.; Manjer, J.; Wirfält, E.; Lenner, P.; Hallmans, G.; Spencer, E.A.; Key, T.J.; Bingham, S.; Khaw, K.T.; Rinaldi, S.; Slimani, N.; Boffetta, P.; Gallo, V.; Norat, T.; Riboli, E. (2010). Dietary beta-carotene, vitamin C and E intake and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(3): 753-765.
- Nahmias, Y.; Goldwasser, J.; Casali, M.; van Poll, D.; Wakita, T.; Chung, R.T.; Yarmush, M.L. (2008). Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*. 47(5): 1437-1445.
- Nakamura, H.; Nakamura, K.; Yodoi, J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annual Review of Immunology*, 15: 351-369.
- Nair, U.; Bartsch, H.; Nair J. (2007). Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(8): 1109-1120.
- Nakabeppu, Y.; Sakumi, K.; Sakamoto, K.; Tsuchimoto, D.; Tsuzuki, T.; Nakatsu, Y. (2006). Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biological Chemistry*, 387(4): 373-379.
- Nameikaite-Cnienė, A.; Imbrasaitė, A.; Sergedienė, E.; Cenas, N. (2005). Quantitative structure-activity relationships in prooxidant cytotoxicity of Polyphenols: Role of potential of phenoxyl radical/phenol redox couple. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441(2): 182-190.

- Navarro, J.; Pérez, R.; Gasque, F.; Lafuente, B. (1979). Influencia de las características del zumo de naranja sobre su calidad y estabilidad durante el almacenamiento aséptico refrigerado. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 20: 389-398.
- Navratil, M.; Gemeiner, P.; Klein, J.; Sturdik, E.; Malovikova, A.; Nahalka, J.; Vikartovska, A.; Domeny, Z.; Smogrovicova, D. (2002). Properties of hydrogel materials used for entrapment of microbial cells in production of fermented beverages. *Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology*, 30(3): 199-218.
- Neuhouser, M.L. (2004). Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 50(1): 1-7.
- Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4): 418-42
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5): 469-484.
- Nogata, Y.; Sakamoto, K.; Shiratsuchi, H.; Ishii, T.; Yano, M.; Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(1): 178-192.
- Noguchi, N. (2008). Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 43(1): 131-138.
- Nordberg, J.; Arnér, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1287-1312.
- Norouzian, D.; Hosseinzadeh, A.; Inanlou, D.N.; Moazami, N. (1999). Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(4): 501-502.
- Nunes, M.; Vila-Real, H.; Fernandes, P.; Ribeiro, M. (2009). Immobilization of naringinase in PVA-alginate matrix using an innovative technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7): 2129-2147.
- Oak, M.H.; Chataigneau, M.; Keravis, T.; Chataigneau, T.; Beretz, A.; Andriantsitohaina, R.; Stoclet, J.C.; Chang, S.J.; Schini-Kerth, V.B. (2003). Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23(6): 1001-1007.
- Okamoto, M.; Ueno, Y. (2006). Is sudden death with vitamin C deficiency caused by lack of carnitine?. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 13(1): 26-29.
- Oliva, M.R.; Muñoz, P.; Valls, V.; Iradi, A.; Catalá, M.D.; Cañete-Nicolás, C. (1997). Radicales libres y modificación oxidativa del ADN. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana. En: Cascales M. *Bioquímica y*

- Fisiopatología del estrés oxidativo*. Ed. Real Academia de Farmacia. Monografía IV: Fundación José Casares Gil, pp. 127-158.
- Ono, M.; Tosa, T.; Chibata, I. (1977). Preparation and properties of naringinase immobilized by ionic binding to DEAE-Sephadex. *Journal of Fermentation Technology*, 55(1): 493-498.
- Ortuño, A.; Baidez, A.; Gómez, P.; Arcas, M.C.; Porras, I.; García-Lido, A.; Del Río, J.A. (2006). Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 98(2): 351-358.
- Ohshima, H.; Yoshie, Y.; Auriol, S.; Gilibert, I. (1998). Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(9): 1057-1065.
- Pallardó, F.V.; Markovic, J.; García, J.L.; Viña, J. (2009). Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2): 77-85.
- Panesar, P.S.; Panesar, R.; Singh, R.S.; Kennedy J.F.; Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of beta-d-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(4): 530-543.
- Parascandola, P.; Branduardi, P.; de Alteriis, E. (2006). PVA-gel (Lentikats (R)) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2): 184-189.
- Park, J.H.; Jin, C.Y.; Lee, B.K.; Kim, G.Y.; Choi, Y.H.; Jeong, Y.K. (2008). Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12): 3684-3690.
- Park, N.H.; Chang, H.N. (1979). Preparation and characterization of immobilized naringinase on porous-glass beads. *Journal of Fermentation Technology*, 57(4): 310-316.
- Passamonti, S.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. (2002). The interaction of anthocyanins with bilirubin translocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(3): 631-636.
- Pastor, N.; Weinstein, H.; Jamison, E.; Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of Molecular Biology*, 304(1): 55-68.
- Pastore, G.; Federici, E.; Bertini, F. (2003). Piemonte, Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinical Chimica Acta*, 333(1): 19-39.
- Pedro, H.A.L.; Alfaia, A.J.; Marques, J.; Vila-Real, H.J.; Calado, A.; Ribeiro, M.H.L. (2007). Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure. *Enzyme and microbial technology*, 40(3): 442-446.
- Peleg, H.; Niam, M.; Rouseff, R.L.; Zehavi, U. (1991). Distribution of bound and free polyphenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*Citrus paradise*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57, 417-426.

- Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.S.; Rice-Evans, C.A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Pervaiz, S.; Clement, M.V. (2007). Superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species?. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(7-8): 1297-1304.
- Peterson, J.J.; Beecher, G.R.; Bhagwat, S. A.; Dwyer, J. T.; Gebhardt, S.E.; Haytowitz, D. B. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(S1): S74-S80.
- Peterson, J.; Dwyer J. (2000). An informatics approach to flavonoid data-base development. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(4): 441-454.
- Peterson, J.; Dwyer, J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18(12): 1995-2018.
- Pino, J.A. (1997). Flavonoids presents in citrus fruits. *Alimentaria*, 286: 63-79
- Pietta, PG. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7): 1035-1042.
- Poulose, S.M.; Harris, E.D.; Patil, B.S. (2005). Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *Journal of Nutrition*, 135(4): 870-877.
- Prakash, S.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P.R. (2002). Enzymic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradisi*) juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4): 394-397.
- Prior, R.L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3): 570S-578S.
- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302.
- Proteggente, A.R.; Pannala, A.S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van De Put, F.; Dacombe, C.; Rice-Evans, C.A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36(2): 217-233.
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(1): 141-164.
- Pulido, R.; Hernandez-García, M.; Saura-Calixto, F. (2003). Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(10): 1275-1282.

- Puri, M.; Marwaha, S.S. (1996), Studies on the applicability of alginate-entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4): 281-285.
- Puri, M.; Banerjee, U.C. (2000). Production, purification and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, 18(3): 207-217.
- Puri, M.; Seth, M.; Marwaha, S.S.; Kothari, R.M. (2001). Debittering of kinnow mandarin juice by covalently bound naringinase on hen egg white. *Food Biotechnology*, 15(1): 13-23.
- Puri, M.; Kaur, H.; Kennedy J.F. (2005). Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(10): 1160-1165.
- Puri, M.; Kaur, A.; Kanwar, J.R.; Singh, R.S. (2008). Immobilized enzymes for debittering citrus juices. En: *Food enzymes: application of new technologies* Ed. Busto, M.D.; Ortega, N. Trivandrum: Trasworld Research Network, pp. 91-103.
- Rahman I. (2009). *Asthma and COPD (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 293-312.
- Rajadurai, M.; Stanely Mainzen Prince, P. (2006) Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: Biochemical and histopathological evidences. *Toxicology*, 228(2-3): 259-268.
- Rajal, V.B.; Cid, A.G.; Ellenrieder, G.; Cuevas, C.M. (2009). Production, partial purification and characterization of alpha-L-rhamnosidase from *Penicillium ulaiense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6): 1025-1033.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545(1): 51-64.
- Ramesh, B.N.; Rao, T.S.; Prakasam, A.; Sambamurti, K.; Rao, K.S. (2010). Neuronutrition and Alzheimer's disease. *The Journal of Alzheimer's Disease*, 19(4): 1123-1139.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(5): 507-526.
- Rapisarda, P.; Pannuzzo, P.; Romano, G.; Russo, G. (2003). Juice components of a new pigmented citrus hybrid *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6): 1611-1616.
- Ratty, A.K.; Sunamoto, J.; Das, N.P. (1988). Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free-radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochemical Pharmacology*, 37(6): 989-995.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.

- Renugadevi, J.; Prabu, S.M. (2009). Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*, 256(1-2): 128-134.
- Rhoden, C.R.; Ghelfi, E.; González-Flecha, B. (2008). Pulmonary inflammation by ambient air particles is mediated by superoxide anion. *Inhalation Toxicology*, 20(1): 11-15.
- Ribeiro, M.H.L.; Silveira, D.; Ferreira-Dias, S. (2002). Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents. *European Food Research and Technology*, 215(6): 462-471.
- Ribeiro, I.A.; Rocha, J.; Sepodes, B.; Mota-Filipe, H.; Ribeiro, M. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 52(3): 13-18.
- Ribeiro, D.S.; Henrique, S.M.B.; Oliveira, L.S.; Macedo, G.A.; Fleuri, L.F. (2010a). Enzymes in juice processing: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(4): 635-641.
- Ribeiro, M.H.L.; Afonso, C.; Vila-Real, H.J.; Alfaia, A.J.; Ferreira, L. (2010b). Contribution of response surface methodology to the modeling of naringin hydrolysis by naringinase Ca-alginate beads under high pressure. *LWT-Food Science and Technology*, 43(3): 482-487.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933-956.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4): 152-159.
- Richter, C. (1992). Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Research*, 275: 249-255.
- Rivero, D.; Pérez-Magariño, S.; González-Sanjosé, M.L.; Valls-Belles, V.; Codoñer, P.; Muñiz, P. (2005). Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9): 3637-3642.
- Rivero-Pérez, M.D.; Muñiz, P.; González-Sanjosé, M.L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14): 5476-5483.
- Rivero-Pérez, M.D.; Muñiz, P.; González-Sanjosé, M.L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8): 2815-2822.
- Robak, J.; Gryglewski, R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37(5): 837-841.
- Robards, K.; Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *A Review Analyst*, 122(2): R11-R34.

- Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4): 401-436.
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10): 2866-2887.
- Rodrigo, R.; Guichard, C.; Charles, R. (2007). Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 21(2): 111-127.
- Romier-Crouzet, B.; Van De Walle, J.; During, A.; Joly, A.; Rousseau, C.; Henry, O.; Larondelle, Y.; Schneider, Y.J. (2009). Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry and Toxicology*, 47(6): 1221-1230.
- Rossner, P.; Svecovaa, V.; Milcovaa, A.; Lnenickovaa, Z.; Solanskya, I.; Sram, R.J. (2008). Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part II. Oxidative damage to lipids and proteins. *Mutation Research*, 642: 21-27.
- Röthing, R.R.; Kulbe, K.D.; Bückmann, F.; Carrea, G. (1990). Continuous coenzyme dependent stereoselective synthesis of sulcatol by alcohol dehydrogenase. *Biotechnology Letters*, 12: 353-356.
- Rothschild, G.; Karsenty, A. (1974). Cloud loss during storage of pasteurized citrus juices and concentrates. *Journal of Food Science*, 39(5): 1037-1041.
- Rouseff, R.L.; Perez-Cacho, P.R.; Jabalpurwala, F. (2009). Historical review of citrus flavor research during the past 100 years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18): 8115-8124.
- Roy, P.; Nigam, N.; Singh, M.; George, J.; Srivastava, S.; Naqvi, H.; Shukla, Y. (2010). Tea polyphenols inhibit cyclooxygenase-2 expression and block activation of nuclear factor-kappa B and Akt in diethylnitrosoamine induced lung tumors in Swiss mice. *Investigational New Drugs*, 28(4): 466-471.
- Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Sorrenti, V.; Giacomo, C.Di.; Virgata, G.; Barcellona, M.L.; Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*, 16(2): 91-98.
- Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Elez-Martinez, P.; De Ancos, B.; Martin-Belloso, O.; Cano, M.P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11): 4403-4409.
- Sarathchandra, S.U.; Perrott, K.W. (1984). Assay of beta-glucosidase activity in soils. *Soil Science*, 138(1): 15-19.
- Saura-Calixto, F.; Goni, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3): 442-447.
- Scalbert, A.; Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130(8): 2073S-2085S.

- Scarmeas, N.; Stern, Y.; Tang, M.X.; Mayeux, R.; Luchsinger, J.A. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 59(6): 912-921.
- Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11): 1191-1212.
- Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2): 177-187.
- Schmidt, A.M.; Crandall, J.; Hori, O.; Cão, R.; Lakatta, E. (1996). Elevated plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in diabetic patients with microalbuminuria: A marker of vascular dysfunction and progressive vascular disease. *British Journal of Haematology*, 92(3): 747-750.
- Schmidt, M.; Schmitz, H.J.; Baumgart, A.; Guédon, D.; Netsch, M.I.; Kreuter, M.H.; Schmidlin, C.B.; Schrenk D. (2005). Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2): 307-314.
- Sekeroglu, G.; Sibel, F.; Fahrettin, G. (2006). Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, 22(1): 55-60.
- Shapiro, Y.E. (2000). Compartmentation in the poly(vinyl alcohol) cryogels. H-1 NMR self-diffusion study. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 164(1): 71-83.
- Shaw, P.E.; Tatum, J.H.; Wilson, C.W. (1984). Improved flavor of navel orange and grapefruit juices by removal of bitter components with beta-cyclodextrin polymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(4): 832-836.
- Shaw, P.E.; Baines, L.; Mitnes, B.A.; Agmon, G. (2000). Commercial debittering processes to upgrade quality of citrus juice products. *ACS Symposium Series Citrus Limonoids*, 758: 120-131.
- Shen, J.; Deininger, P.; Hunt, J.D.; Zhao, H. (2007). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer Research*, 109(3): 574-580.
- Sheridan, J.; Wang, L.M.; Tosetto, M.; Sheahan, K.; Hyland, J.; Fennelly, D.; O'Donoghue, D.; Mulcahy, H.; O'Sullivan, J. (2009). Nuclear oxidative damage correlates with poor survival in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 100(2): 381-388.
- Shinall, H.; Song, E.S.; Hersh, L.B. (2005). Susceptibility of amyloid beta peptide degrading enzymes to oxidative damage: a potential Alzheimer's disease spiral. *Biochemistry*, 44(46): 15345-15350.
- Sies, H. (1991). Oxidative Stress. En: *Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, New York.

- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215: 213-219.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2): 291-295.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1): 184-191.
- Singh, S.V.; Gupta, A.K.; Jain, R.K.; Dhatt, A.S. (2003). Debittering of citrus juices- a review. *Journal of Food Science of Technology*, 40(3): 247-253.
- Singh, S.V.; Gupta, A.K.; Jain, R.K. (2006). Process for debittering of kinnow/ citrus juices by using pretreated indigenous adsorbent resin. Indian Patent application number 2503/DEL/2006.
- Singh, S.V.; Gupta, A.K.; Jain, R.K. (2008). Adsorption of naringin on nonionic (neutral) macroporus adsorbent resin from its aqueous solutions. *Journal of Food Engineering*, 86(2): 259-271.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdic-phosphtungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- Skibola, C.F.; Smith, M.T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4): 375-383.
- Soares, N.F.F.; Hotchkiss J.H. (1998). Naringinase immobilization in packing films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 63(1): 61-65.
- Sönmez, M.F.; Narin, F.; Akkus, D.; Ozdamar, S. (2009). Effect of melatonin and vitamin C on expression of endothelial NOS in heart of chronic alcoholic rats. *Toxicology and Industrial Health*, 25(6): 385-393.
- Soria, F.; Ellenrieder, G. (2002). Thermal inactivation and product inhibition of *Aspergillus terreus* CECT 2663 alpha-l-rhamnosidase and their role on hydrolysis of naringin solutions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(5): 1442-1449.
- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9): 1105-1112.
- Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *Journal of Lipid Research*, 50: S376-S381.
- Stowe, D.F.; Camara, A.K. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidant Redox Signaling*, 11(6): 1373-1414.
- Strauch, K.; Lutz, U.; Bittner, N.; Lutz, W.K. (2009). Dose-response relationship for the pharmacokinetic interaction of grapefruit juice with dextromethorphan investigated by human urinary metabolite profiles. *Food Chemistry Toxicology*, 47(8): 1928-1935.

- Sukhthankar, M.; Alberti, S.; Baek, S.J. (2010). (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) post-transcriptionally and post-translationally suppresses the cell proliferative protein TROP2 in human colorectal cancer cells. *Anticancer Research*, 30(7): 2497-2503.
- Sultana, R.; Perluigi, M.; Butterfield, D.A. (2006). Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxidant Redox Signaling*, 8: 2021-2037.
- Sun, Y.; Hayakawa, S.; Ogawa, M.; Izumori, K. (2007). Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose. *Food Control*, 18(3): 220-227.
- Swaisgood, H.E. (2003). Use of immobilized enzymes in the food industry. En: *Handbook of Food Enzymology*. Eds. Whitaker, J.R.; Vorgen, A.G.I.; Wong, D.W.S. Marcel Dekker, New York, pp. 185-236.
- Swaisgood, H.E. (2004). The use of immobilized enzymes to improve functionality. En: *Proteins in Food Processing*. Ed. Yada, R.Y. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, pp. 608-630.
- Tallarico, P.; Todisco, S.; Drioli, E. (1998). Use of ultrafiltration in the preventing of orange juice bitterness and its effects on the aroma compounds distribution. *Agro Food Industry Hi-tech*, 9(3): 32-36.
- Thangapazham, R.L.; Singh, A.K.; Sharma, A.; Warren, J.; Gaddipati, J.P.; Maheshwari, R.K. (2007). Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 245(1-2): 232-241.
- Tatum, J.H.; Berry, R.E. (1973). Method for determining naringin content in grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 38(2): 340-341.
- Tavirini, S.; D'Innocenti, E.; Remorini, D.; Massai, R.; Guidi, L. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry*, 107(1): 282-288.
- Tavidou, A.; Efthimiadis, A.; Efthimiadis, I.; Paschalidou, H. (2006). Antioxidant effects of simvastatin in primary and secondary prevention of coronary heart disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62(6): 485-489.
- Thane, C.; Reddy, S. (1997). Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutrition and Food Science*, 97(2): 58-65.
- Thirkettle, J. (2000). SB-253514 and analogues novel inhibitors of lipoprotein associated phospholipase A2 produced by *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579. III. Biotransformation using naringinase. *Journal of Antibiotics*, 53: 733-735.
- Thomson, R.H. (1964). Structure and reactivity of phenolic compounds. En: *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Ed. Harborne, J.B. Academic Press, New York, pp. 1-32.

- Thompson, C.A.; Habermann, T.M.; Wang, A.H.; Vierkant, R.A.; Folsom, A.R.; Ross, J.A.; Cerhan, J.R. (2010). Antioxidant intake from fruits, vegetables and other sources and risk of non-Hodgkin's lymphoma: the Iowa Women's Health Study. *International Journal of Cancer*, 126(4): 992-1003.
- Ting, S.V. (1958). Enzymic hydrolysis of naringin in grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(7): 546-549.
- Ting, Y.P.; Sun, G. (2000). Use of polyvinyl alcohol as a cell immobilization matrix for copper biosorption by yeast cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75(7): 541-546.
- Tomas-Barberan, F.A.; Clifford, M.N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 1073-1080.
- Traber, M.G.; Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1): 4-15.
- Trevan, M. (1990). Tecnología enzimática. En: *Biotecnología: Principios Biotecnológicos*. Eds. Trevan, M.; Boffey, S.; Goulding, K.; Stanbury, P. Acribia, Zaragoza, pp. 169-264.
- Tripoli, E.; La Guardia, M.; Giammanco, S.; Di Majo, D.; Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2): 466-479.
- Tsen, H.Y. (1984). Factors affecting the inactivation of naringinase immobilized on chitin during debittering of fruit juice. *Journal of Fermentation Technology*, 62(3): 263-267.
- Tsen, H.Y.; Tsai, S.Y. (1988). Comparison of the kinetics and factors affecting the stabilities of chitin immobilized naringinase from two fungal sources. *Journal of Fermentation Technology*, 66(2): 193-198.
- Tsen, H.Y.; Yu, G.K. (1991). Limonin and naringin removal from grapefruit juice with naringinase entrapped in cellulose triacetate fibers. *Journal of Food Science*, 56(1): 31-34.
- Tuñón, M.J.; García-Mediavilla, M.V.; Sánchez-Campos, S.; González-Gallego, J. (2009). Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Current Drug Metabolism*, 10(3): 256-271.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2): 335-344.
- Ubeaud, G.; Schmitt, C.; Jaeck, D.; Lave, T.; Coassolo, P. (1995). Bosentan, a new endothelin receptor antagonist: prediction of the systemic plasma clearance in man from combine in vivo and in vitro data. *Xenobiotica*, 25(12): 1381-1390.
- Uchida, K. (2007). Lipid peroxidation and redox-sensitive signaling pathways. *Current Atherosclerosis Report*, 9(3): 216-221.

- Ulrich-Merzenich, G.; Zeitler, H.; Vetter, H.; Kraft, K. (2009). Synergy research: vitamins and secondary plant components in the maintenance of the redox-homeostasis and in cell signalling. *Phytomedicine*, 16(1): 2-16.
- Vafeiadou, K.; Vauzour, D.; Lee, H.Y.; Rodríguez-Mateos, A.; Williams, R.J.; Spencer, J.P. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 484(1): 100-109.
- Valdivia, A.; Pérez-Alvarez, S.; Aroca-Aguilar, J.D.; Ikuta, I.; Jordán, J. (2009). Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65(2): 195-208.
- Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C.J.; Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1-2): 37-56.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10): 1161-1208.
- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1): 44-84.
- Valls-Bellés, V.; Codoñer-Franch, P.; González-Sanjosé, M.L.; Muñoz, P. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. Monografía. Madrid. Ed. Centro de Cerveza y Salud.
- Van Aalst, J.A.; Burmeister, W.; Fox, P.L.; Graham, L.M. (2004). Alpha-tocopherol preserves endothelial cell migration in the presence of cell-oxidized low-density lipoprotein by inhibiting changes in cell membrane fluidity. *Journal of Vascular Surgery*, 39(1): 229-237.
- Van Acker, S.A.B.E.; de Groot, M.J.; van den Berg, D.J.; Tromp, M.N.J.L.; den Kelder, G.D.O.; van der Vijgh, W.J.F.; Bast, A. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid. *Chemical Research in Toxicology*, 9(8): 1305-1312.
- Vanamala, J.; Cobb, G.; Turner, N.D.; Lupton, J.R.; Yoo, K.S.; Pike, L.M.; Patil, B.S. (2005). Bioactive compounds of grapefruit (*Citrus paradisi* Cv. Rio Red) respond differently to postharvest irradiation, storage, and freeze drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 3980-3985.
- Vanamala, J.; Reddivari, L.; Yoo, K.S.; Pike, L.M.; Patil, B.S. (2006). Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3): 157-166.
- Van den Berg, R.; Haenen, G.R.M.M.; van den Berg, H.; Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4): 511-517.

- Versteeg, C.; Martens, L.J.H.; Rombouts, F.M. (1977). Enzymatic-hydrolysis of naringin in grapefruit juice. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 10(5): 268-272.
- Vila-Real, H.J.V.; Alfaia, A.J.; Calado, A.R.T.; Ribeiro, M.H.L. (2007). High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion. *Food Chemistry*, 102(3): 565-570.
- Vinson, J.A.; Bose, P. (1988). Comparative bioavailability to humans of ascorbic-acid alone or in a citrus extract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48(3): 601-604.
- Vinson, J.A.; Bose, P. (1988). Comparative bioavailability to humans of ascorbic acid alone or in a citrus extract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48(3): 601-604.
- Virgili, F.; Marino, M. (2008). Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(9): 1205-1216.
- Vita, J.A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 292S-297S.
- Von Sonntag, C. (2006). Free-radical-induced DNA damage and its repair: a chemical perspective. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp. 523
- Wang, Y.C.; Chuang, Y.C.; Ku, Y.H. (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 102(4): 1163-1171.
- Wang, Y.C.; Chuang, Y.C.; Hsu, H.W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106: 277-284.
- Weinberg, F.; Chandel, N.S. (2009). Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cellular and Molecular Life Science*, 66(23): 3663-3673.
- Weinreb, O.; Amit, T.; Mandel, S.; Youdim, M.B. (2009). Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Genes and Nutrition*, 4(4): 283-296.
- Weissbach, H.; Etienne, F.; Hoshi, T.; Heinemann, S.H.; Lowther, W.T.; Matthews, B.; St John, G.; Nathan, C.; Brot, N. (2002). Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397(2): 172-178.
- Widome, R.; Jacobs, D.R.; Hozawa, A.; Sijtsma, F.; Gross, M.; Schreiner, P.J.; Iribarren, C. (2010). Passive smoke exposure and circulating carotenoids in the CARDIA study. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 56(2): 113-118.
- Wilkins, M.R.; Widmer, W.W.; Grohmann, K.; Cameron, R.G. (2007). Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*, 98(8): 1596-1601.
- Willey, J.C.; Harris, C.C. (1990). Cellular and molecular biological aspects of human bronchogenic carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 10(2): 181-209.

- Wilson, J.X. (2009). Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *Biofactors*, 35(1): 5-13.
- Wolfe, K.L.; Kang, X.; He, X.; Dong, M.; Zhang, Q.; Liu, R.H (2008). Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18): 8418-8426.
- Woodward, J. (1985). Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling. En: *Immobilized cells and Enzymes: A Practical Approach*. Ed. Woodward, J. IRL Press Limited, London, pp. 3-37.
- Xu, Y.; Ho, C.T.; Amin, S.G.; Han, C.; Chung, F.L. (1992). Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Research*, 52(14): 3875-3879.
- Xu, C.J.; Fraser, P.D.; Wang, W.J.; Bramley, P.M. (2006). Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15): 5474-5481.
- Xu, G.; Ye, X.; Chen, J.; Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(2): 330-335.
- Xu, G.; Liu, D.; Chen, J.; Ye, X.; Ma, Y.; Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2): 545-551.
- Xu, X.J.; Huang, S.M.; Zhang, L.H. (2009). Biodegradability, Antibacterial Properties, and Ultraviolet Protection of Polyvinyl Alcohol-Natural Polyphenol Blends. *Polymer Composites*, 30(11): 1611-1617.
- Yadav, S.; Yadav, K. (2000). Secretion of alpha-L-rhamnosidase by *Aspergillus terreus* and its role in debittering of orange juice. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 59: 1032-1037.
- Yamagishi, S.I.; Nakamura, K.; Matsui, T.; Noda, Y.; Imaizumi, T. (2008). Inhibitors of advanced glycation end products (AGEs): Potential utility for the treatment of cardiovascular disease. *Cardiovascular Therapeutics*, 26(1): 50-58.
- Yamaguchi, F.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; Ariga, T. (1999). Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7): 2544-2548.
- Yanai, T.; Sato, M. (2000). Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(10): 2179-2185.
- Yang, C.S.; Lambert, J.D.; Sang, S. (2009). Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Archives of Toxicology*, 83(1): 11-21.
- Yoo, K.M.; Lee, K.W.; Park, J.B.; Lee, H.J.; Hwang, I.K. (2004). Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka)

- during maturation and between cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19): 5907-5913.
- Yoo, K.M.; Hwang, I.K.; Moon, B.K. (2009). Comparative flavonoids contents of selected herbs and associations of their radical scavenging activity with antiproliferative actions in V79-4 cells. *Journal of Food Science*, 74(6): C419-C425.
- Yoshioka, N.; Nakashima, H.; Hosoda, K.; Eitaki, Y.; Shimada, N.; Omae, K. (2008). Urinary excretion of an oxidative stress marker, 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), among nickel-cadmium battery workers. *Journal of Occupational Health*, 50(3): 229-235.
- Young, A.J.; Lowe, G.M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1): 20-27.
- Yu, J.; Wang, L.M.; Walzem, R.L.; Miller, E.G.; Pike, L.M.; Patil, B.S. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Science*, 53(6): 2009-2014.
- Yuan, L.Y.; Kaplowitz, N. (2009). Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2): 29-41.
- Yusof, S.; Mohd Ghazali, H.; Swee King, G. (1990). Naringin content in local citrus fruits. *Food Chemistry*, 37(2): 113-121.
- Zhang, H.J.; Zhao, W.; Venkataraman, S.; Robbins, M.E.; Buettner, G.R.; Kregel, K.C.; Oberley, L.W. (2002). Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(23): 20919-20926.
- Zhang, L.S.; Wu, W.Z.; Wang, J.L. (2007). Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Environmental Sciences*, 19(10): 1293-1297.
- Zhang, P.; Peng Z.; Dai, K.; Yan, S.; Yan, W.; Zhang, C.; Chao-Z.; Chen, D.; Xu, B.; Bo X.; Xu, Z. (2009). Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. *European Journal of Pharmacology*, 607(1-3): 1-5.
- Zhu, Q.X.; Shen, T.; Tu, D.Y.; Ding, R.; Liang, Z.Z.; Zhang, X.J. (2005). Protective effects of Ginkgo biloba leaf extracts on trichloroethylene-induced human keratinocyte cytotoxicity and apoptosis. *Skin Pharmacology and Physiology*, 18(4): 160-169.
- Zwart, L.L.; Meerman, J.H.; Commandeur, J.N.; Vermeulen, N.P. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2): 202-226.

8. ANEXO

Tabla 8.1. Contenido de polifenoles totales en los zumos de pomelo.

Zumo	Polifenoles ¹		
	X	S	CV%
FJ	689 ^b	50,2	7,29
PJ	943,5 ^d	47,5	5,03
N-PJ	1227 ^e	44,1	3,59
IN-PJ	963 ^d	21,6	2,24
R-PJ	545 ^a	56,0	10,28
PVA-PJ	802,2 ^c	55,6	6,93

¹ Contenido en polifenoles en $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico.

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Tabla 8.2. Contenido de naringina en los zumos de pomelo.

Zumo	Naringina ¹		
	X	S	CV%
FJ	676 ^c	26,4	3,91
PJ	813,9 ^d	53,7	6,60
N-PJ	359 ^b	50,9	14,18
IN-PJ	398 ^b	59,5	14,95
R-PJ	240 ^a	16,4	6,83
PVA-PJ	780,7 ^d	61,4	8,40

¹ Contenido en naringina en µg/mL

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Tabla 8.3. Actividad antioxidante de los zumos de pomelo, expresados como TEAC.

Zumo	Volumen ¹	Capacidad antioxidante ²		
		X	S	CV%
FJ	5	5,370 ^a	0,592	11,02
	10	10,595 ^b	0,415	3,92
	20	17,140 ^c	0,543	3,17
	30	23,332 ^d	0,741	3,18
PJ	5	8,529 ^a	0,890	10,43
	10	13,167 ^b	0,599	4,55
	20	20,221 ^c	0,923	4,56
	30	24,337 ^d	0,674	2,77
N-PJ	5	11,430 ^a	1,254	10,97
	10	17,562 ^b	1,659	9,45
	20	23,567 ^c	0,876	3,72
	30	27,577 ^d	0,876	3,18
IN-PJ	5	10,483 ^a	0,196	1,87
	10	15,485 ^b	1,278	8,25
	20	23,266 ^c	0,637	2,74
	30	26,461 ^d	0,937	3,54
R-PJ	5	3,337 ^a	0,390	11,69
	10	7,137 ^b	0,494	6,92
	20	11,670 ^c	0,709	6,08
	30	17,012 ^d	1,118	6,57
PVA-PJ	5	9,895 ^a	1,431	14,46
	10	13,779 ^b	1,672	12,13
	20	19,143 ^b	1,220	6,37
	30	23,918 ^c	1,066	4,46

¹ Volumen de zumo en μL

² Capacidad antioxidante en μM Trolox

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Tabla 8.4. Actividad antioxidante FRAP de los zumos de pomelo.

Zumo	Volumen ¹	Capacidad antioxidante ²		
		X	S	CV%
FJ	5	5,529 ^a	0,692	12,52
	10	8,684 ^b	0,993	11,43
	20	15,655 ^c	1,301	8,31
	30	23,579 ^d	1,843	7,82
PJ	5	4,835 ^a	0,486	10,05
	10	6,802 ^b	0,199	2,93
	20	10,613 ^b	0,219	2,06
	30	13,122 ^c	0,692	5,27
N-PJ	5	6,263 ^a	0,554	8,85
	10	8,089 ^b	0,664	8,21
	20	10,749 ^c	0,977	9,09
	30	14,020 ^d	1,601	11,42
IN-PJ	5	3,302 ^a	0,477	14,45
	10	5,614 ^b	0,692	12,33
	20	7,689 ^c	0,759	9,87
	30	10,425 ^d	0,841	8,07
R-PJ	5	1,227 ^a	0,067	5,46
	10	2,390 ^b	0,334	13,97
	20	3,359 ^c	0,214	6,37
	30	4,513 ^d	0,109	2,42
PVA-PJ	5	3,829 ^a	1,381	36,07
	10	5,479 ^b	0,783	14,29
	20	6,887 ^b	0,693	10,06
	30	10 ^c	0,627	6,27

¹ Volumen de zumo en μL

² Capacidad reductora en mM FeSO_4

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Tabla 8.5. Capacidad estabilizadora frente al radical superóxido de los zumos de pomelo mediante el método no enzimático.

Zumo	Volumen ¹	Capacidad estabilizadora ²		
		X	S	CV%
FJ	5	20,0 ^a	5,2	26,00
	10	27,2 ^a	2,8	10,29
	20	42,8 ^b	6,6	15,42
	30	53,0 ^c	3,6	6,79
PJ	5	23,3 ^a	6,7	28,76
	10	33,4 ^b	5,3	15,87
	20	42,2 ^c	4,4	10,43
	30	67,9 ^d	2,4	3,53
N-PJ	5	20,4 ^a	2,6	12,75
	10	30,4 ^b	2,7	8,88
	20	45,4 ^c	3,4	7,49
	30	78,3 ^d	6,1	7,79
IN-PJ	5	37,3 ^a	5,3	14,21
	10	37,9 ^a	0,9	2,37
	20	49,6 ^b	7,5	15,12
	30	60,0 ^c	8,5	14,17
R-PJ	5	24,9 ^a	2,3	9,20
	10	28,9 ^{ab}	1,5	5,17
	20	32,4 ^{ab}	5,0	15,43
	30	34,0 ^b	3,4	10,00
PVA-PJ	5	23,8 ^a	8,1	34,03
	10	26,2 ^a	6,9	26,34
	20	52,7 ^b	4,3	8,16
	30	68,1 ^c	1,3	1,91

¹ Volumen de zumo en μL

² Capacidad estabilizadora en % inhibición

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Tabla 8.6. Capacidad estabilizadora frente al radical superóxido de los zumos de pomelo mediante el método enzimático.

Zumoz	IL50 ¹		
	X	S	CV%
FJ	120 ^a	18,0	15,00
PJ	131 ^{ab}	55,4	42,24
N-PJ	146 ^{ab}	46,8	32,00
IN-PJ	139 ^{ab}	55,0	39,63
R-PJ	180 ^b	7,1	3,93
PVA-PJ	133 ^{ab}	17,3	13,06

¹ Capacidad estabilizadora en IL₅₀ (volumen de zumo necesario para alcanzar una inhibición del 50%) en µL.

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos (p<0,05).

Tabla 8.7. Capacidad de los zumos de estabilizar el radical hidroxilo.

Zumos	Volumen ¹	Capacidad estabilizadora ²		
		X	S	CV%
FJ	5	47,3 ^b	0,4	0,85
	10	31,8 ^a	7,2	22,63
	20	45,1 ^b	1,7	3,76
	30	68,3 ^c	10,2	14,93
PJ	5	42,9 ^a	9,8	22,87
	10	51,4 ^a	3,2	6,23
	20	67,6 ^b	1,5	2,22
	30	66,2 ^b	4,5	6,80
N-PJ	5	42,0 ^a	7,2	17,13
	10	55,9 ^b	4,8	8,59
	20	68,9 ^c	1,0	1,45
	30	74,3 ^c	2,5	3,36
IN-PJ	5	34,6 ^a	7,6	21,97
	10	64,7 ^b	3,1	4,79
	20	64,2 ^b	9,3	14,50
	30	70,5 ^b	3,4	4,82
R-PJ	5	38,4 ^a	4,0	10,42
	10	47,5 ^b	3,9	8,21
	20	59,1 ^c	7,8	13,20
	30	69,9 ^d	6,4	9,16
PVA-PJ	5	35,4 ^a	8,1	22,88
	10	56,5 ^b	2,3	4,07
	20	67,7 ^c	2,7	3,99
	30	69,9 ^c	2,3	3,29

¹ Volumen de zumo en μL

² Capacidad estabilizadora en % inhibición

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0,005$).

Tabla 8.8. Efecto de los zumos de pomelo sobre los niveles de GSH en homogenado de hígado de rata tratado con t-BOOH.

Zumo	Volumen ¹	GSH ²		
		X	S	CV%
FJ	10	34 ^a	7,2	21,18
	20	39 ^{ab}	5,2	13,33
	30	53,3 ^{bc}	11,7	21,95
	40	56,3 ^c	12,9	22,91
PJ	10	36,1 ^a	8,2	22,71
	20	58,9 ^b	14,3	24,28
	30	50,0 ^{ab}	12,2	24,40
	40	47,0 ^{ab}	0,3	0,64
N-PJ	10	44,4 ^a	16,2	36,49
	20	59,6 ^a	23,6	39,60
	30	58,5 ^a	12,2	20,85
	40	65,5 ^a	23,2	35,42
IN-PJ	10	73,1 ^a	43,6	59,64
	20	79,2 ^a	28,2	35,61
	30	88,6 ^a	37,4	42,21
	40	93,8 ^a	31,2	33,26
R-PJ	10	33,5 ^{ab}	7	20,90
	20	31,4 ^a	12,7	40,45
	30	45,3 ^b	6,3	13,91
	40	43,3 ^{ab}	4,6	10,62
PVA-PJ	10	42 ^a	14,1	33,57
	20	40,3 ^a	4,2	10,42
	30	52,5 ^a	2,1	4,00
	40	48,3 ^a	2,3	4,76

¹ Volumen de zumo en μL

² Niveles de GSH en nmol/mg proteína

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 8.9. Efectos de los zumos de pomelo sobre la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata inducida por ABAP.

Zumo	Volumen ¹	Peroxidación lipídica ²		
		X	S	CV%
FJ	10	2,494 ^c	0,46	18,44
	20	1,993 ^b	0,226	11,34
	30	1,539 ^a	0,215	13,97
	40	1,509 ^a	0,184	12,19
PJ	10	2,776 ^b	0,618	22,26
	20	1,947 ^a	0,657	33,74
	30	1,482 ^a	0,215	14,51
	40	1,664 ^a	0,479	28,79
N-PJ	10	2,098 ^b	0,338	16,11
	20	1,206 ^a	0,295	24,46
	30	1,161 ^a	0,138	11,89
	40	1,072 ^a	0,092	8,58
IN-PJ	10	2,534 ^c	0,441	17,40
	20	1,968 ^b	0,281	16,55
	30	1,716 ^{ab}	0,082	4,78
	40	1,426 ^a	0,161	11,29
R-PJ	10	2,911 ^c	0,423	14,53
	20	2,376 ^b	0,399	16,79
	30	1,957 ^a	0,08	4,09
	40	1,714 ^a	0,194	11,32
PVA-PJ	10	2,450 ^c	0,412	16,82
	20	2,088 ^b	0,527	25,24
	30	1,647 ^a	0,209	12,69
	40	1,435 ^a	0,334	23,28

¹ Volumen de zumo en μL

² Peroxidación lipídica en TBARS (nmol/mg proteína)

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,005$).

Tabla 8.10. Efecto de los zumos de pomelo en la formación de 8-OHdG en DNA de timo de ternera.

Zumo	Volumen ¹	8OHdG ²		
		X	S	CV%
FJ	25	56,8 ^a	7,8	13,7
	50	64,0 ^a	12,5	19,5
	100	90,0 ^b	0,1	0,1
PJ	25	56,9 ^a	0,5	0,9
	50	66,5 ^b	0,1	0,1
	100	79,4 ^c	2,7	3,4
N-PJ	25	59,4 ^a	11,2	18,9
	50	53,6 ^a	0,2	0,4
	100	82,8 ^b	6,4	7,7
IN-PJ	25	52,3 ^a	0,7	1,3
	50	56,3 ^b	2,4	4,3
	100	75,6 ^c	0,1	0,1
R-PJ	25	40,1 ^a	1,3	3,2
	50	58,3 ^b	3,3	5,6
	100	85,0 ^c	10,0	11,8
PVA-PJ	25	53,7 ^a	4,1	7,6
	50	61,6 ^b	2,6	4,1
	100	80,1 ^c	4,4	5,4

¹ Volumen de zumo en μL

² Efecto protector frente al daño oxidativo al DNA en % inhibición de la formación de 8-OHdG.

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA, R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos ($p < 0.05$).

Tabla 8.11. IL₅₀ de los zumos de pomelo sobre el daño oxidativo al DNA inducido por Cu²⁺/Ascórbico.

Zumo	IL50 ¹		
	X	S	CV%
FJ	7,1 ^a	0,5	7,0
PJ	6,0 ^a	2,6	37,7
N-PJ	31,4 ^d	0,4	1,3
IN-PJ	20,7 ^c	1,8	8,7
PVA-PJ	13,8 ^b	4,7	29,0
R-PJ	38,1 ^e	1,2	3,1

¹ IL₅₀ en µL

FJ: zumo fresco, PJ: zumo pasteurizado, N-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución, IN-PJ: zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA; R-PJ: zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400, PVA-PJ: zumo pasteurizado con PVA sin naringinasa. Valores con distinta letra son significativamente distintos (p<0.005). IL₅₀: volumen de zumo necesario para alcanzar una inhibición del 50% de formación de 8OHdG.

9. ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis(amidinopropano) dihidroclorido
ABAP	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	Sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico)
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
CDNB	Cloro 2,4-dinitrobenzeno
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CUPRAC	Cooper Reduction Antioxidant Capacity
dG	Desoxiguanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2'-difenil-1-picrilhidracil
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
EO	Estrés oxidativo
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FJ	Zumo fresco
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	Ácido gálico
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro
GST	Gutación S-transferasa
HAT	Hydrogen atom transfer
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRSA	Capacidad estabilizadora frente al radical hidroxilo
HX/XO	Hipoxantina-xantina oxidasa
IL ₅₀	Volumen necesario para alcanzar una inhibición del 50%
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IN-PJ	Zumo pasteurizado y tratado con naringinasa inmovilizada en PVA
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAPKs	Proteína quinasa activada por factores mitóticos
MDA	Malondialdehído
MEDI	Dieta mediterránea
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
NBT	Nitro azul tetrazolio
NF-Kb	Factor nuclear kappa B
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2
NO	Óxido nítrico
NO [•]	Radical óxido nítrico
NO ⁻	Anión nitroxilo
N-PJ	Zumo pasteurizado y tratado con naringinasa en solución,
NQO1	Quinona oxidorreductasa
•OOH	Radical hidroperoxilo
•OH	Radical hidroxilo
8-OHdG	8-hidroxi-desoxiguanosina
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singlete
O ₃	Ozono
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Tampón fosfato salino
PI3K/Akt	Fosfoinositol 3-quinasa/serina-treonina quinasa
PJ	Zumo pasteurizado
PJ-PVA	Zumo pasteurizado y tratado con polivinil alcohol sin naringinasa
PME	Pectina metilesterasa
PMS	5-metilfenacin metosulfato
PVA	Alcohol polivinílico
RBrS	Especies reactivas del bromo
RCIS	Especies reactivas del cloro
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROO [•]	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
R-PJ	Zumo pasteurizado y tratado con Amberlite IR400.
SET	Single electron transfer
SOD	Superóxido dismutasa
SRSA	capacidad estabilizadora frente al radical superóxido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	Terc-butil-hidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético

TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TPTZ	2,4,6-tris-2-piridil-s-triazina
TROLOX	Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico
Trx	Tiorredoxina