

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)



TESIS DOCTORAL

**Metabolismo de flavonoides
y ácidos hidroxicinámicos de la dieta.
Estudios de transporte *in vitro*
y de disponibilidad en humanos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Miren Gómez Juaristi

Directoras

Laura Bravo Clemente

María Raquel Mateos Briz

Madrid, 2015

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



**Metabolismo de flavonoides
y ácidos hidroxicinámicos de la dieta.
Estudios de transporte *in vitro*
y de biodisponibilidad en humanos.**

TESIS DOCTORAL

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por

Miren Gómez Juaristi

Dirigida por las Doctoras

Laura Bravo Clemente y M^a Raquel Mateos Briz

Madrid, 2015

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



**Metabolismo de flavonoides
y ácidos hidroxicinámicos de la dieta.
Estudios de transporte *in vitro*
y de biodisponibilidad en humanos.**

TESIS DOCTORAL

Vº Bº de las Directoras

Dra. Laura Bravo Clemente

Dra. M^a Raquel Mateos Briz

La Doctoranda

Miren Gómez Juaristi

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y dirigida por las Dras. Laura Bravo Clemente y Raquel Mateos Briz.

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a la la beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) **BES-2008-007138** financiada por el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación asociada al proyecto **AGL2007-64042** “Evaluación *in vitro* e *in vivo* del potencial quimiopreventivo de flavanoles de la dieta frente al desarrollo cáncer colónico” (Investigador Principal Dra. Laura Bravo Clemente). Así mismo, este trabajo se ha desarrollado en el marco del proyecto **AGL2010-18269** “Café verde y yerba mate como fuente dietética de ácidos hidroxicinámicos. Estudios *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (humanos) de biodisponibilidad y bioactividad” (Investigador Principal Dra. Laura Bravo Clemente) y el proyecto **CSD2007-00063** “Nuevos ingredientes de alimentos funcionales para mejorar la salud (FUN-C-FOOD)” del programa CONSOLIDER-INGENIO 2010, (Investigador Responsable Dr. Francisco Tomás Barberán, CEBAS-CSIC).

Los estudios en humanos con productos solubles de cacao se realizaron con la financiación del contrato de investigación suscrito entre Investigadores del Departamento de Metabolismo y Nutrición (ICTAN-CSIC) y la empresa Nutrexpa S.L. en el marco del proyecto de investigación “Estudio de la biodisponibilidad de polifenoles y metilxantinas en productos solubles de cacao y su efecto postprandial sobre parámetros del estado redox en voluntarios sanos” (Investigador responsable Dra. Laura Bravo Clemente).

Durante el desarrollo de este trabajo se concedieron dos ayudas para Estancias Breves en el marco de la beca predoctoral FPI mencionada anteriormente, una en School of Food Science and Nutrition de la Universidad de Leeds (Reino Unido) bajo la supervisión del Prof. Gary Williamson durante los meses de septiembre a noviembre de 2010; y otra ayuda para la estancia en Antioxidants Research Lab del Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging de la Universidad de Tufts (Boston, Estados Unidos) bajo la supervisión del Prof. Jeffrey Blumberg durante los meses de mayo a julio de 2011.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este trabajo ha sido posible porque muchas personas me han ayudado. De muchas y diferentes maneras. A todos quiero daros las gracias.

A Laura Bravo. Gracias. Por tu confianza. Por dirigir esta Tesis. Por tu paciencia. Por enseñarme. Por tus consejos. Y sobre todo, por tu cariño.

A Raquel Mateos. Gracias. Por enseñarme. Por tu paciencia. Por tu gran compromiso e inmensa dedicación. Por las risas de todos los días. Porque esto no hubiera sido posible sin ti (y sin los Pilucos). Por Montaraza. Por el Isómero, siempre desafiante.

A Beatriz Sarriá. Gracias. Por toda la ayuda con los estudios en humanos. Por los consejos. Por las risas. Por tus tortillas y tus bizcochos.

A Sara Martínez. Gracias. Por tu cariño. Por tu compañerismo. Porque nos hemos divertido con el HPLC.

A Nines Martín. Gracias. Por tu ayuda y tu ánimo. Por ser un ejemplo de conciliación. Por los buenos ratos dentro y fuera del Instituto.

A Sonia Ramos. Gracias. Por tu ayuda. Por tu inmenso cariño. Por ser tan buena conmigo.

A Luis Goya. Gracias. Por tu ayuda. Por tu cariño. Por los buenos cafés.

A Ildé Rodríguez. Gracias. Por los buenos momentos durante este camino juntos. Por ser Brandon y cumplir como tal las expectativas.

A Miryam Amigo, a Gema Baeza, a Rosana Cabello, a Isa Cordero, a Rocío Estévez, a Elena Gallardo, a Marta Mesías, a Helena Moreno, a Gema Pereira, a Jara Pérez, a José Manuel Silván. Gracias. Por los ánimos. Porque lo hemos pasado muy bien dentro y fuera del Instituto. Por ser tan buena gente.

A Miguel Ángel Bartolomé e Inma Álvarez de la USTA. Gracias. Por vuestra ayuda técnica con las Masas. Por vuestro interés y paciencia.

A Sara Arranz, a María Elena Díaz, a Irene Espinosa, a Ana Granado. Gracias. Por acogerme en el laboratorio en los primeros momentos y siempre estar dispuestas a echar una mano.

A Isabel Fernández Conde y a María Rosa Redondo. Gracias. Por vuestra ayuda técnica en el laboratorio. Por vuestro interés.

A Toni Cilla, a Ben Queguiner. Gracias en la lejanía. Porque nos hemos reído mucho.

A toda la gente del ICTAN que de alguna manera u otra han hecho esto posible. Gracias.

Thanks to Prof. Gary Williamson and Tracy Farrell. For all the work at University of Leeds.

Thanks to Prof. Jeffrey Blumberg and Oliver Chen. For all the work at Tufts University.

A Sol y a las chicas del CAI, especialmente a Lina. Gracias. Por todos vuestros ánimos, paciencia y comprensión en las últimas etapas de este trabajo.

A Irene-Peri, Bea A., Shey-Luis y Sofi-Samu y Antón. Gracias. Por vuestro cariño. Por estar cuando se os necesita (verdaderamente).

A los Nuevos de la Nueve. Gracias. Por hacer los cafés más y más divertidos. Por ser tan buena gente.

A Ele, Miche y Olmo. Gracias. Por los ánimos y todo el cariño. Por ser nuestra familia italiana.

A Cris, Borja, Iván, Brb y Belén. Gracias. Por los tiempos pasados y presentes.

A Bea I., Tamar, Peter y Matilda y Gonzalito. Gracias. Por ser la family (y lo que eso conlleva).

A Nereida. Gracias. Aunque en las antípodas, por estar cerca siempre.

A Paloma. Gracias. Por tus sabios consejos.

A Ander Gómez Juaristi. Gracias. Por tu esfuerzo para (re)unir nuestros caminos, me da fuerza.

A Mila Juaristi. Gracias. Por tu apoyo sin condiciones, sin falla. Por tu paciencia infinita conmigo. Por quererme tanto.

A Telmo. Gracias cada día. Por regalarme momentos absolutamente maravillosos.

A Pablo Iraeta. Gracias. Porque sin ti no hubiese acabado este camino. Por todo lo que aprendo de ti cada día. Por tu generoso esfuerzo. Por tu responsabilidad. Porque me haces mejor persona. Porque nada tiene sentido sin ti. Por tu inmenso amor. Gracias, gracias, gracias.

A mi padre,
Fernando Gómez Sarte

ÍNDICE

Abstract/Resumen en inglés	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	9
1.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	18
1.3. BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	29
1.4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS	41
1.5. EL CACAO Y LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO	46
1.6. EL CAFÉ	60
1.7. LA YERBA MATE	75
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	81
3. MATERIALES Y MÉTODOS	85
3.1. MATERIALES	87
3.1.1. MUESTRAS	87
3.1.2. PATRONES Y REACTIVOS	88
3.1.3. OTROS MATERIALES	88
3.2. MÉTODOS	89
3.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN FENÓLICA DE LOS PRODUCTOS ALIMENTARIOS	89
3.2.1.1. Obtención de la fracción fenólica	89
3.2.1.2. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método Folin-Ciocalteu	90
3.2.1.3. Caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos solubles por HPLC-DAD	90
3.2.1.4. Caracterización de los compuestos fenólicos por LC-MS	93
3.2.2. ESTUDIO DE TRANSPORTE Y METABOLISMO CELULAR IN VITRO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UN MODELO DE EPITELIO INTESTINAL HUMANO, CÉLULAS CACO-2	93
3.2.2.1. Ensayo de viabilidad celular	94

3.2.2.2. Ensayo de metabolismo y transporte celular	95
3.2.2.2.1. Establecimiento del cultivo celular	95
3.2.2.2.2. Evaluación del metabolismo en células Caco-2	97
3.2.2.2.3. Evaluación del transporte en células Caco-2	98
3.2.2.2.4. Identificación y cuantificación de metabolitos	99
3.2.2.2.5. Síntesis <i>in vitro</i> de derivados metilados de compuestos fenólicos	102
3.2.3. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO, CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y YERBA MATE EN VOLUNTARIOS SANOS	102
3.2.3.1. Reclutamiento de voluntarios	103
3.2.3.2. Estudios de biodisponibilidad	103
3.2.3.2.1. Estudio de biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles presentes en productos solubles de cacao en voluntarios sanos	105
3.2.3.2.2. Estudio de biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles presentes en café mezcla tostado/verde y yerba mate en voluntarios sanos	108
3.2.3.4. Análisis de muestras biológicas	111
3.2.3.5. Identificación y cuantificación de metabolitos	113
3.2.3.6. Estudio farmacocinético	115
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	116
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
4.1. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO, EL CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y LA YERBA MATE	121
4.1.1. PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO	121
4.1.2. CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE	125
4.1.3. YERBA MATE	129
4.1.4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO FENÓLICO DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO, CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y YERBA MATE EN LA DIETA	134
4.2. BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS <i>IN VITRO</i>	137
4.2.1. VIABILIDAD CELULAR	140
4.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL MODELO CELULAR DE EPITELIO INTESTINAL HUMANO CON CÉLULAS CACO-2	142

4.2.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLISMO DE FLAVANOLES POR CÉLULAS CACO-2	144
4.2.3.1. Metabolismo y transporte de epicatequina por células Caco-2	145
4.2.3.2. Metabolismo y transporte de epicatequin-3-galato por células Caco-2	154
4.2.3.3. Metabolismo y transporte de procianidina B2 por células Caco-2	163
4.2.4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLISMO DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS POR CÉLULAS CACO-2	171
4.2.4.1. Metabolismo y transporte de ácido clorogénico por células Caco-2	172
4.2.4.2. Metabolismo y transporte de ácido 3,5-dicafeoilquínico por células Caco-2	179
4.2.5. RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS FLAVANOLES Y LOS ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS Y SU BIODISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	186
4.3. BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN HUMANOS	195
4.3.1. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE FLAVANOLES DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO	197
4.3.1.1. Optimización del método de extracción de compuestos fenólicos del cacao presentes en muestras biológicas (plasma y orina)	199
4.3.1.2. Identificación de metabolitos	201
4.3.1.3. Cuantificación de metabolitos en plasma	214
4.3.1.4. Cuantificación de metabolitos en orina	219
4.3.1.5. metabolismo y biodisponibilidad de flavanoles de dos productos solubles de cacao en humanos sanos	225
4.3.2. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS DEL CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y YERBA MATE	235
4.3.2.1. Optimización del método de extracción de compuestos fenólicos del café mezcla tostado/verde y de la yerba mate presentes en muestras biológicas (plasma y orina)	237
4.3.2.2. Identificación de metabolitos derivados de los fenoles de del café mezcla tostado/verde y de la yerba mate	238
4.3.2.3. Cuantificación de metabolitos del café en plasma	256
4.3.2.4. Cuantificación de metabolitos de la yerba mate en plasma	261
4.3.2.5. Cuantificación de metabolitos del café en orina	265
4.3.2.6. Cuantificación de metabolitos del café en orina	273

4.3.2.7. Metabolismo y biodisponibilidad de los ácidos hidroxicinámicos de café mezcla tostado/verde y yerba mate en humanos sanos	278
5. DISCUSIÓN GENERAL	289
6. CONCLUSIONES	303
BIBLIOGRAFÍA	309
ANEXO:	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura básica de los flavonoides, su sistema de numeración y sus principales subclases.	13
Figura.1.2. Mecanismos de acción y actividades biológicas de los polifenoles de la dieta.	18
Figura.1.3. Tipos de transporte celular en el epitelio intestinal.	30
Figura. 1.4. Posiciones potenciales de conjugación de los compuestos fenólicos.	34
Figura 1.5. Esquema de la absorción y metabolismo de polifenoles en el epitelio intestinal.	36
Figura 1.6. Posibles rutas para los polifenoles ingeridos en la dieta.	37
Figura 1.7. <i>Theobroma cacao</i> . Hojas, flores, fruto y semillas.	47
Figura 1.8. Ruta de degradación de flavanoles y procianidinas por la microbiota intestinal.	59
Figura 1.9. <i>Coffea arabica</i> . Hojas, flores, fruto y semillas.	61
Figura 1.10. Metabolismo propuesto para el ácido clorogénico por la microbiota intestinal.	74
Figura 1.11. <i>Ilex paraguarensis</i> . Hojas, flores y frutos.	76
Figura 3.1. Imagen de los productos objeto del presente estudio: Cacao soluble control (CC), Cacao soluble enriquecido en polifenoles (CC-PP), Café verde Nescafé Green Blend®, Yerba Mate de la casa comercial Taragui.	87
Figura 3.2. Esquema de placa bicameral (Transwell) utilizada en los estudios <i>in vitro</i> de transporte y metabolismo de compuestos fenólicos.	95
Figura. 3.3. Bebidas ingeridas por los participantes en los estudios de biodisponibilidad: producto soluble de cacao control (CC) y producto soluble de cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP).	106
Figura. 3.4. Diseño experimental del estudio de intervención con los productos solubles de cacao, control comercial (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP).	106
Figura 3.5. Hoja de información proporcionada a los voluntarios con las pautas a seguir los días previos a la intervención con los productos solubles de cacao.	107
Figura 3.6. Esquema de recogida de muestras de sangre y orina del estudio de biodisponibilidad de los productos solubles de cacao control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP) en voluntarios sanos.	108
Figura 3.7. Diseño experimental del estudio de intervención con café mezcla tostado/verde y yerba mate.	109
Figura. 3.8. Bebidas ingeridas por los participantes en los estudios de biodisponibilidad: café mezcla tostado/verde y yerba mate.	110
Figura 3.9. Hoja de información proporcionada a los voluntarios con la lista de alimentos restringidos los días previos a la intervención con las bebidas de café mezcla tostado/verde y yerba mate.	110
Figura 3.10. Esquema de recogida de muestras de sangre y orina del estudio de biodisponibilidad del café mezcla tostado/verde y yerba mate en voluntarios sanos.	111

Figura 3.11. Diagrama de los parámetros plasmáticos farmacocinéticos calculados para los metabolitos identificados en los estudios de biodisponibilidad <i>in vivo</i> .	116
Figura 4.1. Perfil cromatográfico de los extractos fenólicos de los productos solubles de cacao control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP).	122
Figura 4.2. Perfil cromatográfico de la infusión de café mezcla tostado/verde a 320 nm.	126
Figura 4.3. Perfil cromatográfico de la infusión de yerba mate a 320 nm.	130
Figura 4.4. Estructuras químicas de los flavonoides (epicatequina (EC), epicatequin-3-galato (ECG) y procianidina B2 (PB2)) y ácidos hidroxicinámicos (clorogénico (5-CQA) y 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA)) seleccionados para llevar a cabo los estudios de biodisponibilidad <i>in vitro</i> .	140
Figura 4.5. Viabilidad celular determinada mediante el ensayo de Cristal Violeta de las células Caco-2 incubadas durante 24 h con los flavanoles epicatequina (EC), epicatequin-3-galato (ECG) y procianidina B2 (PB2) y los ácidos hidroxicinámicos clorogénico (CQA) y 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) a distintas concentraciones.	141
Figura 4.6. Evolución de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células Caco-2 a lo largo del tiempo tras la siembra en el sistema de Transwell.	143
Figura 4.7. Porcentaje del colorante rojo fenol (fenolsulfonftaleína, PSP) en los compartimentos del Transwell tras su carga en el lado apical y basolateral.	143
Figura 4.8. Perfil cromatográfico a λ_{\max} de 280 nm del medio de cultivo sin suero utilizado para el mantenimiento de las células Caco-2 y lisado celular.	144
Figura 4.9. Perfil cromatográfico a λ_{\max} de 280 nm del compuesto epicatequina (EC) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV del estándar EC.	145
Figura 4.10. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 280 nm del compuesto EC a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h.	146
Figura 4.11. Perfil cromatográfico tras la síntesis <i>in vitro</i> de los derivados metilados de la epicatequina (EC).	148
Figura 4.12. Extracted Ion Chromatogram (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados de la incubación de EC con células Caco-2 tras su análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa.	150
Figura 4.13. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 280 nm del compuesto epicatequin-3-galato (ECG) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar ECG.	154
Figura 4.14. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 280 nm del compuesto ECG a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h.	156
Figura 4.15. Perfil cromatográfico de la síntesis <i>in vitro</i> de los derivados metilados de epicatequin-3-galato (ECG).	157
Figura 4.16. Extracted Ion Chromatogram (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación de ECG con células Caco-2 y su análisis mediante la técnica LC-QTOF en modo de ionización negativo.	158
Figura 4.17. Extracted Ion Chromatogram (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos	159

identificados tras la incubación de ECG con células Caco-2 y su análisis mediante la técnica LC-QTOF en modo de ionización negativo.	
Figura 4.18. Perfil cromatográfico a λ_{max} 280 nm del compuesto procianidina B2 (PB2) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar PB2.	164
Figura 4.19. Perfil cromatográfico a λ_{max} 280 nm del compuesto PB2 a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h.	165
Figura 4.20. Extracted Ion Chromatogram (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación de PB2 con células Caco-2 y su análisis mediante la técnica LC-QTOF en modo de ionización negativo.	167
Figura 4.21. Perfil cromatográfico a λ_{max} 326 nm del medio de cultivo celular sin suero utilizado para el mantenimiento de las células Caco-2 y del lisado celular.	172
Figura 4.22. Perfil cromatográfico a λ_{max} 326 nm del ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar 5-CQA.	173
Figura 4.23. Perfil cromatográfico a λ_{max} 326 nm del compuesto 5-cafeoilquínico a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h.	174
Figura 4.24. EIC (Extracted Ion Chromatogram) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados de la incubación del ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) con células Caco-2 tras su análisis mediante la técnica LC-QTOF en modo de ionización negativo.	176
Figura 4.25. Perfil cromatográfico a λ_{max} 326 nm del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar 3,5-diCQA.	180
Figura 4.26. Perfil cromatográfico a λ_{max} 326 nm del ácido 3,5-dicafeoilquínico a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h.	181
Figura 4.27. Extracted Ion Chromatogram (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) con células Caco-2 y su análisis mediante la técnica LC-QTOF en modo de ionización negativo.	183
Figura 4.28. Extracted Ion Chromatogram (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) con células Caco-2 y su análisis mediante la técnica LC-QTOF en modo de ionización negativo.	184
Figura 4.29. Metabolismo propuesto para la epicatequina por las células intestinales Caco-2.	187
Figura 4.30. Metabolismo propuesto para el epicatequín-3-galato por las células intestinales Caco-2.	188
Figura 4.31. Metabolismo propuesto para la procianidina B2 por las células intestinales Caco-2.	189
Figura 4.32. Ruta de biotransformación del ácido clorogénico y el ácido 3,5-dicafeoilquínico en las células del epitelio intestinal, Caco-2.	190
Figura 4.33. Transporte de flavanoles (EC, ECG y PB2) y ácidos hidroxicinámicos (5-CQA y 3,5-diCQ) a través de la monocapa de células Caco-2 tras 4 h de incubación.	193
Figura. 4.34. Espectros de masas MS^2 de los metabolitos detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao..	205

Figura 4.35. Espectros de masas MS ² de los metabolitos derivados de hidroxifenilvalerolactonas detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao.	208
Figura 4.36. Espectros de masas MS ² de los metabolitos derivados de ácido valérico detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao.	211
Figura 4.37. Espectros de masas MS ² de los metabolitos microbianos detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao.	212
Figura 4.38. Espectros de masas MS ² de los metabolitos microbianos detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao.	213
Figura 4.39. Concentración plasmática (nM) de los metabolitos de fase II derivados de la epicatequina identificados tras el consumo de los productos solubles de cacao control (CC) y rico en polifenoles (CC-PP).	215
Figura 4.40. Concentración plasmática (nM) de los metabolitos de origen microbiano identificados tras el consumo de los productos solubles de cacao control (CC) y cacao rico en polifenoles (CC-PP).	214
Figura 4.41. Concentración plasmática en nM de los metabolitos de origen microbiano identificados tras el consumo de los productos solubles de cacao control (CC) y cacao rico en polifenoles (CC-PP).	216
Figura 4.42. Metabolitos de fase II de la epicatequina.	228
Figura 4.43. Ruta de biotransformación de la epicatequina y el dímero PB2 por acción de la microbiota intestinal.	231
Figura 4.44. Espectros de masas MS ² correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.	244
Figura 4.45. Espectros de masas MS ² correspondiente a los metabolitos identificados en plasma y/u orina de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate	246
Figura 4.46. Espectros de masas MS ² correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.	251
Figura 4.47. Espectros de masas MS ² correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.	253
Figura 4.48. Espectros de masas MS ² correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.	254
Figura 4.49. Concentración plasmática expresada en μM de los metabolitos derivados de los hidroxicinámicos identificados tras el consumo del café mezcla tostado/verde.	257
Figura 4.50. Concentración plasmática expresada en μM de los metabolitos derivados de los hidroxicinámicos identificados tras el consumo de yerba mate.	269
Figura 4.51. Metabolismo de fase II propuesto para los ácidos hidroxicinámicos presentes en café mezcla tostado/verde	279
Figura 4.52. Metabolismo microbiano propuesto para los ácidos hidroxicinámicos presentes en el café.	282
Figura 4.53. Comparación del porcentaje de eliminación urinaria de los principales grupos de metabolitos identificados en los estudios con café mezcla tostado/verde y yerba mate.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales clases de compuestos fenólicos y su presencia en algunos alimentos.	11
Tabla 1.2. Subclases de flavonoides y su presencia en algunos alimentos.	14
Tabla 1.3. Tipos de ensayos clínicos de intervención.	44
Tabla 1.4. Metabolitos de fase II de catequina/epicatequina detectados en plasma y orina tras el consumo de cacao (y derivados) en estudios en humanos.	54
Tabla 1.5. Metabolitos de la fase II y de origen microbiano de ácidos hidroxicinámicos detectados tras el consumo de café verde y café tostado en estudios en humanos.	69
Tabla 3.1. Gradiente cromatográfico para el análisis de los flavonoides de los productos solubles del cacao.	91
Tabla 3.2. Gradiente cromatográfico para el análisis de los ácidos hidroxicinámicos del café mezcla tostado/verde y yerba mate.	92
Tabla 3.3. Rectas de calibrado y coeficientes de correlación utilizadas para la cuantificación de compuestos fenólicos presentes en las muestras de alimentos.	92
Tabla 3.4. Gradiente cromatográfico para el análisis de los metabolitos celulares procedentes de la incubación con flavanoles (epicatequina, epicatequín galato y procianidina B2) y ácidos hidroxicinámicos (ácidos clorogénico y 3,5-dicafeoilquínico).	99
Tabla 3.5. Rectas de calibrado, coeficientes de correlación utilizados para la cuantificación de metabolitos generados en los estudios con el modelo celular Caco-2.	100
Tabla 3.6. Condiciones del equipo LC-QTOF empleadas para el análisis de metabolitos derivados de compuestos fenólicos.	101
Tabla 3.7. Gradiente cromatográfico para el análisis de los metabolitos celulares procedentes de la incubación con los flavanoles (epicatequina, epicatequín-galato y procianidina B2) y ácidos hidroxicinámicos (ácidos clorogénico y 3,5-dicafeoilquínico).	101
Tabla 3.8. Características basales de los individuos participantes en el estudio de biodisponibilidad de los productos solubles de cacao, cacao control (CC) y cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP).	105
Tabla 3.9. Características basales de los individuos participantes en el estudio de biodisponibilidad de café mezcla tostado/verde y yerba mate.	109
Tabla 3.10. Condiciones del equipo LC-QTOF empleadas para el análisis de metabolitos derivados de compuestos fenólicos presentes en las muestras biológicas (plasma y orina) de los estudios de biodisponibilidad con voluntarios sanos.	113
Tabla 3.11. Gradiente cromatográfico para el análisis de los metabolitos presentes en las muestras de plasma y orina de los estudios de biodisponibilidad de polifenoles presentes en productos solubles de cacao, café mezcla tostado/verde y yerba mate.	114
Tabla 3.12. Rectas de calibrado, coeficientes de correlación, límite de detección (LD) y cuantificación (LC) de los estándares utilizados para la cuantificación de metabolitos detectados en el plasma de voluntarios de los estudios de intervención.	114

Tabla 3.13. Rectas de calibrado, coeficientes de determinación, límite de detección (LD) y cuantificación (LC) de los estándares utilizados para la cuantificación de metabolitos detectados en la orina de voluntarios de los estudios de intervención.	115
Tabla 4.1. Características espectroscópicas y tiempos de retención (TR) de los compuestos fenólicos y metilxantinas identificados en los productos solubles de cacao (CC y CC-PP) mediante análisis por HPLC-DAD y LC-MS en modo de ionización negativa.	123
Tabla 4.2. Contenido fenólico de los productos solubles de cacao control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP), determinado por el método de Folin-Ciocalteu y por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-DAD).	124
Tabla 4.3. Características espectroscópicas de los compuestos fenólicos identificados en la infusión de café mezcla tostado/verde mediante análisis por HPLC-DAD y LC-MS.	127
Tabla 4.4. Contenido fenólico del café soluble mezcla tostado/verde determinado por el método de Folin-Ciocalteu y por cromatografía líquida (HPLC-DAD).	129
Tabla 4.5. Características espectroscópicas de los compuestos fenólicos identificados en la infusión yerba mate mediante análisis por HPLC-DAD y LC-MS.	132
Tabla 4.6. Contenido fenólico de la infusión de yerba mate determinado por el método de Folin-Ciocalteu y por cromatografía líquida (HPLC-DAD).	133
Tabla 4.7. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μ M epicatequina (EC) con células Caco2 tras el análisis mediante LC-QTOF en modo negativo y confirmación por MS/MS.	149
Tabla 4.8. Presencia extracelular e intracelular de los distintos metabolitos de epicatequina generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.	151
Tabla 4.9. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) de entrada desde el compartimento apical al basolateral (AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (BL a AP) e índice de absorción (IA).	152
Tabla 4.10. Cuantificación intra- y extracelularmente de la epicatequina y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.	153
Tabla 4.11. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μ M epicatequín-3-galato (ECG) con células Caco-2 y análisis mediante LC-QTOF en modo de ionización negativa y confirmación por MS/MS.	161
Tabla 4.12. Presencia extracelular e intracelular de los distintos metabolitos de epicatequín-3-galato (ECG) generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.	161
Tabla 4.13. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) de entrada desde el compartimento apical al basolateral (Papp AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (Papp BL a AP) e índice de absorción (IA).	162
Tabla 4.14. Cuantificación intra- y extracelularmente de epicatequín-3-galato (ECG) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.	162
Tabla 4.15. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μ M procianidina B2 (PB2) con células Caco-2 tras el análisis mediante LC-QTOF en modo de ionización negativa y confirmación por MS/MS.	166

Tabla 4.16. Presencia extracelular e intracelular de los distintos metabolitos de procianidina B2 generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.	168
Tabla 4.17. Cuantificación intra- y extracelularmente de la procianidina B2 (PB2) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.	170
Tabla 4.18. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μ M ácido clorogénico (5-CQA) con células Caco2 tras el análisis mediante LC-QTOF en modo negativo y confirmación por MS/MS.	177
Tabla 4.19. Presencia extracelular e intracelular de los distintos metabolitos del ácido 5-cafeoilquínico generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.	177
Tabla 4.20. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) de entrada desde el compartimento apical al basolateral (AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (BL a AP) así como el índice de absorción (IA).	178
Tabla 4.21. Cuantificación intra- y extracelular del ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.	179
Tabla 4.22. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) con células Caco-2 tras el análisis mediante LC-QTOF en modo de ionización negativa y confirmación por MS/MS.	182
Tabla 4.23. Presencia extracelular e intracelular de los distintos metabolitos del ácido 3,5-dicafeoilquínico generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.	185
Tabla 4.24. Coeficiente de permeabilidad aparente Papp de entrada desde el compartimento apical al basolateral (AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (BL a AP) así como el índice de absorción (IA).	185
Tabla 4.25. Cuantificación intra- y extracelularmente del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.	186
Tabla 4.26. Características de metabolitos de fase II y microbianos potencialmente presentes en las muestras biológicas de los voluntarios que consumieron los distintos productos de cacao.	203
Tabla 4.27. Caracterización por LC-QTOF con ionización negativa de los metabolitos de fase II y microbianos hallados en los fluidos biológicos de los voluntarios que consumieron cacao.	207
Tabla 4.28. Parámetros farmacocinéticos de los metabolitos de fase II y microbianos observados en el plasma tras el consumo de los productos solubles de cacao (CC y CC-PP).	218
Tabla 4.29. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μ mol tras el consumo del producto soluble de cacao control (CC).	222
Tabla 4.30. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μ mol tras el consumo del producto soluble de cacao rico en polifenoles (CC-PP).	223
Tabla 4.31. Características de los metabolitos potencialmente presentes en las muestras biológicas de los voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.	239
Tabla 4.32. Caracterización por LC-QTOF con ionización negativa de los metabolitos de fase II y microbianos hallados en los fluidos biológicos de los voluntarios que consumieron café mezcla	243

tostado/verde y yerba mate

Tabla 4.33. Caracterización de los metabolitos de la fase II y microbianos por detección de espectrometría de masas en modo negativo hallados en los fluidos biológicos de los voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate. 256

Tabla 4.34. Parámetros farmacocinéticos de los compuestos sin metabolizar y metabolitos de fase I, fase II y microbianos observados en el plasma tras el consumo del café mezcla tostado/verde. 260

Tabla 4.35. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo del café mezcla tostado/verde. 264

Tabla 4.36. Parámetros farmacocinéticos de los metabolitos sin metabolizar, de fase II y microbianos observados en el plasma tras el consumo de yerba mate. 270

Tabla 4.37. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo de la infusión de yerba mate. 276

TITLE

Dietary flavonoids and hydroxycinnamic acids metabolism. *In vitro* transport experiments and bioavailability studies in humans.

INTRODUCTION

The relationship between diet and health has been extensively investigated. Epidemiological studies consider that a diet rich in foods with a high content in phenolic compounds have beneficial health effects, preventing cancer, diabetes, cardiovascular and neurodegenerative diseases. Polyphenols are an important group of phytochemicals which may play an important role in these beneficial health effects. Nowadays, the food industry is manufacturing new products adding functional ingredients, such as polyphenols, which may improve their healthy properties.

Cocoa and coffee are highly consumed products in the Spanish diet, both containing high amounts of polyphenols. However, it should be noted that coffee loses part of its bioactive compounds during the roasting process. Considering the popularity of this beverage and the demand for healthy foods, some companies are starting to commercialize green coffee products. However, green coffee is too astringent due to its high phenol content; alternatively the blend of green coffee with roasted coffee could balance the flavor and preserve a greater part of the bioactive compounds present in unroasted green coffee beans. Similarly, new soluble cocoa products enriched with dietary components such as polyphenols are being introduced into the food market.

On the other hand, consumption of yerba mate, a very popular beverage in South America, is widely spreading around the world due to its positive effects on health.

The health benefits attributed to cocoa, coffee and yerba mate depend on the bioavailability of their bioactive compounds. Bioavailability may be defined as the fraction of the ingested compound that appears in the bloodstream, either as the parent molecule or as its derived metabolites. Bioavailability is considered a key aspect for understanding the role that food molecules might play in preventing disease.

ABSTRACT

OBJECTIVES AND RESULTS

The general aim of this Thesis was to study the bioavailability and metabolism of flavonoids in cocoa and hydroxycinnamic acids in coffee (a blend of green/roasted coffee) and yerba mate. For this purpose the characterization and quantification of the major phenolic compounds in soluble cocoa, coffee and yerba mate was performed. In addition, *in vitro* transport and cellular metabolism studies of the major flavonoids in cocoa and hydroxycinnamic acids in coffee and yerba mate were evaluated using a human intestinal epithelium model (Caco-2 cells). Additionally, the bioavailability and metabolism of cocoa flavonoids and coffee and yerba mate hydroxycinnamic acids have also been evaluated in humans by carrying out pharmacokinetic studies.

The quantification of the phenolic fraction of the soluble cocoa products, coffee and yerba mate was assessed using two complementary methods, the classic colorimetric Folin-Ciocalteu assay, and chromatographic techniques (HPLC-DAD and LC-MS). The phenolic content in the two cocoa products studied [control cocoa (CC) and a cocoa product enriched in polyphenols (CC-PP)] reached 1.3 and 2.7 mg/g, respectively, being the flavanols epicatechin and procyanidin B2 the major compounds identified. The phenolic content of the green/roasted coffee blend and yerba mate was higher than that of cocoa products, 85.1 mg/g and 80,6 mg/g, respectively, being the major compounds hydroxycinnamic acids, such as caffeoylquinic and dicaffeoylquinic acids. Yerba mate also showed 4.1% of flavonols, mainly rutin and minor amounts of kaempferol-rhamnoglucoside.

In vitro transport and metabolism studies were performed using a human intestinal epithelium model (Caco-2 cells). The cells were grown on a microporous membrane until a differentiated monolayer was established after 21 days in a bicameral system (Transwell plates). The major phenolic compounds previously detected in the above mentioned foods, epicatechin and procyanidin B2, in addition to 5-caffeoylquinic and 3,5-dicaffeoylquinic acids were evaluated. Additionally, the flavanol epicatechin-3-gallate was characterized to determine the possible influence of the chemical structure on the transport and metabolism of this flavanol. The results obtained show that the different chemical structures of the phenolic compounds affected their metabolism and transport across the cell monolayer. Transport was limited (1% for epicatechin, 2% for epicatechin-3-gallate, 5% for 5-caffeoylquinic acid and 8% for 3,5-dicaffeoylquinic acid) and is modulated by efflux mechanisms for flavanols and absorption mechanisms for

hydroxycinnamic acids. Procyanidin B2 was barely absorbed by Caco-2 cells. Regarding the chemical nature of the studied metabolites, flavanols such as epicatechin and epicatechin-3-gallate were preferentially methylated and to a much lower extent sulphated, while 5-caffeoylquinic and 3,5-dicaffeoylquinic acids were hydrolyzed by Caco-2 cells into caffeic acid and subsequently methylated to ferulic acid. Procyanidin B2 was not hydrolyzed by the cells, although it was methylated.

Regarding bioavailability studies in humans, an LC-QTOF was optimized to identify and quantify phenolic metabolites in biological samples. A crossover, randomized, single-blind study was performed in healthy volunteers who drank the two soluble cocoa products (CC and CC-PP) dissolved in skimmed milk on different days. Similarly, a crossover and randomized study evaluated hydroxycinnamic acid bioavailability in healthy volunteers, who drank a soluble green/roasted coffee blend (35% green/65% roasted) in water and an infusion of dried leaves of yerba mate.

The metabolites detected in plasma and urine after the ingestion of the cocoa products were mainly sulphated and/or methylated, and to a lower extent glucuronidated epicatechin conjugates. Plasma metabolites showed a dose-dependent relationship and reached maximum concentrations (C_{max}) shortly after ingestion (1.0-1.5 h). These compounds were mostly excreted 4 h after intake, suggesting that absorption took place at intestinal level. Urinary metabolites accounted for 13% and 11% of the total amount of polyphenols ingested after drinking the control and polyphenol-rich cocoas, respectively. Additionally, metabolites belonging to hydroxyphenylvalerolactone and valeric acid series were characterized, which originate from enzymatic biotransformation of epicatechin by the microbiota, as well as their phase II derived forms. The major metabolite was dihydroxyphenylvalerolactone-3'-sulphate. Plasma kinetics of these compounds showed a T_{max} at 5-6 h, and major excretion took place 4-8 h after intake, in accordance with their colonic origin. The total content of these colonic metabolites in urine (24.6 and 83.8 μ moles for CC and CC-PP, respectively) showed a dose-dependent relationship. Total excretion reached 36.0% and 35.6%, respectively, of the ingested dose.

Hydroxycinnamic acids in coffee and yerba mate are partially bioavailable and extensively metabolized. Compounds detected in biological fluids after ingestion of coffee or yerba mate were unmetabolized hydroxycinnamate esters (caffeoyl-, feruloyl-, *p*-coumaroylquinic acids), hydroxycinnamic acids (caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids) and their phase II metabolites (sulphated, methylated and to a lesser extent

ABSTRACT

glucuronidated). In addition, sulphated caffeoylquinic lactones were detected. These metabolites reach C_{max} quickly (0.5-1.2 h) and were excreted before 4 h post-intake, which is consistent with absorption occurring in the small intestine. These metabolites represented 16.2% and 13.1% of the total metabolites excreted after coffee and yerba mate ingestion, respectively. Microbial metabolites dihydroderivatives of hydroxycinnamic acids (dihydrocaffeic, dihydroferulic and dihydrocoumaric acids) and their phase II derivatives, in addition to feruloylglycine and *isoferuloylglycine*, were detected. These compounds reached their C_{max} later, 5.4 y 6.4 h, and were largely excreted during 4-8 h after ingestion. The most abundant metabolites were dihydrocaffeic-3-sulphate, dihydroferulic, dihydroferulic-4-sulphate and feruloylglycine. Furthermore, dihydroferuloyl-, dihydrocaffeoyl- and *p*-dihydrocoumaroylquinic acids were identified in urine for the first time in an *in vivo* study. These compounds were mainly excreted between 8 and 12 h after coffee and yerba mate intake, in agreement with their microbial origin (accounting for up to 8% of total urinary metabolites). Additionally, two flavonol phase II derivatives from kaempferol and quercetin were identified after ingestion of the yerba mate. Their pharmacokinetic parameters point to having microbial origin. Total urinary excretion of hydroxycinnamic acids (126.4 and 147.6 μ moles respectively) corresponded to 15.0% of the ingested dose for the coffee and 13.2% for the yerba mate, respectively.

CONCLUSIONS

Phenolic chemical characterization of soluble cocoa products, soluble green/roasted (35/65) coffee blend and yerba mate highlights the importance of these products as dietetic sources of polyphenols, specifically flavanols in cocoa and hydroxycinnamic acids in coffee and yerba mate.

The distinct chemical structure of the phenolic compounds studied affected their transport and metabolism through the human intestinal epithelium in an *in vitro* model. These compounds are scarcely absorbed by Caco-2 cells and partially metabolized. Flavanols were preferentially methylated, and to a lower extent sulphated, while hydroxycinnamic acids were mainly hydrolyzed and subsequently methylated. These results show that flavanols and hydroxycinnamic acids are absorbed in the small intestine to a limited extent, reaching the colon where they would be susceptible to microbiota action, determining the final fate of these compounds.

The metabolites found in plasma and urine of volunteers showed that the major metabolites detected at short times post-intake were mainly phase II derivatives and unmetabolized hydroxycinnamic acids, indicating that their absorption occurs most likely in the small intestine. On the other hand, those metabolites which appeared at longer times after consuming the drinks were very likely to be produced by colonic microbiota. These microbial metabolites are the most abundant, comprising compounds derived from flavanol C-ring fission and reduced forms of hydroxycinnamic acids, in addition to their phase II derivatives after colonic absorption.

In conclusion, phenolic compounds naturally present in cocoa products, a green/roasted coffee blend and yerba mate, are partially bioavailable and extensively metabolized after realistic intakes of these beverages, the colonic microbiota having an especial implication on their metabolism.

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Definición y aspectos generales

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo funcional fenol. Muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas y tienen estructuras químicas que cuentan con más de un grupo fenol por molécula (polifenoles, en sentido estricto) (ver Tabla 1.1.).

En su origen, los polifenoles son metabolitos secundarios derivados de las vías del ácido siquímico o del acetato que aparecen como respuesta a situaciones de estrés (plagas, herbívoros, luz ultravioleta), haciendo a la planta más resistente (Bravo, 1998). Los compuestos fenólicos son ubicuos en alimentos y bebidas de origen vegetal (verduras, cereales, legumbres, frutas, frutos secos, semillas, vino, sidra, cerveza, café, té, etc.), por lo que constituyen una parte importante de la dieta (Manach y cols., 2004). Sin embargo, su concentración varía mucho no sólo entre especies vegetales, sino incluso entre cultivos de una misma especie, dependiendo tanto de características genéticas como de factores ambientales (Bravo, 1998). Estos compuestos, que suelen estar en mayor concentración en las partes externas de la planta (piel y cáscara, por ejemplo), son en gran parte responsables de las características organolépticas de los alimentos que los contienen (D'Archivio y cols., 2010). Así mismo, los polifenoles están directamente relacionados con la coloración de frutas y verduras (Harborne, 1993). También el pardeamiento de los alimentos vegetales está relacionado con los compuestos fenólicos; así, la formación de pigmentos amarillos y marrones durante su manipulación y procesado está controlada por los niveles de polifenoles, la presencia de oxígeno y la actividad de la enzima polifenol oxidasa (Shahidi y Naczki, 1995). Se trata de las reacciones de pardeamiento enzimático, en contraposición al pardeamiento no enzimático que se da en alimentos procesados térmicamente por la Reacción de Maillard.

El interés nutricional de los compuestos fenólicos subyace en que diferentes estudios epidemiológicos consideran que una dieta abundante en alimentos ricos en polifenoles tendría efectos beneficiosos en la salud protegiendo frente a ciertas patologías (Arts y Hollman, 2005; Scalbert y cols., 2005a; Vauzour y cols., 2010), tal como la enfermedad cardiovascular (Hertog y cols., 1993; Quiñones y cols., 2013; Tresserra-Rimbau y cols., 2013), el cáncer (Tabrez y cols., 2013; Wang y cols., 2013), la diabetes (Nicolle y cols., 2011; Liu y cols., 2014; Habtemariam y Varghese, 2014) o las

enfermedades neurodegenerativas (Smid y cols., 2012, Wang y cols., 2014), entre las más estudiadas.

A continuación se ofrece una breve revisión de los distintos grupos de compuestos fenólicos identificados, su presencia e ingesta a partir de la dieta, biodisponibilidad y efectos fisiológicos más relevantes que hasta la fecha se conocen sobre estos compuestos.

Clasificación de los compuestos fenólicos

Se conocen más de 8000 compuestos diferentes, que abarcan desde moléculas simples con bajo peso molecular hasta compuestos altamente polimerizados, generalmente conjugados con azúcares (glicósidos) u otros compuestos orgánicos (Bravo, 1998; Tsao, 2010).

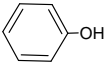
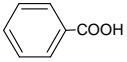
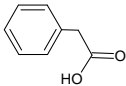
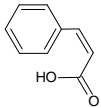
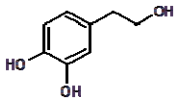
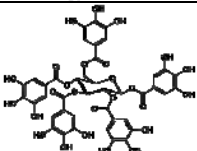
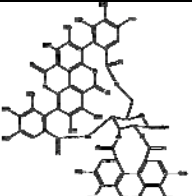
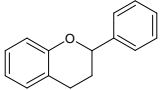
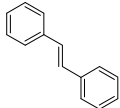
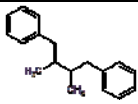
La clasificación de los polifenoles podría hacerse en base a su origen, su actividad biológica, su peso molecular o su estructura química. Atendiendo a sus características estructurales, los polifenoles de la dieta se pueden agrupar fundamentalmente en fenoles simples, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, taninos hidrolizables y condensados, flavonoides, estilbenos y lignanos (Bravo, 1998; Scalbert y Williamson, 2000). En la Tabla 1.1. se muestran estas estructuras, ejemplos de cada grupo de compuestos y alimentos que los contienen.

Los **fenoles simples** constituyen el grupo de compuestos con la estructura fenólica más sencilla, que consta de un anillo aromático (C_6) como principal unidad estructural de fenol, cresol, timol y resorcinol, entre otros. Se han identificado en el tomate, espárrago, tomillo, trigo, avena y centeno (Tabla 1.1.).

Los **ácidos fenólicos** se caracterizan estructuralmente por un anillo fenol (C_6) con un sustituyente carboxílico, dando lugar a ácidos hidroxibenzoicos (C_6-C_1), ácidos fenilacéticos (C_6-C_2) o ácidos fenilpropiónicos, y en particular, ácidos hidroxicinámicos (C_6-C_3) (Tabla 1.1.).

Dentro de los *ácidos hidroxibenzoicos* (C_6-C_1) se encuentran los ácidos gálico, vainílico, hidroxibenzoico, protocatéquico y siríngico, entre otros, que se han identificado en especias (clavo, albahaca, tomillo, canela, nuez moscada o anís estrellado), frutos secos (castaña, dátil o nuez), frutos del bosque, aceitunas/aceite o té negro.

Tabla 1.1. Principales clases de compuestos fenólicos y su presencia en algunos alimentos (Modificado de Bravo, 1998).

Clase	Subclase	Esqueleto carbonado	Estructura Básica	Ejemplos	Alimentos
Fenoles simples		C ₆		Cresol Timol Resorcinol	Tomate, Espárrago, Tomillo, Trigo, Avena, Centeno
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	C ₆ -C ₁		Ácido gálico Ácido vainílico Ác. hidroxibenzoico Ác. protocatéquico Ácido siringico	Castaña, Clavo, Té negro, Albahaca, Tomillo, Canela, Cerveza, Nuez moscada, Dátil, Frutas del bosque Anís estrellado Nueces, Aceitunas
	Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂		Ácido hidroxifenilacético Ác. homovainílico	Aceitunas, Vino tinto, Cerveza
	Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃		Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido cumárico	Café, Yerba mate, Tomates, Cerveza, Trigo
Alcoholes fenólicos		C ₆ -C ₂		Hidroxitirosol Tirosol	Aceite de oliva
Taninos Hidrolizables	Galotaninos	(C ₆ -C ₁) _n		Ácido tánico	Té, Sidra, Fruta inmadura
	Elagitaninos	(C ₆) _n		Punicalagina	Granada
Flavonoides	Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆		Epicatequina Quercetina Apigenina Naringenina Cianidina Daidzeína	Cacao , Té verde, Alcaparras, Cebolla, Manzana, Mejorana, Orégano, Apio, Alcachofa
Estilbenos		C ₆ -C ₂ -C ₆		Resveratrol Pteroesstilbeno	Vino tinto, uva
Lignanos		(C ₆ -C ₃) ₂		Enterodiol Pinoresinol	Semillas de lino, Linaza, Sésamo, Avena, Aceite de oliva

Los *ácidos fenilacéticos* (C₆-C₂) son un grupo abundante de compuestos entre los que destacan el ácido hidroxifenilacético y homovanílico, presentes en las aceitunas, vino tinto y cerveza.

Los *ácidos hidroxicinámicos* (C₆-C₃) son un importante grupo de fenoles de bajo peso molecular, entre los que destacan los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico. Estos últimos suelen encontrarse como derivados glicosilados, pero también esterificados con ácido quínico, siquímico o tartárico. La conjugación de ácidos hidroxicinámicos con ácido quínico (QA) da lugar a diversos derivados cafeoilquínicos (3-, 4- y 5-cafeoilquínico), feruloilquínicos (3-, 4- y 5-feruloilquínico), dicafeoilquínicos (3,4-, 3,5- y 4,5-dicafeoilquínico), diferuloilquínicos (3,4-, 3,5- y 4,5-diferuloilquínico), p-cumaroilquínicos, etc., siendo el ácido 5-*O*-cafeoilquínico, comúnmente conocido *ácido clorogénico*, el principal polifenol del café y la yerba mate. El ácido ferúlico suele estar presente en forma libre en los tomates y la cerveza, siendo el compuesto fenólico más abundante en los granos de cereales, mayoritariamente conjugado con arabinosilanos de las paredes celulares de los vegetales (Kroon y Williamson, 1999).

Con una estructura C₆-C₂ equivalente a la de los ácidos fenilacéticos cabe destacar los **alcoholes fenólicos**. Estos compuestos son de elevada importancia en el aceite de oliva virgen, donde se encuentran el hidroxitirosol y tirosol como los compuestos más representativos de este grupo (Tabla 1.1.).

La condensación de varias unidades de ácidos fenólicos resulta en compuestos de elevado peso molecular conocidos como **taninos hidrolizables**, que a su vez pueden dividirse en *galotaninos* y *elagitaninos* dependiendo de la naturaleza del anillo benzoico, ácido gálico o elágico, respectivamente. El ácido tánico es un representante del grupo de los galotatinos bien caracterizado, presente en té, sidra y frutas inmaduras, mientras que la punicalagina, del grupo de los elagitaninos, se encuentra fundamentalmente en granada (Clifford y Scalbert, 2000).

Los **flavonoides** constituyen el grupo más numeroso dentro de la clasificación mostrada en la Tabla 1.1., con más de 5000 compuestos. Los flavonoides se caracterizan por una estructura de difenilpropano (C₆-C₃-C₆), consistente en dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo oxigenado de 3 átomos de carbono (anillo pirano, C) (Figura 1.1.). En función del estado de oxidación del heterociclo y del número y posición de los sustituyentes hidroxilo, los flavonoides pueden clasificarse en 6 subgrupos (Manach y cols., 2004): flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavan-3-ol (o flavanoles) (Bravo, 1998). Los flavonoides se encuentran mayoritariamente

en su forma glicosilada (*O*-glicósidos y *C*-glicósidos), aunque también pueden ocurrir en las plantas en forma libre (agliconas) o conjugada (esterificados, sulfatados, etc.). Los azúcares preferentemente incorporados son hexosas (glucosa, galactosa, ramnosa) y pentosas (xilosa y arabinosa), unidos generalmente mediante enlaces β -glicosídicos en la posición C_3 y C_7 , aunque otras posiciones también son posibles (Hollman y Arts, 2000). En la Figura 1.1. se muestra la estructura química básica de cada subgrupo de flavonoides y en la Tabla 1.2. se recogen los ejemplos más característicos y su presencia en alimentos.

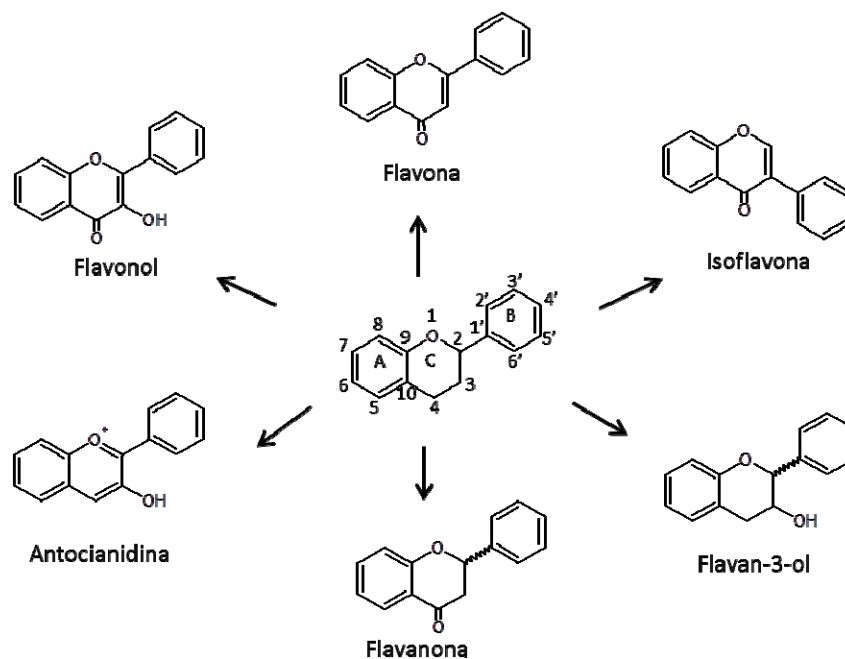


Figura 1.1. Estructura básica de los flavonoides, su sistema de numeración (centro) y sus principales subclases. Modificado de Bravo (1998).

Los *flavonoles* se caracterizan por tener un grupo cetona en el carbono C_4 y una insaturación entre los carbonos C_2 y C_3 . Además tienen un grupo hidroxilo adicional en el carbono C_3 . Es el grupo más ubicuo de flavonoides presente en los alimentos siendo la quercetina el compuesto más representativo presente en cebolla, manzana, etc. Otras fuentes de flavonoles son las verduras como las alcaparras, el vino y el té.

Las *flavonas* poseen un grupo cetona en el carbono C_4 y una insaturación entre los carbonos C_2 y C_3 . Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos. Perejil y apio

1. Introducción

representan las mayores fuentes de flavonas, además de la pimienta, la piel de algunos frutos y el aceite de oliva virgen. Las principales flavonas son luteolina y apigenina.

Las *flavanonas* son compuestos análogos a las flavonas con el anillo pirano saturado. Constituyen un grupo minoritario en los alimentos, apareciendo en grandes concentraciones en los cítricos, además de tomates y plantas aromáticas como la menta. Las flavanonas más importantes son naringenina y hesperetina, aunque frecuentemente se encuentran glicosiladas como naringina y hesperidina, respectivamente. Generalmente se localizan en las partes sólidas, por lo que la concentración en zumo puede llegar a ser hasta 5 veces menor que en el fruto.

Tabla 1.2. Subclases de flavonoides y su presencia en algunos alimentos.

Subclase	Tipos	Ejemplos	Alimentos
Flavonoles		Quercetina Kaempferol Miricetina Isoramnetina	Cebolla, Manzana, Alcaparras, Vino, Uva, Té
Flavonas		Apigenina Luteolina	Perejil, Apio, Aceite de oliva, Pimienta, Piel de algunos frutos
Flavanonas		Naringenina Hesperitina	Cítricos, Tomate, Menta
Antocianidinas		Cianidina Pelargonidina Delfinidina Peonidina Petunidina Malvidina	Vino tinto, Uva, Fresas, Bayas
Flavanoles	Catequinas	Catequina Epicatequina	Cacao, Vino, Té, Leguminosas
	Taninos condensados	Proantocianidina	Uva, Melocotón, Manzana, Vino, Té, Cerveza, Chocolate, Cacao
Isoflavonas		Daidzeína Genisteína	Soja y sus derivados (tofu)

Las *antocianidinas* constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La cianidina es la aglicona más importante, aunque las antocianidinas suelen estar glicosidadas formando los antocianos o antocianinas, responsables del color del vino tinto, uva, fresas y otras bayas.

Los *flavanoles* tienen el anillo pirano o C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C₃. Son los únicos flavonoides que no aparecen glicosilados en los alimentos; sin

embargo, suelen encontrarse esterificados, principalmente con ácido gálico. En la naturaleza pueden encontrarse como monómeros (catequinas) o con distintos grados de polimerización tal como los oligómeros (procianidinas) o polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Las principales fuentes de catequinas son té, vino y cacao, aunque los flavanoles también están presentes en muchas frutas, principalmente en la piel. Los flavan-3-oles (catequina, epicatequina, galocatequina, galocatequín-galato, epigalocatequina y epigalocatequín-galato) son los monómeros encontrados en fruta y té verde, mientras que los flavan-3,4-dioles predominan en leguminosas, uva y vino (Hollman y Arts, 2000).

La di-, oligo- o polimerización de flavanoles da lugar a los taninos condensados o proantocianidinas, considerados fenoles complejos. Estos compuestos aumentan su insolubilidad con el grado de polimerización y, dada su estructura química altamente hidroxilada, pueden formar complejos insolubles con carbohidratos y proteínas. La condensación más frecuente tiene lugar entre el C₄ del heterociclo y los C₆ ó C₈ del anillo A. Estos compuestos son los responsables del carácter astringente de ciertas frutas (uva, melocotón, manzana) y bebidas (vino, té, cerveza), así como del amargor del chocolate (Scalbert y cols., 2005a). A modo de ejemplo se indica en la Tabla 1.2. la proantocianidinina como un tanino condensado tipo de este grupo de compuestos.

Las *isoflavonas* poseen un anillo bencénico lateral en posición C₃ y presentan una estructura semejante a la de los estrógenos. En realidad, las isoflavonas se pueden unir a receptores de estrógenos y de ahí que se cataloguen como compuestos fitoestrógenos. Se pueden presentar como agliconas o a menudo conjugadas con glucosa, pero son termosensibles y pueden hidrolizarse durante su procesamiento industrial y durante su conservación. Este grupo está principalmente representado por genisteína y daidzeína, que habitualmente se encuentran glicosiladas dando lugar la genistina y daidzina, respectivamente. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas.

Los **estilbenos** constituyen otro grupo de fenoles de estructura C₆-C₂-C₆ presentes casi exclusivamente en uva y vino, pero que han despertado gran interés, en particular el resveratrol que contiene el vino, por su papel anticancerígeno, o el pterostilbeno presente en uva tinta (Tabla 1.1).

Por último, cabe destacar otro grupo de compuestos, los **lignan**os, que responden a la estructura C₆-C₃-C₃-C₆. Aunque se han encontrado en alimentos como el

aceite de oliva y los cereales, la linaza es la fuente más rica de estos compuestos fenólicos, tal como el enterodiol (Tabla 1.1.).

Algunos compuestos fenólicos son específicos de determinados alimentos (las flavanonas en los cítricos y las isoflavonas en la soja). Otros, como la quercetina, se pueden encontrar en un gran número de plantas (frutas, vegetales, cereales, leguminosas, té, vino, etc.). Generalmente, los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles. Además, algunos compuestos fenólicos se encuentran asociados a otros componentes de la matriz alimentaria como la fibra dietética (Bravo, 1998). Se trata, principalmente, de compuestos de alto peso molecular, tales como los taninos hidrolizables y condensados, aunque polifenoles de bajo peso molecular, como el ácido ferúlico, se encuentran frecuentemente asociados a los polisacáridos de la pared celular de las plantas. Estos feruloatos, al igual que los taninos, se comportarían como la fibra dietética, no siendo hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre, llegando intactos al intestino grueso. Algunos compuestos polifenólicos como los taninos hidrolizables derivados del ácido elágico (elagitaninos) pueden ser fermentados por la microbiota colónica, formando metabolitos como las urolitionas A y B, biodisponibles y con importantes propiedades anticancerígenas (Giménez-Bastida y cols., 2012).

Ingesta diaria de polifenoles

Determinar la composición de polifenoles presentes en los alimentos es primordial para conocer el consumo medio de estos compuestos en la dieta. Sin embargo, esta tarea puede resultar extremadamente complicada si se tiene en cuenta que la composición fenólica de un alimento viene condicionada, por factores genéticos y ambientales, y por otros relacionados con la manipulación industrial y culinaria, llegando a reducir la concentración de polifenoles en porcentajes muy significativos (Van der Sluis y cols., 2001). Además del contenido de fenoles en los alimentos, la ingesta diaria depende del consumo y los hábitos de ingesta de los individuos de la población. Hace más de una década Scalbert y Williamson (2000) estimaron que la ingesta diaria media de polifenoles estaría en torno a 1 g por persona y día.

Más recientemente, Saura-Calixto y cols. (2007) estimaron que el consumo de polifenoles en la dieta española se encontraba en torno a 2,6-3,0 g por persona y día, determinado por métodos espectrofotométricos que, por lo general, tienden a sobreestimar el contenido real de los alimentos. En el marco del estudio PREDIMED, la

ingesta diaria de polifenoles totales en una población adulta española se ha tasado cromatográficamente en $0,8 \pm 0,3$ g, procedente fundamentalmente de frutas, verduras y bebidas (Tresserra-Rimbau y cols., 2013). Estos autores indicaron que las clases de polifenoles mayoritariamente consumidos fueron flavonoides (54%) y ácidos fenólicos (37%), mientras que el 9% restante estaba compuesto de una mezcla de fenoles entre los que destacaban los estilbenos del vino, entre otros. Además, concretaron que la principal fuente de polifenoles procede de la fruta (naranjas, cerezas y manzanas), que aportan sobre todo flavonoides (flavanonas, flavonas, antocianos y catequinas). Las bebidas no alcohólicas tienen un papel importante en la contribución de ácidos fenólicos en la dieta española, particularmente el café como fuente de ácidos hidroxycinámicos, mientras que la bebida alcohólica rica en polifenoles por excelencia es el vino, como fuente importante de proantocianidinas (flavonoides). La consideración individual de los alimentos de la dieta española señala al café como la principal fuente de compuestos fenólicos en la dieta, contribuyendo con un 18% a la ingesta total de polifenoles, seguido de dos frutas: naranjas (16%) y manzanas (12%). Además, destacan los productos derivados del olivo, aceituna y aceite de oliva, que contribuyen en un 11%, seguido del vino tinto con un 6% (Tresserra-Rimbau y cols., 2013).

Se han reportado valores de ingesta de fenoles totales en otros países muy próximos a los del estudio PREDIMED. Así, la población finlandesa ingiere diariamente $0,8 \pm 0,4$ g de fenoles totales por persona y día (Ovaskainen y cols., 2008), siendo el grupo de polifenoles mayoritario los ácidos fenólicos (75%) proporcionados a través del café y los cereales, seguidos de proantocianidinas, que contribuyeron con 14% gracias al aporte de frutos rojos y derivados. En Polonia se han reportado valores de ingesta de compuestos fenólicos en adultos de 1,2 g por persona y día para hombres, y 1 g para mujeres (Zujko y cols., 2012), gracias al consumo de té, café, patatas, manzanas y pan blanco.

Por último, es importante indicar que los datos de ingesta proporcionados podrían estar subestimados, ya que los métodos habituales utilizados para la cuantificación de polifenoles en los alimentos no consideran aquellos asociados a otros componentes alimentarios como la fibra dietética, ni los compuestos fenólicos de alto peso molecular, que pueden escapar a algunos métodos de análisis (Bravo y cols., 1994).

1.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Muchos de los efectos biológicos de los polifenoles se han atribuido a su gran potencial antioxidante, dado que estos compuestos pueden proteger a los constituyentes de las células contra el daño oxidativo, limitando el riesgo de enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo (Scalbert y cols., 2005a). No obstante, hoy se sabe que estos compuestos son algo más que simples antioxidantes y que están implicados en muchos mecanismos y rutas moleculares que intervienen en distintas funciones fisiológicas, resultando en general en una disminución del riesgo de diversas patologías (Scalbert y cols., 2005a, 2005b; Crozier y cols., 2009).

Las principales actividades de los polifenoles y sus mecanismos de acción se presentan en la Figura 1.2. y se comentan más detenidamente a continuación.

Cabe mencionar que la actividad biológica de los compuestos fenólicos y sus efectos en salud dependen de la dosis ingerida y de la biodisponibilidad de los mismos, como se verá más adelante.

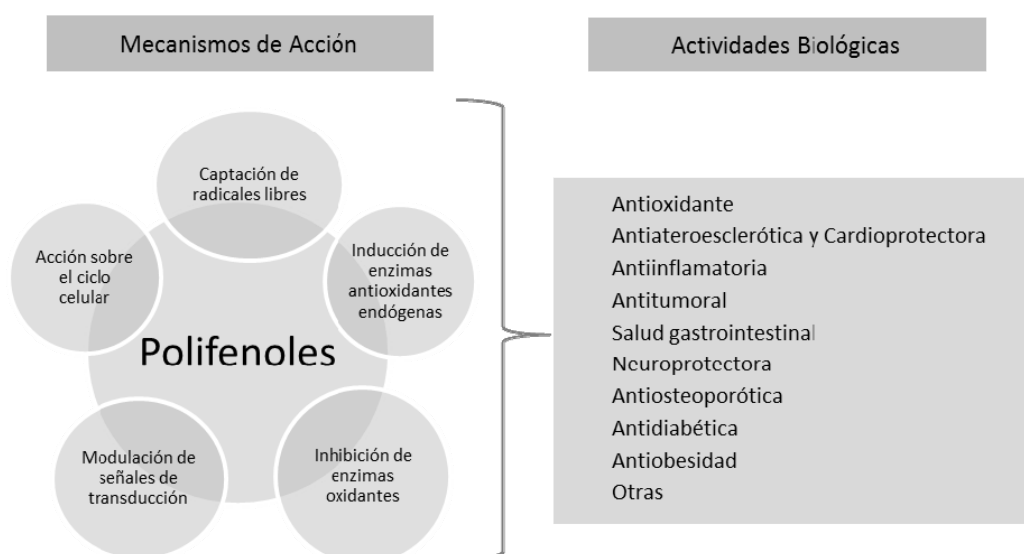


Figura 1.2. Mecanismos de acción y actividades biológicas de los polifenoles de la dieta (basado en Han y cols., 2007).

Actividad antioxidante

Dada su estructura química, los polifenoles son capaces de donar electrones a especies oxidantes, captar radicales libres y quelar iones metálicos (Bravo, 1998). Esta propiedad se ha relacionado con la actividad de los compuestos fenólicos para proteger frente a patologías relacionadas con desequilibrios en los sistemas antioxidantes, tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas y enfermedades inflamatorias (ver referencias en las secciones siguientes). En el metabolismo aerobio, que tiene lugar en la cadena respiratoria mitocondrial, se producen radicales libres, moléculas que tienen uno o más electrones desapareados y que se comportan como altamente reactivas hasta que obtienen el (o los) electrón(es) que le(s) falta(n) para conformarse estables. Los radicales libres más abundantes son los derivados de la molécula de oxígeno y, en conjunto, se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés). La reactividad de las ROS hace que ataquen moléculas próximas a los lugares de producción de los mismos, como lípidos de la membrana celular, proteínas o ácidos nucleicos, dando lugar a reacciones en cadena de oxidación lipídica, proteica y de ácidos nucleicos. Estas reacciones de oxidación están asociadas a procesos fisiológicos y patológicos como envejecimiento, cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedades neurodegenerativas, diabetes o cataratas, como revisan Scalbert y cols., (2005a).

En el organismo humano existen sistemas de protección contra estos radicales libres, sistemas endógenos enzimáticos (catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y sistemas no enzimáticos específicos (glutatión), así como fuentes exógenas procedentes de la dieta (como la vitamina C, vitamina E, carotenoides y polifenoles). Cuando estos mecanismos no son suficientes se produce un aumento de la oxidación, que se conoce como estrés oxidativo, que sería parcialmente responsable de las patologías señaladas anteriormente (Halliwell, 2012).

Resulta oportuno destacar que las ROS son utilizadas por el organismo en diferentes procesos fisiológicos y que nada tienen que ver con patologías. Así, intervienen en reacciones de la cadena respiratoria, en la agregación plaquetaria, el mantenimiento del potencial de membrana, la defensa frente a infecciones o en la detoxificación de xenobióticos. Es decir, las ROS cumplen funciones necesarias para el organismo si sus niveles son controlados adecuadamente. Si no ocurriese este control o no fuera efectivo, se generarían daños en las moléculas oxidables, de ahí la aparición y desarrollo de procesos patológicos o el envejecimiento.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos viene determinada fundamentalmente por su estructura química (Bravo, 1998), presentada en la Figura 1.1., que a su vez determinará el mecanismo de actuación que se detalla a continuación. Los fenoles pueden donar un átomo de hidrógeno a radicales libres o peróxidos, quedándose como radical fenoxilo, estable gracias a los dobles enlaces conjugados del anillo fenólico. De esta forma no se iniciarían o terminarían reacciones en cadena de oxidación con efectos deletéreos. Dicho radical fenoxilo también sería capaz de reaccionar con radicales libres, captándolos e impidiendo la propagación de las reacciones de oxidación. Por último, los polifenoles presentarían capacidad de quelar iones metálicos de hierro y cobre, lo que impediría las reacciones de Fenton que se producen al catalizar peróxido de hidrógeno con dichos metales de transición, con la consiguiente producción de radicales hidroxilo, altamente oxidantes.

Por otra parte y paradójicamente, algunos compuestos fenólicos han sido relacionados con actividad pro-oxidante, promoviendo la oxidación de otros compuestos. Así, Galati y O'Brien (2004) concluyen que los compuestos fenólicos que contienen un anillo fenólico son más pro-oxidantes que los polifenoles que contienen un anillo catecol. Según la revisión de Prochazkova y cols. (2011), aparentemente la capacidad antioxidante/pro-oxidante dependería principalmente de la concentración del compuesto en cuestión, lo que explicaría, al menos en parte, la toxicidad observada de algunos flavonoides *in vivo*.

Actividad antiateroesclerótica y cardioprotectora

Numerosas evidencias epidemiológicas y estudios observacionales en animales y en humanos han asociado el consumo regular de alimentos ricos en polifenoles, principalmente en flavonoides, con un efecto cardioprotector en humanos (revisados en Habauzit y Morand, 2012). En un análisis realizado por Hertog y cols. (1993) revisaron 16 estudios de cohorte, concluyendo que la ingesta de flavonoides estaba inversamente relacionada con la mortalidad por infarto de miocardio; sin embargo, otros autores advierten que las evidencias sobre la relación positiva entre polifenoles y salud cardiovascular son aún limitadas (Hollman y cols., 2011). Recientemente, Peterson y cols. (2012) han revisado un total de 12 estudios de cohorte llevados a cabo en Europa y Estados Unidos, concluyendo que existe una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y la mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV).

Los beneficios de los polifenoles en el sistema vascular surgen a raíz de sus propiedades antioxidantes, contribuyendo a mejorar el metabolismo lipídico y la función endotelial, reducir la presión sanguínea, inhibir la agregación plaquetaria y regular la respuesta inflamatoria (Vauzour y cols., 2010). El papel de los fenoles en el metabolismo lipídico es controvertido (revisado en Hooper y cols., 2008). De entre los posibles agentes reductores de los niveles de lípidos sanguíneos, cabe mencionar la acción de las catequinas por su capacidad para inhibir pasos críticos en la absorción intestinal del colesterol y otros lípidos (Koo y Noh, 2007), o los fenoles del aceite de oliva, por aumentar los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Covas y cols., 2006). Además, atendiendo a las propiedades antioxidantes de estos polifenoles, numerosos estudios en humanos han confirmado la capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) tras la ingesta de flavanoles del cacao (Mathur y cols., 2002) o de ácido clorogénico del café (Yukawa y cols., 2004), neutralizando los radicales libres que generan las células endoteliales, las del músculo liso vascular y los macrófagos. A este respecto cabe destacar los fenoles del aceite de oliva por la reciente alegación aprobada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), sobre la capacidad de prevenir la oxidación de las partículas LDL tras la ingesta de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados contenidos en 20 g de aceite de oliva virgen y/o virgen extra (EFSA, 2011).

La primera manifestación clínica y a menudo fatal de la enfermedad cardiovascular es la formación de un trombo, que puede producirse por la liberación de una placa de ateroma inestable, entre otras causas, y producir isquemia o infarto. En la formación del trombo, las plaquetas han de activarse y agregarse. Algunos estudios *in vivo* apuntan que los flavanoles tendrían efectos inhibidores de la activación a nivel de epinefrina, P-glicoproteína y P-selectina (revisado por Pearson y cols., 2005) y en la agregación plaquetaria (Holt y cols., 2006).

Otros estudios se han enfocado en los beneficios de los polifenoles a nivel endotelial. El efecto hipotensivo de los polifenoles se traduce en un aumento en la secreción de factores de relajación vascular como el óxido nítrico (NO) y una inhibición de los factores de contracción (Endotelina-1). Como consecuencia de la actividad antioxidante de los fenoles, se reduce la formación de peroxinitrito y otras especies reactivas de nitrógeno (RNS). El consumo de té, vino tinto, cacao o soja contribuyen al mantenimiento de una correcta función endotelial tanto en sujetos sanos como en aquellos en riesgo cardiovascular o cerebrovascular (Vita, 2005), ya que los alimentos

ricos en flavonoides favorecen una mayor biodisponibilidad de NO (Heiss y cols., 2007). Por su parte, el ácido clorogénico y/o sus metabolitos también han mostrado un descenso en la presión sanguínea de adultos sanos, aunque los mecanismos no han sido aún bien establecidos (Mubarak y cols., 2012).

Actividad antiinflamatoria

La respuesta inflamatoria es una reacción fisiológica localizada y protectora del organismo frente a la presencia de un estímulo agresor. La inflamación aguda es una respuesta inmediata frente al agente lesivo en la que prevalece la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la migración leucocitaria. En la inflamación crónica, que ocurre por resolución incompleta del foco inflamatorio inicial o episodios múltiples en el mismo sitio, prevalece la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos y el desarrollo de fibroblastos (para posterior fibrosis). Ambas cursan con rubor, hinchazón, calor y dolor.

Las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides se encuadran en la inhibición de la actividad del ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) y la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) productora de NO. La inhibición de estas enzimas por los flavonoides reduce la producción de ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y NO, mediadores cruciales en la inflamación (Sies y cols., 2005).

Se ha demostrado que los flavonoides además pueden inhibir otros mediadores del proceso inflamatorio tales como la proteína C reactiva (PCR), cuya elevación en suero se considera un indicador de inflamación crónica y su concentración plasmática un biomarcador predictivo de la enfermedad cardiovascular. Así, se ha descrito una reducción de los niveles plasmáticos de PCR en ratones alimentados con dieta rica en colesterol y enriquecida con epicatequina respecto a aquellos animales alimentados con la misma dieta pero sin este flavanol (Morrison y cols., 2014). También, epicatequín-3-galato y quercetina parecen activar el transportador ABCA1 (ATP-binding cassette-A1), reducir los niveles de proteínas quimiotácticas, como la MCP-1 (proteína quimioatrayente de macrófagos tipo 1), e inhibir la producción de PCR (González y cols., 2011).

Se ha descrito además una reducción en los niveles plasmáticos de moléculas de adhesión intercelular y vascular (sICAM-1 y sVCAM-1, respectivamente) mediada por la regulación de niveles del factor nuclear de transcripción NF- κ B, que se asocia a la ingesta

de resveratrol en un modelo animal con riesgo de desarrollar aterosclerosis (Do y cols., 2008), observando una reducción de las citoquinas interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Los mecanismos descritos anteriormente son mecanismos celulares, pero también se conoce que los flavonoides son capaces de modular la expresión génica (Kim y cols., 2004), regulando la expresión de genes proinflamatorios y, por tanto, de atenuar la respuesta inflamatoria.

Actividad antitumoral

Las células tumorales se tipifican por una pérdida de respuesta a algunos o todos los factores que regulan el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular en el tejido del cual proceden. Las células tumorales malignas tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes y en etapas posteriores migrar a sitios distantes, dando lugar a tumores secundarios (metástasis) (Johnson y cols., 1994). Según la Nota Descriptiva nº 297 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) con datos de febrero de 2014, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, causando 8,2 millones de defunciones en el año 2012, siendo los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama los más letales. En la misma nota, la OMS señala que aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal (IMC) elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. Las previsiones no son halagüeñas para el futuro, ya que se prevé una tendencia alcista, alcanzando los 22 millones en las próximas décadas (Ferlay y cols., 2013).

El modelo de carcinogénesis se divide en cuatro etapas: iniciación (en la cual el ADN es dañado por diferentes causas y no es reparado de manera eficiente por los mecanismos de protección), promoción, progresión e invasión de tejidos o metástasis.

Los flavonoides podrían emplear diferentes mecanismos para interferir en cada una de las cuatro etapas de la carcinogénesis (Johnson y cols., 1994; Le Marchand, 2002; Ramos, 2008). En las primeras etapas pueden actuar como agentes bloqueantes de la iniciación, y como agentes supresores en etapas posteriores inhibiendo la formación y crecimiento de los tumores. Además, se ha descrito que los compuestos fenólicos podrían:

- Inhibir la formación de compuestos carcinogénicos, capturando al mutágeno o interponiéndose entre éste y su diana.
- Estimular los sistemas de detoxificación metabólicos, por ejemplo enzimas detoxificantes como catecol-*O*-metil transferasa (COMT), UDP-glucuronosil transferasa (UGT) y sulfotransferasa (SULT) que, a través de reacciones de conjugación, aumentan la solubilidad de los compuestos tóxicos para facilitar su eliminación.
- Estimular la reparación del ADN dañado.
- Detener reacciones de oxidación de moléculas como el ADN, debido a su ya comentada capacidad antioxidante.
- Inhibir la proliferación celular, modulando las señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular.
- Inducir apoptosis de células tumorales.
- Inhibir la angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos que aseguran la supervivencia del tumor.
- Inhibir la metástasis e invasión tumoral de otros órganos y tejidos.
- Activar factores de transcripción como el Nrf2 (factor nuclear tipo 2 derivado de eritroide-2) a través de su unión a elementos de respuesta antioxidante (Antioxidant Response Element, ARE), activando la expresión de genes diana implicados en el mantenimiento del balance redox celular y supresión de señales pro-inflamatorias (COX-2, LOX, citoquinas).

La relación entre el consumo de polifenoles y un potencial efecto protector frente a distintos tipos de cáncer se ha estudiado ampliamente *in vitro* y en modelos animales con resultados prometedores. Rodríguez-Ramiro y cols. (2011a) observaron la prevención de la formación de criptas aberrantes (primeros estadios de la carcinogénesis colónica) en animales que, tras la inducción química de cáncer colónico, tuvieron una dieta enriquecida en cacao, atribuyendo este hecho a los flavanoles del cacao. Los estudios en humanos han evolucionado hacia resultados más favorables que permiten vincular la ingesta de polifenoles con un menor riesgo de padecer este tipo de patología. Así, en un estudio realizado en Finlandia en el que se siguieron las enfermedades crónicas de 10054 personas en el que se halló que los hombres que tenían una mayor ingesta de quercetina tenían una menor incidencia de cáncer de pulmón y los que ingerían más miricetina tenían menor incidencia de cáncer de próstata

(Knekt y cols., 2002). Recientemente, se ha demostrado que el consumo diario y regular de alimentos ricos en polifenoles, tales como té, cacao, vino o aceite de oliva parece evidenciar un efecto protector frente al desarrollo de cáncer y metástasis (Weng y Yen, 2012).

Mantenimiento de la salud gastrointestinal

La acción de los polifenoles de la dieta podría ser en parte responsable de los beneficios observados en salud gastrointestinal atribuidos a la ingesta de una dieta rica en frutas y verduras. En el colon es donde se alcanza la mayor concentración de polifenoles que no se han absorbido en el tracto gastrointestinal, siendo posible que estos compuestos puedan proteger a la mucosa intestinal frente a la acción de ROS o compuestos oxidados presentes en el lumen debido a su capacidad antioxidante. Además, no se descarta la acción directa de los compuestos fenólicos sobre las células del epitelio intestinal.

Asimismo, se ha estudiado el efecto de los polifenoles sobre la propia microbiota intestinal. En ese sentido, se ha descrito un efecto modulador de la epicatequina sobre las bacterias del género *Clostridium* y *Bacterioides* (Lee y cols., 2006), y que el consumo de dietas ricas en flavanoles pueden apoyar la salud gastrointestinal a través del ejercicio de acciones prebióticas (Tzounis y cols., 2008).

Actividad neuroprotectora

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patología de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer, que representan un problema creciente en la sociedad. La activación de microglía y astrocitos y la producción de citoquinas y ROS en las mismas son procesos cruciales en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Pan y cols., 2010). Hasta la fecha existen pocos resultados sobre la actividad neuroprotectora de los fenoles y, además, éstos no son concluyentes (Higdon y Frei, 2003; Scalbert y cols., 2005a; Han y cols., 2007). Cabe destacar un trabajo realizado en ratones donde la ingesta de dietas suplementadas con bayas (muy ricas en polifenoles) mejoró la señalización neuronal y previno los déficits comportamentales asociados a la enfermedad de Alzheimer en ese modelo murino (Joseph y cols., 2003). Los flavonoides, gracias a su poder antioxidante, podrían reducir el daño por protección y regeneración neuronal. Así, recientemente se ha justificado la menor agregación de

péptido amiloide β ($A\beta$) en las células neuronales por acción de catequina y epicatequina basado en la habilidad de estos compuestos para quelar metales que interactúan con $A\beta$, disminuyendo la producción de ROS (Albarracín y cols., 2012).

Aunque las evidencias disponibles muestran cierta actividad neuroprotectora de los fenoles, los mecanismos implicados para prevenir los desórdenes neuronales aún son desconocidos, siendo necesario un estudio más completo para establecer las dosis necesarias y la forma de administración de los polifenoles con potencial neuroprotector.

Actividad antiosteoporótica

La osteoporosis es una disminución de la masa ósea y de su resistencia mecánica que ocasiona una menor resistencia del hueso y que conduce fácilmente a fracturas óseas, principalmente en mujeres después de la menopausia y en ancianos en general.

Algunos estudios epidemiológicos sugieren una relación entre el consumo de procianidinas y catequinas y el aumento de la densidad mineral ósea (Hardcastle y cols., 2011; Welch y cols., 2012). En línea con estos resultados se ha observado un incremento de la diferenciación de osteoblastos, una reducción de la osteoclastogénesis y un aumento de la masa ósea de ratas al tomar una dieta suplementada con arándanos (Chen y cols., 2010). Similarmente, otro estudio llevado a cabo con ratas macho orquidectomizadas (deficientes en andrógenos), como modelo de osteoporosis masculina, mostró que la suplementación de la dieta con polifenoles de té verde incrementó la osteocalcina sérica, la densidad mineral ósea y el volumen trabecular de fémur y tibia (Shen y cols., 2011).

Aunque los resultados disponibles evidencian la actividad antiosteoporótica de los compuestos fenólicos, se hace necesario el desarrollo de más estudios epidemiológicos, así como estudios *in vivo* e *in vitro* para conocer los mecanismos de acción implicados en estos procesos.

Actividad antidiabética

La diabetes mellitus es un conjunto de trastornos endocrino-metabólicos que se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia), generalmente debidos a la baja o nula producción de insulina por el páncreas y repercute en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Este tipo se conoce como diabetes tipo I y cuando son las propias células del organismo las que no responden a la

insulina (resistencia a la insulina), se trata de diabetes tipo 2, siendo ésta la más frecuente. La diabetes afecta con el tiempo a los tejidos causando complicaciones de diversa índole que potencialmente pueden ser letales.

Los compuestos polifenólicos son capaces de inhibir la absorción de glucosa y, por tanto, disminuir sus niveles en sangre (Scalbert y cols., 2005a). La atenuación de la glicemia postprandial y la mejora en la secreción de insulina podría llevarse a cabo por diversos mecanismos, tales como la inhibición de la digestión de carbohidratos, la estimulación de las células pancreáticas β , la activación de los receptores de insulina y de glucosa en tejidos periféricos y la modulación de señales intracelulares en tejidos diana, mejorando la sensibilidad tisular a la insulina (Andújar y cols., 2012). Además, los flavonoides parecen inhibir la actividad de las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa, así como el transporte mediado por GLUT2, por lo que la ingesta de flavonoides, y más concretamente de flavanoles, ha sido asociada a una menor incidencia de hiperglucemia y diabetes mellitus tipo 2, aunque la evidencia sigue siendo limitada (Zamora-Ros y cols., 2013). Grassi y cols. (2008) observaron una mayor sensibilidad a insulina tras la ingesta de chocolate y que atribuyeron a los flavanoles. Por su parte, los derivados hidroxicinámicos, principalmente el ácido clorogénico, parecen reducir la absorción intestinal de glucosa (Meng y cols., 2013). Es por ello que el consumo regular de café, cuyo principal componente polifenólico es el ácido clorogénico, reduciría el riesgo de padecer diabetes hasta un 30% al activar la acción de la insulina y mejorar la tolerancia a glucosa (Huxley y cols., 2009).

Actividad antiobesidad

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad y sus efectos metabólicos asociados se consideran una amenaza para la salud pública mundial. Según la OMS, en la nota descriptiva nº 311 actualizada a enero de 2015, la obesidad en el mundo se ha duplicado desde 1980. En el año 2014, más de 1.9 billones de adultos tenían sobrepeso ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$), de ellos, 600 millones eran obesos ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$). La causa fundamental de la obesidad y sobrepeso es un desequilibrio entre las calorías ingeridas y las calorías gastadas. Un elevado IMC es el principal factor de riesgo para patologías como la enfermedad cardiovascular o la diabetes.

Algunos polifenoles como las catequinas, antocianinas o resveratrol, entre otros, han mostrado tener capacidad de modulación de los mecanismos moleculares implicados en el metabolismo energético, en la adiposidad y en la obesidad.

Así, estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos fenólicos serían capaces de reducir la viabilidad de los adipocitos y de la proliferación de los preadipocitos (Chen y cols., 2015), suprimir la diferenciación de adipocitos y la acumulación de triglicéridos, estimular la lipólisis y β -oxidación y reducir la inflamación.

Los estudios animales han sugerido diferentes efectos fisiológicos de la ingesta de polifenoles sobre la disminución del peso y grasa corporal: disminución de la absorción de lípidos y glucosa (por inhibición de la lipasa pancreática, de la fosfolipasa y la expresión del transportador de glucosa SGLT-1), disminución de la síntesis lipídica, incremento de la β -oxidación, incremento del almacenamiento de glucosa (al aumentar la expresión de GLUT1 y GLUT4, que ocurrirían en el intestino delgado, hígado, músculo esquelético y tejido adiposo) (revisado en Grove y Lambert, 2010).

Sin embargo, los estudios llevados a cabo en humanos se perfilan prometedores, aunque hasta ahora son limitados. Estudios epidemiológicos han revelado que el consumo habitual de té oolong y té verde se asocia con baja grasa corporal (Wu y cols., 2003) y más bajo IMC (Hughes y cols., 2008). Estudios clínicos también muestran efectos de interés en la lucha contra la obesidad. Nagao y cols. (2007) realizaron un estudio de intervención en el que los participantes bebían té verde que contenía 583 mg de catequinas durante 12 semanas. Los resultados de este estudio mostraron una disminución de la grasa corporal, presión arterial y colesterol LDL respecto al grupo control. Venables y cols. (2008) observaron que los individuos que realizaban ejercicio físico tras ingerir un suplemento que contenía 890 mg de polifenoles de té verde y 366 mg de epigallocatequín-galato tenían unas tasas mayores de oxidación de grasa que los que ingerían un placebo. Sin embargo, no todos los estudios de intervención en humanos han mostrado unos efectos tan claros en la disminución del peso y grasa corporal. Por ejemplo, el estudio de Auvichayapat y cols. (2008) en el que los individuos obesos ingerían una cápsula que contenía 34 mg de epigallocatequín-galato tres veces al día durante 12 semanas hallaron que, a pesar de que se detectó una modesta disminución del peso corporal, no se vieron modificados el IMC o el porcentaje de grasa corporal. Cabe destacar por otra parte, que las dosis proporcionadas en estos estudios fueron menores que en aquellos en los que se obtuvieron resultados más positivos

Por último, los estudios en humanos se han considerado limitados por varias razones. Entre ellas, el uso de bebidas como el té verde, que contiene cafeína, hace que el papel de esta metilxantina no quede claramente establecido en los efectos antiobesidad (Grove y Lambert, 2010), o bien que no se contemple claramente la

variación interindividual (sexo, edad) o incluso el origen de la población (asiáticos, europeos, etc.) participante en todos estos estudios.

1.3. BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Uno de los aspectos que más condiciona la actividad biológica de los compuestos fenólicos es su biodisponibilidad y biotransformación metabólica. Por ello, el estudio de la distribución de los polifenoles en la dieta y su biodisponibilidad en el organismo es clave para poder establecer su actividad biológica y evaluar la concentración a la cual pueden ejercer sus efectos beneficiosos.

Previo a la absorción de cualquier componente de los alimentos ha de tener lugar su liberación de la matriz alimentaria, o bioaccesibilidad, que genera la fracción bioaccesible y potencialmente biodisponible por el epitelio intestinal. La **biodisponibilidad**, definida como la fracción que alcanza la circulación sistémica y el sitio específico donde pueda ejercer su acción biológica (Porrini y Riso, 2008), viene condicionada por numerosos factores (D'Archivio y cols., 2010). Inicialmente se relacionó más la absorción de los fenoles con la estructura química del compuesto que con la concentración ingerida (Scalbert y Williamson, 2000), aunque otros factores de índole genético, ambiental o culinario también determinan la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. Además, los polifenoles más abundantes no son siempre los más activos biológicamente, bien porque tienen una baja actividad intrínseca, o bien porque son pobremente absorbidos, altamente metabolizados o rápidamente excretados (Manach y cols., 2004). A continuación se hace un breve repaso de los aspectos más determinantes de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de la dieta.

Transporte de los compuestos fenólicos a través del epitelio intestinal

Los procesos de absorción de los compuestos fenólicos, al igual que los demás componentes de los alimentos, tienen lugar principalmente en el intestino delgado, en concreto en el duodeno y en menor medida en el yeyuno.

Las células relacionadas con la absorción intestinal o enterocitos son el tipo celular mayoritario en el epitelio que reviste el intestino. La membrana apical del

1. Introducción

enterocito presenta microvellosidades que forman un borde en cepillo que aumenta considerablemente la superficie de absorción. Los enterocitos son células estructural y funcionalmente polarizadas. La polarización de estas células se garantiza por una red bien organizada de uniones intercelulares como las uniones estrechas, las uniones adherentes, las uniones gap y los desmosomas, que separan el dominio apical o luminal del dominio basolateral o sub-endotelial. Las uniones estrechas constituyen una estructura continua en forma de cinturón en el lado luminal del espacio intercelular y mantienen las células estrechamente unidas, evitando la difusión paracelular (entre células) de microorganismos u otros antígenos. Se considera que gran parte de la propiedad barrera del epitelio intestinal se deben a estas uniones estrechas (Alberts y cols., 2002).

La absorción a través del epitelio intestinal puede producirse de varias maneras, que dependen principalmente de la naturaleza química del compuesto. Se distinguen dos tipos de transporte, *paracelular* y *transcelular*. El transporte *paracelular* o *intercelular* se produce por difusión simple a través de las uniones estrechas, mientras que en el transcelular intervienen mecanismos de difusión pasiva o transporte mediado por portador (Figura 1.3.).

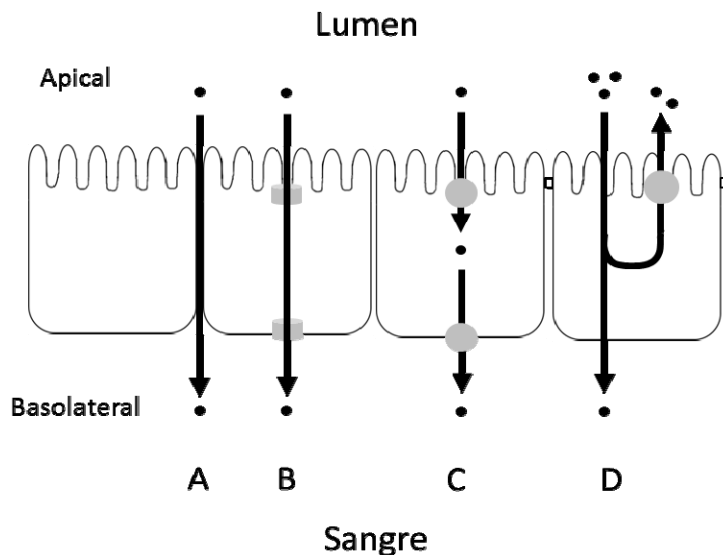


Figura.1.3. Tipos de transporte celular en el epitelio intestinal. A. Transporte paracelular o intercelular. B. Transporte transcelular pasivo. C. Transporte mediado por portador. D. Transporte de eflujo. Adaptado de Chan y cols. (2004).

Se distinguen dos tipos de transporte activo según el sentido, *transporte activo de absorción*, que va preferentemente desde el lumen hacia la sangre, regulado por las proteínas de la familia MRP (Multidrug associated Resistance Protein) (excepto las MRP2) y *transporte de secreción o eflujo* (Figura 1.3.), que devuelve al lumen intestinal las moléculas absorbidas por el enterocito, limitando así su absorción, transporte en el que interviene fundamentalmente los transportadores p-glicoproteína (P-gp) y MRP2.

Se han descrito dos grandes familias genéticas de transportadores en la membrana de los enterocitos implicados en el transporte de los compuestos fenólicos, de tipo ABC (ATP-Binding Casette) y tipo SLC (Solute Carrier o transportadores de soluto). En el grupo de la familia SLC se han caracterizado los siguientes transportadores:

- SGLT1 o transportador dependiente de glucosa, localizado en la membrana apical de enterocitos y responsable de la absorción de glucósidos de polifenoles al interior del enterocito (Walgren y cols., 2000).
- MCT o transportador de monocarboxilato, responsable de la absorción de ácidos fenólicos (Konishi y Kobayashi, 2004) o el flavanol del té, epicatequín-3-galato (Vaidyanathan y Walle, 2003).

En el grupo de la familia ABC se han caracterizado los siguientes transportadores:

- MRP2 o proteínas asociadas a la resistencia de múltiples drogas, localizado en la membrana apical de los enterocitos, responsables del eflujo de algunos glucósidos de flavonoides (Walgren y cols., 1998, 2000).
- P-gp o p-glicoproteína, presente en la membrana apical y responsable de eflujo de algunos compuestos fenólicos esterificados con ácido gálico (Vaidyanathan y Walle, 2003).

Por lo general, los compuestos hidrofílicos de bajo a moderado peso molecular pueden permear el intestino a través de los poros entre células, *transporte paracelular* (Figura 1.3.A.), mientras que las moléculas lipofílicas de tamaño moderado se transportan preferentemente vía *transcelular pasiva* (Figura 1.3.B.).

Si el proceso de transporte consume energía se dice que es un *transporte activo* y es el caso de los transportadores ABC y algunos SLC. Cuando el transporte mediado

por portador no requiere energía se define como un proceso de *transporte facilitado* y se basa en un gradiente de concentración del sustrato.

Reacciones de conjugación o biotransformación de los compuestos fenólicos

El metabolismo de los polifenoles sigue las mismas vías que el metabolismo de xenobióticos (Manach y cols., 2004). Para ello, intervienen un conjunto de reacciones globalmente denominadas de biotransformación, en las que se modifica de manera más o menos compleja la estructura química de los xenobióticos para aumentar su hidrosolubilidad y así facilitar su eliminación vía renal o biliar, por lo que también se denominan reacciones de detoxificación. Estas reacciones son mediadas generalmente por procesos enzimáticos endógenos aunque también juega un papel importante la microbiota intestinal, como se detallará más adelante.

Las biotransformaciones dependen de la polaridad y lipofilia de los compuestos y están sujetas a procesos enzimáticos de metabolización de fase I y de fase II. En el metabolismo de fase I, los compuestos fenólicos son comúnmente sometidos a reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, mediadas por enzimas del complejo citocromo P-450 (CYP) localizadas en el retículo endoplasmático y las mitocondrias de las células. La mayor concentración de estas enzimas se ha encontrado en el hígado, pared intestinal, riñón e incluso en cerebro (Lavandera y cols., 2007). A continuación se presentan las principales enzimas de fase I relacionadas con el metabolismo de los compuestos fenólicos:

- β -Glucosidasa citosólica (CBG). Esta enzima rompe los enlaces β -glucosídicos liberando las agliconas para su conjugación posterior. Es una enzima citosólica que se halla abundantemente en hígado, riñón e intestino delgado de mamíferos (Day y cols., 1998).
- Lactasa-floricina hidrolasa (LPH). Es una glucosidasa que se encuentra en el borde en cepillo de las células del intestino delgado y es responsable de la hidrólisis extracelular de algunas formas glucosídicas de los compuestos fenólicos (Day y cols., 2003).
- Esterasa intestinal. Esta enzima es capaz de hidrolizar los compuestos fenólicos que contienen grupos ésteres en su estructura química. Se localizan en el borde del cepillo de las células intestinales (Andreasen y cols., 2001).

Las reacciones de metabolización de fase II son reacciones de conjugación catalizadas por enzimas tipo transferasa, para transformar el compuesto en otro más

hidrofílico. La reacción de glucuronidación es la más frecuente, además de otras reacciones clave en la conjugación de los compuestos fenólicos tal como la sulfatación y metilación. Las enzimas implicadas en estas reacciones se detallan a continuación:

- UDP-glucuronosil transferasa (UGT). Esta enzima utiliza ácido uridín-5'-difosfo glucurónico (UDP) como cofactor y se han descrito 16 isoenzimas en el lumen del retículo endoplasmático, de entre las que cabe destacar la UGT1A, encargada de la glucuronidación de fenoles en el intestino, hígado y riñones (Mackenzie y cols., 1997; Nakamura y cols., 2008).
- Sulfotransferasa (SULT). Esta enzima cataliza la reacción de transferencia del grupo sulfato desde el cofactor 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato (PAPs) a un grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos. Las enzimas sulfotransferasas humanas forman una familia de 11 isoenzimas localizadas en el citosol de células hepáticas, intestinales, placentarias, plaquetas y en algunos otros tejidos (Coughtrie y Johnston, 2001).
- Catecol-*O*-metiltransferasa (COMT). Esta enzima precisa un grupo catecol para que tenga lugar la transferencia del grupo metilo a los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, en presencia de Mn^{2+} y utilizando como donador la molécula S-adenosil-metionina (SAM). Se han detectado 2 formas de esta enzima, una forma predominante que es soluble en el citoplasma (S-COMT) y otra unida a la membrana del retículo endoplasmático rugoso en el lado citoplasmático (MB-COMT). La mayor concentración de COMT se halla en hígado, riñón, intestino y cerebro (Ulmanen y cols., 1997).

En la Figura 1.4. se muestran las posibles posiciones de conjugación. Nótese que la COMT requiere un grupo catecol para llevar a cabo la reacción de metilación.

Es importante resaltar que los mecanismos de conjugación son altamente eficientes, con lo que la presencia de agliconas en el plasma es nula o se hallan en muy baja concentración tras la ingesta de dosis nutricionales. Una excepción son las catequinas del té, cuya forma parental puede alcanzar una proporción significativa de la cantidad total en el plasma (Lee y cols., 2002).

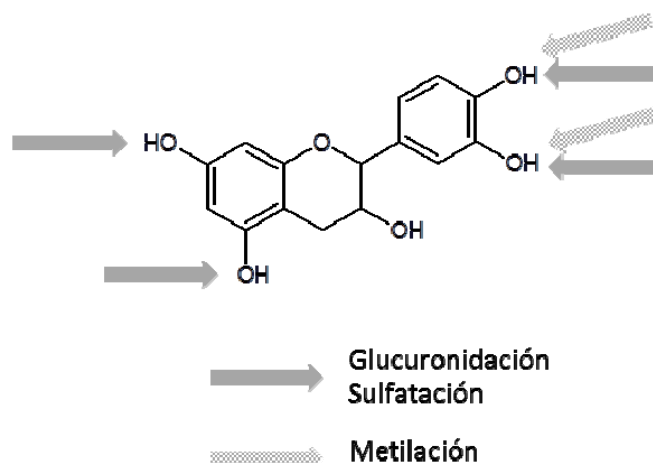


Figura. 1.4. Posiciones potenciales de conjugación de los compuestos fenólicos. Las flechas sin trama indican las posiciones de metilación y las flechas con trama las posiciones de glucuronidación y sulfatación (D'Archivio y cols., 2010).

Biodisponibilidad y biotransformación de los fenoles de la dieta a lo largo del tracto digestivo

La mayoría de los polifenoles presentes en los alimentos se encuentran principalmente galoilados, esterificados, glicosilados o incluso polimerizados en su forma nativa, y necesitan ser hidrolizados a su forma aglicona para su posterior absorción.

Por lo general, los compuestos fenólicos no sufren modificación a nivel oral, si bien se ha descrito la hidrólisis de algunos glicósidos de flavonoides a sus respectivas agliconas por acción de β -glucosidasas salivares (Walle y cols., 2005). Igualmente, se ha descrito la hidrólisis del compuesto epigallocatequín-galato a epicatequín-3-galato por acción de una esterasa presente en la saliva (Yang y cols., 1999). En humanos, la mayor parte de los polifenoles son estables a la acción de los ácidos estomacales (Gee y cols., 1998), de forma que no se produce la hidrólisis de glicósidos o de polímeros, ni tampoco su absorción, llegando al intestino en su forma nativa conjugada. Únicamente, las agliconas de algunos flavonoides, como quercetina y daidzeína, y algunos ácidos fenólicos en su forma libre, como los ácidos cinámico y ferúlico, pueden ser absorbidos en el estómago de animales (Manach y cols., 2004; 2005). El ácido cafeico también sufre absorción pasiva en el estómago gracias a su forma no ionizada, a diferencia de sus

análogos esterificados que en animales atraviesan el estómago intactos, como es el caso del ácido clorogénico (Olthof y cols., 2001).

Los compuestos fenólicos glicosilados se absorben a través del transportador dependiente de glucosa (SGLT1) y se hidrolizan a sus correspondientes agliconas gracias a la acción del enzima β -glucosidasa citosólica (CBG) (Scalbert y Williamson, 2000). Otra enzima implicada en la hidrólisis de compuestos glicosilado es la lactasa-floricina hidrolasa (LPH), ubicada en el cepillo de las microvellosidades intestinales, por lo que la hidrólisis ocurre extracelularmente, previa a su absorción. Algunos autores han descrito la implicación de otros transportadores de membrana, tales como las proteínas asociadas a la resistencia de múltiples drogas (MRP2), que favorecen la salida del enterocito de algunos glicósidos (Walle, 2004) (Figura 1.5.). Cabe destacar que la mucosa intestinal carece de enzimas α -ramnosidasas, por lo que la absorción de ramnoglucósidos ocurre a nivel colónico tras su hidrólisis por acción de la microbiota colónica (Day y cols., 1998).

Los derivados galoilados, tal como el epigalocatequín-galato, pueden atravesar las paredes del intestino sin hidrólisis o desconjugación previa (Yang y cols., 1999), gracias a los transportadores de monocarboxilato (MCT) implicados en el transporte de polifenoles acilados, así como en el transporte de los mismos a los tejidos diana (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008). Otros compuestos esterificados, como los derivados hidroxicinámicos clorogénico o ferúlico, asociado a la fibra dietética (Kern y cols., 2003a), pueden ser liberados por acción de esterases tanto lumbales como en células de la mucosa intestinal (Andreasen y cols., 2001) para su posterior absorción intestinal.

Los flavanoles que generalmente se encuentran en forma monomérica y en su forma aglicona, se absorben mayoritariamente por procesos de difusión pasiva. La absorción de oligómeros (procianidinas) y polímeros (proantocianidinas) es controvertida: por una parte, se postula que la absorción de oligómeros es posible, siempre y cuando las unidades monoméricas que lo conformen no excedan de 2 ó 3 (Shoji y cols., 2006), aunque otros autores insisten en que es necesaria una hidrólisis en monómeros previamente a su absorción. El acuerdo existe cuando se trata de polímeros de elevado grado de polimerización que no son capaces de atravesar la membrana intestinal, alcanzando el colon, donde quedan disponibles para su degradación por la microbiota colónica (Gonthier y cols., 2003).

Los polifenoles absorbidos en el intestino delgado, cuando no ocurren mecanismos de eflujo, en cuyo caso volverían al lumen intestinal, sufren una extensa

1. Introducción

conjugación durante el proceso de metabolización por acción del sistema enzimático de fase II ya detallado previamente. Las agliconas se glucuronizan extensivamente en el enterocito, aunque también pueden formarse derivados sulfatados y metilados. En ocasiones, la metabolización de los polifenoles conduce a derivados diglucuronidados, disulfatados, metilsulfatados, metilglucuronidados, sulfoglucuronidados, etc., como es el caso de los derivados *O*-glucuronidado-*O*-sulfatado, *O*-diglucuronidado y metil-*O*-diglucuronidado de la quercetina, o los derivados metilsulfatados de epigallocatequina y epigallocatequín-galato (Crozier y cols., 2009). Los procesos de transporte y biotransformación mencionados se esquematizan en la Figura 1.5.

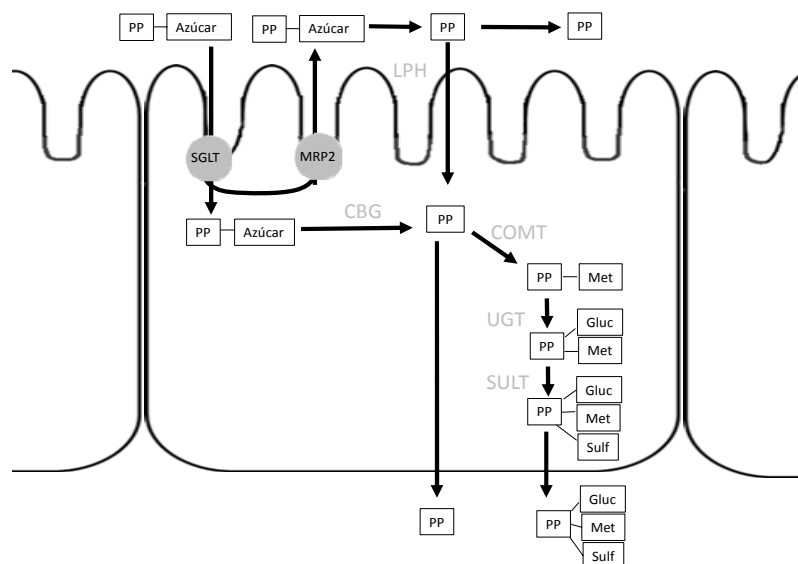


Figura 1.5. Esquema de la absorción y metabolismo de polifenoles en el epitelio intestinal. Gluc: grupo glucurónico; CBG: β -glucosidasa citosólica; COMT: catecol-*O*-metil transferasa; LPH: lactasa-floricina hidrolasa; MCT: transportador de monocarboxilato; Met: grupo metilo; MRP2: proteínas asociadas a la resistencia de múltiples drogas; PP: polifenoles; SGLT1: transportador dependiente de glucosa; Sulf: grupo sulfato; SULT: sulfotransferasa; UGT: UDP-glucuronosil transferasa. Basado en Scalbert y Williamson, 2000; Walle, 2004.

Los metabolitos que llegan al torrente circulatorio alcanzan el hígado, donde pueden verse sometidos otra vez a los procesos de metabolización de fase II. Los metabolitos conjugados en el enterocito, junto con los metabolitos colónicos que no han sido excretados en las heces y que se detallarán en el siguiente apartado, son generalmente distribuidos a los distintos tejidos a través de la circulación sanguínea,

siendo finalmente eliminados por la orina. También desde el hígado puede tener lugar la denominada *circulación enterohepática*, al ser los metabolitos secretados con la bilis y de nuevo absorbidos en el intestino, reanudando el ciclo metabólico descrito para los compuestos fenólicos (Figura 1.6.).

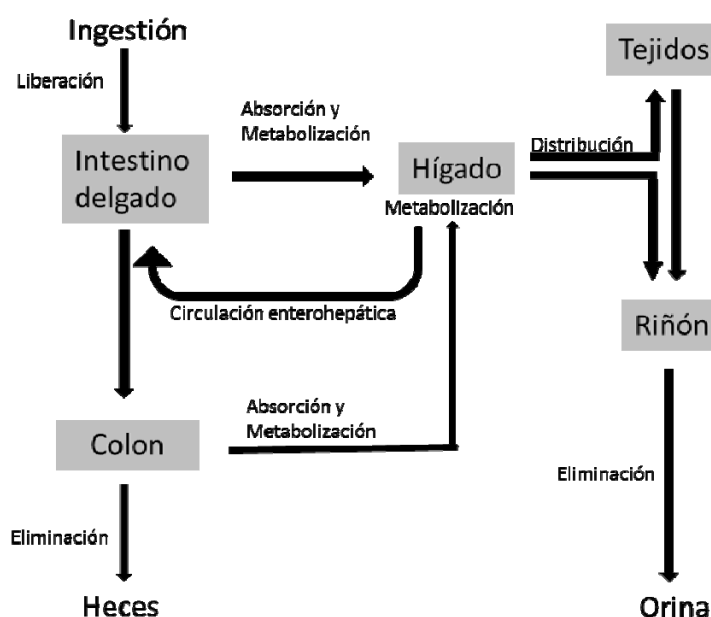


Figura 1.6. Posibles rutas para los polifenoles ingeridos en la dieta. Modificado de Scalbert y Williamson (2000).

La biodisponibilidad de los polifenoles en general es limitada en el organismo humano (Manach y cols., 2004). Manach y cols. (2005) hallaron en una revisión de 97 ensayos agudos en humanos que, tras la ingesta de 50 mg de equivalentes de fenoles totales en forma de aglicona, se alcanzaba una concentración plasmática de los metabolitos totales entre 0 y 4 μM . En concreto, el ácido gálico parece ser el compuesto mejor absorbido ($C_{\text{max}} = 4 \mu\text{M}$), seguido de isoflavonas ($C_{\text{max}} = 2 \mu\text{M}$), flavonoles (1,5 μM), flavanonas ($C_{\text{max}} = 0,5 \mu\text{M}$) y flavanoles ($C_{\text{max}} = 0,4 \mu\text{M}$), mientras que los taninos hidrolizables y condensados apenas se absorbían a nivel intestinal. La baja biodisponibilidad de los polifenoles sugiere la necesidad de un consumo diario y crónico de alimentos ricos en polifenoles para mantener las concentraciones plasmáticas y garantizar las propiedades fisiológicas que se les asocian.

El análisis de la excreción urinaria de polifenoles muestra en general pequeñas recuperaciones de los compuestos originales en forma de metabolitos de fase II, salvo excepciones como las isoflavonas (66%) o los alcoholes fenólicos (60%). Adicionalmente, se ha identificado una gran variedad de metabolitos derivados de la microbiota colónica, dependiente de las poblaciones que conforman la microbiota, lo que justifica la gran diferencia inter-individual. Este metabolismo colónico está despertando gran interés, pues permite conocer otros metabolitos no considerados hasta hace relativamente poco tiempo y que podrían justificar en parte la actividad que se asocia a los polifenoles presentes en los alimentos. Además, la identificación estructural de los metabolitos microbianos, algunos en significativamente mayor concentración que aquellos derivados de fase II, permite planificar con mayor criterio estudios *in vitro* con modelos celulares para el conocimiento de los mecanismos moleculares de acción.

Metabolismo colónico de los compuestos fenólicos

El intestino humano está colonizado por un gran número de microorganismos que viven en simbiosis con el organismo que habitan. La microbiota colónica está constituida por una población diversa de bacterias anaerobias estrictas y anaerobias facultativas que degradan la matriz del alimento no digerido y absorbido, transformando los componentes a metabolitos microbianos.

Se ha estimado que una fracción del 90-95% de los polifenoles de la dieta en general no son absorbidos en el intestino delgado y, por lo tanto, alcanzan el colon (Calani y cols., 2012), mientras que para el caso particular de los flavonoides, el 70% de los fenoles absorbidos alcanzan el intestino grueso (Roowi y cols., 2010, Stalmach y cols., 2010b). Al colon también llegan compuestos excretados a través de la bilis tras su absorción intestinal (circulación enterohepática) o derivados desde el enterocito a través de transportadores MRP2 (mecanismo de eflujo). La microbiota colónica metaboliza los fenoles mediante reacciones de hidrólisis (compuestos glicosilados, glucuronidados, sulfatados y acilados), así como reacciones de reducción, descarboxilación, desmetilación, deshdroxilación y rotura de anillos heterocíclicos para generar compuestos de menor peso molecular (Shamat, 1993; Calani y cols., 2012). Estos metabolitos microbianos, además, pueden ser absorbidos localmente y transportados a través de la circulación portal hacia el hígado (Figura 1.6), susceptibles de ser de nuevo biotransformados por acción de las enzimas de fase II, dando lugar a

derivados microbianos glucuronidados y sulfatados antes de alcanzar la circulación sistémica, los tejidos diana y ser excretados en la orina (Scalbert y Williamson, 2000).

Así, las esterasas bacterianas de la microbiota colónica permiten la liberación de ácidos ferúlico, sinápico o *p*-cumárico asociados a las paredes celulares de cereales (Andreasen y cols., 2001), así como hidrolizar flavonoides esterificados a ácidos fenólicos y otros ácidos orgánicos. De esta forma, en el colon se forman principalmente ácidos aromáticos como el benzoico, fenilacético, fenilpropiónico, hipúrico, así como γ -valerolactonas y ácidos valéricos. En humanos, las enzimas α -ramnosidasas únicamente están presentes en la microbiota colónica, por lo que algunos ramnoglucósidos como la rutina son hidrolizados en el colon (Day y cols., 1998), como se ha comentado anteriormente. Los fenoles de alto peso molecular, tal como las procianidinas, son despolimerizadas a sus correspondientes monómeros por acción de las enzimas microbianas (Appeldoorn y cols., 2009).

Los polifenoles, como se ha visto, interaccionan con la microbiota intestinal, pero además se considera que esta interacción es bidireccional, es decir, que además de las reacciones metabólicas descritas para los fenoles, tienen lugar cambios en cuanto al crecimiento y actividad de las bacterias debido a la influencia de los propios compuestos fenólicos y/o sus metabolitos (Ozkan y cols., 2004; Lee y cols., 2006; Alakomi y cols., 2007; Requena y cols., 2010), promocionando poblaciones más beneficiosas para la salud. Así, Jaquet y cols. (2009) reportaron que el consumo de tres tazas de café soluble durante tres semanas producía un incremento de la actividad metabólica y/o el número de poblaciones de *Bifidobacterium spp.*, un grupo de bacterias con reputado efecto positivo en la salud humana, sin impacto en la microbiota dominante, de ahí que se haya atribuido un efecto prebiótico a los compuestos fenólicos.

Actividad biológica de los metabolitos de compuestos fenólicos

La biotransformación que sufren los compuestos fenólicos durante el proceso digestivo va a determinar la bioactividad final de estos compuestos en el organismo (Del Rio y cols., 2010a, 2013; Selma y cols., 2009; Monagas y cols., 2010).

Numerosos ensayos *in vitro* han revelado una pérdida significativa del carácter antioxidante de los metabolitos derivados de fase II respecto al compuesto parental. Así, la glucuronidación en C3' y C4' del anillo B de la quercetina resta potencia respecto a la posición C3 del anillo pirano (Shirai y cols., 2001), y los derivados metilados en la

posiciones C3' y C4' de la catequina y epicatequina son menos antioxidantes que la aglicona (Dueñas y cols., 2010).

Cuando se ha trabajado con los propios metabolitos de fase II en sistemas *in vitro* se han reportado efectos controvertidos. Mientras que la glucuronidación del compuesto epicatequín-galato en posición C3' disminuyó un 20% la capacidad de inhibir la producción de NO respecto de la aglicona (Lu y cols., 2003), algunos metabolitos de epicatequina demostraron inhibir el crecimiento celular. Tal es el caso del compuesto 3'-metil-epicatequina, que mostró ser tan efectivo como la epicatequina en la inhibición de la apoptosis inducida en neuronas (Schroeter y cols., 2001). La interacción de los polifenoles con las rutas de señalización celular se ha estudiado fundamentalmente con formas no conjugadas, aunque también se ha evaluado el efecto de los propios metabolitos, como el estudio desarrollado por Wang y cols. (2010), en el que observaron que el 4'-metil-epigallocatequín-galato inhibe la proliferación y la activación del factor nuclear NF-κB (factor nuclear que controla la transcripción del ADN) e induce la apoptosis de células LNCaP (células de cáncer de próstata) en menor medida que el compuesto epigallocatequín-galato libre.

Por todo lo anterior, se ha cuestionado si los metabolitos conjugados, en ocasiones menos activos que el compuesto original, podrían justificar los efectos beneficiosos en la salud humana asociados al consumo de los compuestos fenólicos. Pérez-Vizcaíno y cols. (2012) lo denominan *The flavonoid paradox*, y sugieren que el fenómeno de conjugación es reversible, estableciéndose así un ciclo de conjugación-deconjugación, donde mayoritariamente la forma conjugada se transporta en el torrente circulatorio y se desconjuga en los tejidos para generar la aglicona como compuesto más bioactivo. Apoyando esta teoría recientemente se ha descrito una disminución de las formas conjugadas de hidroxitirosol junto con un aumento en paralelo del propio hidroxitirosol en los glóbulos rojos hasta las seis horas de la ingesta de un extracto rico en fenoles del alperujo por ratas, sugiriendo una hidrólisis intracelular a la forma desconjugada (Rubió y cols., 2014a).

Por último, cabe destacar el efecto de los metabolitos microbianos sobre la microbiota intestinal. Así, algunos ácidos como metil-gálico, gálico, cafeico, 4-hidroxifenilpropiónico, fenilpropiónico y 4-hidroxifenilacético, procedentes del metabolismo microbiano de las catequinas del té, fueron capaces de inhibir el crecimiento de bacterias intestinales patógenas o no beneficiosas sin afectar a las bacterias beneficiosas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Lee y cols., 2006).

Los efectos en salud derivados de la interacción entre los compuestos fenólicos y la microbiota intestinal no sólo van hacia el incremento de la población de bacterias beneficiosas, ejerciendo acciones prebióticas, sino que podrían estar relacionados con la funcionalidad de la actividad metabólica de la microbiota (Monagas y cols., 2010).

1.4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Existen diversos modelos para el estudio de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, desde aproximaciones más básicas con modelos *in vitro*, cultivos celulares, fermentación colónica y perfusión intestinal mediante aislamiento de tejido animal, hasta estudios *in vivo* apoyados con animales de experimentación o intervenciones en humanos. En este apartado, además de los modelos de estudio mencionados se tratarán brevemente las bases de la metabolómica.

Modelos de estudio

El objeto final de cualquier estudio de biodisponibilidad es conocer qué ocurre con los compuestos en el organismo humano una vez ingeridos. Para ello, el paso lógico sería acudir a los estudios clínicos con humanos; sin embargo, estos estudios requieren una organización de gran complejidad, con una gran inversión técnica y económica. Por ello, antes de llevar a cabo un estudio en humanos, se recurre a modelos *in vitro* e *in vivo* con animales de experimentación. No obstante, la respuesta obtenida en los ensayos *in vitro* o con animales de experimentación no es siempre directamente extrapolable a los resultados en humanos.

Los modelos *in vitro* de absorción se han basado en membranas artificiales y en cultivos celulares, que pueden incluir un sólo tipo de células o varios, en cuyo caso se denominan *cocultivos*. Los cultivos celulares presentan diversas ventajas para el estudio de la absorción intestinal de xenobióticos, entre ellas, la reducción del tiempo y coste, además de la posibilidad de realizar dichos estudios en células humanas y evitar la controvertida experimentación animal (Audus y cols., 1990). Las células del epitelio gastrointestinal humano no pueden utilizarse directamente para la realización de estos estudios, a pesar de que se obtienen fácilmente, porque no forman monocapas celulares, imprescindibles para la realización de ensayos de absorción. Como alternativa

se utilizan células humanas procedentes de un adenocarcinoma de colon, denominadas células Caco-2. Estas células se parecen morfológica y bioquímicamente a colonocitos sanos y, cuando crecen en determinadas condiciones, forman una monocapa celular semejante al epitelio intestinal humano (Artursson, 1990). Se ha observado una correlación excelente entre los coeficientes de permeabilidad a través de las células Caco-2, parámetro que determina la velocidad de transferencia a través de la monocapa celular, y la biodisponibilidad de xenobióticos susceptibles de absorberse por difusión pasiva (Artursson y Karlsson, 1991; Camenisch y cols., 1998). En general, los estudios de biodisponibilidad con este modelo celular son eficaces y reportan información a considerar previo al desarrollo de un estudio *in vivo*.

No obstante, se han desarrollado *cocultivos* con objeto de mimetizar de una manera más fisiológica la absorción intestinal, como es el caso del cocultivo de células Caco-2 con células HT29-MTX, secretoras de mucina (proteína formadora de gel que recubre el tejido epitelial), en estudios de biodisponibilidad de compuestos de interés nutricional (Walter y cols., 1996). Otros autores van más allá y desarrollan este cocultivo de células Caco-2 y HT29-MTX, al que incorporan fibroblastos e inmunocitos con objeto de alcanzar un modelo *in vitro* incluso más fisiológico (Li y cols., 2013).

Otros ejemplos de cocultivos son aquellos de células Caco-2 con células hepáticas (HepG2) como recientemente han desarrollado los autores Rubió y cols. (2014b) para valorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de extractos fenólicos de aceite de oliva y tomillo.

El estudio de la biodisponibilidad de polifenoles a nivel del sistema nervioso central a menudo también conlleva el empleo de cocultivos. Así, cabe mencionar el trabajo de Faria y cols. (2014), quienes desarrollaron un modelo *in vitro* de permeabilidad de los flavonoides a través de la barrera hematoencefálica, con células hCMEC/D3, con resultados aceptables.

La perfusión intestinal mediante aislamiento de tejido animal constituye un modelo *in vitro* ampliamente utilizado para valorar la absorción de los compuestos fenólicos. Esta alternativa consiste en aislar completamente el segmento intestinal del animal y utilizarlo como una membrana semipermeable en un dispositivo adecuado que mimetice el lumen y el lado basolateral, a fin de evaluar la transferencia y, por tanto, la absorción a través del intestino delgado.

Otros modelos *in vitro* son los modelos de fermentación colónica que reproducen la biotransformación de los nutrientes a nivel colónico. Estos modelos están

basados en uno o varios quimostatos o tanques de fermentación, inoculados con microbiota fecal en condiciones fisiológicas de temperatura y pH y en condiciones anaerobias (MacFarlane y cols., 1998; Cinquin y cols., 2006). Además, se han desarrollado modelos de fermentación continua para emular las condiciones *in vivo* (MacFarlane y MacFarlane, 2007).

A pesar de los avances técnicos en los modelos *in vitro*, éstos no pueden reemplazar a los estudios *in vivo*. La utilización de modelos animales permite avanzar en el conocimiento de la biodisponibilidad de los fitoquímicos de una manera más aproximada que con los modelos *in vitro* antes mencionados. Sin embargo, no debe perderse de vista las diferencias fisiológicas entre el metabolismo humano y animal en la interpretación de los resultados (Mortensen y cols., 2008). Los estudios con animales de experimentación, principalmente con roedores, se utilizan mucho en el área de nutrición para evaluar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Donovan y cols., 2006; Rubió y cols., 2014a, 2014c, entre otros). Los estudios con ratas o ratones son los más utilizados, siempre que los objetivos lo permitan, y en cualquier caso, este tipo de estudios viene reglado por un Comité de Bioética para su aprobación en base a la regulación existente (Mortensen y cols., 2008). Por lo general, los estudios de biodisponibilidad se basan en la obtención de sangre a distintas horas tras una única ingesta del nutriente a evaluar, además de la recogida de orina y heces. Un procedimiento muy utilizado para estudios de biodisponibilidad es el modelo *in situ* de perfusión intestinal, que consiste en aislar el segmento intestinal de interés en el animal anestesiado, administrar el compuesto y medir su desaparición desde el citado segmento y/o su aparición en la sangre del animal. En este caso, el flujo sanguíneo está intacto, lo que permite la evaluación del mecanismo de absorción en condiciones controladas y semi-conscientes.

Otros modelos animales menos empleados, como el cerdo (Azorín-Ortuño y cols., 2011) o los primates (Tian y cols., 2012), suponen una mejor aproximación al estudio de biodisponibilidad y metabolismo de los humanos; sin embargo, su coste y complejidad impiden su uso habitual.

Por último, los estudios agudos en humanos, constituyen la aproximación idónea para evaluar la relación de causalidad entre una exposición y un efecto. Los estudios de intervención en humanos en el área de nutrición son iguales a los ensayos farmacéuticos, en cuanto a tipo de intervención y consideraciones éticas (Lund, 2003). Un estudio de intervención se basa en la aplicación de una intervención nutricional,

1. Introducción

aguda o crónica, en condiciones controladas para medir un efecto biológico, como por ejemplo el efecto de un compuesto o nutriente o el efecto de una dieta específica, como la dieta mediterránea. Los ensayos clínicos o estudios de intervención según su metodología se pueden clasificar en *estudios no controlados*, en los que no se establece un grupo control o conjunto de participantes que reciben un tratamiento estándar, bien sea placebo, otro compuesto o ninguna intervención, pero que en ningún caso reciben el compuesto en estudio, y *estudios controlados*, en los que existe un grupo control con el que se comparan los resultados obtenidos tras la intervención. Dentro de los estudios controlados hay que distinguir *estudios abiertos*, aquellos en los que tanto el sujeto como el investigador conocen el tipo de tratamiento o intervención asignada, *estudios simple ciego*, aquellos en los que el sujeto desconoce el grupo de tratamiento al que ha sido asignado, y *estudios doble ciego*, en los que tanto el sujeto como el investigador desconocen la asignación a los grupos de tratamiento. Otra clasificación de los ensayos clínicos controlados sigue la randomización o *asignación aleatoria*. En estos estudios, el participante es asignado a un grupo u otro de tratamiento siguiendo un método de aleatorización. En los *estudios no aleatorizados* los participantes son asignados a uno u otro grupo siguiendo un método de asignación sistemática predeterminada o el juicio del investigador. Otra clasificación de los estudios clínicos viene dada por el tipo de diseño del estudio; así, se dividen en *estudios comparativos*, en los que la población elegida se divide en dos grupos iguales o paralelos y cada uno de ellos recibe un tratamiento, y *estudios cruzados*, en los cuales cada participante recibe un tratamiento en una primera fase y otro tratamiento en una etapa posterior. Los ensayos clínicos deben respetar las disposiciones legales y los aspectos éticos (protección de los derechos de los participantes) (Tabla 1.3.) (Idoate e Idoipe, 2002).

Tabla 1.3. Tipos de ensayos clínicos de intervención.

Según metodología		Según aleatorización	Según diseño del estudio
Controlados	Abierto Simple ciego Doble ciego	Aleatorizado No aleatorizado	Comparativo Cruzado
No controlados			

Aunque los estudios en humanos representan el objetivo final en la investigación nutricional, en ocasiones el efecto de la nutrición sobre la salud o enfermedad no puede ser completamente explicado. Además, la actuación de los

compuestos bioactivos a nivel molecular y su papel en procesos fisiológicos representan la razón por la cual los modelos *in vitro* y modelos animales son ampliamente utilizados en investigación nutricional (Mortensen y cols., 2008).

Metabolómica

Con el avance tecnológico de la espectrometría de masas se ha abierto un amplio campo en el estudio de los compuestos fenólicos y sus metabolitos. Se trata de la metabolómica, definida como el conjunto de metabolitos sintetizados por un organismo de forma análoga al genoma o proteoma (Fiehn, 2001). Más tarde Villas-Boas y cols. (2005) se refirieron a la metabolómica como un conjunto de ciencias integradas que van dirigidas a identificar y cuantificar el conjunto de metabolitos, como intermediarios o productos finales de las rutas metabólicas, tanto intracelulares como extracelulares, de un sistema biológico, siendo todos ellos parte del metaboloma completo.

Se puede considerar que la metabolómica sería la etapa final en el estudio de las ciencias “ómicas”, donde en una primera aproximación se encuentra la genómica o estudio del funcionamiento, contenido y evolución del genoma, seguida de la transcriptómica o estudio de la expresión de los genes, y de la proteómica o estudio de la estructura y función de las proteínas. La metabolómica se ha convertido en una herramienta de gran interés en nutrición y su objetivo final sería entender los efectos de los compuestos de los alimentos sobre el perfil metabólico y su regulación (Gibney y cols., 2005).

Según Fiehn (2001, 2002), existen diferentes estrategias analíticas para afrontar el estudio metabolómico: a) análisis diana (*target analysis*), centrado exclusivamente en un metabolito concreto de interés y utilizado fundamentalmente para *screening*; b) perfil metabólico (*metabolic profiling*), se restringe a la identificación y cuantificación de un número predefinido de metabolitos que pueden pertenecer a una clase de compuestos específica, como los compuestos fenólicos, o limitarse a miembros de una ruta metabólica concreta; c) metabolómica (*metabolomics*), en la que se realiza un análisis exhaustivo en el que todos los metabolitos de un sistema biológico son identificados y cuantificados, revelando el metaboloma del sistema biológico bajo estudio; y por último, d) huella dactilar metabólica (*metabolic fingerprinting*), que se emplea para clasificar muestras de forma rápida según su origen o relevancia biológica, sin necesidad de determinar el nivel individual de cada metabolito.

A continuación se sigue otra clasificación más sencilla según un enfoque dirigido o no dirigido. El dirigido consiste en analizar un grupo de metabolitos relacionados con una ruta metabólica específica o con una familia química determinada. Actualmente el enfoque que más se utiliza y con más potencial es el no dirigido, que se basa en comparar patrones de metabolitos (fingerprints o huellas metabólicas) que cambian en respuesta a una enfermedad, un cambio ambiental como la dieta o una alteración genética.

En general, los estudios metabolómicos tratan de obtener un perfil metabólico o conjunto de metabolitos de una muestra biológica compleja tal como el plasma, orina, tejidos o cultivos celulares. Se utilizan técnicas analíticas complementarias entre ellas basadas en la espectrometría de masas, que dan una medida de los metabolitos presentes en la muestra biológica. Estas medidas se tratan con técnicas estadísticas multivariantes, como por ejemplo el análisis de componentes principales (PCA, Principal Analysis Components), de las que se obtiene una información bioquímica relevante. De esta forma se determina el perfil metabólico de un estado concreto en comparación con un control. Esta información permite estudiar las causas de la patología, establecer biomarcadores o dianas terapéuticas, entre otros.

De forma habitual la espectrometría de masas se puede acoplar/complementar a otras técnicas analíticas como es el caso de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), que completa la identificación estructural del compuesto (Lenz y cols., 2007; Lindon y cols., 2008).

1.5. EL CACAO Y LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO

El cacao procede de la semilla del árbol *Theobroma cacao* (L.) de la familia *Sterculiaceae* (Figura 1.7). La palabra *Theobroma* deriva del griego *Theos* Dios y *broma* alimento, alimento de los dioses (Knapp, 1920). Esta planta es natural de los bosques tropicales ecuatoriales. De entre las variedades de esta planta hay dos variedades principales, Criollo y Forastero, y una tercera variedad, Trinitario, que es un híbrido de las anteriores (Wollgast y Anklam, 2000a). La variedad Criollo, cultivado en el centro y sur de América, es el cacao de mayor calidad, con sabor y aroma más delicado, siendo el más utilizado por los fabricantes de chocolates finos; sin embargo, el cacao Forastero,

que se cultiva principalmente en el oeste de África y Brasil, es el menos aromático y el de mayor uso comercial mundial.



Figura 1.7. *Theobroma cacao*. Hojas y flores (izquierda) y fruto y semillas (derecha). Modificado de Pabst (ed.) Köhler's Medizinal Pflanzen (1887).

El cacao es la materia prima con la que se prepara el chocolate. Tras la fermentación de los granos de cacao, usualmente realizada en los propios lugares de cultivo siguiendo métodos tradicionales escasamente controlados (Lefebvre y cols., 2012), éstos son cuidadosamente tostados, proceso que le confiere el característico aroma, y posteriormente molidos y desengrasados para separar el polvo. El cacao en polvo es mezclado con manteca de cacao en distintas proporciones para obtener diferentes variedades de chocolate. Así, el chocolate negro contiene como mínimo un 50% de polvo de cacao, mientras que el chocolate con leche y el blanco contienen menos de un 40% y 20%, respectivamente.

El cacao es conocido y consumido mundialmente (Cooper y cols., 2008). En España, se consume aproximadamente 4,7 g/persona/día de chocolate (Rusconi y Conti, 2010). Esta cifra aumenta hasta 8,8 g/persona/día cuando se incluyen además de chocolate, cacao y sucedáneos (Martín-Cerdeño, 2007). Además, España es la mayor

consumidora de productos de cacao en polvo, generalmente disueltos en leche, con una tasa de aproximadamente 1,7 kg/persona/año (Urpí-Sarda y cols., 2009a). Los productos solubles de cacao son populares en diferentes grupos de población como parte del desayuno o merienda, representando una importante fuente de compuestos fenólicos en la dieta. Además, la industria alimentaria ofrece una amplia variedad de estos productos, dependiendo del gusto o necesidad particular de cada consumidor, enriquecidos en flavonoides o fibra, así como productos con un menor contenido en azúcar respecto al producto original, entre otros.

Polifenoles del cacao

El cacao es también reconocido como una importante fuente de antioxidantes por su alto contenido en compuestos fenólicos. Los principales polifenoles presentes en la semilla de cacao son los flavonoides, concretamente flavan-3-oles, así como procianidinas de distinto grado de polimerización y cantidades menores de flavonoles, flavonas y antocianos. Los flavanoles representan el grupo mayoritario de flavonoides del cacao y sus derivados e incluyen la epicatequina, catequina y sus formas oligoméricas y poliméricas. La epicatequina es el monómero mayoritario, representando el 35% del contenido total en polifenoles (Wollgast y Anklam, 2000a; Andrés-Lacueva y cols., 2008). Entre las proantocianidinas oligoméricas destacan los dímeros procianidina B1, B2, B5, el trímero C1 y el tetrámero D (Hammerstone y cols., 1999; Cooper y cols., 2007). Los flavonoles, principalmente como glicósidos de quercetina, también están presentes en el cacao: quercetina-3-*O*-arabinósido, quercetina-3-*O*-glucósido (isoquercitrina) y en menor cantidad quercetina-3-*O*-galactósido además de pequeñas cantidades de la forma aglicona, quercetina (Andrés-Lacueva y cols., 2008). Las semillas de cacao contienen también una pequeña cantidad de flavonas, luteolina y sus glucósidos luteolina-8-*O*-glucósido y luteolina-6-*C*-glucósido, así como apigenina y su derivado glucosilado apigenina-8-*C*-glucósido (Sánchez-Rabaneda y cols., 2003). En el grupo de los antocianos se encuentran cianidina-3-*O*-arabinósido y cianidina-3-*O*-galactósido (Niemenak y cols., 2006). Otros derivados polifenólicos, tales como ácidos fenólicos, flavanonas, estilbenos, fenoles simples e isocumarinas, también están presentes en el cacao en menor proporción (revisado en Khan y cols., 2014).

La fracción fenólica de las semillas del cacao difiere cuantitativamente de la que se encuentra en sus derivados (chocolates, productos solubles, etc.) debido a los

diferentes procesados y contenidos de cacao con que se formulan dichos derivados (Wollgast y Anklam, 2000b; Andrés-Lacueva y cols., 2008).

El contenido total de polifenoles en el cacao, cuantificado cromatográficamente, varía desde 8-10 mg/g en la semilla fermentada, a 2,0-2,4 mg/g en el chocolate negro o 0,6-0,9 mg/g en el chocolate con leche (Wollgast, 2004).

Cacao y salud

Muchos estudios sugieren que el consumo de cacao y sus productos derivados como el chocolate puede tener efectos positivos sobre la salud humana, asociados en parte al alto contenido en antioxidantes de estos productos. Aunque el presente apartado se centra en los beneficios atribuidos a los compuestos fenólicos, cabe destacar que el cacao contiene otros componentes bioactivos, como la fibra dietética y las metilxantinas, que sin duda contribuyen a los efectos beneficiosos del consumo del cacao.

Los efectos del cacao sobre la salud descritos en la bibliografía van desde la protección cardiovascular, reduciendo el riesgo de enfermedad cardiovascular (Ding y cols., 2006; Grassi y cols., 2009; Buijsse y cols., 2010; Hooper y cols., 2012) a efectos antitumorales (revisado por Maskarinec, 2009; Martín y cols., 2013b), fundamentado en parte por el carácter antioxidante de los fenoles que lo componen.

Numerosas evidencias han encontrado una asociación entre la **salud cardiovascular** y el consumo de cacao (Hertog y cols., 1993; Corti y cols., 2009; Hooper y cols., 2012), modulando positivamente la lipemia, función endotelial, presión sanguínea, función anti-plaquetaria e inflamación (revisado en Arranz y cols., 2013).

La mayoría de estudios en humanos describen un *efecto hipolipemiante* de los flavanoles del cacao y del chocolate en humanos. Así, se ha confirmado un descenso en los niveles séricos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Fraga y cols., 2005; Grassi y cols., 2008), así como un incremento significativo en los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) (Monagas y cols., 2009; Khan y cols., 2012; Martínez-López y cols., 2014c; Sarriá y cols., 2014). Estos efectos han sido observados en sujetos sanos, en los que se reducía tanto el colesterol total (CT) como el LDL en sangre tras 14 días consumiendo un producto de chocolate con leche (Fraga y cols., 2005), en pacientes ligeramente hiperlipémicos, quienes tenían mayores concentraciones de HDL tras un consumo regular durante 10 semanas de un producto de cacao en polvo soluble (Monagas y cols., 2009; Khan y cols., 2012), en sujetos sanos y ligeramente

hiperlipémicos, quienes aumentaron los niveles de HDL tras 4 semanas consumiendo dos productos solubles de cacao enriquecidos en flavanoles (Martínez-López y cols., 2014b) y fibra dietética (Sarriá y cols., 2014), y en pacientes hipertensos, quienes mejoraron los niveles de LDL y de CT tras 4 semanas tomando asiduamente chocolate negro (Grassi y cols., 2008). También se ha confirmado el beneficio del consumo de chocolate en pacientes diabéticos, al mejorar los niveles séricos de HDL tras 8 semanas (Mellor y cols., 2010, 2013) y los niveles de LDL en mujeres diabéticas y menopáusicas tras el consumo continuo de chocolate rico en flavonoides durante 1 año (Curtis y cols., 2012).

Algunos estudios de intervención han observado un descenso en los niveles sanguíneos de triglicéridos (TG) como consecuencia del consumo prolongado de cacao y productos derivados en pacientes sanos (Tzounis y cols., 2011), sujetos hipertensos (Baba y cols., 2007) y sujetos con otras patologías asociadas al riesgo cardiovascular (Monagas y cols., 2009).

Adicionalmente se han observado menores niveles de LDL oxidadas (LDL-ox), biomarcador de riesgo cardiovascular, con el consumo regular de cacao, como por ejemplo de 130 mg/d (Baba y cols., 2007) o 93 mg/d de un producto soluble de cacao (Khan y cols., 2012). Este efecto se ha atribuido fundamentalmente al carácter antioxidante de los fenoles.

El consumo de cacao o productos derivados también se ha asociado a una mejora en la *función endotelial*. Heiss y cols. (2010) observaron mayores niveles plasmáticos de nitrito y, por tanto, mayor biodisponibilidad de NO en pacientes con riesgo cardiovascular tras el consumo de cacao rico en flavanoles (750 mg/d). Además, la dilatación mediada por flujo (FMD), como biomarcador de la función endotelial, mejoró significativamente tanto en etapas postprandiales como tras el consumo crónico de cacao o productos derivados, como se dedujo tras un meta-análisis de 42 estudios de intervención (Hooper y cols., 2012). Como consecuencia, la EFSA (2012) aprobó en Julio de 2012 una alegación sobre la relación causa-efecto entre la ingesta de 200 mg de flavanoles de cacao y el mantenimiento de la vasodilatación dependiente del endotelio, aceptando así la inclusión de cacao y chocolate en el contexto de una dieta equilibrada. Tales cantidades podrían ser proporcionadas por 2,5 g de cacao en polvo rico en flavanoles o 10 g de chocolate negro rico en flavanoles (Arranz y cols., 2013). Ahora bien, el contenido en grasas y azúcares de gran parte de los productos de cacao y chocolate debería tenerse en cuenta en el contexto de una dieta equilibrada, razón que

justifica la creciente comercialización de productos cada vez más enriquecidos en cacao y con menor contenido en grasa o incluso bajos en calorías.

También se ha relacionado el consumo de cacao con una mejora significativa de la *tensión arterial*. Varios meta-análisis revisados por Cherniack (2011) han evaluado el efecto del consumo de cacao en la tensión arterial, observando reducciones de 4,5 y 2,5 mm Hg en la presión sistólica y diastólica, respectivamente. A este respecto se admite que una reducción de 3 mm de Hg en la presión sanguínea sería suficiente para reducir el riesgo asociado a la *hipertensión*. Este hecho ha sido evidenciado tanto en sujetos normotensos (Heiss y cols., 2010; Sarriá y cols., 2012) como hipertensos (Muniyappa y cols., 2008; Grassi y cols., 2008; Desch y cols., 2010). Además, un grupo de sujetos que habían sufrido un evento coronario reducían su presión arterial sistólica en 4,2 mm Hg cuando consumían un cacao que aportaba 750 mg/d de flavanoles, a diferencia del grupo control que tomó solo 18 mg/d de flavanoles (Heiss y cols., 2010). Sin embargo, una saturación en la dosis de polifenoles podría inducir la ausencia de cambios en la presión arterial, tal y como observaron Almoosawi y cols. (2010) al incrementar la ingesta diaria de polifenoles de 500 a 1000 mg. Los mayores niveles de NO asociados al consumo crónico de flavanoles del cacao podrían ser los principales responsables de la menor tensión arterial.

Se ha asociado el carácter antioxidante del cacao con una mayor disponibilidad endotelial de NO, que inhibe la síntesis celular de eicosanoides y más concretamente de leucotrienos con propiedades vasoconstrictoras (revisado en Arranz y cols., 2013), contribuyendo a inhibir la *agregación plaquetaria*. Así, el consumo prolongado de cacao en sujetos sanos ha mostrado una menor agregación plaquetaria a la pared endotelial (Murphy y cols., 2003; Hermann y cols., 2006), al igual que aquellos sujetos que habían sufrido un evento coronario, en los que se reducía la adhesión postprandial de plaquetas al consumir un producto de chocolate rico en flavanoles (Flammer y cols., 2007). Recientemente, Carnevale y cols. (2012) han observado en sujetos fumadores que consumían chocolate enriquecido con 85% de cacao un efecto positivo sobre la inhibición de la función plaquetaria.

Por otra parte, estudios llevados a cabo tanto con chocolate como con cacao en polvo han mostrado un efecto **anti-inflamatorio** (Monagas y cols., 2009; Nogueira y cols., 2012). Un grupo de sujetos obesos e hipertensos reducían sus niveles de PCR tras 4 semanas consumiendo más de 2 g diarios de polifenoles con un producto de cacao (Nogueira y cols., 2012), aunque algunos autores sólo han confirmado estos efectos del

cacao en sujetos sanos tras un mes ingiriendo diariamente casi 500 mg de flavanoles (Tzounis y cols., 2011). Otro reciente estudio ha observado una relación dosis-respuesta entre la cantidad de flavanoles ingeridos, desde 30 a 900 mg diarios, y los menores niveles postprandiales de PCR en un grupo de sujetos obesos (Stote y cols., 2012). Por otra parte, otros autores han mostrado una tendencia a reducir los niveles plasmáticos de IL-6 (Nogueira y cols., 2012; Stote y cols., 2012) o los niveles de la citoquina IL-1 β (Sarriá y cols., 2014) tras el consumo de diversos productos ricos en cacao.

Aunque los estudios sobre el efecto del cacao en pacientes diabéticos son escasos, en parte debido a su contenido en azúcar, cada vez se reportan más resultados que confirman los beneficios del consumo de cacao y sus derivados frente a la **diabetes**. En particular, Grassi y cols. (2005a, 2005b, 2008) mostraron un aumento significativo en la sensibilidad tisular a insulina junto a una menor resistencia a la insulina tanto en pacientes sanos como hipertensos, con o sin baja tolerancia a la glucosa, consumiendo 100 g diarios de chocolate negro. También Davison y cols. (2008) llevaron a cabo un estudio en un grupo de sujetos obesos, observando una menor resistencia a la insulina al consumir un cacao enriquecido en flavanoles. El efecto de la glucosa del cacao parece contrarrestarse con el conocido papel hipoglicémico de los polifenoles, observado tras consumir dos productos de cacao con y sin azúcar (Njike y cols., 2011) y un producto de cacao rico en fibra dietética (Sarriá y cols., 2014), sin inducir en ambos estudios cambios en el índice de masa corporal. Por último, cabe mencionar que el efecto hipoglicémico de los flavanoles no es efectivo a dosis superiores a 100 mg al día, como concluyen Hooper y cols. (2012) del meta-análisis llevado a cabo con 42 estudios de intervención con humanos.

Aparte de los beneficios reportados para la salud cardiovascular, los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que los compuestos fenólicos del cacao podrían contribuir a un **efecto anti-cancerígeno**. Los primeros estudios epidemiológicos no ofrecieron resultados halagüeños, como el conocido Zutphen Study, en el que participaron 806 hombres de entre 65 y 84 años, y no se encontró relación alguna entre la ingesta de catequina y el cáncer de pulmón o de piel (Arts y cols., 2001), o el estudio de Boutron-Ruault y cols. (1999) que incluso encontró una relación negativa entre la ingesta de chocolate y la incidencia de cáncer colorrectal. Más tarde, el estudio de Iowa Women's Health Study estableció una relación inversa entre el consumo de catequina y la incidencia de cáncer colorrectal en mujeres postmenopáusicas (Arts y cols., 2002). Por último, cabe destacar el estudio llevado a cabo con los indios Kuna de la isla de San Blas

de Panamá, cuya ingesta de cacao se ha considerado la más alta en el mundo; los resultados de este estudio revelaron una menor incidencia de enfermedad cardiovascular, diabetes y cáncer respecto a la de la población panameña que no vivía en la isla (Bayard y cols., 2007).

Los modelos animales también han permitido demostrar la capacidad de los polifenoles del cacao en prevenir la formación de criptas aberrantes, primeros estadios de la carcinogénesis colónica (Rodríguez-Ramiro y cols., 2011a). Estos mismos autores ya habían demostrado la capacidad de los fenoles del cacao para inhibir el daño oxidativo al ácido desoxirribonucleico (ADN) en células hepáticas HepG2 sometidas a estrés oxidativo (Martín y cols., 2008), demostrando asimismo el efecto protector de un extracto fenólico del cacao frente a los efectos nocivos del procarcinógeno acrilamida (Rodríguez-Ramiro y cols., 2011b). Recientemente, han sugerido que tales efectos anticancerígenos podrían ser debidos a la ya conocida capacidad antioxidante de los polifenoles y a su papel en la regulación de las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular, apoptosis y metástasis (Martín y cols., 2013b).

Biodisponibilidad de los polifenoles del cacao

La **biodisponibilidad** de polifenoles ha sido extensamente estudiada en alimentos como cacao y sucedáneos, tal como se recoge en la Tabla 1.4. Los flavan-3-oles del cacao, debido a su bajo peso molecular, pueden ser absorbidos en el intestino delgado y alcanzar la circulación sistémica. Como ya se ha explicado, los flavanoles son metabolizados por enzimas de la fase II presentes tanto en los enterocitos como en los hepatocitos u otras células con capacidad metabólica. De esta manera, se han detectado derivados glucuronidados, sulfatados y metil-sulfatados del monómero epicatequina tras la ingesta de productos de cacao o derivados del mismo. Actis-Goretta y cols. (2012) cuantificaron la abundancia relativa de estos derivados en 33% para los conjugados glucuronidados, 28% para sulfatados y 33% para metil-sulfatados en un período post-ingesta de 24 h. Según estos autores, junto con Ottaviani y cols. (2012), el conjugado glucuronidado más abundante es el metabolito epicatequín-3'-glucurónido, y el conjugado sulfatado mayoritario el metabolito epicatequín-3'-sulfato.

Tabla 1.4. Metabolitos de fase II de catequina/epicatequina detectados en plasma y orina tras el consumo de cacao (y derivados) en estudios en humanos.

Alimento rico en cacao Dosis ingerida	Fluido biológico	Metabolitos hallados	Cmax (µM)	Tmax (h)	Referencia bibliográfica	
Chocolate negro 100 g (154 mg flavanoles)	Plasma	(-)-epicatequín-3'-β-D-glucurónido	0,290 ± 0,049	3,2 ± 0,2	Actis Goretta y cols., 2012	
		(-)-epicatequín-4'-β-D-glucurónido	0,044 ± 0,011	3,4 ± 0,3		
		(-)-epicatequín-7'-β-D-glucurónido	0,022 ± 0,006	12,8 ± 4,8		
		(-)-epicatequín-3'-sulfato	0,233 ± 0,060	3,2 ± 0,2		
		(-)-epicatequín-4'-sulfato	0,011 ± 0,003	3,5 ± 0,3		
		3'-O-metil(-)epicatequín-4'-sulfato	0,049 ± 0,014	3,6 ± 0,3		
		3'-O-metil(-)epicatequín-5-sulfato	0,153 ± 0,043	3,8 ± 0,2		
		3'-O-metil(-)epicatequín-7-sulfato	0,040 ± 0,010	3,8 ± 0,2		
		4'-O-metil(-)epicatequín-5-sulfato	0,018 ± 0,006	3,8 ± 0,2		
	4'-O-metil(-)epicatequín-7-sulfato	0,013 ± 0,004	3,8 ± 0,2			
	Orina	(-)-epicatequín-3'-β-D-glucurónido				
		(-)-epicatequín-4'-β-D-glucurónido				
		(-)-epicatequín-7'-β-D-glucurónido				
		(-)-epicatequín-3'-sulfato				
		(-)-epicatequín-4'-sulfato				
		(-)-epicatequín-5-sulfato				
		3'-O-metil(-)epicatequín-4'-sulfato				
		3'-O-metil(-)epicatequín-5-sulfato				
		3'-O-metil(-)epicatequín-7-sulfato				
4'-O-metil(-)epicatequín-5-sulfato						
4'-O-metil(-)epicatequín-7-sulfato						
3'-O-metil(-)epicatequín-β-D-glucurónido						
4'-O-metil(-)epicatequín-β-D-glucurónido						
Bebida láctea de cacao (1101mg de flavanoles)	Plasma	(-)-epicatequín-3'-β-D-glucurónido	0,589 ± 0,085	2 h	Ottaviani y cols., 2012	
		(-)-epicatequín-3'-sulfato	0,331 ± 0,026	2 h		
		(-)-epicatequín-5-sulfato	0,037 ± 0,003			
		(-)-epicatequín-7-sulfato	0,012 ± 0,001			
		3'-O-metil(-)epicatequín-5-sulfato	<0,020			
		3'-O-metil(-)epicatequín-7-sulfato	<0,020			
		4'-O-metil(-)epicatequín-5-sulfato	<0,020			
		4'-O-metil(-)epicatequín-7-sulfato	<0,020			
40 g de cacao soluble (460 mg de flavanoles)	Orina	Epicatequín-O-sulfato			Llorach y cols., 2009	
		O-metil-epicatequina				

10 g cacao en 250 mL de agua (13,2 mg de flavanoles)	Plasma	(epi)catequín- <i>O</i> -sulfato <i>O</i> -metil-(epi)catequín- <i>O</i> -sulfato	0,083 ± 0,008 0,060 ± 0,008	1,4 ± 0,2 1,3 ± 0,2	Mullen y cols., 2009
	Orina	(epi)catequín- <i>O</i> -sulfato (epi)catequín- <i>O</i> -sulfato <i>O</i> -metil-(epi)catequín- <i>O</i> -sulfato Epicatequín glucurónido			
Cacao soluble con leche 2 x 20g /día* (93 mg de flavanoles)	Orina	Epicatequín- <i>O</i> -glucurónido Epicatequín- <i>O</i> -glucurónido Epicatequín- <i>O</i> -glucurónido Epicatequín- <i>O</i> -glucurónido Epicatequín- <i>O</i> -sulfato Epicatequín- <i>O</i> -sulfato Epicatequín- <i>O</i> -sulfato <i>O</i> -metil-epicatequín- <i>O</i> -glucurónido <i>O</i> -metil-epicatequín- <i>O</i> -glucurónido <i>O</i> -metil-epicatequín- <i>O</i> -glucurónido <i>O</i> -metil-epicatequín- <i>O</i> -sulfato <i>O</i> -metil-epicatequín- <i>O</i> -sulfato <i>O</i> -metil-epicatequín- <i>O</i> -sulfato			Urpí Sarda y cols., 2009a
*estudio crónico					
40 g de cacao soluble (64,1 mg de flavanoles)	Orina	Epicatequín-glucurónido 3 isómeros de epicatequín-sulfato			Roura y cols., 2008
40 g de cacao soluble (64,1 mg de flavanoles)	Plasma	Epicatequín-glucurónido			Roura y cols., 2007
Producto de cacao enriquecido en procianidinas en 250 mL de leche (527 mg de flavanoles)	Plasma	Epicatequín-glucurónido Metil-epicatequín-glucurónido Epicatequín-sulfato Metil-epicatequín-sulfato		1-2 h	Tomas-Barberán y cols., 2007
	Orina	Epicatequín-glucurónido Metil-epicatequín-glucurónido Epicatequín-sulfato Metil-epicatequín-sulfato Metil-epicatequín-glucurónido-sulfato			

Cacao en polvo en 300 mL de agua (917 mg flavanoles)	Plasma	Epicatequina Catequina 4'-metil-epicatequina epicatequin-O-β-D-glucurónido 4'-O-metil(-)-epicatequin-O-β-D-glucurónido			Schroeter y cols., 2006
10 g de cacao soluble (289 mg deflavanoles)	Orina	Epicatequina*			Ito y cols., 2005
		*tras tratamiento con glucuronidasa			
40 g de cacao soluble en 250 ml de leche entera (54,4 mg de epicatequina)	Plasma	Epicatequín glucurónido	0,626 ± 0,198	2 h	Roura y cols., 2005
	Orina	Epicatequín sulfatos Epicatequina glucurónidos			
Chocolate o cacao (220 mg de epicatequina)	Plasma	Epicatequín-sulfato Epicatequín-glucurónido Epicatequín-sulfo-glucurónido 3'-O-metil(-)-epicatequín-sulfato 3'-O-metil-epicatequín-sulfoglucurónido		2 h	Baba y cols., 2000
	Orina	Epicatequina Epicatequín-sulfato Epicatequín-sulfo-glucurónido 3'-O-metil(-)-epicatequín-sulfato 3'-O-metil-epicatequín-sulfoglucurónido			
40 g de chocolate negro con pan (892 mg de polifenoles totales conteniendo 82 mg de epicatequina)	Plasma	Epicatequín-sulfatados Epicatequín-glucuronidados	Epicatequina tras hidrólisis enzimática 0,383 μM	2 h	Richelle y cols., 1999
80 g de chocolate negro con pan (1783 mg de polifenoles totales conteniendo 164 mg de epicatequina)			Epicatequina tras hidrólisis enzimática 0,7 μM	2,6 h	

Por el contrario, las procianidinas oligoméricas, muy abundantes en el cacao, muestran una absorción limitada debido a su alto peso molecular, especialmente las de mayor grado de polimerización, y llegan inalteradas al colon, donde son metabolizadas por la microbiota a derivados de ácidos fenólicos de estructuras químicas más sencillas. Así, mientras los compuestos monoméricos son absorbidos en un 22-55%, las procianidinas son hasta 100 veces menos biodisponibles (<0,5%) (Baba y cols., 2001). Sin embargo, cabe destacar que se ha descrito la presencia de procianidina B2 (PB2) en plasma (Holt y cols., 2002) y en orina (Urpí-Sarda y cols., 2009a).

En general, los estudios farmacocinéticos en cacao y/o chocolate presentados en la Tabla 1.4. muestran que la máxima concentración de los metabolitos de fase II en el plasma de los voluntarios alcanza valores entre 12 nM y más de 500 nM. Esta concentración máxima ocurre a tiempos cortos post-ingesta, en torno a las 1, 2 y 3 h (Richelle y cols., 1999; Baba y cols., 2000; Roura y cols., 2005; Tomás-Barberán y cols., 2007; Mullen y cols., 2009; Actis-Goretta y cols., 2012; Ottaviani y cols. 2012).

Respecto a la **excreción urinaria** de metabolitos, los flavanoles del cacao serían excretados en la orina, donde se registra un perfil de metabolitos de la fase II similar al del plasma. Cuantitativamente se observan diferencias entre los distintos tipos de intervención (Tabla 1.4.). Baba y cols. (2000) hallaron una excreción de epicatequina del 29,8% y 25,3% tras la ingesta de chocolate y cacao, respectivamente. Ito y cols. (2005) sólo recuperaron un 2% de epicatequina del chocolate ingerido, mientras que Mullen y cols. (2009) determinaron una recuperación del 18% de flavanoles tras una bebida de cacao. Más recientemente, Ottaviani y cols. (2012), también tras la ingesta de una bebida soluble de cacao, cuantificaron la excreción urinaria de epicatequina en 3% respecto de la ingerida, y Actis-Goretta y cols. (2012) reportaron valores del 21,7% tras la ingesta de chocolate. Por otra parte, Actis Goretta y cols. (2012) sugirieron una excreción biliar, reabsorción y nueva metabolización por enzimas de fase II al detectar epicatequín-7- β -D-glucurónido en el plasma tras 10 h post-ingesta (C_{max} = 20 nM).

Además de los metabolitos de fase II comentados, cabe destacar los de origen microbiano que, tras el consumo de flavanoles del cacao, son mayoritariamente ácidos fenólicos. Así, Rios y cols. (2003) detectaron seis ácidos fenólicos: ácidos *m*-hidroxifenilpropiónico, ferúlico, 3,4-dihidroxifenilacético, *m*-hidroxifenilacético, vaníllico y *m*-hidroxibenzoico en la orina de voluntarios sanos, cuyos niveles aumentaron tras el consumo de chocolate. Más tarde, Urpí-Sarda y cols. (2009a) observaron un incremento de la excreción en la orina de los ácidos cafeico, ferúlico, hidroxifenilacético, vaníllico,

hidroxibenzoico, 4-hidroxihipúrico e hipúrico, así como epicatequina y procianidina B2, al cabo de 24 h de la ingesta de un producto de cacao soluble, remarcando además grandes diferencias interindividuales. Otro conjunto característico de metabolitos microbianos del cacao lo conforman genéricamente aquellos que derivan del compuesto fenilvalerolactona. Llorach y cols. (2009) observaron que la excreción de compuestos derivados de la ruta de biotransformación vía fenilvalerolactona y fenilvalérico ocurría a partir de las 6 h tras la ingesta de un producto soluble de cacao, atribuyéndolo al metabolismo por la microbiota del colon. También identificaron en plasma altas concentraciones de hidroxifenilvalerolactona ($0,48 \mu\text{M}$) junto con menores concentraciones de otros ácidos fenólicos como los ácidos fenilacético y protocatéuico ($20,3$ y $10,5 \mu\text{M}$, respectivamente).

En la Figura 1.8. se muestra la ruta de degradación de flavanoles y procianidinas por la microbiota intestinal, que implica la fisión del anillo C, transformación en compuestos derivados de hidroxifenilvalerolactona y ácido hidroxifenilvalérico, y la subsiguiente transformación en ácidos fenólicos simples (Urpí-Sarda y cols., 2009a). Aunque la mayoría de los compuestos son comunes a otras vías del catabolismo microbiano de flavonoides, el compuesto 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona se podría considerar como potencial biomarcador de ingesta de flavanoles (Appeldoorn y cols., 2009; Monagas y cols., 2010).

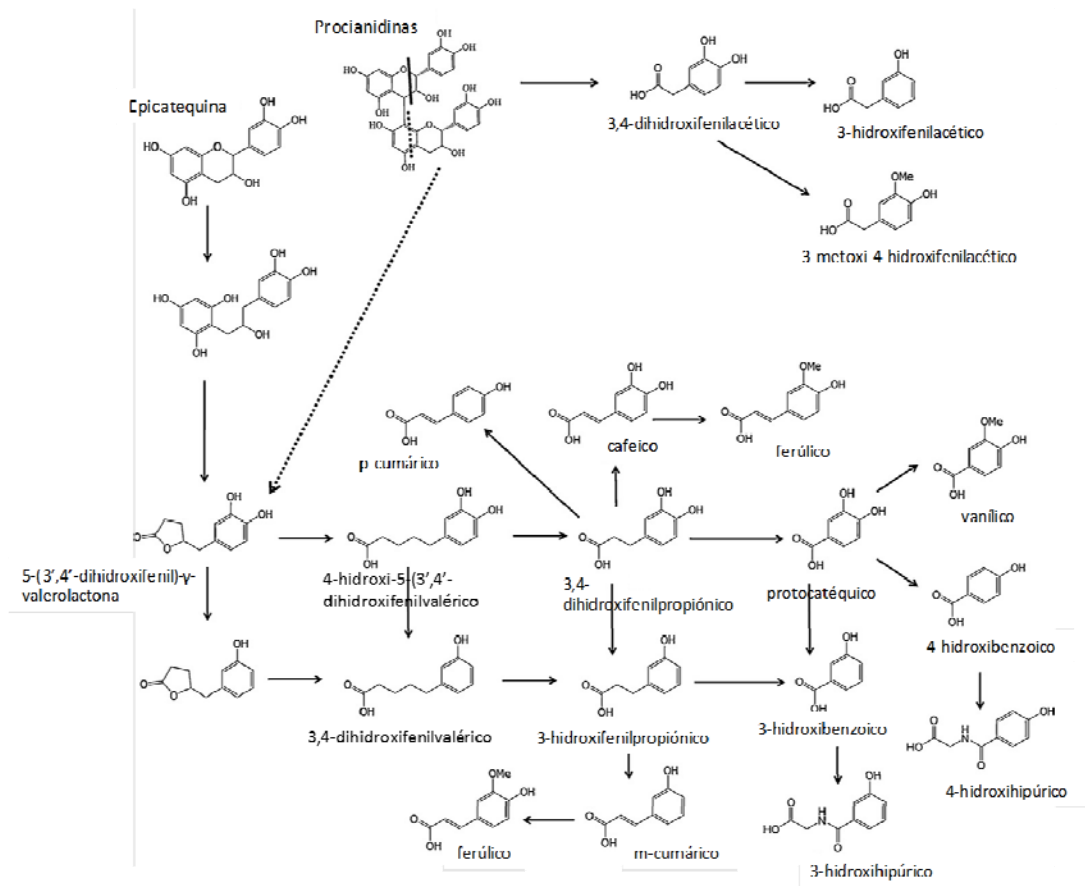


Figura 1.8. Ruta de degradación de flavanoles y procianidinas por la microbiota intestinal (tomado de Urpí-Sarda y cols., 2009a).

Efecto de la leche en la biodisponibilidad de los polifenoles del cacao

Se ha generado una notable controversia acerca de si la leche consumida con el cacao, como es el caso de los productos solubles de cacao o el chocolate con leche, afecta a la absorción intestinal de polifenoles. Algunos compuestos fenólicos son moléculas altamente hidroxiladas que pueden formar complejos insolubles con proteínas (Bravo, 1998), por lo que las proteínas lácteas se unirían a los polifenoles del cacao/chocolate impidiendo o disminuyendo su absorción en el tracto gastrointestinal (Cooper y cols., 2007). En un estudio publicado en la revista *Nature*, Serafini y cols. (2003) observaron que la ingesta de 100 g de chocolate negro resultaba en un incremento de la capacidad antioxidante del plasma de los voluntarios participantes; sin embargo, cuando la ingesta se realizaba junto con 200 mL de leche entera, o bien se consumían 200 g de chocolate con leche, la capacidad antioxidante del plasma se

reducía significativamente. Otro estudio publicado en la misma revista (Schroeter y cols., 2003) en respuesta al trabajo anterior, encontró que la leche no afectaba a la absorción de los polifenoles del cacao tomados en una bebida de cacao y sugirió que el efecto observado por Serafini y cols. (2003) podría deberse a la interacción de la matriz del chocolate, ralentizando la absorción de los antioxidantes. Posteriormente, Keogh y cols. (2007) tampoco encontraron interferencias en la absorción de la catequina y epicatequina del cacao tomado con leche en polvo. Roura y cols. (2007, 2008) indicaron que la leche no dificultaba la biodisponibilidad de los polifenoles tras la ingesta de un producto soluble de cacao consumido con leche. Sin embargo, Mullen y cols. (2009) observaron que la leche disminuía la absorción y excreción de flavanoles del cacao en la orina, aunque no afectó a su farmacocinética. Estos últimos autores encontraron también una relación inversa entre el contenido de fenoles del cacao y la influencia de las proteínas de la leche en su biodisponibilidad. Urpí-Sarda y cols. (2010) también evaluaron la influencia de la leche sobre la biodisponibilidad de los flavanoles del cacao, observando un efecto sobre la formación de algunos metabolitos microbianos derivados del cacao. Más recientemente, Zhang y cols. (2013) evaluaron el efecto de las proteínas y la grasa de la leche en la absorción de los compuestos fenólicos y el cambio en la capacidad antioxidante del plasma, observando que la leche entera reducía significativamente la absorción de los polifenoles, indicando como responsables del fenómeno la formación durante la digestión de complejos entre las proteínas y la grasa de la leche (conjuntamente, no por separado) con los compuestos fenólicos.

1.6. EL CAFÉ

Café se denomina al alimento consumido como bebida preparada por infusión a partir de las semillas del cafeto tostadas y molidas (*Coffea sp.* Familia *Rubiaceae*). Su cultivo se realiza en áreas tropicales, con un 45% de la producción mundial en América del Sur, principalmente Brasil y Colombia. El café es una de las infusiones más consumidas en todo el mundo (Higdon y Frei, 2006), repartido en sus dos variedades más características, *Coffea arabica* (L.) y *Coffea canephora* (L.), comúnmente conocida como Robusta, originarias de Etiopía y Zaire, respectivamente (Figura 1.9.). El procesado del grano de café requiere primero separar el grano de la cereza madura, lo que se denomina beneficiado, para a continuación tostarlo y obtener así un producto

altamente aromático y palatable. El tipo de tueste determina dos tipos de café, el natural o torrefacto. Además, se presentan otras modalidades como el descafeinado, mezcla o soluble.

Actualmente el consumo *per cápita* de café en España alcanza los 4,5 kg/año (términos de café verde), frente a Finlandia donde se consumen 12 kg/año y Japón con un consumo de 3,3 kg/año. En el caso español, el consumo equivale a 24.140 millones de tazas al año, equivalente a 599 tazas por habitante al año según la Federación Española de Café. La media nacional de consumo de café está entre una y tres tazas al día, siendo la franja de edad en la que se registra un mayor consumo la comprendida entre los 46 y los 55 años; de hecho, el 94% de los españoles de esta edad consume café habitualmente (Centro de Información de Café y Salud).

Aprovechando el gusto y hábito de la población mundial por el consumo de café y teniendo en cuenta la pérdida significativa de compuestos bioactivos del café durante su tostado (Schenker y cols., 2002), hasta el 50% de compuestos fenólicos (Alonso-Salces y cols., 2009), en los últimos años se han empezado a comercializar mezclas de café tostado y verde, así como extractos concentrados de café verde en forma de nutracéutico, por sus reconocidos beneficios en nuestro organismo.



Figura 1.9. *Coffea arabica*. Hojas, flores, fruto y semillas. Modificado de Pabst (ed.), Köhler's Medizinal Pflanzen (1887).

Polifenoles del café verde

El café es una de las fuentes principales de compuestos fenólicos (Tresserra-Rimbau y cols., 2013), aportando en la dieta española un 18% de los polifenoles ingeridos. En otros países como Japón, se ha estimado que el café puede aportar el 50% de los polifenoles totales ingeridos con las bebidas (Fukushima y cols., 2009). En consumidores regulares de café la ingesta de fenoles puede alcanzar 1 g al día, pudiendo representar el café la principal fuente de polifenoles en la dieta (Crozier y cols., 2010).

Se han identificado hasta 44 compuestos fenólicos en semillas de café de las variedades Arábica y Robusta, siendo mayoritarios los derivados de los ácidos hidroxicinámicos. Así, los isómeros de los ácidos cafeoilquínicos [ácidos 3-cafeoilquínico o neoclorogénico, 4-cafeoilquínico o criptoclorogénico, 5-*O*-cafeoilquínico o clorogénico], y dicafeoilquínicos [ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico], junto con isómeros del ácido feruloilquínico [ácidos 3-feruloilquínico, 4-feruloilquínico, 5-feruloilquínico] constituyen la fracción mayoritaria del extracto fenólico del café verde (Clifford y Jarvis, 1988; Alonso-Salces y cols., 2009). Además, pero en mucha menor concentración, se han identificado ácidos fenólicos simples (ácido caféico y ferúlico), amidas de ácidos cinámicos, glicósidos de ácidos cinámicos y otros hidroxicinamatos (Clifford y cols., 2006a, 2006b). La concentración total de estos compuestos en la semilla verde de la variedad Robusta (88 mg/g) supera a la variedad Arábica (68,8 mg/g) (Fujioka y Shibamoto, 2008). El ácido 5-cafeoilquínico es el fenol mayoritario en el café, representando casi un 50% del total de derivados hidroxicinámicos (Mullen y cols., 2011) y llegando a alcanzar hasta 14 o 41 mg por taza de café tostado o café verde, respectivamente (Mills y cols., 2013).

Café y salud

Los efectos del consumo de café sobre la salud han sido objeto de numerosos estudios por su controvertido papel. Así, la mayoría de los estudios de cohorte prospectivos no han observado que el consumo de café esté significativamente asociado con un mayor riesgo cardiovascular o de infarto (Higdon y Frei, 2006). De hecho, el café ha sido tradicionalmente asociado a una serie de efectos perjudiciales a nivel vascular y arterial debido a su contenido en cafeína (Cornelis y El-Soheemy, 2007; Rixsen y cols., 2009) y diterpenos (Bonita y cols., 2007). Sin embargo, el contenido fenólico podría mitigar el daño oxidativo a macromoléculas tales como el ADN, lípidos y proteínas por el

aumento de ROS, clave en los procesos patológicos, al margen de otros efectos beneficiosos sobre distintas funciones fisiológicas, lo que justifica los beneficios crecientes que se asocian al consumo de café y que se detallarán a continuación. Al igual que se comentó para el cacao, el café contiene otros compuestos bioactivos de gran interés, como las metilxantinas o las melanoidinas; aunque estos compuestos puedan actuar de forma combinada con los fenoles, aquí sólo se hará mención a aquellas actividades relacionadas con los compuestos fenólicos.

En la revisión de Di Castelnuovo y cols. (2012) se recogen los efectos negativos del café: incremento de la presión sanguínea, resistencia vascular sistémica, actividad de renina, epinefrina y norepinefrina, endurecimiento de las arterias, efectos producidos a nivel de la función endotelial en personas sanas, además de un incremento en los niveles de lípidos séricos y de homocisteína. Sin embargo, estos efectos adversos pueden ser contrarrestados por el efecto favorable del café en la diabetes tipo 2 y la ausencia de asociación con la hipertensión descrita en mujeres. Se ha publicado una revisión sistemática y meta-análisis de estudios prospectivos de cohortes por Ding y cols. (2013), en el que concluyen que el consumo moderado de café se asocia inversamente con el riesgo de enfermedad cardiovascular, alcanzándose el menor riesgo con el consumo de 3 a 5 tazas al día. Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se ha evaluado la calidad de vida de 11.423 españoles, concluyendo que no hay una asociación entre el consumo de café y el desarrollo de algunas enfermedades crónicas como diabetes, distintos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc., descartando el mayor riesgo de mortalidad por **enfermedad cardiovascular** (ECV) en sujetos que previamente habían sufrido un evento cardiovascular al consumir café cafeinado y filtrado (López-García y cols., 2011).

El consumo de café se ha relacionado tradicionalmente con un efecto negativo sobre la *lipemia*, aumentando los niveles séricos de CT y LDL. Los diterpenos cafestol y kawheol, presentes de forma natural en las semillas de café, han sido identificados como los componentes responsables en gran parte de la respuesta hipercolesterolemizante (Hammar y cols., 2003). El contenido de diterpenos disminuye drásticamente en el café filtrado (Thelle y Strandhagen, 2005), la forma más habitual de consumo en la actualidad, lo que puede explicar las crecientes evidencias sobre el efecto hipolipemizante tras el consumo asiduo de café, asociado en parte a su contenido fenólico. Así, un estudio llevado a cabo en sujetos sanos que tomaron 24 g de café/d durante una semana mostraron una reducción significativa de los niveles de CT, LDL y de

los biomarcadores de oxidación lipídica malondialdehído (MDA) y especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), además de una reducción en la susceptibilidad a la oxidación de las LDL tras la intervención con café en comparación con la etapa en la que sólo tomaron agua mineral (Yukawa y cols., 2004). Atendiendo al componente fenólico mayoritario del café (el ácido 5-cafeoilquínico) y en línea con los menores niveles de LDL-ox observados en el citado estudio, se ha descrito que el ácido 5-cafeoilquínico evita la inactivación de la paraoxonasa-1 en las lipoproteínas humanas, permitiendo así su efecto protector frente a la oxidación de LDL (Gugliucci y Markowicz-Bastos, 2009). En otro estudio más reciente con consumidores habituales de café, los participantes tomaron 4 y 8 tazas/d de café durante 1 mes en etapas diferenciadas, observando que las concentraciones de CT, HDL y apolipoproteína A-I (Apo A-I) incrementaron en un 12%, 7% y 4%, respectivamente, mientras que las proporciones de LDL/HDL y Apo B/Apo A-I disminuyeron significativamente en un 8% y 9%, respectivamente, al comparar la etapa de 8 tazas/d respecto a la etapa control (0 tazas/d) (Kempf y cols., 2010).

Los efectos del café sobre la *función endotelial* son controvertidos, puesto que el consumo de café cafeinado produce efectos agudos adversos (Papamichael y cols., 2005; Buscemi y cols., 2010), mientras que el café descafeinado produce efectos beneficiosos (Buscemi y cols., 2009), señalando a la cafeína como el responsable de los efectos negativos. Por el contrario, los polifenoles del café se asocian con la capacidad de disminuir la producción de ROS y aumentar la disponibilidad endotelial de NO (Suzuki y cols., 2006). Además, se ha descrito la capacidad de los ácidos dicafeoilquínicos para inhibir la angiotensina II en células de musculatura lisa vascular, favoreciendo así la vasodilatación (Chiou y cols., 2011). Cabe destacar que durante el proceso de tostado del café se forma hidroxihidroquinona (HHQ), que puede inhibir la acción endotelial del 5-cafeoilquínico. Sin embargo, el café verde prácticamente carece o contiene cantidades mínimas de este componente, además de presentar una mayor proporción de 5-cafeoilquínico, lo que asegura sus efectos positivos a nivel endotelial (Ochiai y cols., 2009). Buscemi y cols. (2009) evaluaron el consumo agudo de café descafeinado en la función endotelial de un grupo de sujetos sanos y observaron una mayor FMD al incrementar la dosis de 1 a 2 tazas de café expreso descafeinado, por lo que atribuyeron este efecto al incremento de la ingesta de derivados hidroxicinámicos.

El efecto *anti-plaquetario* del café se puso de manifiesto en un estudio cruzado en humanos llevado a cabo con café y cápsulas de cafeína, al observar cómo la intervención del café produjo un descenso en la agregación plaquetaria, ausente tras

ingerir un comprimido que contenía la misma cantidad de cafeína. Estos resultados sugerían que otros componentes del café estaban implicados en el proceso anti-agregante, apuntando a los compuestos fenólicos (Natella y cols., 2008).

Se ha sugerido que el café puede aumentar el riesgo cardiovascular por su efecto hipertensor, atribuido a su contenido en cafeína, ya que esta metilxantina puede elevar los niveles plasmáticos de hormonas del estrés tales como epinefrina, norepinefrina y cortisol (Lane y cols., 2002). Sin embargo, estos efectos difieren según el consumo sea agudo o crónico (Riksen y cols., 2009). Además, el efecto hipertensor del café también ha sido observado al consumir café descafeinado, por lo que otros ingredientes del café distintos a la cafeína podrían estar implicados (Corti y cols., 2002), aunque sí se ha demostrado que se puede contrarrestar por los compuestos fenólicos que contiene esta bebida. Así, un extracto de café enriquecido en derivados hidroxicinámicos, en concreto con 5-cafeoilquínico puro, produjo una respuesta *hipotensiva* en ratas (Suzuki y cols., 2002). La mayoría de estos estudios se han realizado con café tostado, si bien la mayor concentración fenólica del café verde debería de potenciar los efectos saludables de este alimento. En concordancia, un grupo de sujetos sanos que suplementaron su dieta con un extracto de café verde, 140 mg/d de 5-cafeoilquínico, redujeron su presión arterial sistólica y diastólica en 5 y 4,2 mm Hg, respectivamente, tras 4 meses de consumo (Ochiai y cols., 2004), mientras que el mismo producto consumido por sujetos medianamente hipertensos durante el mismo periodo de tiempo reducía la presión arterial sistólica y diastólica de los voluntarios en 10 y 7 mm Hg, respectivamente (Watanabe y cols., 2006), sugiriendo que los efectos positivos podrían intensificarse en los pacientes con un mayor riesgo.

El café y los extractos de café han demostrado tener un efecto inhibitor de la expresión de genes implicados en la **inflamación** (Paur y cols., 2010). El ácido clorogénico y su metabolito el ácido cafeico parecen inhibir la expresión de la IL-1 β , así como de sVCAM-1 y sICAM-1 (Chang y cols., 2010). También se ha descrito actividad anti-inflamatoria para la cafeína y los diterpenos, habiéndose demostrado que cada uno de estos compuestos aisladamente no parece tener la misma eficacia, lo que sugiere que el poder anti-inflamatorio del café deriva del efecto sinérgico de todos o algunos de sus componentes bioactivos (Chu y cols., 2011). El efecto anti-inflamatorio del café podría ser consecuencia de un consumo sostenido a largo plazo de esta bebida, ya que estudios en humanos sanos adscritos a un consumo moderado de café durante un mes no tuvo efecto sobre las citoquinas pro-inflamatorias (Kempf y cols., 2010; Gavrieli y cols., 2011)

mientras que la ingesta habitual de café durante un año si manifestó una tendencia a disminuir los niveles de IL-6 y TNF- α , así como los niveles plasmáticos de PCR (Yamashita y cols., 2012). A nivel postprandial, los niveles de PCR disminuían tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad coronaria tras ingerir 200 mg de cafeína (Shechter y cols., 2011), confirmando un efecto beneficioso independientemente del estado de salud. El estudio ATTICA concluye que hay una asociación positiva entre la ingesta de café y los niveles de PCR en hombres y mujeres que consumen más de 200 mL diarios de esta bebida (Zampelas y cols., 2004); sin embargo, Rebello y cols. (2011) no encontraron un efecto del café en las concentraciones de PCR en un meta-análisis de estudios llevados a cabo en sujetos que consumían entre 0 y 3 tazas diarias.

Por último, entre los factores de riesgo asociados a la salud cardiovascular se encuentra la **diabetes**, estrechamente relacionada con la **obesidad**. Estudios epidemiológicos revisados por Van Dam y Hu, (2005) y por Zhang y cols. (2009) apuntan a una asociación inversa entre el consumo de café y el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, siendo los mecanismos responsables la menor absorción de glucosa y los menores niveles de insulina en sangre. Así, Murase y cols. (2012) apuntaron a los polifenoles del café como los compuestos bioactivos responsables de suprimir la hiperglicemia e hiperinsulinemia postprandial. Estos efectos podrían contrarrestar las propiedades hiperglicemiantes de la cafeína (Johnston y cols., 2003); sin embargo, el consumo moderado tanto de café descafeinado como de café normal y otras bebidas conteniendo cafeína sugiere una relación inversa con el desarrollo de diabetes tanto en hombres como en mujeres (Salazar-Martínez y cols., 2004). Por otra parte, el café es un alimento interesante desde el punto de vista del control del peso, ya que además de presentar un rico contenido en compuestos bioactivos, estimula el metabolismo energético por inducción de catecolaminas o por inhibición de los receptores de adenosina (Greenberg y cols., 2006).

El consumo de café se ha asociado a la disminución de ciertos tipos de **cáncer** como el de piel, mama, endometrio, hígado y colon (Kim y cols., 2013; Ludwig y cols., 2014). Concretamente, el riesgo de padecer cáncer de endometrio se reduce entre un 50-60% al consumir 3 o más tazas diarias de café (Hirose y cols., 2007; Bravi y cols., 2009), u 8 o más tazas de café, independientemente de su método de preparación (Gavrilyuk y cols., 2014). De forma similar, una reducción del 50% en el desarrollo de cáncer hepatocelular ha sido asociado con el consumo de tan sólo 1 taza de café al día (Kurozawa y cols., 2005), llegando incluso a proteger en un 70% con un consumo mayor

de 5 tazas (Gelatti y cols., 2005). Según un estudio llevado a cabo en mujeres menopaúsicas, aquellas que consumían café de forma habitual tenían un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Baker y cols., 2006). Giovannucci (1998) describió una reducción del 24% del riesgo de padecer cáncer colorrectal en sujetos que consumían al menos 4 tazas diarias de café comparado con consumidores no habituales. De forma similar, otros estudios más recientes también encuentran una relación inversa entre el consumo de café y este tipo de cáncer (Galeone y cols., 2010; Tian y cols., 2013).

El ácido 5-cafeoilquínico del café puede ejercer su papel anti-cancerígeno aumentando la expresión de enzimas antioxidantes e inhibiendo la activación de las distintas señales implicadas en la proliferación celular, así como potenciando la apoptosis de células tumorales (Feng y cols., 2005). Los ácidos hidroxicinámicos también han mostrado un papel anti-proliferativo en células cancerígenas por inhibición de las topoisomerasas I y II (González de Mejía y cols., 2005). Por otra parte, los diterpenos presentes en el café podrían también contribuir a esa acción anti-cancerígena al inducir enzimas antioxidantes como la glutatión S-transferasa (GST) y la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), o inhibir algunas isoenzimas procarcinogénicas del citocromo P450 (Cavin y cols., 2002).

Biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles del café

La biodisponibilidad de polifenoles del café ha sido objeto de números estudios de intervención en humanos (Farah y cols., 2008; Stalmach y cols., 2009; Renouf y cols., 2010a, 2010b, 2013; Redeuil y cols., 2011). En general se ha observado que los ácidos hidroxicinámicos del café son parcialmente biodisponibles y los metabolitos mayoritarios en sangre son ácidos fenólicos y derivados hidroxicinámicos. Así, según Stalmach y cols. (2009) tras la ingesta de 200 mL de café que aportaban 412 μ moles (146 mg) de derivados hidroxicinámicos totales, correspondiendo un 29% al ácido clorogénico, la concentración máxima C_{max} para este compuesto sin metabolizar fue de 2,2 nM a un tiempo T_{max} de 1,0 h, mientras que otros metabolitos derivados (ácido cafeico-3-O-sulfato, ácido ferúlico-4-O-sulfato y las lactonas sulfatadas de los ácidos 3-cafeoilquínico y 4-cafeoilquínico alcanzaban valores de $C_{max} = 20-92$ nM a $T_{max} = 0,6-1,0$ h. Por otra parte, los ácidos dihidroderivados, como el dihidroferúlico, dihidroferúlico-4-O-sulfato y dihidrocafeico-3-O-sulfato, alcanzan valores de $C_{max} = 145-385$ nM a T_{max} mayores a 5 h, de acuerdo a su metabolización mayoritariamente colónica (Stalmach y

cols., 2009). En cambio, la ingesta de un extracto de café verde conteniendo 170 mg de ácidos clorogénicos alcanza una concentración total de ácidos cafeoilquínicos de 8,2 μM en plasma, siendo el ácido 5-cafeoilquínico el mayoritario con $C_{\text{max}} = 5,9 \mu\text{M}$ a las 3,3 h, frente a $C_{\text{max}} = 14,8 \mu\text{M}$ del total de derivados hidroxicinámicos (Farah y cols., 2008). En la Tabla 1.5. se presentan los trabajos realizados con café verde y tostado conjuntamente y los parámetros farmacocinéticos facilitados en las publicaciones.

Más tarde Redeuil y cols. (2011) caracterizaron el perfil de metabolitos en plasma tras la ingesta de café instantáneo, observando dos conjuntos de metabolitos, aquellos cuyo T_{max} se alcanzaron a tiempos cortos (0,5-2,0 h), correspondientes a derivados monoacilquínicos, lactonas, ácidos cafeico y ferúlico y sus derivados de fase II; y aquellos cuyo T_{max} se alcanzó a tiempos significativamente más largos (8-12 h), correspondiente a dihidroderivados de los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados de fase II. Renouf y cols. (2013) mostraron el mismo perfil farmacocinético que estos autores, aunque detectaron menor número de metabolitos.

Con respecto a la **excreción urinaria** de los metabolitos del café, cabe mencionar el estudio de Stalmach y cols. (2009) en el que, tras la ingesta de café conteniendo 412 μmoles (146 mg) de ácidos fenólicos e hidroxicinámicos de forma natural, se observó que un 29% del total de metabolitos excretados en orina correspondió a los derivados de ácidos hidroxicinámicos que serían absorbidos en el intestino delgado. Una proporción elevada de los metabolitos hallados en la orina corresponden con dihidroderivados de los ácidos cafeico y ferúlico (dihidrocafeico y dihidroferúlico) de origen microbiano, en sus formas sulfatadas y glucuronidadas (17,2%), alcanzando sus máximas concentraciones en torno a las 8-10 h.

El contenido mayoritario de los metabolitos de origen microbiano está de acuerdo con el estudio desarrollado por Stalmach y cols. (2010a) con individuos ileostomizados, al registrar un 70% menos de metabolitos en orina al cabo de las 24 h tras la ingesta de café instantáneo (136 mg de ácidos clorogénicos) que el estudio llevado a cabo por los mismos autores en voluntarios con colon funcional (Stalmach y cols., 2009), siendo fundamentalmente ácidos hidroxicinámicos y sus derivados de fase II, y en menor proporción, derivados monoacilquínicos.

Tabla 1.5. Metabolitos de la fase II y de origen microbiano de ácidos hidroxicinámicos detectados tras el consumo de café verde y café tostado en estudios en humanos. La dosis ingerida se ha calculado a partir del contenido total de ácido clorogénico detallado en las referencias bibliográficas.

Bebida de café Dosis ingerida	Fluido Biológico	Metabolitos hallados	Cmax (µM)	Tmax (h)	Referencia bibliográfica
Café soluble (Tres dosis: 176 mg, 352 mg y 704 mg de ácidos hidroxicinámicos)	Plasma	Ác. 3- <i>O</i> -feruloilquinico	<0,100	0,5-1,5	Renouf y cols., 2013
		Ác. 4- <i>O</i> -feruloilquinico	<0,100	0,5-1,5	
		Ác. 5- <i>O</i> -feruloilquinico	<0,100	0,5-1,5	
		Ác. 3- <i>O</i> -cafeoilquinico	<0,100	0,5-1,5	
		Ác. 4- <i>O</i> -cafeoilquinico	<0,100	0,5-1,5	
		Ác. 5- <i>O</i> -cafeoilquinico	<0,100	0,5-1,5	
		Ác. ferúlico	0,020; 0,026; 0,064	0,5-1,5	
		Ác. cafeico		0,5-1,5	
		Ác. <i>iso</i> ferúlico		0,5-1,5	
		Ác. dihidroferúlico	~0,400; 0,500, 1,0	7-11	
		Ác. dihidrocafeico	~0,200; 0,300; 0,700	7-11	
Café instantáneo 400 mL (no se especifica el contenido en ácidos clorogénicos)	Plasma	Ác. dihidrocafeico		0,5-2	Redeuil y cols., 2011
		Ác. cafeico- 4- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. cafeico- 3- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. dihidrocafeico-4- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. dihidrocafeico-3- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. dihidrocafeico-3- <i>O</i> -glucurónido		0,5-2	
		Ác. ferúlico		0,5-2	
		Ác. <i>iso</i> ferúlico		0,5-2	
		Ác. dihidroferúlico		8-12	
		Ác. dihidro <i>iso</i> ferúlico		8-12	
		Ác. dimetoxicinámico		0,5-2	
		Ác. dihidrodimetoxicinámico		8-12	
		Ác. ferúlico-4- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. dihidroferúlico-4- <i>O</i> -sulfato		8-12	
		Ác. dihidro <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -sulfato		8-12	
		Ác. ferúlico-4- <i>O</i> -glucurónido		0,5-2	
		Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -glucurónido		0,5-2	
		Ác. dihidroferúlico-4- <i>O</i> -glucurónido		8-12	
		Ác. 3- <i>O</i> -feruloilquinico		0,5-2	
		Ác. 4- <i>O</i> -feruloilquinico		0,5-2	
		Ác. 5- <i>O</i> -feruloilquinico		0,5-2	
		Ác. 3- <i>O</i> -cafeoilquinico		0,5-2	
Ác. 3- <i>O</i> -cafeoilquinico lactona		0,5-2			

		Ác. 3- <i>O</i> -feruloilquínico lactona		0,5-2	
		Ác. 4- <i>O</i> -feruloilquínico lactona		0,5-2	
		Ác. feruloilquínico lactona-sulfato (2 isómeros)		0,5-2	
		Ác. feruloilquínico lactona-glucurónido (2 isóm)		0,5-2	
		Ác. cafeoilquínico lactona-sulfato (3 isómeros)		0,5-2	
		Ác. <i>m</i> -cumárico- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. <i>o</i> -cumárico- <i>O</i> -sulfato		0,5-2	
		Ác. dihidrocumárico- <i>O</i> -sulfato		8-12	
Café instantáneo Nescafé Gold Blend (136 mg de ácidos hidroxicinámicos)	Fluido ileal	Ác. 3- <i>O</i> -cafeoilquínico lactona- <i>O</i> -sulfato			Stalmach y cols., 2010a
		Ác. 4- <i>O</i> -cafeoilquínico lactona- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. 3- <i>O</i> -feruloilquínico			
		Ác. 4- <i>O</i> -feruloilquínico			
		Ác. 5- <i>O</i> -feruloilquínico			
		Ác. ferúlico-4'- <i>O</i> -sulfato			
		Feruloilglicina			
		Ác. dihidroferúlico-4- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -glucurónido			
		Ác. cafeico-3- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. cafeico-4- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. dihidrocafeico-3- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. 3- <i>O</i> -cafeoilquínico lactona- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. 4- <i>O</i> -cafeoilquínico lactona- <i>O</i> -sulfato			
	Orina	Ác. 3- <i>O</i> -feruloilquínico			
		Ác. 4- <i>O</i> -feruloilquínico			
		Ác. 5- <i>O</i> -feruloilquínico			
		Ác. ferúlico-4- <i>O</i> -sulfato			
		Feruloilglicina			
		Ác. dihidroferúlico-4- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -glucurónido			
		Ác. cafeico-3- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. cafeico-4- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. dihidrocafeico			
Café soluble instantáneo (335 mg de ácidos hidroxicinámicos)	Plasma	Ácido ferúlico	0,139 ± 0,044	0,5-3	Renouf y cols., 2010a
		Ácido cafeico	0,081 ± 0,027	0,5-3	
		Ácido <i>iso</i> ferúlico	0,098 ± 0,032	0,5-3	
		Ácido dihidrocafeico		8-12	
		Ácido dihidroferúlico		8-12	

Café instantáneo (146 mg de ácidos hidroxicinámicos)	Plasma	<p>Ác. dihidrocafeico-3-<i>O</i>-sulfato Ác. dihidroferúlico-4-<i>O</i>-sulfato Ác. cafeico-3-<i>O</i>-sulfato Ác. ferúlico-4-<i>O</i>-sulfato</p>			Fumeaux y cols., 2010
	Orina	<p>Ác. dihidrocafeico-3-<i>O</i>-glucurónido Ác. cafeico-4-<i>O</i>-sulfato Ác. dihidroferúlico-4-<i>O</i>-sulfato Ác. cafeico-3-<i>O</i>-sulfato Ác. dihidroferúlico-4-<i>O</i>-glucurónido Ác. ferúlico-4-<i>O</i>-sulfato Ác. <i>iso</i>ferúlico-3-<i>O</i>-sulfato Ác. dihidro<i>iso</i>ferúlico-3-<i>O</i>-glucurónido Ác. <i>iso</i>ferúlico-3-<i>O</i>-glucurónido</p>			
Café instantáneo (146 mg de ácidos hidroxicinámicos)	Plasma	Ác. 5- <i>O</i> -cafeoilquinico	0,002 ± 0,001	1,0 ± 0,2	Stalmach y cols., 2009
		Ác. 3- <i>O</i> -cafeoilquinico lactona- <i>O</i> -sulfato	0,027 ± 0,003	0,6 ± 0,1	
		Ác. 4- <i>O</i> -cafeoilquinico lactona- <i>O</i> -sulfato	0,021 ± 0,004	0,7 ± 0,1	
		Ác. 3- <i>O</i> -feruloilquinico	0,016 ± 0,002	0,7 ± 0,1	
		Ác. 4- <i>O</i> -feruloilquinico	0,014 ± 0,002	0,8 ± 0,1	
		Ác. 5- <i>O</i> -feruloilquinico	0,006 ± 0,002	0,9 ± 0,1	
		Ác. cafeico-3- <i>O</i> -sulfato	0,092 ± 0,011	1,0 ± 0,2	
		Ác. ferúlico-4- <i>O</i> -sulfato	0,076 ± 0,009	0,6 ± 0,1	
			(0,046 ± 0,013)*	(4,3 ± 0,3)*	
		Ác. dihidroferúlico	0,385 ± 0,086	4,7 ± 0,3	
		Ác. dihidroferúlico-4- <i>O</i> -sulfato	0,145 ± 0,053	4,8 ± 0,5	
		Ác. dihidrocafeico	0,041 ± 0,010	5,2 ± 0,5	
		Ác. dihidrocafeico-3- <i>O</i> -sulfato	0,325 ± 0,099	4,8 ± 0,6	
	Orina	Ác. 3- <i>O</i> -cafeoilquinico lactona- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. 4- <i>O</i> -cafeoilquinico lactona- <i>O</i> -sulfato			
		Ác. 3- <i>O</i> -feruloilquinico			
		Ác. 4- <i>O</i> -feruloilquinico			
Ác. 5- <i>O</i> -feruloilquinico					
	Ác. ferúlico-4- <i>O</i> -sulfato				
	Ác. feruloilglicina				
	Ác. dihidroferúlico				
	Ác. dihidroferúlico-4- <i>O</i> -sulfato				
	Ác. dihidroferúlico-4- <i>O</i> -glucurónido				
	Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -sulfato				
	Ác. <i>iso</i> ferúlico-3- <i>O</i> -glucurónido				

* Los valores dobles del ácido ferúlico-4-*O*-sulfato son debidos a un perfil de absorción bifásico.

		Ác. dihidroisofeólico-3-O-glucurónido					
		Ác. cafeico-3-O-sulfato					
		Ác. cafeico-4-O-sulfato					
		Ác. dihidrocafeico-3-O-sulfato					
		Ác. dihidrocafeico-3-O-glucurónido					
Extracto de café verde (170 mg de ácidos hidroxinámicos)	Plasma	Ác. 3-cafeoilquinico	0.9 ± 1.4	4.0 ± 2.6	Farah y cols., 2008		
		Ác. 4-cafeoilquinico	1.4 ± 1.1	3.6 ± 2.2			
		Ác. 5-cafeoilquinico	5.9 ± 4.2	3.3 ± 2.4			
		Ác. 3,4-dicafeoilquinico	1.5 ± 1.6	2.6 ± 1.8			
		Ác. 3,5-dicafeoilquinico	2.7 ± 2.7	3.2 ± 2.5			
		Ác. 4,5-dicafeoilquinico	2.5 ± 3.0	3.3 ± 2.5			
		Ác. cafeico	1.1 ± 0.9	3.6 ± 2.1			
		Ác. ferúlico	0.8 ± 0.3	2.9 ± 1.8			
		Ác. isofeólico	0.9 ± 0.2	2.9 ± 1.8			
		Ác. <i>p</i> -cumárico	0.4 ± 0.03	2.5 ± 1.8			
		Orina	Ác. gálico				
			Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico				
			Ác. dihidrocafeico				
			Ác. vaníllico				
Ác. siringico							
Ác. sinápico							
Ác. 5-cafeoilquinico							
Ác. 4-cafeoilquinico							
Ác. cafeico							
Ác. ferúlico							
Extracto de café verde (300 mg de ácidos hidroxinámicos)	Plasma	Ácido 3-cafeoilquinico	0,039 ± 0,012		Matsui y cols., 2007		
		Ácido 4-cafeoilquinico	0,007 ± 0,002				
		Ácido 5-cafeoilquinico	0,007 ± 0,002				
		Ácido 3-feruloilquinico	0,007 ± 0,002				
		Ácido 4-feruloilquinico	0,004 ± 0,002				
		Ácido 5-feruloilquinico	0,014 ± 3,44				
		Ácido ferúlico	0,009 ± 0,004				
		Ácido dicafeoilquinico	(trazas)				

Café tostado (1201 mg de ácidos hidroxicinámicos)	Plasma	Ácido 3-cafeoilquinico	1,00 ± 0,75	1,75 ± 0,99	Monteiro y cols., 2007	
		Ácido 4-cafeoilquinico	1,04 ± 0,68	2,08 ± 1,20		
		Ácido 5-cafeoilquinico	3,14 ± 1,64	2,33 ± 1,17		
		Ácido 3,4-dicafeoilquinico	0,92 ± 0,32	2,25 ± 1,25		
		Ácido 3,5-dicafeoilquinico	1,17 ± 0,95	2,33 ± 1,17		
		Ácido 4,5-dicafeoilquinico	1,11 ± 0,36	2,33 ± 1,17		
		Ácido cafeico	1,56 ± 1,52	1,42 ± 0,38		
	Orina	Ácido 5-cafeoilquinico				
		Ácido cafeico				
		Ácido dihidrocafeico				
		Ácido ferúlico				
		Ácido isoferúlico				
		Ácido <i>p</i> -cumárico				
Café en polvo descafeinado (250-290 mg de ácidos hidroxicinámicos)	Orina	Ácido clorogénico			Ito y cols., 2005	
		Ácido cafeico				
		Ácido <i>m</i> -cumárico				
		Enterodiol				
		Enterolactona				

Acerca del **metabolismo colónico** tras el consumo de café se ha descrito un aumento significativo de los ácido ferúlico, *isoferúlico*, dihidroferúlico, 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propiónico, vanílico e hidroxihipúrico (Rechner y cols., 2001), señalando a los tres primeros (ferúlico, *isoferúlico* y dihidroferúlico) como posibles biomarcadores específicos del metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos del café. Gonthier y cols. (2006) identificaron distintos compuestos derivados del metabolismo colónico producidos mediante reacciones de deshdroxilación, desmetilación, deshdrogenación, glicinación e hidrogenación. Dichos metabolitos microbianos serían los ácidos 3- y 4-hidroxifenilpropiónico, 3,4-dihidroxifenilpropiónico, 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico, 3- y 4-hidroxifenilacético, 3,4-dihidroxifenilacético, 3-metoxi-4-hidroxifenilacético, 3- y 4-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxibenzoico, 3-metoxi-4-hidroxibenzoico, *m*-coumárico, hipúrico y 3-hidroxihipúrico.

El modelo de catabolismo microbiano de los ácidos hidroxicinámicos (Figura 1.10.) se ha estudiado principalmente para el ácido clorogénico (Rechner y cols., 2001, 2004; Gonthier y cols., 2003). Según Rechner y cols. (2004), el primer paso de la metabolización después de la desesterificación sería la reducción del doble enlace del cafeico, generando 3,4-dihidroxifenilpropiónico (ácido dihidrocafeico). Este compuesto se metabolizaría a 3-hidroxifenilpropiónico, mediante una reacción de deshdroxilación, el cual, si es absorbido por el intestino grueso, que proporcionaría el metabolito 3-hidroxihipúrico mediante β -oxidación y glicinación en el hígado y, si no es absorbido, sufriría deshdroxilación colónica a 3-fenilpropionico, el cual se transformaría en hipúrico tras su absorción colónica y posterior β -oxidación y glicinación en hígado.

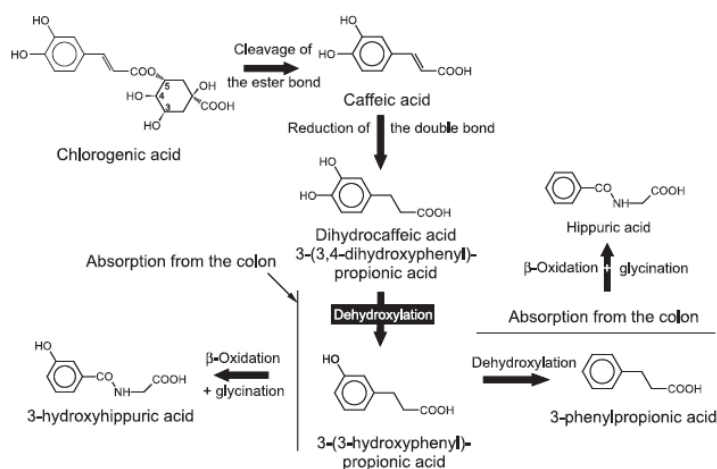


Figura 1.10. Metabolismo propuesto para el ácido clorogénico por la microbiota intestinal (Rechner y cols., 2004).

Efecto de la leche en la biodisponibilidad de los polifenoles del café

Muy frecuentemente, la bebida de café se mezcla con leche para su consumo. Hasta la fecha sólo se conoce un trabajo que haya tratado el efecto de la leche en la biodisponibilidad de los polifenoles del café (Renouf y cols., 2010b). En este trabajo se realizaron tres intervenciones con voluntarios sanos que tomaron café soluble en agua, café soluble con un 10% de leche entera y café soluble con azúcar y crema no láctea, conteniendo los tres tratamientos la misma cantidad de ácidos clorogénicos (332 mg). Estos autores concluyeron que la leche entera adicionada al café no alteraba la biodisponibilidad total de los compuestos fenólicos, mientras que el azúcar y la crema no láctea afectaban a los parámetros farmacocinéticos T_{max} y C_{max} , pero no así a la aparición de compuestos fenólicos del café en el plasma.

1.7. LA YERBA MATE

Cielito, cielito que sí
guárdense su chocolate
aquí somos puros indios
y solo tomamos mate.

____Bartolomé Hidalgo, 1810.
Poeta uruguayo

El mate o yerba mate es una bebida amarga que se prepara como una infusión a partir de las hojas y tallos del arbusto *Ilex paraguariensis*, Saint-Hilaire (familia *Aquifoliaceae*). Esta especie de arbusto es nativa de las regiones subtropicales de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, donde el consumo de la yerba mate está muy extendido. Se estima que en estos países el 30% de la población ingiere más de un litro de mate al día (De Morais y cols., 2009), fundamentalmente por sus propiedades estimulantes.

Durante su procesado, las hojas y tallos son sometidos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo, proceso denominado zapecado, con el que se logra mantener el color verde y se adquieren aromas propios. A continuación, el mate es sometido a un proceso de secado con en el que se elimina el resto de humedad y posteriormente, se muele y tamiza.

Existen tres formas básicas de consumir la yerba mate. La forma más común es el **mate o cimarrón**, una infusión que se prepara en un recipiente también llamado mate

en el que se vierte agua entre 75 y 82°C que se succiona por medio de la denominada bombilla. El **tereré** es similar al mate pero se prepara con agua fría. Y el **mate cocido**, que es una infusión que se prepara agregando yerba mate a agua bien caliente, previo a hervir, para a continuación colar dejando la infusión libre de las hojas de mate. Esta última forma de mate cocido es equivalente al que se prepara a partir de bolsitas de papel, similares a las de otras infusiones como el té.

Uruguay es el principal país consumidor de este producto, 6-8 kg por habitante y año (Bracesco y cols., 2011), seguido por Argentina con un consumo de 6 kg por habitante y año según un informe del Ministerio Argentino de Agricultura, Ganadería y Pesca con fecha de julio 2013 (Parra, 2013). Solamente tres estados en Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina y Paraná) tienen bebedores de mate entre su población, estimándose que el 70% de los hombres de estos estados consumen cimarrón diariamente (Bracesco y cols., 2011). Aunque en España el consumo de yerba mate no está muy extendido, es muy habitual en población inmigrante latinoamericana.



Ilex paraguariensis A. St.-Hil.

Figura 1.11. *Ilex paraguariensis*. Hojas, flores y frutos. Modificado de Köhler's Medizinal Pflanzen (1887).

Polifenoles del mate

El mate presenta un perfil polifenólico similar al del café verde, donde el 80% de la composición fenólica está representada por isómeros de los ácidos cafeoilquínico (3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico y 5-cafeoilquínico) y dicafeoilquínico (3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico y cantidades menores de 1,5-dicafeoilquínico). Pequeñas concentraciones de mono-, di- y triésteres de ácido quínico y otros hidroxicinamatos, junto con glicósidos de flavonoles como la rutina (quercetín-3-O-ramnoglucósido) también han sido detectados en el mate (Bravo y cols., 2007; Dugo y cols., 2009).

Se han reportado contenidos fenólicos de hasta 87 mg/g de materia seca (Bravo y cols., 2007), si bien, al igual que con el café, durante el secado se pueden producir importantes pérdidas de hasta el 50% de los polifenoles (Heck y de Mejia, 2007; De Moraes y cols., 2009).

Mate y salud

Desde que el estudio pionero de Gugliucci y Stahl (1995) reportase que el extracto acuoso de *I. paraguayensis* es capaz de inhibir la oxidación de las LDL *in vitro*, varios estudios han confirmado la alta capacidad antioxidante de los extractos del mate, debido a su contenido en compuestos fenólicos, sugiriendo que el consumo de la yerba mate puede contribuir a la prevención de aterosclerosis, diabetes y enfermedades inflamatorias por distintos mecanismos de acción, como se revisan por Markowicz-Bastos y cols. (2007) y por Heck y de Mejia (2007). Aunque la yerba mate presenta otros grupos de compuestos potencialmente bioactivos, como metilxantinas y saponinas, sólo se detallarán los beneficios asociados a la fracción fenólica del mate.

Una de las propiedades en salud más aceptadas del mate es su efecto en **enfermedad cardiovascular**, con potencial cardioprotector asociado a sus propiedades hipocolesterolémicas, anti-trombóticas, antiaterogénicas, hipotensoras, mejora de la función endotelial y la respuesta vascular (Andersen y Fogh, 2001; De Moraes y cols., 2009; Schinella y cols., 2009). Se ha descrito en ensayos clínicos con voluntarios hiperlipémicos que el consumo de mate (330 mL tres veces al día) contribuyó significativamente al efecto hipocolesterolémico del tratamiento farmacológico con estatinas (De Moraes y cols., 2009), perfilándose los derivados cafeoilquínicos como los principales responsables del efecto beneficioso en salud cardiovascular del mate.

Los mecanismos por los que estos compuestos fenólicos intervienen en la salud cardiovascular son múltiples. Por una parte, se ha observado que el ácido 5-cafeoilquínico y el ácido caféico tienen efecto *hipotensor*, aumentando la biodisponibilidad de NO y disminuyendo la producción de ROS en el endotelio vascular, lo que lleva a una mejora de la *función endotelial* (Suzuki y cols., 2006). También se ha descrito la protección por el 5-cafeoilquínico de la paraoxonasa-1 en lipoproteínas humanas, permitiendo así su efecto protector frente a la oxidación de LDL (Gugliucci y Markowicz-Bastos, 2009) y se ha referido la inhibición por 5-cafeoilquínico de la actividad de los enzimas COX-I y COX-II, así como de la expresión de P-selectina en plaquetas (Park, 2009), bloqueando la *activación plaquetaria*. Igualmente, uno de los principales metabolitos circulantes tras la ingesta de ácidos hidroxicinámicos, el ácido dihidrocaféico, es capaz de captar ROS producidos en células endoteliales y aumentar la actividad de la NOS, pudiendo contribuir a la mejora de la función endotelial mediada por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Huang y cols., 2004). Otro mecanismo por el que los derivados dicafeoilquínicos pueden ejercer su efecto cardioprotector y antiaterosclerótico es mediante la inhibición de angiotensina II en células de la musculatura lisa vasculares y la protección de las células endoteliales frente al estrés oxidativo (Chen y cols., 2007; Chiou y cols., 2011).

Además del beneficio en salud cardiovascular asociado al efecto hipolipemiante del mate, la reducción en la acumulación de grasa en hígado y en tejido adiposo tiene un claro papel beneficioso frente a **obesidad**. El mate es utilizado, junto con otras hierbas, como suplemento dietético en estrategias de adelgazamiento. Un estudio en humanos, donde consumieron uno de estos suplementos, mostró su eficacia en la pérdida de peso (5,1 kg vs. 0,3 kg tras 45 días de consumo del preparado o placebo) (Andersen y Fogh, 2001). En este estudio se observó un retraso en el vaciado gástrico con el consiguiente efecto saciante. En otro estudio con animales a los que se indujo obesidad con dieta hipergrasa se observó que el mate redujo significativamente el peso corporal, la grasa visceral, el tamaño de los adipocitos, las concentraciones sanguíneas y hepáticas de lípidos, así como los niveles sanguíneos de glucosa, insulina y leptina. Además, el mate contrarrestó el efecto de la dieta hipergrasa sobre la expresión de diversos factores de transcripción y receptores, y de enzimas clave en lipólisis y lipogénesis en tejido adiposo (Pang y cols., 2008), demostrando así la potente actividad anti-obesidad del mate y los mecanismos moleculares implicados en dicho efecto.

Otro efecto en salud de gran interés del mate es la disminución en el riesgo de padecer **diabetes tipo 2**. Se ha estudiado que la yerba mate es capaz de reprimir la expresión de SGLT1 (transportador de glucosa dependiente de sodio), el principal transportador de glucosa en el epitelio intestinal, lo que explicaría el efecto del ácido clorogénico sobre la absorción de esta hexosa y su contribución a la homeostasis glucídica (Oliveira y cols., 2008). También se ha hipotetizado sobre el efecto de los ácidos hidroxycinámicos reduciendo la digestibilidad de los carbohidratos de la dieta y, por tanto, disminuyendo el índice glicémico, ya que se ha demostrado en estudios *in vitro* la capacidad del ácido 5-cafeoilquinico de inhibir la α -amilasa pancreática (Narita e Inouye, 2009).

En conjunto, todos los efectos beneficiosos derivados del consumo de yerba mate se relacionan con la disminución de factores de riesgo cardiovasculares, diabetes tipo 2 y obesidad, muy relevantes en el desarrollo del denominado **síndrome metabólico**, por lo que el consumo de esta bebida podría tener gran interés en la lucha contra este síndrome, cuya prevalencia en países occidentales está aumentando notablemente.

El consumo de mate se ha relacionado con el desarrollo de algunos tipos de **cáncer** (cavidad bucal, faringe, laringe, esófago, pulmón, vejiga). Existe controversia en los estudios epidemiológicos que asocian el consumo de yerba mate con el desarrollo de estos tipos de cáncer. Algunos estudios muestran un aumento en el riesgo de cáncer orofaríngeo principalmente, aunque también de otros tipos de cáncer, asociado a ingestas elevadas de mate, siendo mayor el riesgo en fumadores y bebedores de alcohol (Goldenberg, 2002; Goldenberg y cols., 2003). Sin embargo, otros estudios no han mostrado dicha asociación o sólo cuando el mate es tomado a muy alta temperatura, debido al daño térmico en la mucosa orofaríngea, lo que la haría más susceptible a la acción de mutágenos y procarcinógenos en el mate, tabaco, etc. (Loria y cols., 2009). Por el contrario, estudios en cultivos celulares muestran un efecto antiproliferativo de los compuestos fenólicos del mate frente a células cancerígenas orales, inhibiendo las topoisomerasas I y II (González de Mejía, 2005); además, demuestran un efecto protector frente a daño al ADN inducido por peróxido de hidrógeno en células hepáticas, renales y de vejiga aisladas de ratones tratados con mate (Miranda y cols., 2008). El efecto de reducción de la viabilidad celular e inducción de apoptosis de células tumorales tras el tratamiento con ácidos hidroxycinámicos (Miccadei y cols., 2008) se asociaría a su actividad antioxidante, al aumentar la actividad y expresión de enzimas

antioxidantes en células tumorales de pulmón y epidermis suprimiendo señales celulares implicadas en supervivencia y proliferación (NF- κ B, AP-1 y MAPK) (Feng y cols., 2005), aunque en otro modelo celular no se observó dicho efecto (Granado-Serrano y cols., 2007).

En medicina popular, la infusión de yerba mate se ha utilizado para el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades digestivas y hepáticas, artritis, reumatismo y otras enfermedades inflamatorias, obesidad, hipertensión e hipercolesterolemia (De Morais y cols., 2009).

Biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles de la yerba mate

Hasta la fecha no se conocen estudios sobre la biodisponibilidad de los polifenoles de la yerba mate. Cabe esperar que al presentar un perfil de compuestos fenólicos similar al del café verde, su biodisponibilidad sea similar.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Numerosas evidencias científicas muestran que alimentos ricos en compuestos fenólicos ejercen efectos beneficiosos en la salud humana. Estos beneficios vienen estrechamente determinados por la biodisponibilidad de dichos compuestos, es decir, por cómo se absorben y metabolizan estos componentes bioactivos presentes en los alimentos en el tracto gastrointestinal humano.

De entre los muchos alimentos ricos en compuestos fenólicos, se han seleccionado el cacao y el café por su elevado consumo en la dieta española, así como la yerba mate, de gran consumo en algunos países latinoamericanos y que está empezando a consumirse en España como infusión o nutraceutico, dado que popularmente se le atribuyen propiedades saludables. Estos tres alimentos consumidos como bebidas son objeto de estudio de esta Tesis, puesto que además de su contenido elevado en polifenoles, sus componentes fenólicos tienen diferentes estructuras químicas, lo que permite estudiar la biodisponibilidad de diferentes grupos de polifenoles. Concretamente, se seleccionaron dos productos solubles de cacao (uno de ellos enriquecido en polifenoles), un producto de café verde soluble (Nescafé GreenBlend, que es un producto compuesto por café tostado mezclado con un 35% de café verde) y la yerba mate en infusión. Los polifenoles presentes en el cacao son mayoritariamente del grupo de los flavanoles, mientras que en el café y en la yerba mate pertenecen al grupo de los ácidos hidroxicinámicos.

Aunque existen varios estudios sobre la biodisponibilidad de polifenoles del cacao, la novedad aquí presentada radica en las dosis ingeridas. La mayoría de los estudios previos se han realizado con dosis más elevadas, mientras que en el presente estudio se ha tratado de que las dosis ingeridas fueran realistas, es decir, reproduciendo patrones de consumo habitual, similares a los que un consumidor tomaría según las indicaciones comerciales. De la misma manera, se ha realizado el estudio con café mezcla tostado/verde y con yerba mate, de especial interés en el caso de ésta última, ya que no se conocen estudios de biodisponibilidad de polifenoles en yerba mate.

Previamente se hizo necesario caracterizar la fracción fenólica de los alimentos, productos solubles de cacao, café mezcla tostado/verde y yerba mate, para a continuación evaluar en un modelo celular que reproduce el epitelio intestinal humano (células Caco-2), el transporte y metabolismo de los compuestos fenólicos mayoritarios de estos productos. Estos modelos permiten ahondar en el comportamiento individual

2. Justificación y Objetivos

de los polifenoles en cuanto a su absorción y metabolización, de interés en la interpretación de los resultados observados en humanos.

El **objeto general** de esta Tesis Doctoral fue el estudio de la biodisponibilidad y de la metabolización de los flavonoides presentes en el cacao y de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el café y en la yerba mate. Para ello se establecieron los siguientes **objetivos específicos**.

- Caracterizar y cuantificar los compuestos fenólicos mayoritarios de los productos solubles de cacao, café y yerba mate.
- Estudiar el transporte y metabolismo celular *in vitro* de los flavonoides mayoritarios del cacao y de los ácidos hidroxicinámicos mayoritarios del café y yerba mate en un modelo de epitelio intestinal humano (células Caco-2).
- Estudiar la biodisponibilidad y el metabolismo de los flavonoides de productos solubles de cacao en voluntarios sanos.
- Estudiar la biodisponibilidad y el metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos de café y yerba mate en voluntarios sanos.

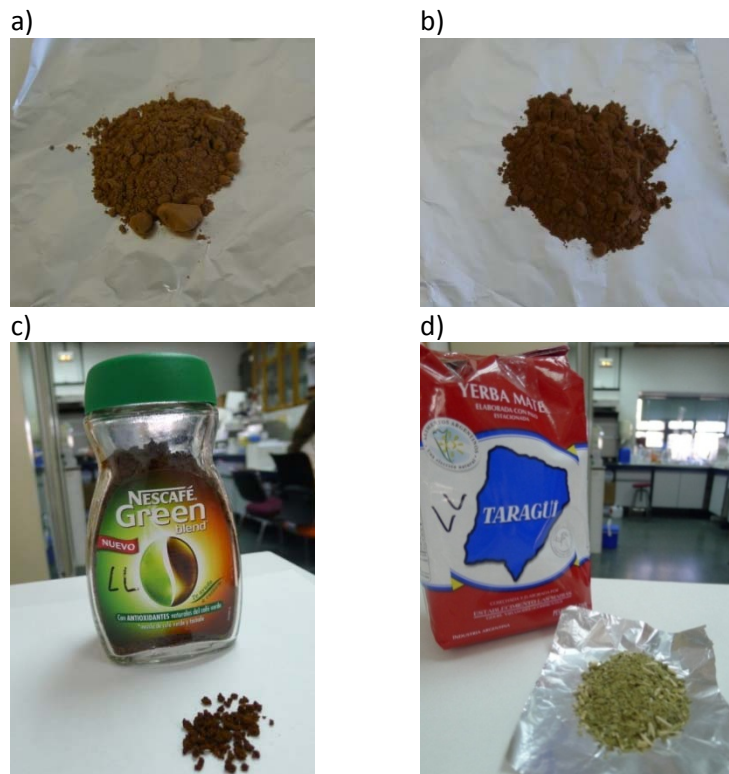
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. MUESTRAS

Las muestras seleccionadas para desarrollar los objetivos propuestos en la presente Tesis Doctoral se especifican a continuación (Figura 3.1.):

- Los productos solubles de cacao suministrados por la empresa Nutrexpa S.L. en forma de sobres monodosis, un cacao comercial, denominado en esta Tesis cacao control (CC) y otro enriquecido en polifenoles (CC-PP) (Figuras 3.1.a. y 3.1.b.).
- Un producto de café, mezcla tostado/verde que actualmente comercializa la empresa Nestlé bajo la denominación de Nescafé Green Blend®. Este producto se presenta en forma de café instantáneo y contiene un 35% de café verde y un 65% de café tostado. Fue adquirido en un local comercial de Madrid (Figura 3.1.c.).
- Yerba mate de la casa comercial Taragui adquirida en un comercio de Madrid en forma de hojas secas listas para infundir (Figura 3.1.d.).



3.1.2. PATRONES Y REACTIVOS

Los compuestos fenólicos epicatequina, catequina, ácido clorogénico (5-cafeoilquínico), ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumaríco, rutina y ácido hidroxifenilacético fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química (Madrid), mientras que los patrones procianidina B2 y epicatequín-3-galato se adquirieron a Extrasynthese Genay Cedex (Francia). El ácido 3,5-dicafeoilquínico fue adquirido a Chengdu Biopurify Phytochemicals (China).

Los reactivos acetonitrilo, ácido fórmico, metanol, reactivo de Folin Ciocalteu, cloruro sódico, hidrógeno fosfato de sodio, dihidrógeno fosfato de potasio, acetona, carbonato sódico anhidro, tampón fosfato 0,1M pH 7,9 y dodecil-sulfato sódico (SDS) fueron adquiridos a Panreac (Madrid). Los reactivos para los análisis mediante HPLC, LC-MS y LC-QTOF fueron de calidad adecuada para cromatografía y espectrometría de masas.

La casa comercial Sigma-Aldrich Química (Madrid) suministró el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (21063 High glucose, HEPES, no Phenol Red), los antibióticos gentamicina, estreptomina y penicilina, el suero fetal bovino (FBS), la solución Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), el ácido ascórbico y el colorante cristal violeta. Así mismo, proporcionó la enzima catecol-*O*-metil transferasa (COMT), la S-adenosil metionina (SAM) y el ditiotreitól (DTT). Los aminoácidos no esenciales (NEAA) y la tripsina procedieron de Lonza (Madrid). La fenolsulfonftaleína (PSP) (rojo fenol) fue de Invitrogen (Paisley, UK). El medio de cultivo Minimum Essential Medium (MEM) fue suministrado por Gibco BRL Life Technologies (Escocia, Reino Unido).

3.1.3. OTROS MATERIALES

Todo el material estéril necesario para el cultivo de células (platos, flasks, pipetas y placas multipocillos) fue adquirido en Cajal (Madrid). Las placas bicamerales Transwell Inserts (3450 Costar) de 24 mm de diámetro de inserto, 4,67 cm² de superficie y 0,4 µm de tamaño de poro fueron suministradas por Corning Incorporated (Corning, NY, EEUU) a través de Cultek S.L.U (Madrid).

El material utilizado para los análisis por cromatografía (viales, tapones, insertos, filtros de jeringa de 0,45 µm de nylon) se adquirió en Agilent Technologies (Madrid).

El material fungible estéril para toma de muestras biológicas (tubos vacutainer, vías, jeringas, botes estériles) se compró a Ormacisa S.L. (Madrid).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN FENÓLICA DE LOS PRODUCTOS ALIMENTARIOS

La caracterización y cuantificación de la fracción fenólica de los dos productos solubles de cacao, café mezcla tostado/verde y yerba mate se llevó a cabo mediante dos métodos complementarios, uno colorimétrico y otro cromatográfico. Así, tras obtener la fracción fenólica se determinó el contenido total de polifenoles mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu que indica la capacidad reductora de la muestra y es proporcional al contenido de compuestos fenólicos. El análisis se completó con la determinación cromatográfica mediante HPLC-DAD, que además proporciona la composición individual de la fracción fenólica de los alimentos.

3.2.1.1. Obtención de la Fracción Fenólica

Dada la dificultad de disolver completamente los productos solubles de cacao (CC y CC-PP) en agua caliente, la fracción fenólica se obtuvo mediante un procedimiento de extracción líquida con una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos, previamente desarrollado en el grupo de investigación (Bravo y cols., 1994). A partir de 1 g de muestra se añadieron 40 mL de una solución metanólica acidificada consistente en HCl 2N al 0,8% en metanol:agua (50:50, v/v). Tras agitación intensa durante 1 h a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min recogiendo el sobrenadante. El residuo obtenido se mezcló con 40 mL de una disolución acetona:agua (70:30 v/v) y se repitió el proceso descrito. Ambos sobrenadantes se combinaron llevándose a un volumen final de 100 mL con una mezcla 50:50 (v/v) de las dos soluciones de extracción (metanol acidificado y acetona acuosa). Las extracciones se realizaron por triplicado.

El café mezcla tostado/verde es un producto soluble en agua, por lo que la extracción orgánica se sustituyó por simple disolución del producto en agua hirviendo, dejando enfriar antes de llevar a cabo el análisis. Para la preparación se disolvieron 3,5 g en 250 mL de agua.

Para el caso de la yerba mate, y a pesar de su insolubilidad en agua, en vez de practicar una extracción orgánica se simuló el proceso de preparación de una infusión

para caracterizar el contenido real que los voluntarios tomarían en la dosis suministrada en el estudio de intervención que se describirá más adelante. Para ello, se añadieron 250 mL de agua hirviendo en un vaso que contenía 4,91 g de yerba mate en forma de hojas secas, filtrando con un colador de tela tras 5 min de infusión. La cantidad de yerba mate utilizada para preparar la infusión fue aquella necesaria para equiparar la ingesta de polifenoles con el café mezcla tostado/verde.

Sobre los extractos de los productos solubles de cacao e infusiones de café mezcla tostado/verde y yerba mate así obtenidos se analizó el contenido en compuestos polifenólicos como se describe en los siguientes apartados.

3.2.1.2. Determinación del Contenido de Compuestos Fenólicos Totales mediante el Método Folin-Ciocalteu

El contenido total en compuestos fenólicos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Montreau, 1972). Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reducir el reactivo Folin-Ciocalteu, mezcla de sodio tungstato y sodio molibdato, generando color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de polifenoles. Se pipetearon 0,5 mL de los extractos y se añadieron 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y dejó reposar 3 min. Posteriormente se añadieron 10 mL de una solución de carbonato de sodio anhidro de concentración 75 g/L y se enrasó a 25 mL con agua destilada. A continuación se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 min, agitando cada 10 min. Transcurrida una hora, se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro DU640 Beckman (Beckman Instruments Inc., Fullerton, California, EEUU). Paralelamente se llevó a cabo un blanco, sustituyendo la muestra por 0,5 mL de disolvente. Se utilizó ácido gálico como patrón de referencia para expresar los resultados. El análisis se realizó por triplicado.

3.2.1.3. Caracterización y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Solubles por HPLC-DAD

La caracterización de la fracción fenólica de las muestras se completó mediante el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección por red de diodos (DAD).

En primer lugar, se concentró a sequedad 2 mL de cada muestra, mediante presión reducida (SpeedVac, Mod. Savant, ThermoScientific, Waltham, MA, EEUU) en el caso de los extractos orgánicos, y con corriente de nitrógeno para las infusiones, resuspendiendo las muestras en 200 μ L de agua acidificada con ácido fórmico al 1% y filtrando (0,45 μ M) antes de su análisis.

Se empleó un equipo Agilent Serie 1200 (Agilent Technologies, Waldrom, Alemania) acoplado a un detector DAD y equipado con una bomba cuaternaria, compartimento de columna termostatizado, inyector automático y automuestreador termostatizado, controlado por el software Agilent ChemStation (versión B.03.02).

Para el análisis de los productos solubles de cacao se empleó una columna Superspher 100 RP18 (250 x 4 μ m) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) precedida por una precolumna (ODS RP 18). La fase móvil consistió en un gradiente binario de un disolvente acuoso acidificado [Fase A: ácido fórmico/agua (1:99, v/v)] y un disolvente orgánico [Fase B: acetonitrilo (ACN)]. El método cromatográfico operó con un caudal de 0,6 mL/min, un volumen de inyección de 50 μ L y una temperatura del horno de 37°C. La detección de los flavonoides del cacao se realizó a 280 nm y el tiempo de análisis fue de 50 min. El gradiente de elución se especifica en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Gradiente cromatográfico para el análisis de los flavonoides de los productos solubles de cacao.

Tiempo (min)	Agua-Fórmico (1%) (%)	ACN (%)
0	94	6
20	90	10
25	87	13
30	85	15
40	90	10
45	94	6
50	94	6

Para el análisis del café mezcla tostado/verde y la yerba mate se utilizó una columna Superspher 100 RP18 (250 x 4 μ m) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) precedida por una precolumna (ODS RP 18), caudal de 1 mL/min y volumen de inyección de 20 μ L. La temperatura del horno se fijó a 30°C. La longitud de onda para la detección de los ácidos hidroxycinámicos fue de 320 nm y el tiempo de análisis de 65 min. El gradiente binario se detalla en la Tabla 3.2.

3. Materiales y Métodos

Tabla 3.2. Gradiente cromatográfico para el análisis de los ácidos hidroxicinámicos del café mezcla tostado/verde y yerba mate.

Tiempo (min)	Agua-Fórmico (1%) (%)	ACN (%)
0	90	10
5	80	20
35	75	25
45	65	35
50	65	35
60	90	10
65	90	10

La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante rectas de calibrado con estándares puros. En la Tabla 3.3. se especifican los patrones utilizados, concentraciones empleadas, rectas de calibrado y los respectivos coeficientes de determinación (R^2).

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los estándares utilizados se determinaron por HPLC y se calcularon aplicando las siguientes fórmulas:

$$LD = (3,3 \times DE_{\text{área}})/B$$

$$LC = (10 \times DE_{\text{área}})/B$$

Donde $DE_{\text{área}}$ es la desviación estándar de la respuesta o área y B la pendiente de la recta de calibrado.

Tabla 3.3. Rectas de calibrado y coeficientes de determinación utilizadas para la cuantificación de compuestos fenólicos presentes en las muestras de alimentos. Límites de detección (LD), límite de cuantificación (LC).

Compuesto	Concentraciones (μM)	Recta	R^2	LD (μM)	LC (μM)
Epicatequina	3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125, 250, 500	Área = 15,093*C+48,101	0,999	0,03	0,10
Catequina	3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125, 250, 500	Área=15,612*C+26,882	0,999	0,04	0,11
Procianidina B2	3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125, 250, 500	Área = 24,353*C+32,24	0,999	0,02	0,06
Ácido 5-cafeoilquinico	10, 50, 125, 250, 500, 1000	Área =18,671*C+222,45	0,999	0,04	0,14
Ácido 3,5-dicafeoilquinico	10, 50, 125, 250, 500, 1000	Área =32,295*C+285,87	0,999	0,03	0,08
Rutina	10, 50, 125, 250, 500, 1000	Área = 19,26*C+43,495	0,999	0,04	0,13

La cuantificación de la epicatequina, catequina y procianidina B2 (PB2) se realizó con sus respectivas rectas de calibrado, mientras que la procianidina B1 se cuantificó con la recta de su isómero PB2.

La cuantificación de los ácidos monoacilquínicos se realizó en función del ácido 5-cafeoilquínico, los ácidos diacilquínicos según el ácido 3,5 dicafeoilquínico y los flavonoles empleando la recta de calibrado de la rutina.

3.2.1.4. Caracterización de los Compuestos Fenólicos por LC-MS

Para confirmar la identidad química de los compuestos fenólicos presentes en los productos solubles de cacao, café mezcla tostado/verde y yerba mate se llevó a cabo el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas simple cuadrupolo (LC-MS).

El equipo empleado constó de un HPLC-DAD (Agilent Technologies, Serie 1100) acoplado a un detector espectrómetro de masas simple cuadrupolo (Agilent Technologies, Serie 1100, Waldrom, Alemania). Para el análisis de masas se ajustó la fuente de ionización de electrospray (ESI-MS) a presión atmosférica operando en modo de ionización negativa, trabajando con un voltaje capilar de 3000 V, con nitrógeno como gas nebulizador a un caudal de 12 L/h y temperatura de secado de 300°C. El espectro de masas se adquirió en un rango de masa comprendido entre m/z 100 y 900 (1,5 s).

El resto de parámetros cromatográficos coincidían con las condiciones descritas en el apartado anterior 3.2.1.3., excepto la composición ácida de las fases móviles que, tanto agua como acetonitrilo, contenían 0,1% de ácido fórmico.

3.2.2. ESTUDIO DE TRANSPORTE Y METABOLISMO CELULAR *IN VITRO* DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UN MODELO DE EPITELIO INTESTINAL HUMANO, CÉLULAS CACO-2

El estudio *in vitro* de biodisponibilidad celular de los polifenoles mayoritarios de la fracción fenólica de los productos objeto de este trabajo se llevó a cabo mediante un modelo celular de epitelio intestinal humano Caco-2 bien establecido. Estas células se parecen morfológica y bioquímicamente más a enterocitos que a colonocitos, lo que ha

permitido emplearlas como modelo de epitelio intestinal humano en estudios de absorción y transporte de diferentes compuestos en el intestino delgado y colon (Meunier y cols., 1995; Artursson y cols., 2001).

Los compuestos fenólicos ensayados fueron los flavan-3-oles epicatequina, epicatequín-3-galato y procianidina B2 y los ácidos hidroxicinámicos 5-cafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico.

Previamente, se comprobó la ausencia de toxicidad de estos compuestos a la concentración utilizada en los ensayos experimentales mediante el ensayo de viabilidad celular.

3.2.2.1. Ensayo de Viabilidad Celular

La viabilidad celular se determinó mediante la técnica del Cristal Violeta, basada en la medida espectrofotométrica de la densidad relativa de células vivas que han sido capaces de incorporar el colorante en su membrana. Para ello, las células fueron sembradas a baja densidad en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio a otro sin suero durante 8 h para habituar las células a las condiciones experimentales y prevenir posibles interferencias con los componentes del suero. Se trataron las células durante 24 h con los compuestos fenólicos en medio de cultivo sin suero, estableciendo un control con medio sin suero y sin polifenoles. A continuación, se retiraron las condiciones ensayadas y se lavaron las células dos veces con tampón fosfato salino (PBS 0,01 M, pH 7,4, preparado con 8 g de NaCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ y 0,24 g de KH₂PO₄ en 1 L de agua destilada). Después, se incubaron con 50 µL de cristal violeta (preparado al 0,2% en etanol) durante 20 min. Las placas multipocillo se lavaron tres veces y se secaron cuidadosamente, volteando la placa sobre papel absorbente. Se añadió 100 µL de una disolución de dodecil-sulfato sódico (SDS) al 1%, determinando la absorbancia de cada pocillo a 570 nm utilizando un lector de placas (BioTek, Winooski, VT, EEUU), siendo la intensidad del color inversamente proporcional a la toxicidad del compuesto evaluado. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular referido a las células control no tratadas. Cada determinación se llevó a cabo por octuplicado.

3.2.2.2. Ensayos de Metabolismo y Transporte Celular

3.2.2.2.1. Establecimiento del cultivo celular

Los estudios de transporte y metabolismo celular *in vitro* se llevaron a cabo en un modelo celular de epitelio intestinal humano que permite emular la absorción y el metabolismo de los compuestos fenólicos. Este modelo emplea la línea celular Caco-2, células de epitelio intestinal humano que derivan originalmente de células de adenocarcinoma de colon.

Las células Caco-2 fueron suministradas por la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en el pase número 49, utilizándose para los ensayos entre los pases 50-60.

Las células se mantuvieron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro utilizando como medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (21063 High glucose, HEPES, sin Rojo Fenol), enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) inactivado térmicamente (45 min a 56°C), conteniendo 0,5% de aminoácidos no esenciales (NEAA) y 50 mg/L de penicilina y estreptomicina. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% de CO₂.

Para la obtención de la monocapa celular de epitelio intestinal, las células se sembraron en cámaras bicamerales de 6 pocillos (Transwell Inserts Costar) de 24 mm de diámetro del inserto, 4,67 cm² de superficie y 0,4 μm de tamaño de poro (Figura 3.2.).

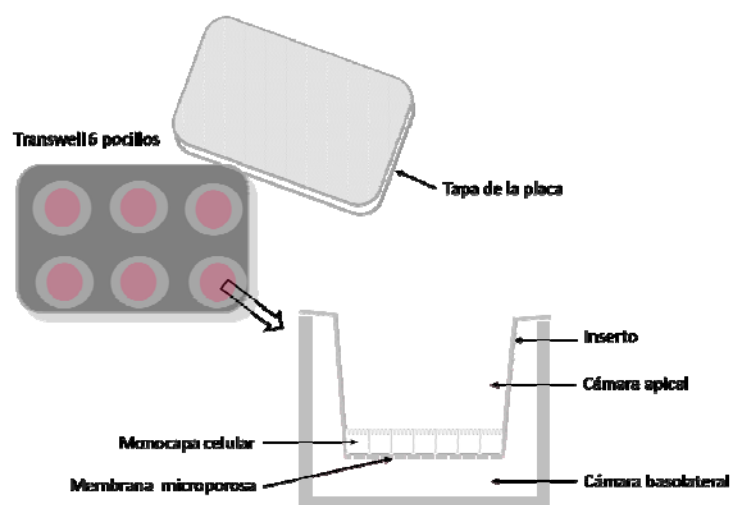


Figura 3.2. Esquema de placa bicameral (Transwell) utilizada en los estudios *in vitro* de transporte y metabolismo de compuestos fenólicos.

3. Materiales y Métodos

Las células se sembraron a una densidad 400.000 células por cm^2 adicionando 2 mL de medio en el compartimento basal y 2 mL en el apical. Uno de los pocillos se dejó sin células y con medio de cultivo para establecer un blanco. Las placas se mantuvieron en un incubador a 37°C con 5% de CO_2 , cambiando el medio de cultivo cada dos días. La monocapa de células confluentes fue mantenida hasta los 21 días post-siembr, tiempo durante el cual estas células se diferencian estructural y funcionalmente formando una monocapa de células polarizadas con una superficie apical con microvellosidades y una superficie basal, en contacto con la membrana microporosa del Transwell. Las proteínas y transportadores de membrana de cada zona (apical/basolateral) corresponden con las de células epiteliales intestinales.

El seguimiento de la formación de la monocapa celular se realizó a través de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y de la prueba del rojo fenol.

La TEER es una medida de la integridad de la monocapa mediante la monitorización de la resistencia de la monocapa al paso de la corriente eléctrica. Se utilizó un equipo Milicell-ERS (Millipore Ltd., Watford, Reino Unido) que consta de unos electrodos de pequeño tamaño de Ag/AgCl.

Los valores de TEER se calcularon aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{TEER}_{\text{monocapa}} (\Omega \text{ cm}^2) = (\Omega_{\text{muestra}} - \Omega_{\text{blanco}}) \times 4,67 \text{ cm}^2$$

Donde:	Ω_{muestra}	Resistencia de un pocillo con células (ohmios)
	Ω_{blanco}	Resistencia del un pocillo sin células o blanco (ohmios)
	$4,67 \text{ cm}^2$	Superficie de la membrana sobre la que crecen las células

La prueba del rojo fenol consiste en la cuantificación del paso del colorante fenolsulfonftaleína (PSP) (rojo fenol) a través de la monocapa de células Caco-2, siendo la transferencia del mismo inversamente proporcional a la integridad de la monocapa. Para ello, se adicionaron $100 \mu\text{M}$ de PSP disuelto en medio DMEM sin suero al compartimento apical o basolateral mientras que en el lado contrario se completó con medio DMEM sin suero y colorante. Se mantuvieron las células en incubación durante 60 min a 37°C en atmósfera controlada y al cabo de ese tiempo se determinó la absorbancia a 479 nm en un espectrofotómetro para cuantificar el contenido de

colorante PSP en cada compartimento. Valores inferiores al 0,1% de colorante en el compartimento contrario al de incubación indicaron un estado óptimo de la monocapa, siendo adecuada para su uso en los experimentos de transporte y metabolismo.

Una vez transcurridos los 21 días y tras comprobar la integridad de la monocapa se procedió al desarrollo del experimento de transporte y metabolismo celular. Para ello, el día anterior al experimento se retiró el medio de cultivo, se lavó cada pocillo con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) y se cambió el medio de cultivo a medio sin suero para prevenir posibles interferencias con los componentes del suero.

3.2.2.2.2. Evaluación del metabolismo en células Caco-2

Los compuestos fenólicos objeto de estudio se añadieron al compartimento apical (2 mL) a una concentración final de 100 μ M (preparados en 0,1% de DMSO con el fin de garantizar la solubilidad de los compuestos más lipofílicos) disueltos en medio DMEM sin suero y 300 μ M de ácido ascórbico como protector antioxidante. De igual forma, se adicionaron 2 mL de medio DMEM sin suero con 300 μ M de ácido ascórbico al compartimento basolateral. Como referencia se incubaron las células que servirán de control en las mismas condiciones a excepción de los compuestos fenólicos (medio DMEM sin suero con 0,1% DMSO y 300 μ M de ácido ascórbico). Las células control y tratadas se incubaron durante 1, 2 y 4 h a 37°C en atmósfera controlada de 5% CO₂ y 95% de aire.

Transcurridos los tiempos de incubación, se recogieron los medios presentes en los compartimentos apical y basolateral para su posterior almacenamiento a -20°C hasta su análisis por cromatografía líquida de alta eficacia con detección de diode-array (HPLC-DAD) y cromatografía líquida acoplada a detector de espectrometría de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (LC-QTOF).

Por otro lado, se lavaron las células dos veces con PBS, se recogieron mediante raspado y se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 200 μ L de PBS y se sonicó durante 10 min a temperatura ambiente para romper las membranas celulares y liberar los posibles metabolitos presentes en el interior de las células. Finalmente, y tras centrifugar las suspensiones celulares a 7000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un eppendorf y se congeló a -20°C hasta su análisis por HPLC y LC-QTOF (ver apartado 3.2.2.2.4.). Cada condición se llevó a cabo por sextuplicado.

3.2.2.2.3. Evaluación del transporte en células Caco-2

Para estudiar el transporte de los compuestos fenólicos en este modelo celular, se evaluó el sentido predominante de transferencia a través de la monocapa Caco-2 (apical a basolateral o basolateral a apical). Para ello, el transporte apical → basolateral se estudió mediante la adición de la solución fenólica disuelta en DMEM con 0,1% DMSO y 300 μM de ácido ascórbico en el compartimento apical, mientras que el transporte basolateral → apical se evaluó mediante la adición de la solución fenólica en el compartimento basolateral. Siempre se tomaron como referencia células tratadas con DMEM que contenían 0,1% de DMSO y 300 μM de ácido ascórbico sin polifenoles. Al cabo de 1, 2 y 4 h de incubación, se recogieron los medios y se almacenaron a -20°C. Cada condición se ensayó por sextuplicado.

Se determinó el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app} , cm/s) en ambas direcciones tras 1 h de incubación de los compuestos con las células Caco-2 siguiendo la ecuación:

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \left(\frac{V_r}{A \cdot C_0} \right)$$

Donde:

- dQ/dt Velocidad de permeabilidad hacia el compartimento receptor (μM/s)
- V_r Volumen del compartimento receptor (2 cm³)
- A Área de la superficie de la membrana del Transwell (4,67 cm²)
- C₀ Concentración inicial en el compartimento donador (μM)

Además, calculando el cociente entre el $P_{app_{AP-BL}}$ (sentido apical-basolateral) y el $P_{app_{BL-AP}}$ (sentido basolateral-apical), se obtuvo el parámetro índice de absorción (IA) ($P_{app_{AP-BL}}/P_{app_{BL-AP}}$), que indicó el sentido preferente de transferencia a través de la monocapa por los compuestos fenólicos. Valores superiores a 1,0 indicaban un transporte mayoritariamente hacia la sangre portal mientras que valores inferiores a 1,0 indicaban un transporte de eflujo o hacia el lumen intestinal.

3.2.2.2.4. Identificación y cuantificación de metabolitos

Los metabolitos celulares resultantes de la incubación de los compuestos fenólicos con las células Caco-2 fueron caracterizados y cuantificados por HPLC-DAD. Se empleó la técnica LC-QTOF para confirmar la identidad de los compuestos ya caracterizados por HPLC-DAD e identificar nuevos compuestos sin estándares disponibles comercialmente o que se encontraban en concentración menor a la del límite de detección del HPLC-DAD.

Se utilizó el mismo equipo HPLC ya descrito en la Sección 3.2.1.3, equipado con detector DAD, automuestreador y compartimento de columna termostaticado. Por una parte, las muestras procedentes de la incubación con los flavanoles se analizaron en fase reversa con una columna Superspher 100 RP18 (250 x 4 μ m) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) precedida por una precolumna (ODS RP18). El método consistió en un gradiente binario (Tabla 3.4.) cuyas fases móviles fueron agua al 1% de ácido fórmico y ACN, caudal 1 mL/min y un volumen de inyección de 50 μ L. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. Por otra parte, las muestras de las incubaciones con ácidos hidroxicinámicos fueron analizadas también en fase reversa con una columna Nucleosil 120 RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Teknokroma, Madrid) precedida por una precolumna (ODS RP18). El método consistió en un gradiente binario (Tabla 3.4.) cuyas fases móviles fueron las mismas que las citadas anteriormente, caudal 1 mL/min y un volumen de inyección de 20 μ L. Los cromatogramas se adquirieron a 326 nm.

Tabla 3.4. Gradiente cromatográfico para el análisis de los metabolitos celulares procedentes de la incubación con flavanoles (epicatequina, epicatequín galato y procianidina B2) y ácidos hidroxicinámicos (ácidos clorogénico y 3,5-dicafeoilquinico).

Flavanoles	Tiempo (min)	Agua-Fórmico (1%) (%)	ACN (%)
	0	90	10
	20	80	20
	30	75	25
	40	90	10
Ácidos hidroxicinámicos			
	0	100	0
	10	95	5
	20	85	15
	25	70	30
	30	65	35
	35	90	10
	40	100	0
	45	100	0

3. Materiales y Métodos

En la Tabla 3.5. se recogen las rectas de calibrado obtenidas con estas condiciones cromatográficas de los patrones seleccionados, así como los límites de detección y cuantificación calculados como se detalla en 3.2.1.3.

Tabla 3.5. Rectas de calibrado, coeficientes de determinación utilizados para la cuantificación de metabolitos generados en los estudios con el modelo celular Caco-2, así como los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Compuesto	Concentraciones (μM)	Recta	R ²	LD (μM)	LC (μM)
Epicatequina	1, 10, 50, 100	Área = 6,738*C-0,968	0,999	0,03	0,09
Epicatequín-3-galato	1, 10, 50, 100	Área = 39,177*C-26,961	0,999	0,01	0,02
Procianidina B2	1, 10, 50, 100	Área = 18,638*C-2,3565	0,999	0,01	0,03
Ácido 5-cafeoilquínico	12,5, 25, 50, 100	Área = 19,734*C-1,2609	0,999	0,08	0,25
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	12,5, 25, 50, 100	Área = 36,767*C-99,435	0,998	0,04	0,14

Existen diferencias entre las rectas de epicatequina y procianidina B2 obtenidas en las condiciones descritas en el apartado 3.2.1.3 y las actuales, debido a los distintos caudales utilizados, 0,6 y 1 mL/min respectivamente, que justifica la relación inversa entre el flujo y la respuesta del compuesto. Asimismo, se observan pendientes más pequeñas para las rectas de los ácidos 5-cafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico obtenidas en las condiciones utilizadas para la caracterización de las muestras (apartado 3.2.1.3.) que las obtenidas con las condiciones empleadas para el análisis de metabolitos celulares, por trabajar con la longitud de onda de 320 nm (apartado 3.2.1.3.), ligeramente menor al máximo de absorción de los ácidos hidroxycinámicos, 326 nm, utilizada en esta sección.

Para la confirmación de los metabolitos presentes en los medios de incubación de los experimentos *in vitro*, se utilizó un equipo de cromatografía líquida Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldrom, Alemania) dotado con bomba cuaternaria, degasificador, inyector automático termostatzado, detector DAD y módulo de columna termostatzado acoplado a su vez a un espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF), Agilent Accurate Mass QTOF LC-MS, con fuente de ionización a presión atmosférica con electrospray (ESI), tecnología Jet Stream. Los softwares Mass Hunter Data Acquisition (B.04.00) y Mass Hunter Qualitative Analysis (B.04.00), de Agilent

Technologies, controlaron el equipo. La columna utilizada fue Ascentis Express C18 (15 cm x 3 mm 2,7 μ m) (Sigma-Aldrich Química, Madrid). En la Tabla 3.6. se detallan las condiciones de trabajo del equipo.

Tabla 3.6. Condiciones del equipo LC-QTOF empleadas para el análisis de metabolitos derivados de compuestos fenólicos.

Volumen de inyección	20 μ L
Fase móvil	Fase A: Agua (0,1% fórmico) Fase B: ACN (0,1% fórmico)
Caudal de la fase móvil	0,3 mL/min
Rango se masas	<i>m/z</i> 100-970
Modo de Ionización	negativa
Temperatura de gas secante, nitrógeno	325°C
Caudal de gas	10 L/min
Presión del nebulizador	25 psi
Voltaje del capilar	3500 V
Voltaje del fragmentador	150 V
Voltaje del skimmer	65 V
Masas de referencia	<i>m/z</i> 119,0363; <i>m/z</i> 966,0007

El gradiente cromatográfico utilizado para el estudio de los metabolitos procedentes de la incubación de las células Caco-2 con los flavanoles (epicatequina, epicatequín-galato y procianidina B2) y los ácidos hidroxicinámicos (ácidos 5-cafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico) aparece en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Gradiente cromatográfico para el análisis de los metabolitos celulares procedentes de la incubación con los flavanoles (epicatequina, epicatequín-galato y procianidina B2) y ácidos hidroxicinámicos (ácidos clorogénico y 3,5-dicafeoilquínico).

	Tiempo (min)	Agua-Fórmico (0,1%) (%)	ACN-Fórmico (0,1%) (%)
Flavanoles	0	90	10
	10	70	30
	15	90	10
	20	90	10
Ácidos hidroxicinámicos			
	0	90	10
	10	70	30
	15	60	40
	20	50	50
	22	90	10
	30	90	10

3.2.2.2.5. Síntesis *in vitro* de derivados metilados de compuestos fenólicos

Se optimizó la reacción de síntesis *in vitro* de derivados metilados de compuestos fenólicos para la identificación de metabolitos generados tras la incubación de los polifenoles con células Caco-2.

En un eppendorf se añadieron 100 μ L de enzima COMT (1 U/ μ L), 50 μ L de solución fenólica y 100 μ L de tampón de reacción (Buffer M) y se mantuvo la mezcla durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 250 μ L de solución de S-adenosín-metionina (SAM) 10 mM y se agitó con suavidad. Seguidamente, la mezcla se mantuvo en agitación moderada en baño de agua a 37°C durante 4 horas. Las concentraciones finales de reacción quedaron de la siguiente manera: 5 mM SAM, 100 μ M compuesto fenólico y 100 unidades de enzima COMT. El tampón Buffer M es una disolución que contiene tampón fosfato 0,1 M (pH 7,9), 1 mM de ditioneitol (DTT) y 10 mM de MgCl₂. Paralelamente, se desarrolló un blanco sin la enzima COMT mezclando 50 μ L de solución fenólica, 200 μ L de Buffer M y 250 μ L de solución SAM. Transcurridas las 4 horas de incubación, se detuvo la reacción añadiendo 25 μ L de ácido perclórico 4 mM, se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 min y los sobrenadantes resultantes se recogieron y conservaron a -20°C hasta su análisis por HPLC-DAD. Las muestras se filtraron (0,45 μ m) antes de su análisis por HPLC-DAD.

3.2.3. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE BIODISPONIBILIDAD Y METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO, CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y YERBA MATE EN VOLUNTARIOS SANOS

Se llevaron a cabo dos estudios de intervención en voluntarios sanos para estudiar la biodisponibilidad *in vivo* de los compuestos fenólicos que contenían los dos productos solubles de cacao, uno con contenido normal de polifenoles (CC) y otro enriquecido en polifenoles (CC-PP), el café mezcla tostado/verde y la infusión de yerba mate.

Todos los estudios se diseñaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Se solicitó la aprobación al Comité de Bioética del CSIC además del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid antes del inicio de cada

estudio. Se elaboró toda la documentación pertinente, incluyendo copia de la información que se proporcionó a los voluntarios, descripción de la intervención, encuestas a completar por los voluntarios, etc. Igualmente, se contrató un seguro para los participantes en los estudios.

3.2.3.1. Reclutamiento de Voluntarios

El reclutamiento de los voluntarios se llevó a cabo mediante anuncios y carteles en facultades, escuelas de idiomas y de formación profesional, centros deportivos municipales y centros médicos, e impartiendo breves charlas entre clases en las Facultades de Biología, Farmacia y Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Las personas interesadas en cada estudio asistieron a una reunión para recibir más información acerca del mismo. En dicha reunión se explicaron los objetivos del estudio, así como las condiciones de participación y los voluntarios tuvieron la oportunidad de preguntar todas sus dudas. Aquellos sujetos que decidieron participar tuvieron una entrevista con un miembro del equipo investigador en la que rellenaron un cuestionario previo proporcionando sus datos personales y respondiendo a algunas cuestiones de salud general. Con objeto de conocer mejor su estado de salud y comprobar si cumplían los criterios de inclusión, los voluntarios debían aportar una analítica de sangre reciente, y si no disponían de ella se concertaba una cita para que se sometieran a un análisis de sangre rutinario en un laboratorio de análisis clínicos. Una vez superada la selección, los potenciales participantes firmaron el Consentimiento Informado del estudio.

Los datos proporcionados por los participantes en cada ensayo fueron recogidos en una ficha del voluntario a la que sólo tenían acceso dos miembros del equipo de investigación de acuerdo con la Ley de Protección de Datos 15/1999 (regulada en el Real Decreto 1720/2007). En dicha ficha se asignaba un código numérico a cada participante, que fue utilizado para designar sus muestras y cuestionarios durante todo el estudio.

3.2.3.2. Estudios de Biodisponibilidad

Los criterios de inclusión generales para la participación en los estudios de biodisponibilidad fueron los siguientes:

- Hombres y mujeres sanos, de edad comprendida entre 18 y 55 años

3. Materiales y Métodos

- No padecer patología aguda o crónica ni estar sometidos a tratamiento farmacológico o haber tomado antibióticos en los 3 últimos meses
- No ser vegetarianos
- No ser fumadores
- En el caso de mujeres, no estar embarazadas
- No presentar un índice de masa corporal (IMC) mayor a 25 kg/m²

En cada estudio, los voluntarios recibieron por escrito información detallada sobre las instrucciones a seguir en los días previos a la intervención, así como información sobre los beneficios y posibles riesgos derivados del consumo de cada producto. Se les proporcionó una lista de alimentos a restringir en los 3 días previos a cada intervención para reducir el consumo de alimentos ricos en los componentes bioactivos objeto de estudio (polifenoles). Con excepción de las restricciones indicadas, los voluntarios debían mantener sus hábitos dietéticos y de actividad física. Para asegurar el cumplimiento de las restricciones alimentarias, los 3 días previos a la intervención los voluntarios rellenaron un registro dietético de 72 h donde recogieron de forma detallada los alimentos consumidos, sus cantidades y el modo de preparación empleado.

Tras un ayuno de 12 h, los voluntarios se personaron en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), y un miembro del equipo los acompañó a la Unidad de Nutrición Humana (UNH), donde permanecieron bajo la supervisión de una enfermera cualificada y de un miembro del equipo de investigación. Al inicio de la intervención, los sujetos fueron pesados y tallados con una báscula Body Fat Monitor BF400 (OMRON, Holanda) y sus constantes fisiológicas cardiovasculares (presión arterial y frecuencia cardíaca) fueron medidas con un tensiómetro de brazo BS 150 Pic Indolor Diagnostic. A continuación, una enfermera les insertó un catéter en la vena cubital del brazo no dominante para extraer una muestra de sangre basal antes del consumo del producto objeto del estudio (t = 0 h). La sangre fue recogida en tubos vacutainer conteniendo ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) como anticoagulante. Transcurridos unos minutos desde la primera extracción, los voluntarios tomaron la bebida a estudiar, y posteriormente se obtuvieron otras muestras sanguíneas a diferentes horas. Inmediatamente después de cada extracción, el plasma era separado de la sangre, alicuotado en tubos eppendorf y conservado a -80°C hasta su análisis. En paralelo, los voluntarios recogieron toda la orina que eliminaban en botes de 1,5 L

conteniendo ácido ascórbico como conservante antes del consumo de cada producto (t = -2-0 h) y a distintos intervalos de tiempo, iniciando un nuevo recipiente en cada intervalo. Se midió el volumen total de orina en cada intervalo y se conservó alícuotado en tubos tipo Falcon de 15 mL a -20°C hasta el momento de su análisis.

3.2.3.2.1. Estudio de la biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles en productos solubles de cacao en voluntarios sanos

El objetivo de este estudio era determinar la biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos presentes en los productos solubles de cacao, control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP), mediante la determinación de la concentración plasmática y excreción urinaria de fenoles y metabolitos derivados por LC-QTOF.

Se llevó a cabo un estudio de intervención aleatorizado, cruzado y ciego en voluntarios sanos. De las personas interesadas en participar en el estudio, 14 dieron su consentimiento informado pero un voluntario fue retirado del estudio por incumplimiento de las normas referentes a las restricciones de alimentos. Los 13 voluntarios restantes fueron distribuidos en dos grupos de 6 y 7 personas y fueron citados en días distintos con objeto de poder recibir una mejor atención por parte del grupo investigador y sanitario. En la Tabla 3.8. se recogen las características de los participantes al inicio del estudio.

Tabla 3.8. Características basales de los individuos participantes en el estudio de biodisponibilidad de los productos solubles de cacao, cacao control (CC) y cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP).

	Edad (años)	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	FC (puls/min)
Hombres (n=3)	26,67 ± 3,21	75,60 ± 11,26	22,47 ± 2,97	127,67 ± 9,61	83,00 ± 9,54	72,67 ± 15,18
Mujeres (n=10)	32,60 ± 9,85	61,36 ± 9,61	23,36 ± 3,73	121,88 ± 5,99	77,00 ± 3,46	69,56 ± 11,48

IMC: índice de masa corporal; FC: frecuencia cardíaca; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; puls: pulsaciones

El estudio constó de dos días de intervención en los que los voluntarios consumieron los dos productos de cacao, CC y CC-PP separados por un intervalo de dos semanas de lavado. En la Figura 3.3. se puede observar el aspecto de los productos ingeridos por los participantes. Las dosis de cacao administradas a los voluntarios se establecieron según las recomendaciones del fabricante, de forma que los voluntarios

3. Materiales y Métodos

consumieron 15 g de CC y 25 g de CC-PP, ambos disueltos en 200 mL de leche semi-desnatada. Un esquema del estudio se muestra en la Figura 3.4.

a)



b)



Figura. 3.3. Bebidas ingeridas por los participantes en los estudios de biodisponibilidad: a) producto soluble de cacao control (CC) y b) producto soluble de cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP).

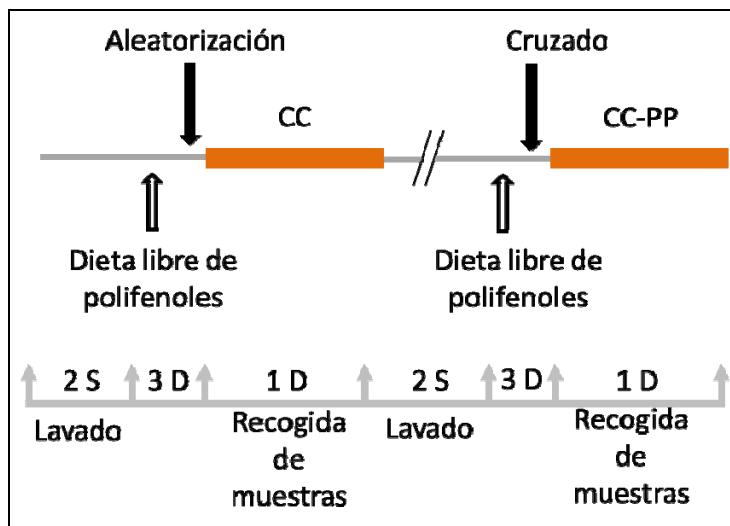


Figura. 3.4. Diseño experimental del estudio de intervención con los productos solubles de cacao, control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP). D, día; S, semana.

Los 3 días previos a cada intervención se restringió el consumo de los siguientes alimentos ricos en polifenoles: productos derivados de cacao (chocolate, bombones, cacao soluble, etc.), zumos, té, vino, mosto, naranjas, mandarinas, manzanas, uvas, fresas o fresones u otros frutos del bosque, remolacha, cebolla, soja y derivados de soja. En la Figura 3.5. se muestra la hoja que se entregó a los voluntarios y que contiene las indicaciones a seguir durante las 72 h previas a la intervención.

<u>PAUTAS A SEGUIR LOS DÍAS PREVIOS A LA INTERVENCIÓN</u>
<p>Desayuno</p> <ul style="list-style-type: none"> -Únicamente leche semi o desnatada con/sin azúcar. Nada de café, té u otras infusiones, cacao, etc -Para acompañar, se podrá tomar algo de bollería (sin cacao/chocolate), cereales de desayuno (no integrales y sin frutos secos; ej. cornflakes, rice krispies), pan blanco (normal o de molde) con mantequilla, galletas tipo María (sin cacao) -En lugar de leche se podría tomar algún producto lácteo no chocolateado o con vainilla
<p>Media mañana y merienda</p> <ul style="list-style-type: none"> -Leche o producto lácteo no chocolateado o con vainilla -Sándwich/bocadillo (pan blanco) de embutido (no vegetal). Si se toman quesos tipo Philadelphia mejor naturales a los especiados, al igual que los patés -Bollería surtida (sin cacao o vainilla)
<p>Comida y cena</p> <ul style="list-style-type: none"> -Como primeros platos, se puede tomar arroz, pasta o caldos, todo ello preparado sin tomate natural, condimentos, especias o hierbas aromáticas (pimienta, comino, perejil, albahaca, etc.) o sus salsas. No puede usarse aceite de oliva (se puede emplear aceite de girasol). Abajo se indica una lista de alimentos que no pueden comerse -Como segundos platos, se permiten todo tipo de carnes blancas o rojas y pescado tanto azul como blanco. Se pueden preparar a la plancha (sin condimentación) con aceite de girasol o en este último si se prefiere frito. -También se pueden tomar huevos en cualquiera de sus formas culinarias (si es frito será en aceite de girasol). -Se puede introducir algún producto precocinado tipo san jacob, croquetas, calamares, etc. (todo ello frito en aceite de girasol) -No está permitido ningún tipo de verdura ni hortaliza aun así se podría tomar una pequeña ración de patatas en cualquiera de sus formas culinarias (emplear aceite de girasol para freír o plancha o en forma de puré -El pan será siempre blanco (normal o molde) -De postre se podrá ingerir bien fruta (melón, sandía, plátano) o algún producto lácteo no chocolateado o con vainilla. <p>Frutas permitidas: sólo se podrá tomar melón, sandía o plátano, máximo 1 ración al día y nunca la noche antes de la visita al Instituto para las pruebas.</p>
<p><u>ALIMENTOS PROHIBIDOS</u></p>
<p>Frutas: no se puede tomar ningún tipo de frutas a excepción de las indicadas arriba. Tampoco pueden tomarse compotas o mermeladas.</p> <p>Verduras y hortalizas: no puede tomarse ninguna verdura ni hortaliza los dos días previos al estudio, salvo patatas (máximo una ración al día y nunca la noche antes de la visita al centro).</p> <p>Salsas, condimentos, especias o hierbas aromáticas: pimienta, pimentón, ñoras, azafrán, clavo, nuez moscada, comino, perejil, albahaca, cilantro, eneldo, romero, orégano, etc. Tampoco podrá usarse jugo de limón para pescados o arroces.</p> <p>Lácteos: batidos de cacao, vainilla, fresa o cualquier otra fruta. Helados de sabores (excepto los de nata). Yogures o similares con frutas o derivados. Flanes o natillas, si contienen vainilla, tampoco podrán tomarse.</p> <p>Bebidas: zumos de frutas, cacao, café, té, infusiones, vino, cerveza. No se pueden tomar bebidas tipo mosto, refrescos de limón o naranja, bebidas tipo Minute-Maid Antiox, etc.</p> <p>Frutos secos, dátiles, pasas, orejones, etc.</p> <p>Legumbres</p> <p>Aceite de oliva, vinagre</p> <p>Cereales integrales y sus derivados (incluido pan integral)</p> <p>Azúcar moreno, canela</p>

Figura 3.5. Hoja de información proporcionada a los voluntarios con las pautas a seguir los días previos a la intervención con los productos solubles de cacao.

3. Materiales y Métodos

Al inicio de cada día de intervención los voluntarios fueron pesados, tallados y la presión arterial y frecuencia cardíaca fueron determinadas por triplicado (Tabla 3.8.). Una vez insertada la vía, se tomaron muestras de sangre basal ($t = 0$) y, tras beber el cacao con leche, a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 h. A las 2, 4 y 8 h, los voluntarios recibieron un desayuno, almuerzo y merienda, libres de polifenoles, así como agua y bebidas isotónicas a demanda durante todo el día. En los días de la intervención los voluntarios recogieron la orina en condiciones basales ($t=-2-0$ h) y a los intervalos de tiempo 0-4, 4-8, 8-12 y 12-24 h (Figura 3.6.). Pasadas 8 h desde el inicio de la intervención, los voluntarios abandonaron la Unidad de Nutrición Humana del ICTAN con instrucciones de mantener la restricción dietética en la cena a tomar esa noche, y volvieron al día siguiente para traer las orinas correspondientes a los 2 últimos intervalos.

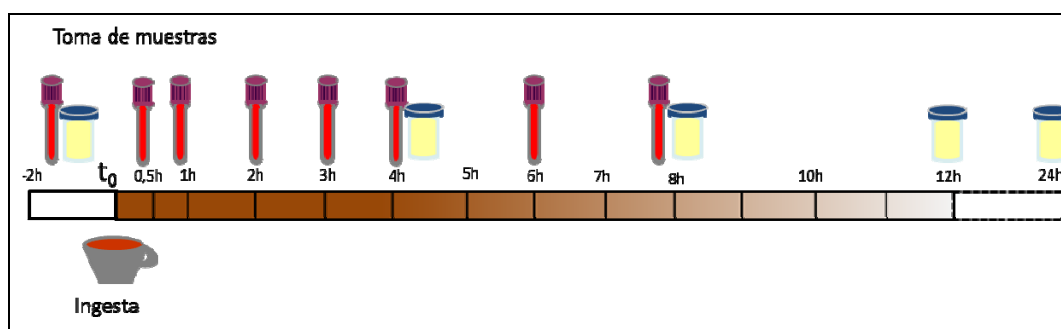


Figura 3.6. Esquema de recogida de muestras de sangre y orina del estudio de biodisponibilidad de los productos solubles de cacao control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP) en voluntarios sanos.

3.2.3.2.2. Estudio de la biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles presentes en café mezcla tostado/verde y yerba mate en voluntarios sanos

El objetivo general del estudio era determinar la biodisponibilidad de los polifenoles presentes en dos productos ricos en ácidos hidroxicinámicos, un producto soluble de café mezcla tostado/verde, conteniendo un 35% de café verde, y una infusión de yerba mate.

Para ello, se llevó a cabo un estudio de intervención cruzado y aleatorizado en 12 voluntarios sanos que dieron su consentimiento informado antes de empezar, completando todos ellos el estudio con éxito. Los voluntarios fueron distribuidos en dos

grupos de 6 individuos cada uno. La Tabla 3.9. muestra las características basales de los participantes.

Tabla 3.9. Características basales de los individuos participantes en el estudio de biodisponibilidad de café mezcla tostado/verde y yerba mate.

	Edad (años)	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	FC (puls/min)
Hombres (n=7)	27,86 ± 3,48	68,43 ± 9,96	23,42 ± 2,52	124,60 ± 8,20	76,40 ± 5,50	62,60 ± 8,79
Mujeres (n=5)	28,88 ± 3,56	66,00 ± 13,27	22,43 ± 3,33	121,14 ± 16,01	74,29 ± 11,80	75,43 ± 4,76

IMC: índice de masa corporal; FC: frecuencia cardíaca; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; puls: pulsaciones

El procedimiento seguido fue igual que en el estudio anterior, excepto que en este estudio los voluntarios consumieron 3,5 g de café mezcla tostado/verde disuelto en 250 mL de agua caliente y 4,91 g de yerba mate, infusionados en 250 mL de agua hirviendo durante 5 minutos y filtrado con colador de tela. En la Figura 3.7. se muestra un esquema general del estudio y en la Figura 3.8. el aspecto de las bebidas ingeridas por los participantes.

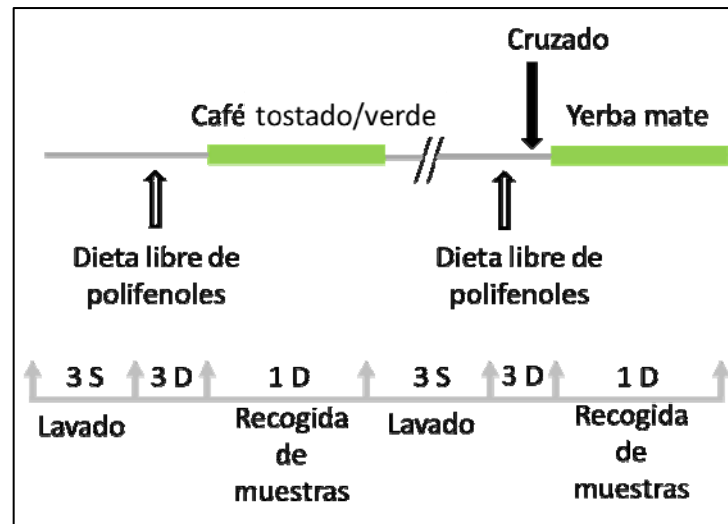


Figura 3.7. Diseño experimental del estudio de intervención con café mezcla tostado/verde y yerba mate. D: día, S: semanas.

a)



b)



Figura. 3.8. Bebidas ingeridas por los participantes en los estudios de biodisponibilidad: a) café mezcla tostado/verde y b) yerba mate.

Los 3 días previos a la intervención se restringió el consumo de los siguientes alimentos ricos en polifenoles: cacao, café, té, vino y productos derivados de éstos, frutas, zumos y verduras, con excepción de plátano, sandía, melón y patatas. Así mismo, se restringió el consumo de legumbres, aceite, vinagre y frutos secos. En la Figura 3.9. se muestra la hoja que se entregó a los voluntarios con la lista de alimentos restringidos durante las 72 h previas a la intervención.

<u>ALIMENTOS PROHIBIDOS LOS DÍAS PREVIOS A LA INTERVENCIÓN</u>
-Café (ni siquiera descafeinado)
-Otras infusiones (yerba mate, manzanilla, poleo, etc.)
-Té (negro, rojo, blanco, verde)
-Chocolate, cacao y productos derivados (bombones, chocolatinas, batidos de chocolate, donuts o galletas con chocolate, etc.)
-Zumos de frutas (naturales o envasados, con o sin leche)
-Vino (blanco, tinto, rosado), cava, champán
-Cerveza
-Sidra, mosto
-Frutas: en general, no se puede tomar ninguna fruta durante los dos días previos a cada visita al centro de investigación Únicamente se pueden comer plátanos, melón, o sandía, moderadamente. Se pueden sustituir los postres por yogur natural (no con frutas), postres lácteos, etc
-Frutas secas: pasas (uvas o ciruelas), orejones
-Frutos secos: nueces, almendras, pistachos
-Mermeladas o compotas de frutas
-Soja ni alimentos o bebidas derivados de la soja
-Cebollas, remolacha, berenjenas, apio, puerro y alcachofas

Figura 3.9. Hoja de información proporcionada a los voluntarios con la lista de alimentos restringidos los días previos a la intervención con las bebidas de café mezcla tostado/verde y yerba mate.

Al inicio del día de intervención se monitorizó el peso, la talla, la presión arterial y frecuencia cardíaca por triplicado (Tabla 3.9.) y tras la inserción de la vía, se practicó una extracción sanguínea en condiciones basales y a las 0,5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 12 h tras la ingesta del café y yerba mate. Se recogió la orina a distintos intervalos de tiempo -2-0, 0-2, 2-5, 5-8, 8-12 y 12-24 h. En la Figura 3.10. se presenta un esquema de las muestras tomadas durante los ensayos con las bebidas ricas en ácidos hidroxicinámicos. Durante la intervención, se proporcionó a los voluntarios agua y bebidas isotónicas a demanda, así como un desayuno, almuerzo y merienda libres de polifenoles a las 2, 6 y 10 h, respectivamente, desde la hora en que consumieron el café y la yerba mate. Los voluntarios permanecieron en la Unidad de Nutrición Humana del ICTAN durante las primeras 12 h de intervención y regresaron al día siguiente para entregar las orinas correspondientes al último intervalo, debiendo haber mantenido las restricciones dietéticas en la cena tomada esa noche.

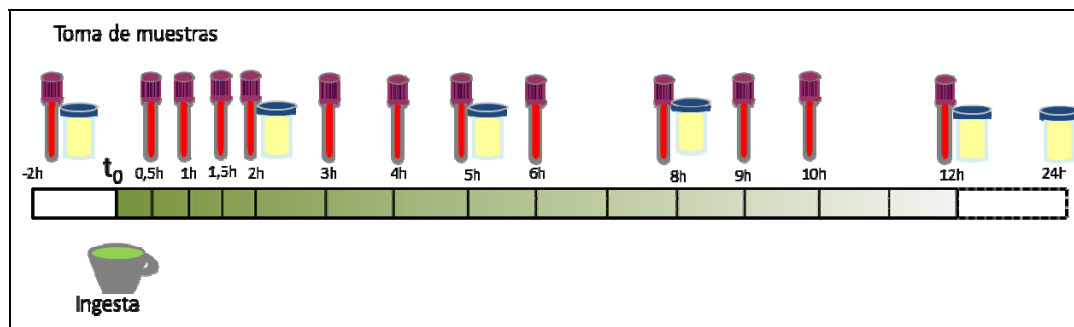


Figura 3.10. Esquema de recogida de muestras de sangre y orina del estudio de biodisponibilidad del café mezcla tostado/verde y yerba mate en voluntarios sanos.

3.2.3.4. Análisis de Muestras Biológicas

Para analizar los compuestos fenólicos y sus metabolitos derivados presentes en los plasmas y orinas generados en los estudios de biodisponibilidad previamente detallados (3.2.3.3.), se aplicaron distintos protocolos a las muestras biológicas con el fin de obtener extractos fenólicos aptos para su análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-QTOF).

Los plasmas se trataron con acetonitrilo para precipitar las proteínas y practicar una extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos. Aunque el fundamento

utilizado para la obtención de extractos ricos en polifenoles a partir de las muestras generados tras el consumo de productos ricos en flavanoles (cacao) y ácidos hidroxicinámicos (café mezcla tostado/verde y yerba mate) era el mismo, los protocolos aplicados difirieron ligeramente para mejorar la recuperación de los metabolitos.

Así, para la extracción de metabolitos de las muestras de plasma del estudio con los productos solubles de cacao se mezcló 1 mL de plasma con 50 μ L de ácido ascórbico (0,2 g/mL) en un eppendorf de 2 mL. A continuación, se añadieron 750 μ L de acetonitrilo frío y se vortexó durante 2 min, centrifugando a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Se reservó el sobrenadante y el pellet se sometió al mismo proceso anterior dos veces más. Los sobrenadantes se juntaron y se llevaron a evaporación en vacío (Speed Vac, Mod. Savant, Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU). El residuo obtenido se mantuvo a -20°C hasta el momento del análisis por LC-QTOF, momento en el que se resuspendió en 150 μ L de fase móvil (90% de agua MilliQ acidificada con 0,1% de ácido fórmico y 10% de acetonitrilo acidificado con 0,1% de ácido fórmico), se centrifugó a 14000 rpm y se filtró con filtros de jeringa de 0,45 μ m previa inyección en el equipo.

Para el caso de la extracción de los metabolitos presentes en el plasma del estudio de café mezcla tostado/verde y yerba mate se adaptó el protocolo de Day y cols. (2001). Para ello, se acidificaron 400 μ L de plasma con 12 μ L de ácido fórmico al 50% y se vortexó. Se vertió el plasma acidificado gota a gota sobre 1000 μ L de acetonitrilo frío, conteniendo 0,2 g/mL de ácido ascórbico, se vortexó 20 segundos 3 veces y se centrifugó a 10000 rpm 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de metanol frío, se agitó y centrifugó nuevamente a 10000 rpm 10 min a 4°C. Se juntaron los sobrenadantes y se evaporaron a sequedad con una corriente de N₂ a 30°C. Las muestras así preparadas se mantuvieron a -20°C. El día del análisis, se resuspendió el residuo en 100 μ L de fase móvil (90 % de agua acidificada con 0,1% de ácido fórmico y 10% de acetonitrilo acidificado con 0,1% de ácido fórmico), se centrifugó a 14000 rpm y se filtró con filtros de jeringa de 0,45 μ m y se analizó por LC-QTOF.

En ambos estudios las muestras de orina se analizaron directamente tras dilución 1:1 (v/v) con agua Milli-Q, vortexándose y centrifugándose a 14000 rpm antes de su análisis en el equipo LC-QTOF.

3.2.3.5. Identificación y Cuantificación de Metabolitos

Con objeto de identificar y cuantificar los metabolitos presentes en los fluidos biológicos de los voluntarios de los estudios de biodisponibilidad, se utilizó el mismo equipo Agilent 1200 acoplado a un detector QTOF con fuente de ionización a presión atmosférica con electrospray (ESI) presentado en la sección 3.2.2.2.4. La columna utilizada fue Ascentis Express C18 (15 cm x 3 mm 2,7 μ m) (Sigma-Aldrich Química, Madrid). Las condiciones de trabajo del equipo empleadas para el análisis de los metabolitos presentes en las muestras de plasma y orina se detallan en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Condiciones del equipo LC-QTOF empleadas para el análisis de metabolitos derivados de compuestos fenólicos presentes en las muestras biológicas (plasma y orina) de los estudios de biodisponibilidad con voluntarios sanos.

Volumen de inyección de plasma	30 μ L
Volumen de inyección de orina	5 μ L
Fase móvil	Fase A: Agua (0,1 % fórmico); Fase B: ACN (0,1 % fórmico)
Caudal de la Fase móvil	0,3 mL/min
Rango de masas	m/z 100-970
Modo de Ionización	negativa
Temperatura de gas secante, nitrógeno	325°C
Caudal de gas	10 L/min
Presión del nebulizador	25 psi
Voltaje del capilar	3500 V
Voltaje del fragmentador	150 V
Voltaje del skimmer	65 V
Masas de referencia	m/z 119,0363; m/z 966,0007

En la Tabla 3.11. se presentan los gradientes binarios utilizados para el análisis de los metabolitos presentes en las muestras de plasma y orina generados en los estudios de biodisponibilidad con voluntarios sanos tras el consumo de los productos objeto de estudio.

3. Materiales y Métodos

Tabla 3.11. Gradiente cromatográfico para el análisis de los metabolitos presentes en las muestras de plasma y orina de los estudios de biodisponibilidad de polifenoles presentes en productos solubles de cacao, café mezcla tostado/verde y yerba mate.

	Tiempo (min)	Agua-Fórmico (0,1%) (%)	ACN-Fórmico (0,1%) (%)
Estudio biodisponibilidad de cacao	0	90	10
	10	70	30
	15	90	10
	20	90	10
Estudio de biodisponibilidad de café mezcla tostado/verde y yerba mate			
	0	90	10
	10	70	30
	15	60	40
	20	50	50
	22	90	10
	30	90	10

En la Tabla 3.12. y 3.13. se recogen las rectas de calibrado obtenidas con estas condiciones cromatográficas de los patrones utilizados así como los límites de detección y cuantificación calculados para los fluidos biológicos plasma y orina, respectivamente.

Tabla 3.12. Rectas de calibrado, coeficientes de determinación, límite de detección (LD) y cuantificación (LC) de los estándares utilizados para la cuantificación de metabolitos detectados en el plasma de voluntarios de los estudios de intervención.

Compuesto	Concentraciones (μM)	Recta	R^2	LD (μM)	LC (μM)
Epicatequina	0,005; 0,01; 0,1; 1	Área = $3\text{E}+06 \cdot \text{C} - 44708$	0,981	0,0011	0,0033
Ácido hidroxifenilacético	0,005; 0,01; 0,1; 1	Área = $1\text{E}+06 \cdot \text{C} - 1728$	0,996	0,0025	0,0075
Ácido 5-cafeoilquinico	0,005; 0,01; 0,1, 1	Área = $3\text{E}+06 \cdot \text{C} + 1521$	0,999	0,0029	0,0087
Ácido cumárico	0,005; 0,01; 0,1, 1	Área = $2\text{E}+06 \cdot \text{C} + 18817$	0,992	0,0007	0,0022
Ácido cafeico	0,005; 0,01; 0,1, 1	Área = $2\text{E}+06 \cdot \text{C} + 4721$	0,982	0,0006	0,0019
Ácido ferúlico	0,005; 0,01; 0,1, 1	Área = $1\text{E}+06 \cdot \text{C} - 11971$	0,999	0,0008	0,0023

Tabla 3.13. Rectas de calibrado, coeficientes de determinación, límite de detección (LD) y cuantificación (LC) de los estándares utilizados para la cuantificación de metabolitos detectados en la orina de voluntarios de los estudios de intervención.

Compuesto	Concentraciones (μM)	Recta	R ²	LD (μM)	LC (μM)
Epicatequina	0,25; 0,5; 1,0; 2,0	Area = 116251*C + 4473	0,997	0,025	0,075
Ácido hidroxifenilacético	0,25; 0,5; 1,0; 2,0	Área = 425294*C – 21222	0,996	0,030	0,090
Ácido 5-cafeoilquinico	0,05; 0,1; 2,5; 5; 10	Área = 540762*C – 19831	0,994	0,033	0,100
Ácido 3,5-dicafeoilquinico	0,05; 0,1; 2,5; 5; 10	Área = 583820*C – 39675	0,998	0,033	0,100
Ácido cumárico	0,05; 0,1; 2,5; 5; 10	Área = 525902*C – 65859	0,996	0,033	0,100
Ácido cafeico	0,05; 0,1; 2,5; 5; 10	Área = 571628*C – 99239	0,990	0,028	0,083
Ácido ferúlico	0,05; 0,1; 2,5; 5; 10	Área = 245186*C – 35203	0,998	0,029	0,086

La cuantificación de los metabolitos detectados en plasma se reporta en concentración molar, mientras que en la orina se expresa en cantidad y no concentración, considerando el volumen total de orina excretado por cada voluntario en cada fase de los estudios.

3.2.3.6. Estudio Farmacocinético

Los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos hallados se calcularon mediante el programa complemento de Microsoft Excel, PK Functions for Microsoft Excel (Usansky, Desai & Tang-Liu. Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, California, EEUU). Así se determinaron los siguientes parámetros representados en la Figura 3.11.:

- **Cmax:** Concentración máxima del metabolito en la muestra sanguínea.
- **Tmax:** Tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima.
- **Área bajo la curva (AUC):** Relaciona la variación de la concentración plasmática de un metabolito en función del tiempo. Es directamente proporcional a la dosis o a la fracción de la dosis absorbida y, por lo tanto, representa la cantidad total de compuesto que llega a la circulación sistémica.

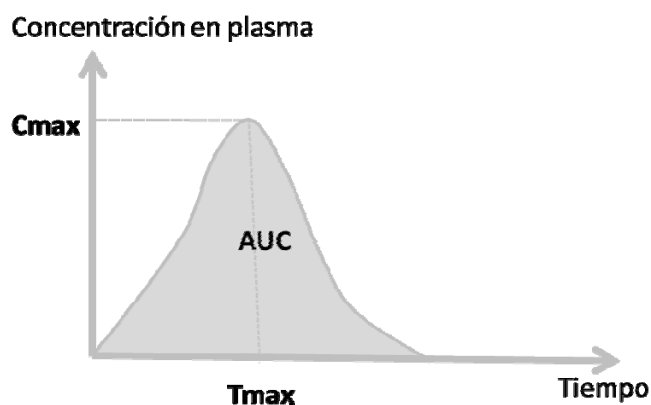


Figura 3.11. Diagrama de los parámetros farmacocinéticos plasmáticos calculados para los metabolitos identificados en los estudios de biodisponibilidad *in vivo*.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados se trabajó con el programa estadístico SPSS Statistics versión 17.0 para Windows (SPSS Inc., Irlanda).

La comparación entre medias en el estudio de viabilidad celular se realizó mediante el análisis de la varianza ANOVA de un factor, aplicando el test de Levene de homogeneidad de la varianza para contrastar la homocedasticidad (o igualdad de varianzas). Para determinar las diferencias entre las medias se aplicó análisis *Post Hoc*, utilizando el test de Tukey para varianzas iguales. Se estableció como nivel de significación $p < 0,05$.

El análisis estadístico llevado a cabo en los estudios de biodisponibilidad de cacao en humanos se realizó mediante estadística no paramétrica, utilizando la prueba de Wilcoxon. Se estableció como nivel de significación $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

4.1. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO, EL CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y LA YERBA MATE

Previo a los estudios biodisponibilidad se caracterizó la fracción fenólica de los cuatro productos ricos en polifenoles objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, cuantificando el contenido fenólico total mediante el clásico método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, seguido de caracterización cromatográfica mediante HPLC-DAD y LC-ESI-MS para cuantificar la fracción fenólica e identificar los componentes mayoritarios presentes en los distintos productos.

4.1.1. PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO

Los productos solubles de cacao control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP) han sido elaborados y suministrados por la empresa Nutrexp, S.L. Se aisló la fracción fenólica de estos productos mediante el método de extracción orgánica puesto a punto en el grupo de investigación (Bravo y cols., 1994) y se analizó espectrofotométricamente a 750 nm siguiendo el protocolo de Folin-Ciocalteu (Montreau, 1972). El contenido fenólico hallado fue de $21,70 \pm 1,40$ y $25,63 \pm 1,00$ mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de producto seco, para CC y CC-PP, respectivamente. Se observó poca diferencia entre el contenido fenólico de estos productos a pesar de que el CC-PP es un producto enriquecido en compuestos fenólicos según las especificaciones de la empresa suministradora.

Seguidamente, los extractos fenólicos orgánicos se analizaron por HPLC-DAD para identificar y cuantificar los polifenoles constituyentes. En la Figura 4.1. se muestran los cromatogramas correspondientes a ambos productos solubles de cacao (CC y CC-PP).

La identificación cromatográfica de los fenoles se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención (TR) y espectros con los estándares disponibles comercialmente y posterior confirmación mediante análisis por espectrometría de masas, simple cuadrupolo, acoplada a cromatografía líquida (LC-MS). Así se identificaron los flavan-3-oles monoméricos epicatequina (pico 7, TR 32,0 min) y catequina (pico 4, TR 22,4 min) y diméricos procianidinas PB1 (pico 3, TR 18,8 min) y PB2 (pico 5, TR 28,9 min) (Figura 4.1.) todos con un máximo de absorción a 280 nm como se indica en la Tabla 4.1. En esta misma Tabla también se indica el ion cuasimolecular $[M-H]^-$ y los fragmentos moleculares de los cuatro flavanoles identificados resultantes del análisis del extracto

orgánico por LC-MS en modo de ionización negativa. Así, los monómeros proporcionaron el ion cuasimolecular a m/z 289, acompañado del ion-fragmento a m/z 245, mientras que los dímeros dieron lugar al ion $[M-H]^-$ a m/z 577 y el ion-fragmento a m/z 289, coincidente con una unidad monomérica.

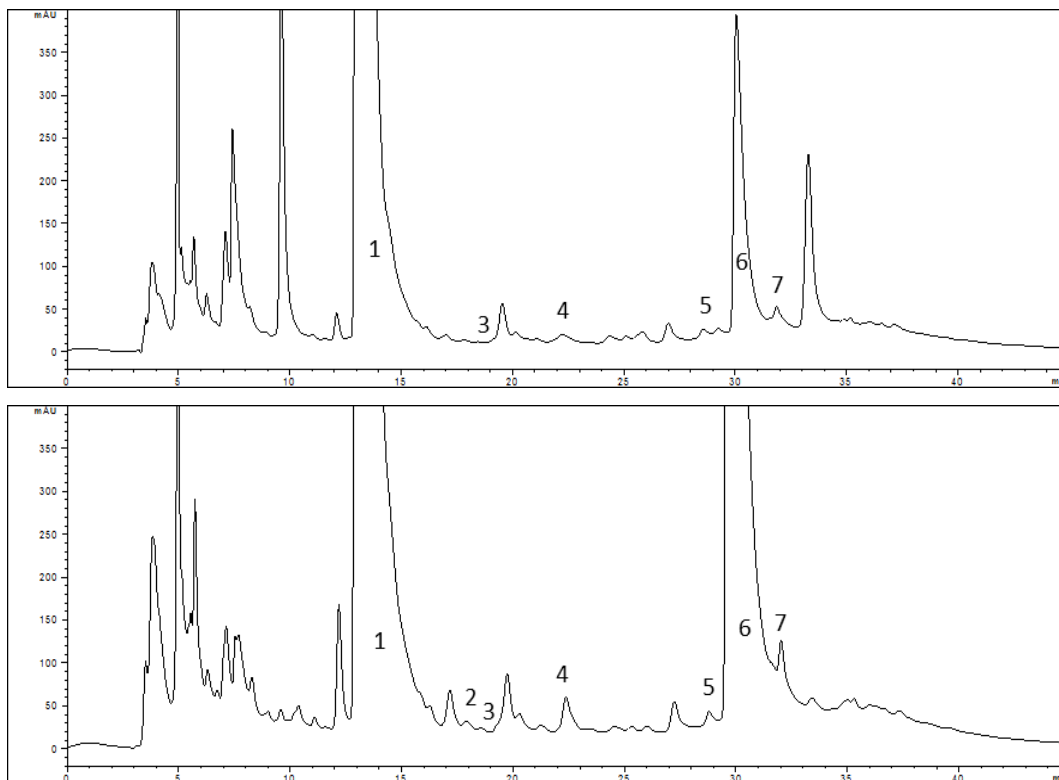


Figura 4.1. Perfil cromatográfico de los extractos fenólicos de los productos solubles de cacao control (CC), panel superior, y enriquecido en polifenoles (CC-PP), panel inferior, adquiridos a 280 nm. Los números indican los picos identificados en las muestras cuyas características se recogen en la Tabla 4.1.

El método utilizado para la extracción de los fenoles de los productos solubles de cacao también extrae las metilxantinas, otro tipo de compuesto bioactivo naturalmente presente en el cacao. Por comparación con patrones comerciales se identificaron las dimetilxantinas teobromina (3,7-dimetilxantina, pico 1, TR 13,5 min), teofilina (1,3-dimetilxantina, pico 2, TR 18,0 min) y la trimetilxantina cafeína (1,3,7-trimetilxantina, pico 6, TR 30,4 min), como se observa en la Figura 4.1. Estos compuestos, además de presentar un máximo de absorción muy próximo a los flavanoles (272 nm las metilxantinas y 280 nm los flavanoles), muestran una polaridad muy parecida, lo que hizo necesario optimizar el gradiente de elución utilizado en el

HPLC para lograr una separación aceptable entre ambos grupos de compuestos, fenoles y metilxantinas. No se proporcionan los datos correspondientes al análisis por LC-MS de las metilxantinas, esto es $[M-H]^-$ y fragmentos, por precisar un protón para que tenga lugar su ionización (es decir, requieren ionización positiva) en contraposición a lo que ocurre con los fenoles (ionización negativa).

Tabla 4.1. Características espectroscópicas y tiempos de retención (TR) de los compuestos fenólicos y metilxantinas identificados en los productos solubles de cacao (CC y CC-PP) mediante análisis por HPLC-DAD y LC-MS en modo de ionización negativa. Se incluye los datos cromatográficos y el máximo de absorción UV de las metilxantinas presentes en estos productos de cacao.

Pico	Nombre	TR (min)	λ max	$[M-H]^-$	Iones fragmentos
1	Teobromina	13,5	272	-	-
2	Teofilina	18,0	272	-	-
3	Procianidina B1	18,8	280	577	289
4	Catequina	22,4	280	289	245
5	Procianidina B2	28,9	280	577	289
6	Cafeína	30,4	272	-	-
7	Epicatequina	32,0	280	289	245

Se utilizaron rectas de calibrado de epicatequina, catequina y PB2 para la cuantificación por HPLC-DAD de la fracción fenólica, mientras que la procianidina B1 se cuantificó con la recta de su isómero PB2 (Tabla 3.3. de Materiales y Métodos). En la Tabla 4.2. se presentan los contenidos de los compuestos fenólicos identificados en los productos solubles de cacao expresados en mg por gramo de muestra seca. Los resultados señalaron a la epicatequina como el monómero más abundante (0,57-1,15 mg/g m.s.) frente al contenido de la catequina (0,32-0,53 mg/g m.s.). Respecto a las procianidinas diméricas, PB2 presentó un mayor contenido que la PB1 (0,39-0,82 mg/g m.s. vs 0,04-0,23 mg/g m.s.), siendo su cómputo global menor que el de los compuestos monoméricos.

Tabla 4.2. Contenido fenólico de los productos solubles de cacao control (CC) y enriquecido en polifenoles (CC-PP), determinado por el método de Folin-Ciocalteu y por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-DAD).

		CC	CC-PP
Folin-Ciocalteu (mg EAG/g m.s.)	Polifenoles Totales	21,70 ± 1,40	25,63 ± 1,00
HPLC-DAD (mg/g m.s.)	Epicatequina	0,57 ± 0,07	1,15 ± 0,06
	Catequina	0,32 ± 0,03	0,53 ± 0,04
	Procianidina B1	0,04 ± 0,02	0,23 ± 0,02
	Procianidina B2	0,39 ± 0,05	0,82 ± 0,06
	Flavanoles Totales	1,32 ± 0,17	2,73 ± 0,18

Los resultados se expresan en mg por gramo de materia seca, considerando la humedad de 6,5 y 6,7% para CC y CC-PP, respectivamente. Media ± desviación estándar (n =3). EAG: equivalentes de ácido gálico.

El contenido total de polifenoles cuantificado por HPLC-DAD resultó ser el doble para la muestra CC-PP en comparación con CC, mientras que el valor proporcionado por el método de Folin-Ciocalteu fue de tan solo 1,2 veces mayor. Además, el método espectrofotométrico arrojó valores superiores en 16 y 9 veces para el CC y CC-PP, respectivamente, que aquellos determinados por el método cromatográfico, lo que indicó una posible interferencia de otros compuestos presentes en el extracto orgánico, sobrestimando el contenido final de compuestos fenólicos determinado con el método Folin-Ciocalteu, hecho ampliamente reconocido (Waterhouse, 2003; George y cols., 2005; Ainsworth y Gillespie, 2007). Ha de señalarse que no se identificaron otras procianidinas oligoméricas ni otro tipo de polifenoles en los productos solubles de cacao que pudieran contribuir al valor espectrofotométrico. Parte de estas diferencias se podrían explicar también por el uso del ácido gálico como patrón de referencia, de naturaleza química y factor de respuesta diferente de los flavan-3-oles identificados en los productos solubles de cacao. Sin embargo, se mantuvo el ácido gálico como patrón porque en esta Tesis Doctoral se han caracterizado otras bebidas ricas en ácidos hidroxicinámicos, café mezcla tostado/verde y yerba mate, muy diferentes de los fenoles del cacao, y así poder comparar los contenidos entre las bebidas. Igualmente, este es un patrón ampliamente utilizado por distintos autores, lo que permitiría la comparación de los resultados con aquellos reportados en la bibliografía.

4.1.2. CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE

El café mezcla tostado/verde es un preparado comercial instantáneo soluble en agua. Para evitar posibles alteraciones de la fracción fenólica durante la extracción orgánica, su caracterización se realizó sobre la disolución que se obtiene de disolver el producto comercial en agua, al contrario de lo que sucede con los productos solubles de cacao cuya disolución en agua resulta más dificultosa.

En primer lugar se cuantificó el contenido de polifenoles mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, que rindió unos valores de $109,15 \pm 1,71$ mg EAG/g de muestra seca .

A continuación, se caracterizaron individualmente los fenoles presentes en el café mezcla tostado/verde por HPLC-DAD siguiendo el protocolo especificado en Materiales y Métodos (sección 3.2.1.3.), mostrándose un cromatograma típico en la Figura 4.2. El perfil cromatográfico, obtenido a 320 nm, muestra seis picos mayoritarios, tres de ellos a TR tempranos (5,1, 8,3 y 8,6 min, picos 1, 3 y 4, respectivamente) y los restantes a tiempos más tardíos, 25,7, 27,2 y 31,0 min (picos 16, 17 y 18, respectivamente). Todos presentaban un espectro de absorción UV similar, con un máximo a 326 nm y un hombro a 296 nm, sugiriendo pertenecer a la misma familia de compuestos químicos. Dos de estos picos coincidieron con los patrones disponibles, ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico) a TR 8,3 min (pico 3) y el ácido 3,5-dicafeoilquínico que eluía a 27,2 min (pico 17). El resto de picos mayoritarios se identificaron siguiendo el trabajo previamente desarrollado en el grupo de investigación (Bravo y cols., 2007) y se confirmaron mediante análisis por LC-MS en modo de ionización negativa. Así, los picos 1 y 4 a TR 5,1 y 8,6 min mostraron el mismo patrón de fragmentación que el ácido clorogénico, esto es un ion cuasimolecular $[M-H]^-$ a m/z 353 y tres picos a m/z 191, 179 y 707 correspondientes a las unidades del ácido quínico, ácido cafeico y un aducto dimérico de la molécula de ácido cafeoilquínico, respectivamente (Tabla 4.3.). Esta información permitió asignar los picos 1 y 4 a los ácidos 3-cafeoilquínico (neoclorogénico) y 4-cafeoilquínico (criptoclorogénico), respectivamente, atendiendo al orden de elución de estos isómeros del ácido clorogénico (Bravo y cols., 2007). Respecto a los picos 16 y 18, que eluyeron a 25,7 y 31,0 min, respectivamente, mostraron un espectro de masas idéntico al pico 17, ácido 3,5-dicafeoilquínico, con un ion cuasimolecular a m/z 515 e iones-fragmento a m/z 353, 191 y 179, correspondientes a las unidades de los ácidos cafeoilquínico, quínico y cafeico, respectivamente, permitiendo identificar la presencia de los ácidos 3,4-

dicafeoilquínico y 4,5-dicafeoilquínico, respectivamente, isómeros del ácido 3,5-dicafeoilquínico (Bravo y cols., 2007).

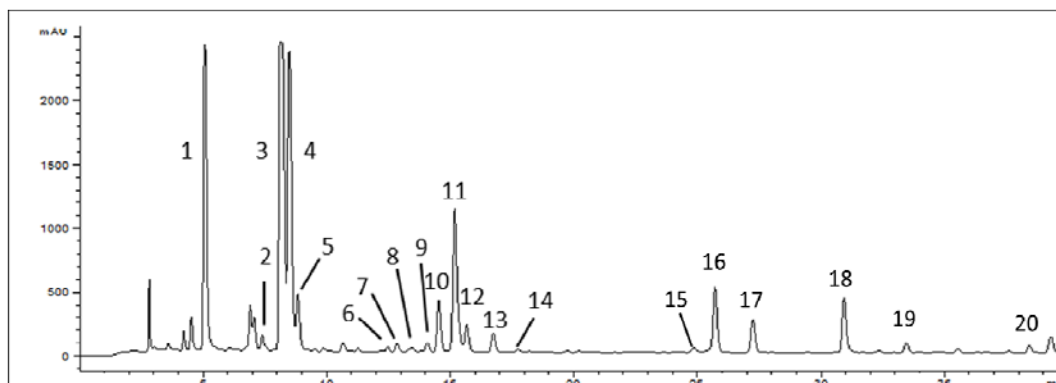


Figura 4.2. Perfil cromatográfico de la infusión de café mezcla tostado/verde a 320 nm. Las condiciones cromatográficas se especifican en la sección 3.2.1.3 de Materiales y Métodos. Los detalles cromatográficos y espectroscópicos de los compuestos identificados se muestran en la Tabla 4.3.

Otros compuestos identificados en la infusión de café mezcla tostado/verde pertenecientes a los derivados hidroxicinamoilquínicos son aquellos que contienen ácido ferúlico. Así, se han caracterizado cinco derivados feruloilquínicos a TR 8,8, 13,5, 14,5, 15,2 y 17,7 min (picos 5, 8, 10, 11 y 14, respectivamente) de características espectroscópicas muy similares a los ácidos cafeoilquínico anteriormente descritos, λ_{\max} a 324 nm y hombro a 296 nm. El análisis por LC-MS dio lugar en todos los casos a un ion cuasimolecular a m/z 367 y fragmentos a m/z 193, 191, 735 que correspondieron a los ácidos ferúlico y quínico, además del aducto formado de la unión de dos moléculas de ácido feruloilquínico, no pudiendo concretarse la estructura de los distintos derivados al no haberse realizado análisis químicos adicionales que aportaran mayor información, como por ejemplo RMN o MSⁿ.

También se han caracterizado tres derivados hidroxicinámicos compuestos de ácido cumárico esterificado con el ácido quínico (ácidos cumaroilquínicos) a los TR 6,3, 12,5 y 12,8 min (picos 2, 6 y 7, respectivamente). Estos compuestos presentaron un ligero efecto hipsocrómico del máximo de absorción a 310-314 nm respecto el máximo de 324-326 nm descrito para la mayoría de los derivados hidroxicinámicos identificados, coincidente con la λ_{\max} del ácido *p*-cumárico (310 nm). Los espectros LC-MS mostraron el ion cuasimolecular a m/z 337 compatible con el ácido cumaroilquínico y un ion-

fragmento a m/z 163 correspondiente al ácido cumárico. Los picos 6 y 7 también arrojaron otro ion-fragmento a m/z 191 propio del ácido quínico.

En menor concentración se ha observado la presencia de otro grupo de compuestos hidroxicinámicos, los ácidos cafeoilferuloilquínicos, a TR 33,4 y 38,4 min (picos 19 y 20, respectivamente), con espectro semejante a los ácidos dicafeoilquínicos (λ_{max} a 326 nm y hombro a 296 nm) y un espectro LC-MS compatible con dicha estructura química: ion cuasimolecular a m/z 529 e iones-fragmento a m/z 367, 193 y 161 coincidentes con el ácido feruloilquínico (equivalente al ion molecular tras la pérdida de una molécula de ácido cafeico deshidratado [Ion molecular-ácido cafeico- H_2O]), ácido ferúlico y ácido cafeico deshidratado, respectivamente.

Tabla. 4.3. Características espectroscópicas de los compuestos fenólicos identificados en la infusión de café mezcla tostado/verde mediante análisis por HPLC-DAD y LC-MS.

Pico	Nombre	TR (min)	λ max	[M-H] ⁻	Iones fragmentos
1	Ácido 3-cafeoilquínico (neoclorogénico)	5,1	326 hombro 296	353	191, 179, 707
2	Ácido cumaroilquínico	6,3	314	337	163
3	Ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico)	8,3	326 hombro 296	353	191, 179, 707
4	Ácido 4-cafeoilquínico (criptoclorogénico)	8,6	326 hombro 296	353	191, 179, 707
5	Ácido feruloilquínico	8,8	324 hombro 296	367	193, 191, 735
6	Ácido cumaroilquínico	12,5	310	337	163, 191
7	Ácido cumaroilquínico	12,8	310	337	163, 191
8	Ácido feruloilquínico	13,5	324 hombro 296	367	193, 191, 735
9	Ácido cafeoilquínico lactona	14,1	326 hombro 296	335	179, 135
10	Ácido feruloilquínico	14,5	324 hombro 296	367	193, 191, 735
11	Ácido feruloilquínico	15,2	324 hombro 296	367	193, 191, 735
12	Ácido cafeoilquínico	15,6	328 hombro 296	335	161, 671
13	Ácido cafeoilquínico	16,7	328 hombro 296	335	161
14	Ácido feruloilquínico	17,7	324 hombro 296	367	193, 191, 735
15	Ácido dimetoxicinamoilquínico	25,0	326 hombro 294	381	173
16	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	25,7	326 hombro 296	515	353, 191, 179
17	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	27,2	326 hombro 296	515	353, 191, 179
18	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	31,0	326 hombro 296	515	353, 191, 179
19	Ácido cafeoilferuloilquínico	33,4	326 hombro 296	529	367, 193, 161
20	Ácido cafeoilferuloilquínico	38,4	326 hombro 296	529	367, 193, 161

Además, se han identificado dos derivados monoacilsiquímicos a TR 15,6 y 16,7 min (picos 12 y 13, respectivamente) y cuyo máximo de absorción se registra a 328 nm y hombro a 296 nm. El espectro LC-MS proporcionó el $[M-H]^-$ a m/z 335, además del ion-fragmento a m/z 161, del ácido cafeico deshidratado. En ningún caso se detectó el ion del ácido siquímico (m/z 173), aunque el pico cromatográfico a TR 15,6 min (pico 12) mostró en su espectro LC-MS un ion-fragmento adicional a m/z 671 que podría corresponder con un aducto dimérico del ácido cafeoilsiquímico. Se propone que estos picos corresponden a isómeros del ácido cafeoilsiquímico, compuestos identificados en frutos como la ciruela o en la yerba mate (Jaiswal y cols., 2010, 2013).

También se ha caracterizado un compuesto cuyo pico aparece a TR 14,1 min (pico 9) identificado como cafeoilquinico lactona, con características cromatográficas similares a las de los ácidos cafeoilquinicos y análisis por LC-MS: $[M-H]^-$ m/z 335 y un fragmento mayoritario a m/z 179 que corresponde al ácido cafeico, así como un fragmento a m/z 135 correspondiente con la descarboxilación del ácido cafeico. Este compuesto procede de la deshidratación del ácido quínico para formar una 1,5-lactona durante el tostado del café (Farah y cols., 2005). No se han observado otras lactonas derivadas de otros ácidos mono- o diacilquinicos.

Por último, se ha identificado un derivado doblemente metilado del ácido cafeico (pico 15) como ácido dimetoxicinamoilquinico con TR 25,0 min y máximo de absorción a 326 nm y hombro a 294. El análisis por LC-MS mostró un $[M-H]^-$ a m/z 381 cuyo fragmento principal fue m/z 173 correspondiente con el ácido quínico deshidratado.

Cabe mencionar que el café mezcla tostado/verde contiene las metilxantinas cafeína y teobromina. Sin embargo, estos compuestos presentan su máximo de absorción a 272 nm y, como se indicó al principio del capítulo, requieren ionización positiva para su detección por LC-MS, por lo que en las condiciones analíticas seleccionadas para la caracterización del café no se detectan.

La cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el café mezcla tostado/verde se llevó a cabo mediante el empleo de rectas de calibrado de los estándares disponibles, el ácido clorogénico para cuantificar todos los derivados monoacilquinicos y 3,5-dicafeoilquinico para los correspondientes derivados diacilquinicos (Tabla 3.3. de Materiales y Métodos). En la Tabla 4.4 se muestran los resultados obtenidos. El total de ácidos hidroxicinámicos identificados en la fracción fenólica del café, el 84,7% está compuesta por los derivados monoacilquinicos, siendo

los ácidos cafeoilquínicos (clorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico) los compuestos mayoritarios (67,5% del total de polifenoles identificados) junto con los ácidos feruloilquínicos (10%), seguidos en menor proporción por los ácidos cafeoilsiquímicos (4,3%), los ácidos cumaroilquínicos (2%) y el ácido dimetoxicinamoilquínico (0,9%). El restante 15,3% de la fracción fenólica la configuran los derivados diacilquínicos, en particular los ácidos dicafeoilquínicos (10,3%) y una pequeña proporción de ácidos cafeoilferuloilquínicos (2,2%) y el compuesto cafeoilquínico lactona (2,8%).

Tabla 4.4. Contenido fenólico del café soluble mezcla tostado/verde determinado por el método de Folin-Ciocalteu y por cromatografía líquida (HPLC-DAD).

		Café
Folin-Ciocalteu (mg EAG/g m.s.)	Polifenoles totales	109,15 ± 1,71
HPLC-DAD (mg/g m.s.)	Ácidos cafeoilquínicos	57,4 ± 0,3 (67,5%)
	Ácidos cumaroilquínicos	1,7 ± 0,1 (2,0%)
	Ácidos feruloilquínicos	8,5 ± 0,4 (10,0%)
	Ácidos cafeoilsiquímicos	3,7 ± 0,3 (4,3%)
	Ácidos dicafeoilquínicos	8,8 ± 0,2 (10,3%)
	Ácidos cafeoilferuloilquínico	1,9 ± 0,1 (2,2%)
	Cafeoilquínico lactona	2,3 ± 0,2 (2,8%)
	Ácido dimetoxicinamoilquínico	0,8 ± 0,1 (0,9%)
	Total Ácidos Hidroxicinámicos	85,1 ± 1,6

Los resultados se expresan en mg por gramo de materia seca, considerando la humedad de 6,5%. Valores entre paréntesis representan el porcentaje respecto al total de polifenoles cuantificados por HPLC. Media ± desviación estándar (n=3). EAG: equivalentes de ácido gálico.

4.1.3. YERBA MATE

La caracterización de la fracción fenólica de la yerba mate se llevó a cabo en la infusión obtenida tras la maceración de 4,91 gramos de yerba en agua hirviendo durante 5 minutos, emulando la forma de preparación de la infusión en el estudio de biodisponibilidad en humanos. Además, en un trabajo que se llevó a cabo con anterioridad a esta Tesis en el grupo de investigación (Bravo y cols., 2007) se observó un contenido fenólico determinado por Folin-Ciocalteu similar entre el análisis del extracto orgánico y la infusión, concluyendo que los fenoles del mate se extraen fácilmente durante la preparación de la infusión por su alta solubilidad en agua.

La cantidad de compuestos fenólicos de la infusión de yerba mate analizada mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu mostró un contenido de polifenoles de 6% referido a peso seco de producto ($78,17 \pm 0,14$ mg EAG/g peso seco).

El análisis de los polifenoles de la yerba mate mediante HPLC mostró un perfil (Figura 4.3.) muy parecido al obtenido en el caso del café mezcla tostado/verde (Figura 4.2.). Al igual que el caso del café, la identificación se apoyó en los patrones comerciales disponibles (ácidos 5-cafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico) y las características espectroscópicas de absorción UV y masas (Tabla 4.5.). Así, se caracterizaron los picos de TR 5,0, 8,3 y 8,6 min (picos 1, 4 y 5, respectivamente) con un máximo de absorción a 326 nm y un hombro a 296 nm con idéntico patrón de fragmentación en masas: $[M-H]^-$ a m/z 353 e iones-fragmento a m/z 191, 179 y 707, coincidentes con el ácido quínico, ácido cafeico y aducto dimérico, respectivamente. Toda esta información de nuevo permitió su identificación como los ácidos 3-cafeoilquínico (neoclorogénico), 5-cafeoilquínico (clorogénico) y 4-cafeoilquínico (criptoclorogénico), respectivamente.

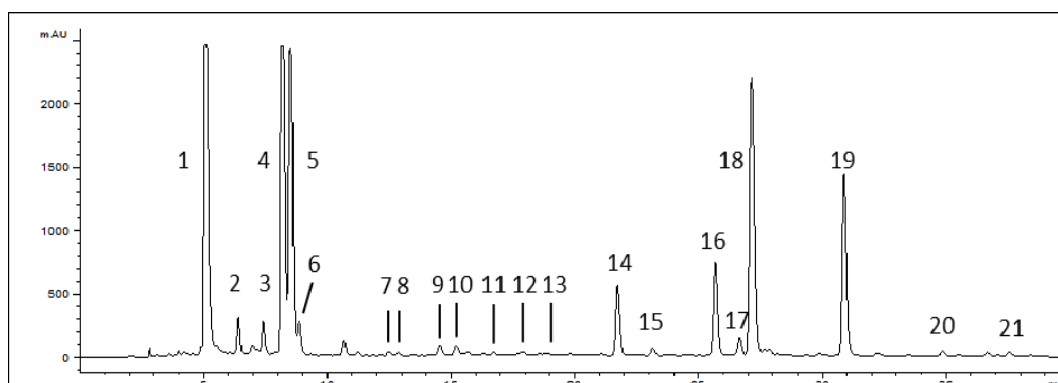


Figura 4.3. Perfil cromatográfico de la infusión de yerba mate a 320 nm. Las condiciones cromatográficas se especifican en la sección 3.2.1.3 de Materiales y Métodos. Los detalles cromatográficos y espectroscópicos de los compuestos identificados se muestran en la Tabla 4.5.

Aplicando el mismo procedimiento se caracterizaron los picos de TR 26, 27 y 31 min (picos 16, 18 y 19) como los ácidos 3,4-, 3,5- y 4,5-dicafeoilquínicos, respectivamente, respaldado por el análisis de sus espectros de absorción UV (λ_{\max} a 326 nm y hombro a 296 nm) y espectro de masas $[M-H]^-$ a m/z 515 del ion cuasimolecular y fragmentos a m/z 353, 191 y 179, correspondientes al derivado monocafeoilquínico, ácido quínico y ácido cafeico, respectivamente.

Otros compuestos fenólicos derivados de los ácidos hidroxicinámicos hallados en la infusión de yerba mate fueron los derivados feruloilquínicos a TR 8,8, 14,5, 15,2 y 17,9 min (picos 6, 9, 10 y 13), con espectro característico de los derivados hidroxicinámicos y patrón de fragmentación en el análisis mediante LC-MS en consonancia con su estructura química, $[M-H]^-$ a m/z 367 e iones-fragmentos a m/z 193, 191 y 735 (ácidos ferúlico, quínico y aducto dimérico, respectivamente).

Dentro de los derivados monoacilquínicos, también se identificaron los ácidos cumaroilquínicos, a TR 12,5 y 12,8 min (picos 7 y 8), con un máximo a 310 nm e iones a m/z 337, 163 y 191 coincidentes con el ion cuasimolecular, ácido cumárico y ácido quínico, respectivamente. En el mismo grupo se englobarían los derivados cafeoilquímicos, que aparecen a TR 15,6 y 16,8 min (picos 11 y 12), con λ_{\max} a 328 nm y hombro a 296 nm e iones a m/z 335, 161 y 671 que correspondían al ion cuasimolecular $[M-H]^-$, aducto de dos moléculas (m/z 671) y ácido cafeico deshidratado (m/z 161).

Otros compuestos minoritarios presentes en la infusión fueron los diésteres cafeoilferuloilquínicos, a TR 33,7 y 37,8 min (picos 20 y 21). Tanto el espectro UV como el de masas estaban en línea a lo observado para los compuestos de esta naturaleza (datos UV: λ_{\max} 326 y hombro a 296; datos masas: ion cuasimolecular a m/z 529 e iones-fragmento a m/z 367, 193 y 161, correspondientes a las unidades de los ácidos feruloilquínico, ferúlico y caféico deshidratado, respectivamente).

En la yerba mate se identificaron otros compuestos no presentes en el café mezcla tostado/verde, como dos glicósidos del ácido cafeico, a TR 6,5 y 7,5 min (picos 2 y 3, respectivamente) y espectro UV con λ_{\max} a 316 nm y hombro a 296 nm característico de los ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo, fue el espectro de masas el que finalmente permitió su identificación como glucósidos de ácido cafeico por mostrar un ion cuasimolecular a m/z 341 e ion-fragmento a m/z 179 propio de la unidad cafeico, tras la pérdida de una molécula de glucosa deshidratada (m/z 162). Derivados cafeoilhexósidos han sido identificados en mate y otros frutos por otros autores (Jaiswal y cols., 2010, 2014).

4. Resultados y Discusión

Tabla. 4.5. Características espectroscópicas de los compuestos fenólicos identificados en la infusión yerba mate mediante análisis por HPLC-DAD y LC-MS.

Pico	Nombre	TR (min)	λ max	[M-H] ⁻	Iones fragmentos
1	Ácido 3-cafeoilquínico (neoclorogénico)	5,0	326 hombro 296	353	191, 179, 707
2	Glucósido del ácido cafeico	6,5	316 hombro 296	341	179
3	Glucósido del ácido cafeico	7,5	316 hombro 296	341	179
4	Ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico)	8,3	326 hombro 296	353	191, 179, 707
5	Ácido 4-cafeoilquínico (criptoclorogénico)	8,6	326 hombro 296	353	191, 179, 707
6	Ácido feruloilquínico	8,8	324 hombro 296	367	193, 191, 735
7	Ácido cumaroilquínico	12,5	310	337	163, 191
8	Ácido cumaroilquínico	12,8	310	337	163, 191
9	Ácido feruloliqunioco	14,5	324 hombro 296	367	193, 191, 735
10	Ácido feruloliqunioco	15,2	324 hombro 296	367	193, 191, 735
11	Ácido cafeoilsiquímico	15,6	328 hombro 296	335	161, 671
12	Ácido cafeoilsiquímico	16,8	328 hombro 296	335	161
13	Ácido feruloilquínico	17,9	324 hombro 296	367	193, 191, 735
14	Rutina	21,9	256; 354	609	301
15	Quercetín- <i>O</i> -glucósido	23,2	256; 344	463	301
16	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	26,0	326 hombro 296	515	353, 191, 179
17	Kaempferol- <i>O</i> -ramnoglucósido	26,9	266; 344	593	
18	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	27,0	326 hombro 296	515	353, 191, 179
19	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	31,0	326 hombro 296	515	353, 191, 179
20	Ácido cafeoilferuloilquínico	33,7	326 hombro 296	529	367, 193 161
21	Ácido cafeoilferuloilquínico	37,8	324 hombro 296	529	367, 193, 161

Otro conjunto de compuestos presentes en el mate pero no en el café mezcla tostado/verde pertenecían al grupo de los flavanoles. Así, se ha identificado la rutina, que eluyó a 21,9 min (pico 14) y resultó ser un pico predominante en el conjunto de los fenoles caracterizados en la yerba mate. La disponibilidad comercial de rutina junto con el espectro UV-vis característico de los flavanoles (λ_{max} a 256 y 354 nm) y el ion cuasimolecular [M-H]⁻ a m/z 609 permitió su inequívoca identificación. También se han identificado glicósidos derivados de los flavanoles. En particular, se identificó a TR 23,2 min (pico 15) un compuesto con λ_{max} a 256 y 344 nm y un espectro de masas con ion cuasimolecular [M-H]⁻ a m/z 463 y un ion-fragmento a m/z 301, derivado de la pérdida de la molécula de glucosa (m/z 162) para dar el ion correspondiente a la quercetina, lo que permitió su identificación como quercetín-*O*-glucósido. Por último, se registró un

pico a TR de 26,9 min (pico 17), espectro con doble máximo a 266 y 344 nm, e ion $[M-H]^-$ a m/z 593, que correspondió a un kaempferol-*O*-ramnoglucósido, coincidentes con glicósidos de flavonoles previamente descritos en el mate (Bravo y cols., 2007). Cabe mencionar que las características espectroscópicas (λ_{\max} a 256-266 y 344-354 nm) de los flavonoles permitieron su identificación y cuantificación a la λ 320 nm en la que se llevaron a cabo los análisis mediante HPLC-DAD.

Tal como se ha comentado para el café mezcla tostado/verde, las metilxantinas presentes en el mate (cafeína y teobromina, principalmente) no se detectaron a la longitud de onda de trabajo.

La cuantificación de los compuestos identificados en la yerba mate (Tabla 4.6.) permitió conocer que aproximadamente el 63,2% del total de polifenoles detectados son derivados monoacilquínicos, fundamentalmente el ácido clorogénico y sus isómeros, mientras que el 28,4% corresponde a derivados diacilquínicos, en particular ácidos dicafeoilquínicos (27,8%). En proporciones menores se hallaron glucósidos del ácido cafeico (4,3%) y flavonoles (aproximadamente el 4,1% restante).

Tabla 4.6. Contenido fenólico de la infusión de yerba mate determinado por el método de Folin-Ciocalteu y por cromatografía líquida (HPLC-DAD).

		Yerba Mate
Folin-Ciocalteu (mg EAG/g m.s.)	Polifenoles Totales	78,17 ± 0,14
HPLC-DAD (mg/g m.s.)	Glucósido del ácido cafeico	3,5 ± 0,2 (4,3%)
	Ácidos cafeoilquínicos	44,5 ± 0,8 (55,2%)
	Ácidos p-cumaroilquínicos	0,5 ± 0,1 (0,6%)
	Ácidos feruloilquínicos	3,2 ± 0,1 (4,0%)
	Ácidos cafeoil-siquímicos	2,7 ± 0,2 (3,4%)
	Ácidos dicafeoilquínicos	22,4 ± 0,5 (27,8%)
	Ácidos cafeoilferuloilquínico	0,5 ± 0,1 (0,6%)
	Flavonoles	3,3 ± 0,3 (4,1%)
	Total Polifenoles	80,6 ± 2,3

Los resultados se expresan en mg por gramo de materia seca, considerando la humedad de 4,8%. Valores entre paréntesis representan el porcentaje respecto al total de polifenoles cuantificados por HPLC. Media ± desviación estándar (n = 3). EAG: equivalentes de ácido gálico.

4.1.4. ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO FENÓLICO DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO, CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y YERBA MATE EN LA DIETA

El cacao y sus sucedáneos son productos habituales de la dieta española, con un consumo estimado en 3,2 kg *per capita* al año (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2007). Igualmente, el consumo de café tostado está muy extendido, alcanzando los 4,5 kg/año, equivalente a 24.140 millones de tazas al año o 599 tazas por habitante al año (Federación Española de Café). Cabe resaltar que el café pierde parte de sus compuestos bioactivos en el proceso de tostado y por ello, aprovechando el gusto y hábito de la población mundial por el consumo de café, se está empezando a comercializar el café verde aunque todavía de manera incipiente en países occidentales. Si bien la palatabilidad del café verde resulta demasiado astringente por su alto contenido en compuestos fenólicos, su mezcla con café tostado podría ser una alternativa comercial que equilibra el sabor y preserva parte de los compuestos bioactivos presentes en el café sin tostar o café verde. Respecto al consumo de la yerba mate, empieza a incrementarse en países fuera de Argentina, Paraguay, Uruguay y Brasil, los mayores consumidores mundiales de esta bebida. Para el caso particular de Europa existen dos mercados principales, el de la población inmigrante y el de las compañías nutracéuticas y de suplementos dietéticos.

Como parte de los beneficios que se asocian a determinados alimentos de la dieta se relacionan con su contenido fenólico, resulta de interés caracterizar y cuantificar esta fracción. Aunque es bien conocido que el ensayo de Folin-Ciocalteu sobreestima la composición fenólica de un alimento por las interferencias que en general las técnicas colorimétricas presentan (Sánchez-Rangel y cols., 2013), es el método más comúnmente empleado a la hora de hacer una primera caracterización del contenido fenólico de cualquier alimento. Los resultados presentados sitúan al café mezcla tostado/verde (109,15 mg/g peso seco) como el producto de mayor contenido fenólico en comparación con la yerba mate (78,17 mg/g) y los productos solubles de cacao, 25,63 y 21,70 mg/g para el rico en polifenoles (CC-PP) y el cacao control convencional (CC), respectivamente. Ahora bien, si se considera la pauta habitual de consumo basado en la recomendación del fabricante de disolver en 250 mL el contenido de las monodosis comerciales, con contenidos de 18, 2 y 1,5 g para los sobres de cacao, café soluble y bolsitas de yerba mate, respectivamente, la ingesta de polifenoles es mayor en el caso de los productos solubles de cacao (461 y 391 mg para CC y CC-PP),

seguido por el café soluble mezcla tostado/verde (218 mg) y en último lugar la yerba mate (117 mg).

Para completar esta primera caracterización obtenida por el método de Folin-Ciocalteu, se recurrió al estudio individual de cada bebida por cromatografía HPLC-DAD de los componentes mayoritarios que integran su fracción fenólica. Los resultados presentados muestran que estos compuestos fenólicos mayoritarios en el cacao fueron los flavanoles monoméricos y diméricos, mientras que los ácidos hidroxicinámicos monoacilquínicos y diacilquínicos fueron los más abundantes en el café mezcla tostado/verde y en la yerba mate.

Así, el contenido total de dichos compuestos fenólicos para los productos evaluados fue de: 1,32 y 2,73 mg/g de polifenoles para el cacao control y el cacao enriquecido en compuestos fenólicos, respectivamente, 85,1 mg/g para el café mezcla tostado/verde y 80,6 mg/g para la yerba mate.

Se ha publicado un ranking de las fuentes dietéticas más ricas en compuestos fenólicos (Pérez-Jiménez y cols., 2010), cuyos datos se obtuvieron a partir de la base de datos de Phenol-Explorer (www.phenol-explorer.eu). En la clasificación de los alimentos más ricos en estos compuestos determinados cromatográficamente se encontraban algunas especias y hierbas secas como el clavo de olor (152 mg/g), menta piperita (120 mg/g), anís estrellado (54,6 mg/g), cacao en polvo (34,5 mg/g), frutos rojos (17,6 mg/g), semillas como las de lino (15,3 mg/g), frutos secos como castaña (12,1 mg/g) y avellana (5,0 mg/g) y algunos vegetales, incluyendo las aceitunas (5,7-3,5 mg/g) y alcachofas (3,1 mg/g), entre otros.

Centrándonos en los productos de cacao, se han reportado diferentes contenidos de fenoles en función del tipo de producto de cacao caracterizado; 34,5, 16,6, 2,4 y 0,2 mg/g, correspondiente al cacao puro en polvo, chocolate negro, chocolate con leche y bebidas de chocolate con leche, respectivamente (Pérez-Jiménez y cols., 2010). Los productos solubles de cacao de este trabajo ofrecieron un contenido fenólico (1,32 mg/g y 2,73 mg/g en CC y CC-PP, respectivamente) mayor que la bebida de chocolate con leche y próximo al de la tableta de chocolate con leche, lo que evidencia su valor como fuente de polifenoles en la dieta.

Respecto al contenido fenólico determinado para el café mezcla tostado/verde (85,1 mg/g) en comparación con los 2,1 mg/g de fenoles reportado para el café tostado filtrado (Pérez-Jiménez y cols., 2010), pone de manifiesto la marcada influencia del tostado en el contenido fenólico y la significativa contribución que supone la mezcla de

un 35% de café verde en el café mezcla tostado/verde estudiado, aportando una mayor cantidad de compuestos fenólicos que el café tostado convencional, con el consiguiente beneficio nutricional y alzando a este producto entre las cinco fuentes dietéticas más ricas en fenoles.

La yerba mate, en cambio, no se encontraba en esta lista, pero considerando el contenido calculado en este trabajo (80,6 mg/g) y de acuerdo a lo reportado por otros autores (Deladino y cols., 2013; Peres y cols., 2013), se situaría entre los cinco primeros puestos del ranking de las fuentes dietéticas más ricas en polifenoles (Pérez-Jiménez y cols., 2010).

Por otra parte, Treserra-Rimbau y cols. (2013) estudiaron la ingesta de polifenoles en la dieta española y concluyeron que el café es la principal fuente de polifenoles en nuestra dieta, aportando un 18% de todos los compuestos fenólicos ingeridos en los alimentos, siendo la contribución del cacao menor, aportando un 10%.

En conclusión, los productos estudiados en esta Tesis constituyen fuentes importantes de compuestos fenólicos en nuestra dieta, de flavanoles para los productos solubles de cacao y ácidos hidroxicinámicos para el caso de café mezcla tostado/verde y la yerba mate, por lo que su consumo habitual podría contribuir beneficiosamente a la salud de la población.

4.2. BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO*

4.2. BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS *IN VITRO*

El transporte y metabolización de los compuestos fenólicos característicos de los productos objeto de este trabajo se ha estudiado tras su incubación con las células Caco-2 tratando de emular su paso por el intestino delgado y su contacto con el epitelio intestinal.

Para ello se realizaron experimentos con un modelo bien establecido de absorción y transporte (Hidalgo y cols., 1989) consistente en soportes permeables bicamerales (Transwell) donde se sembraron e incubaron las células Caco-2 hasta la formación de una monocapa diferenciada. Se seleccionaron por una parte compuestos del grupo de los flavonoides (Figura 4.4.), los flavanoles epicatequina (EC) y procianidina B2 (PB2) como componentes mayoritarios del cacao, y se amplió el estudio incorporando el compuesto epicatequín-3-galato (ECG) para evaluar el comportamiento metabólico que pudiera tener el flavanol EC esterificado con ácido gálico en comparación con el monómero y el dímero PB2. Por otra parte, se ensayaron dos ácidos fenólicos del grupo de los ácidos hidroxicinámicos (Figura 4.4.), los ácidos 5-cafeoilquínico (5-CQA) y 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA), al ser los ácidos mono- y diacilquínicos mayoritarios de la fracción fenólica del café mezcla tostado/verde y de la yerba mate. Los experimentos se realizaron con 100 μM de cada compuesto fenólico. Esta dosis es suprafisiológica, pues hasta 50 μM se consideran valores realistas de flavonoides que se pueden hallar en el lumen del tracto gastrointestinal (Walgren y cols., 1998; Vaidyanathan y Walle, 2001). Sin embargo, se duplicó dicha concentración fisiológica con objeto de facilitar la identificación de posibles metabolitos tanto en el interior como en el exterior celular, una vez confirmada la ausencia de toxicidad.

Los polifenoles fueron incubados con las células durante 1, 2 y 4 h, tiempos que podría mimetizar una situación fisiológica de permanencia en el tracto gastrointestinal.

Se han analizado los metabolitos presentes en el interior de la célula y en el medio de cultivo por HPLC-DAD. Las formas originales fueron identificadas por comparación con los espectros de absorción y TR de los patrones puros. Los picos cromatográficos de los posibles metabolitos se asignaron en base al espectro UV-Vis, similar al del compuesto original, si bien su TR se vio modificado por las distintas conjugaciones producidas durante su metabolismo celular. Adicionalmente, se aplicó otra técnica analítica de mayor sensibilidad para la identificación de los metabolitos formados tras la incubación con las células Caco-2 y confirmar las estructuras halladas,

LC-QTOF, analizando los medios de cultivo de los compartimentos basolateral y apical. Se llevó a cabo un estudio dirigido buscando los potenciales metabolitos en función de la masa exacta del ion cuasimolecular en modo de ionización negativa, $[M-H]^-$, y posterior confirmación mediante el análisis MS/MS que permite evaluar el patrón de fragmentación del compuesto postulado. Esta técnica permite determinar la estructura de los potenciales metabolitos, glucuronidados, metilados o sulfatados y combinación entre ellos, pero no la posición de los grupos sustituyentes.

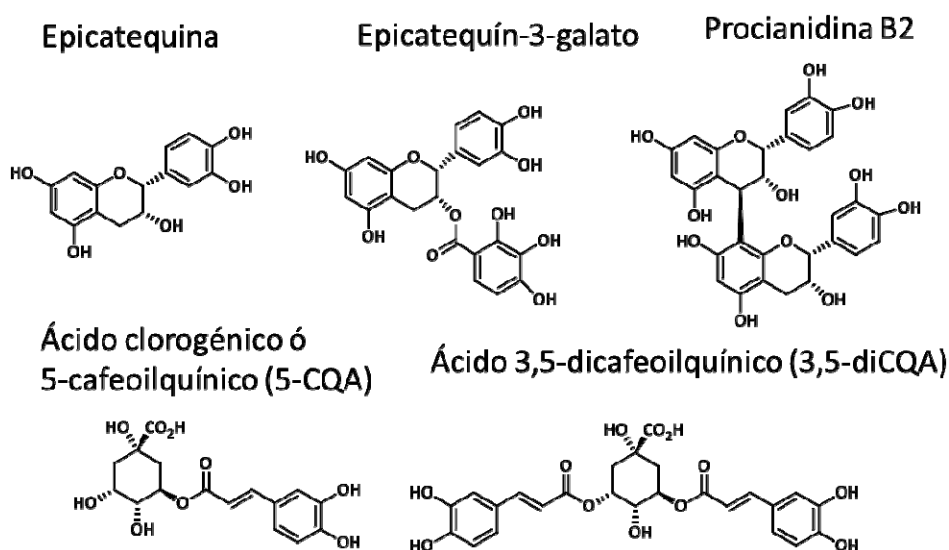


Figura 4.4. Estructuras químicas de los flavonoides epicatequina, epicatequín-3-galato y procianidina B2 y los ácidos hidroxicinámicos clorogénico y 3,5-dicafeoilquínico seleccionados para llevar a cabo los estudios de biodisponibilidad *in vitro*.

Para algunos compuestos se llevó a cabo la síntesis *in vitro* de los derivados metilados a partir de los estándares puros, a fin de comparar con aquellos obtenidos por biotransformación celular.

4.2.1. VIABILIDAD CELULAR

Antes de llevar a cabo los estudios de transporte y metabolismo de los compuestos fenólicos con el sistema modelo del epitelio intestinal mediante el uso de monocapas de células Caco-2, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo Cristal Violeta, incubando las células con diferentes concentraciones de los polifenoles (10, 25,

50, 100 y 200 μM) para comprobar que la dosis seleccionada de 100 μM no era citotóxica para esta línea celular.

En la Figura 4.5. se muestran los valores obtenidos de viabilidad celular expresada en porcentaje de células vivas. Ninguna de las concentraciones ensayadas modificó la viabilidad celular tras 24 h de incubación con EC, ECG, PB2, 5-CQA y 3,5-diCQA, mostrando valores similares a los de las células control sin tratar. En el caso de la PB2, las dosis de 50 y 100 μM parecen disminuir ligeramente la viabilidad, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, $p < 0,05$). Estos resultados confirman la ausencia de toxicidad de estos compuestos hasta 200 μM , permitiendo proceder a los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* con la dosis de 100 μM seleccionada.

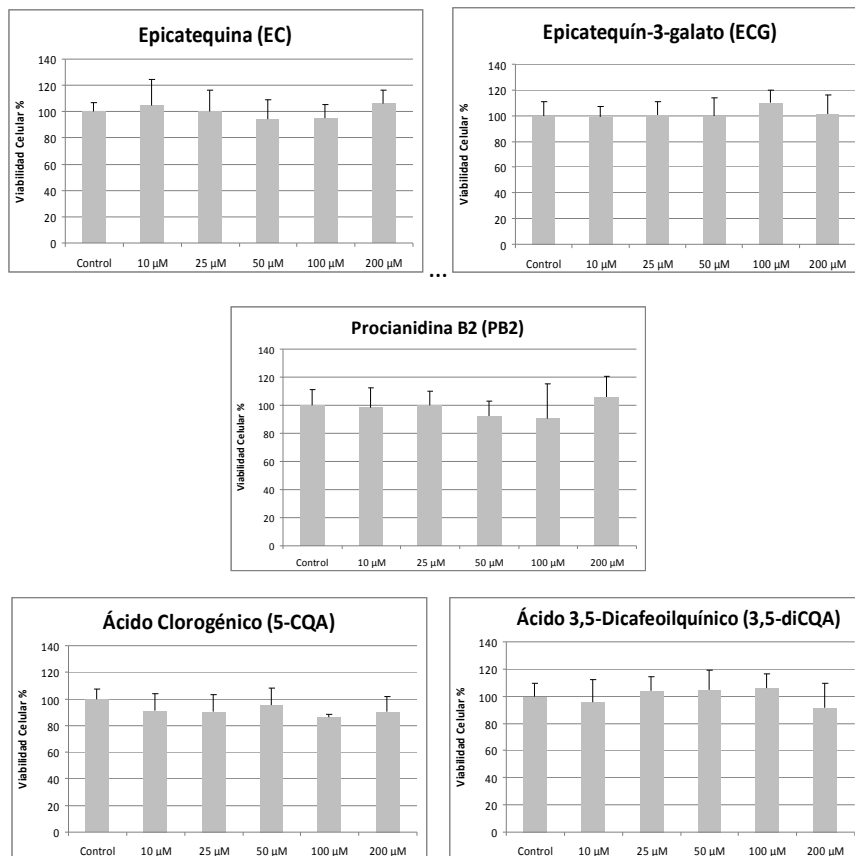


Figura 4.5. Viabilidad celular determinada mediante el ensayo de Cristal Violeta de las células Caco-2 incubadas durante 24 h con los flavanoles epicatequina, epicatequín-3-galato y procianidina B2 y los ácidos hidroxicinámicos clorogénico y 3,5-dicafeoilquinico a distintas concentraciones (10, 25, 50, 100 y 200 μM). Los resultados se expresan como la media de 8 determinaciones más la desviación estándar. No se detectaron diferencias significativas entre dosis ($p < 0,05$).

4.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL MODELO CELULAR DE EPITELIO INTESTINAL HUMANO CON CÉLULAS CACO-2

En primer lugar se hizo necesario poner a punto el modelo de diferenciación de las células de colon humano Caco-2 en el sistema bicameral Transwell. Se ensayaron distintas condiciones de siembra y mantenimiento previamente descritas en la bibliografía, utilizando dos determinaciones, la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y la prueba del Rojo Fenol, para valorar la estabilidad e integridad de la monocapa celular Caco-2, además de su monitorización por microscopio óptico.

Siguiendo el trabajo de Laparra y cols. (2005), dónde estudiaron la biodisponibilidad del ácido arsénico por las células Caco-2, se realizaron distintos ensayos en Transwells de 6 pocillos de 4,67 cm² de superficie, sembrando las células a distinta densidad (entre 100.000 y 280.000 células por pocillo) con medio Minimum Essential Medium (MEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino (FBS) y suplementado con 1% de piruvato sódico, 1% de tampón HEPES, 1% de los antibióticos penicilina y estreptomina y 0,1% del antifúngico fungizona, con o sin suplementación con aminoácidos no esenciales (NEAA, 0-1%). En ningún caso se observó la correcta formación y mantenimiento de la monocapa celular diferenciada.

Se ensayó otro protocolo puesto a punto por Hubatsch y cols. (2007) para evaluar la permeabilidad de fármacos a través de la monocapa de Caco-2, empleando Transwells de 12 pocillos de 1,12 cm² de superficie. Tras diversas pruebas, las condiciones finalmente utilizadas implicaron una siembra de 400.000 células por pocillo de 4,67 cm² (Transwell de 6 pocillos y 0,4 µm de tamaño de poro para evitar la trans migración de las células al otro lado de la membrana), mantenidas en medio DMEM rico en glucosa, HEPES, sin rojo fenol (Invitrogen 21063) y suplementado con 10% de FBS, inactivado con calor para desnaturalizar las proteínas (45 min a 56°C), además de un 1% de NEAA, 10.000 U/mL de penicilina y 1000 µg/mL de estreptomina. Los Transwells utilizados, de mayor área que los del protocolo original, permitían una monitorización más cómoda del desarrollo de la monocapa de células mediante el microscopio óptico, además de presentar mayor volumen apical y basolateral para toma de muestra y análisis complementarios de identificación de metabolitos.

A modo de ejemplo, en la Figura 4.6. se representan los valores de TEER (eje Y), que determina la resistencia de la monocapa de células Caco-2 al paso de la corriente eléctrica, durante los días tras la siembra (eje X) en las condiciones descritas. Se

observaron valores óptimos de resistencia en torno al décimo día postsiembra, que se mantuvieron hasta al menos los 25 días de registro. Aquellos pocillos que mostraban valores anormalmente más pequeños indicaban anomalías en la formación de la monocapa y fueron excluidos de los ensayos. De manera general, los experimentos de transporte y metabolismo se llevaron a cabo a los 20-21 días postsiembra.

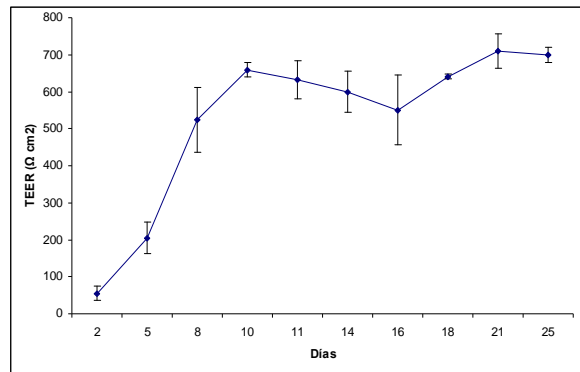


Figura 4.6. Evolución de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células Caco-2 a lo largo del tiempo tras la siembra en el sistema de Transwell.

Una vez evaluada la resistencia de la monocapa, el mismo día de la puesta de condiciones con los compuestos fenólicos para llevar a cabo los estudios de biodisponibilidad se reservaban dos pocillos para comprobar el estado de la monocapa mediante la prueba del Rojo Fenol. Este ensayo cuantifica el paso del colorante fenolsulfonftaleína (PSP) a través de la monocapa de células Caco-2, dónde la transferencia del colorante PSP es inversamente proporcional a la integridad de la monocapa. Así, se valoró la transferencia del colorante PSP en ambos sentidos, de modo que valores inferiores a 0,1% de PSP en el lado contrario al de carga indicaban un estado óptimo de la monocapa de las células Caco-2 (Figura 4.7).

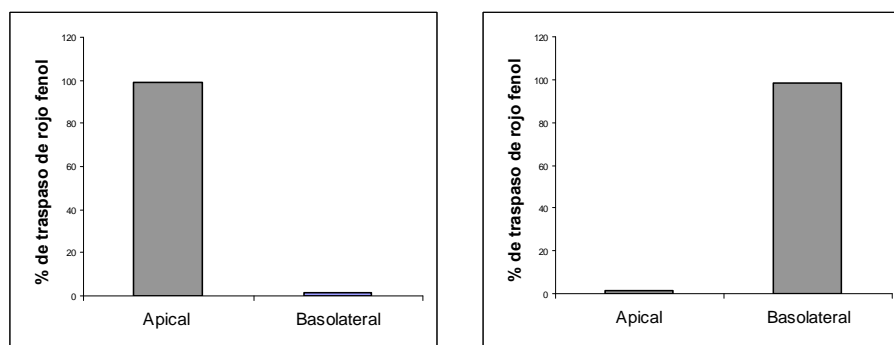


Figura 4.7. Porcentaje del colorante rojo fenol (fenolsulfonftaleína, PSP) en los compartimentos del Transwell tras su carga en el lado apical (izquierda) y basolateral (derecha) correspondiente a monocapas de células Caco-2 perfectamente diferenciadas.

4.2.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLISMO DE FLAVANOLES POR CÉLULAS CACO-2

Una vez comprobada la estabilidad de la monocapa de células Caco-2 se procedió al estudio del metabolismo de los tres flavanoles seleccionados, epicatequina, procianidina B2 y epicatequín-3-galato.

En primer lugar se evaluó el perfil cromatográfico del medio de cultivo que había estado en contacto con las células durante 4 horas en ausencia de los compuestos fenólicos para descartar posibles interferencias de sus componentes con los distintos polifenoles estudiados y sus metabolitos. Con el mismo fin, se analizaron los contenidos citoplasmáticos obtenidos tras lisar las células control no tratadas con los compuestos fenólicos.

Como se puede observar en la Figura 4.8.a., se detectaron cuatro picos propios del medio de cultivo sin suero a TR de 5,5, 7,5, 9,7 y 12,4 min. Por su parte, en las muestras de lisado celular (Figura 4.8.b.) se detectaron varios picos, aunque de menor intensidad que aquellos observados en el medio de cultivo, destacando particularmente aquel registrado a TR de 9,9 min.

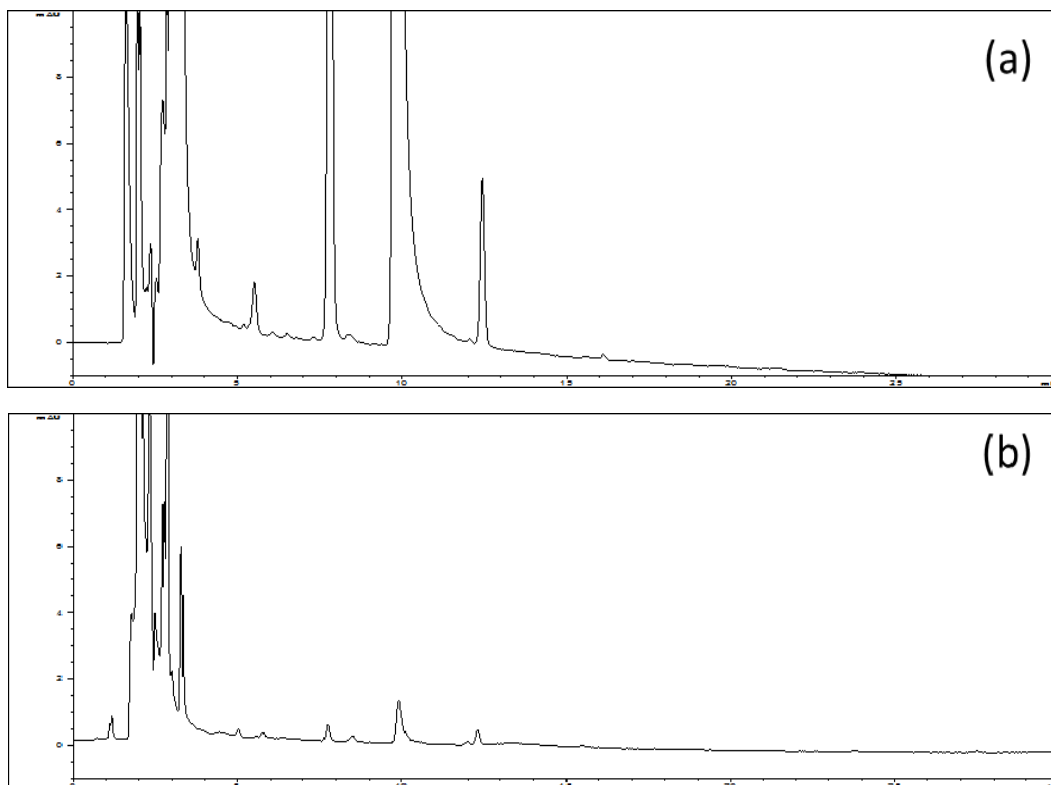


Figura 4.8. Perfil cromatográfico a λ_{max} 280 nm del medio de cultivo sin suero utilizado para el mantenimiento de las células Caco-2 (a) y lisado celular (b).

4.2.3.1. Metabolismo y Transporte de Epicatequina (EC) por Células Caco-2

Previo a la incubación del patrón EC con las células, se evaluó cromatográficamente disuelto en el medio de cultivo a la concentración de estudio, 100 μM . En la Figura 4.9. se muestra el cromatograma adquirido a 280 nm, en el que se puede observar un intenso pico a TR de 11,7 min correspondiente a EC y que no coelúa con el resto de los picos inherentes al medio ya descritos en la Figura 4.8. También se identificó una pequeña cantidad del isómero de la EC, la catequina (C), con idéntico espectro de absorción UV-Vis aunque menor TR, 6,2 min. Su proporción alcanzó un 0,8% con respecto al estándar EC. La presencia de C en la disolución de EC llevó a estudiar su origen antes de proceder con los estudios de biodisponibilidad propiamente dichos. Para ello, se evaluó cromatográficamente el estándar EC disuelto en agua, revelando un contenido del 0,3% de C respecto de EC, estable en las siguientes 4 h a temperatura ambiente. Sin embargo, cuando la EC se disolvió en medio de cultivo se observó que el pico de C evolucionaba hasta el 0,8%, lo que pondría de manifiesto la influencia del medio de cultivo en la isomerización de EC a C.

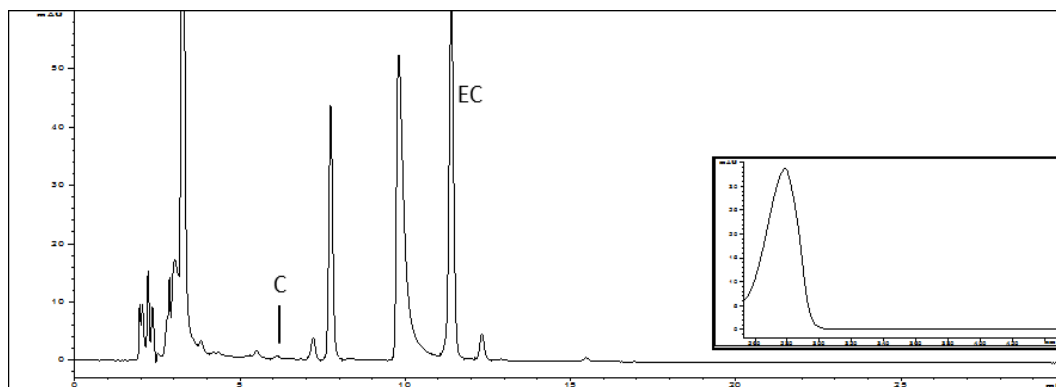


Figura 4.9. Perfil cromatográfico a λ_{max} 280 nm de epicatequina (EC) a concentración de 100 μM en medio de cultivo y espectro de absorción UV del estándar EC (inserto).

Una vez caracterizado el patrón, se llevó a cabo el estudio del metabolismo con las células Caco-2. Así, se adicionó la EC disuelta en medio de cultivo, conteniendo un pequeño porcentaje de DMSO, para favorecer su disolución en agua al preparar la disolución madre, junto con ácido ascórbico para protegerlo de la oxidación, quedando una concentración final en el pocillo de 100 μM del fenol, 0,1% de DMSO y 300 μM de ácido ascórbico. La EC se adicionó en el compartimento apical del Transwell y se incubó

con las células Caco-2 durante 1, 2 y 4 h para evaluar una posible relación tiempo dependiente con el rendimiento de la metabolización. Todos los medios presentes en ambos lados de la monocapa de células, apical y basolateral, además del contenido citoplasmático, se caracterizaron por HPLC-DAD a la λ_{\max} de 280 nm.

A modo de ejemplo, en la Figura 4.10 se representan los cromatogramas correspondientes al medio de cultivo de los compartimentos apical (AP) y basolateral (BL), además del contenido citoplasmático tras su lisis (LIS) después de la incubación de EC con las células durante 4 horas, por observarse mayor rendimiento del metabolismo del compuesto fenólico.

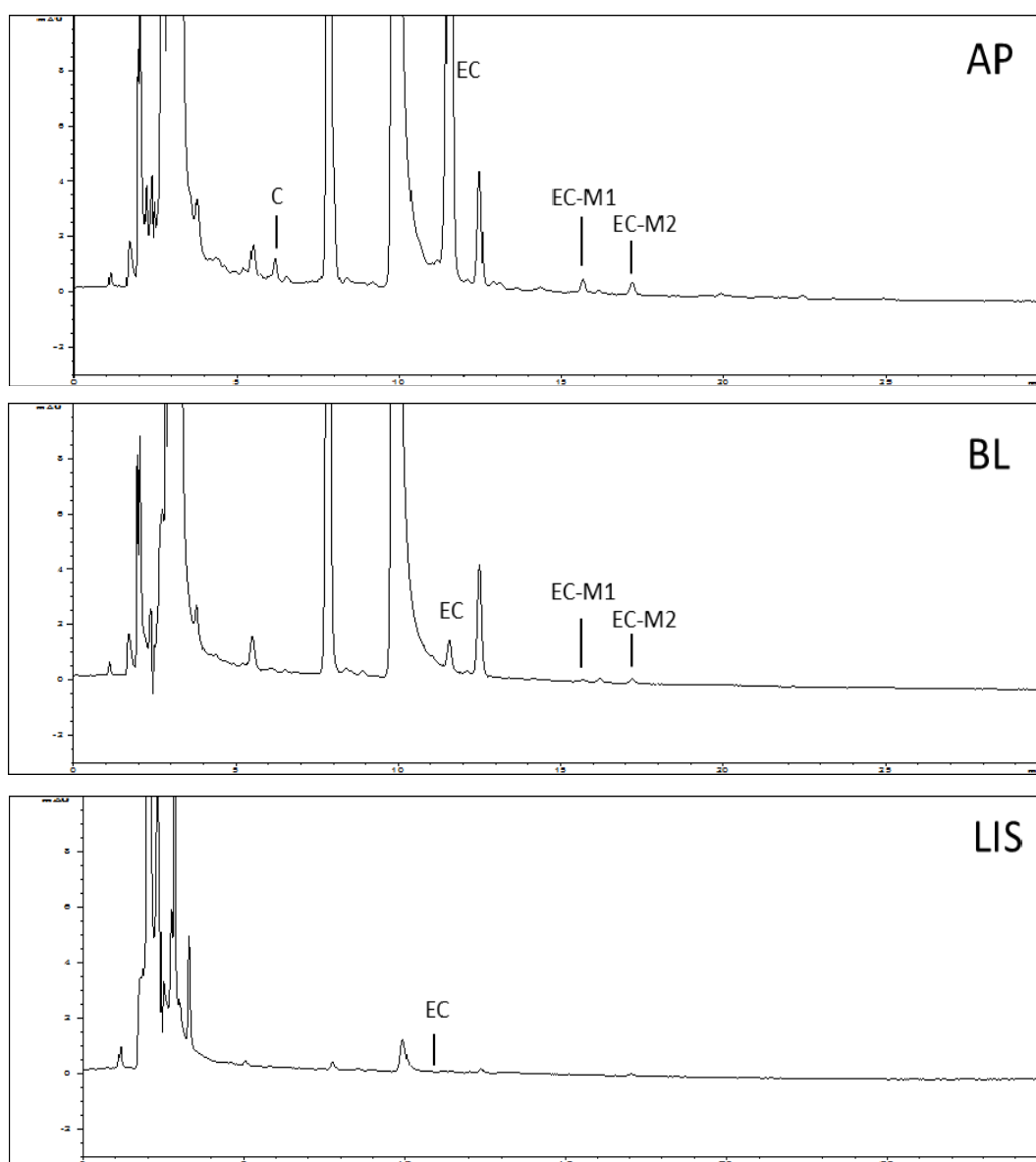


Figura 4.10. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 280 nm del compuesto EC a concentración 100 μ M tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h en los compartimentos apical (AP) y basolateral (BL), y en el contenido citoplasmático (LIS). EC: epicatequina, EC-M1 y EC-M2: metabolitos de EC.

En primer lugar se confirmó la absorción de EC a través de la monocapa celular Caco-2, al observarse un pico en el lado basolateral (Figura 4.10.BL.) a TR de 11,3 min e igual espectro UV-Vis que la EC, también presente en el contenido citoplasmático (Figura 4.10.LIS.).

También se identificó la presencia de C a TR 6,2 min en ambos compartimentos. Ahora bien, para discernir entre el efecto del medio de cultivo y el de las células Caco-2 para isomerizar la EC, paralelamente se monitorizó la evolución del estándar incubado en las mismas condiciones de concentración y tiempo (37°C y 5% CO₂ durante 1, 2 y 4 h) en ausencia de células. El análisis cromatográfico reveló una cierta constancia en el porcentaje de C respecto al contenido de EC (0,8%) frente al 1,4% registrado al cabo de las 4 h en presencia de las células. Sin embargo, esta pequeña diferencia no permite asegurar la intervención de las células en la isomerización de la EC, puesto que se encuentra dentro del margen de error de este tipo de estudios con células, (aproximadamente del 5% de error entre los replicados para valores de concentración de 100 µM, y superior a menor concentración, de estos estudios *in vitro* realizados en el laboratorio).

Además, se detectaron dos nuevos picos en el compartimento apical (Figura 4.10.AP.) a TR de 15,9 min y 17,5 min, etiquetados como EC-M1 y EC-M2, no descritos ni en el medio de cultivo (Figura 4.8.) ni en la disolución del standard con el medio de cultivo (Figura 4.9.), lo que sugirió que se trataban de productos generados a partir del metabolismo de EC. Estos picos presentaban un espectro UV-Vis similar a la EC, indicando pertenecer al mismo grupo de compuestos. Estos mismos picos se observaron también en el compartimento basolateral (Figura 4.10.BL.) y uno de ellos (EC-M1) en el contenido citoplasmático (Figura 4.10.LIS.), aunque sensiblemente más pequeño. De hecho, cabe mencionar que los cromatogramas de HPLC-DAD no siempre permitieron la observación de estos picos, aunque sí pudo confirmarse su presencia tras su análisis por LC-QTOF, como se verá más adelante. Al aparecer a TR más tardíos que el flavanol estudiado se especuló sobre la posibilidad de tratarse de derivados metilados de EC. Para comprobarlo, se recurrió a la síntesis de este compuesto mediante la reacción del patrón con S-adenosil metionina (SAM) catalizada por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), como se describe en la sección de Materiales y Métodos 3.2.2.2.5. El análisis cromatográfico tras la reacción enzimática reveló la presencia de dos picos a TR de 15,8 y 17,6 min y con el mismo espectro de absorción UV-Vis que la EC, por lo que se identificaron tentativamente como dos derivados metilados de EC

(Figura 4.11). Estos picos coincidieron con los hallados en las muestras procedentes de la incubación de EC con células Caco-2 en el lado apical y basolateral.

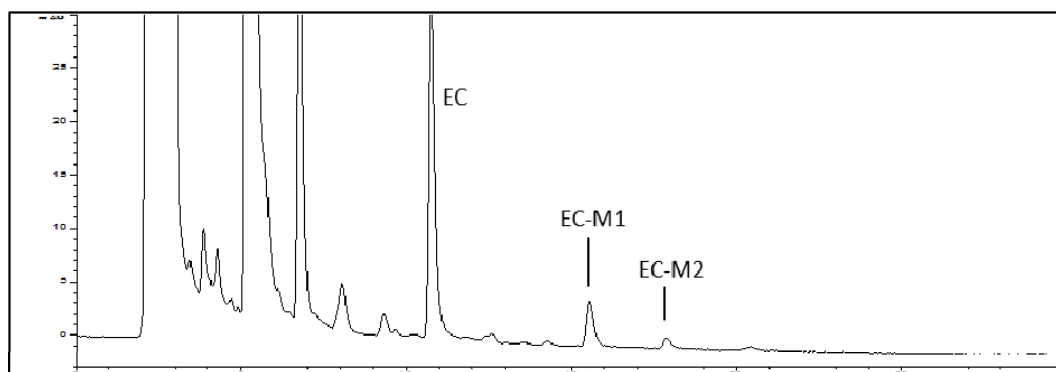


Figura 4.11. Perfil cromatográfico tras la síntesis *in vitro* de los derivados metilados de la epicatequina (EC) siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2.2.5. de Materiales y Métodos y evaluación por HPLC-DAD a λ_{max} 280 nm.

No se identificaron más picos de los comentados tras la incubación de EC con la monocapa de células Caco-2, aunque hay que tener en cuenta la limitada sensibilidad del HPLC-DAD para este tipo de estudios, por lo que no se podía descartar la presencia de algún metabolito a concentración inferior al límite de detección. Por ello, se recurrió al análisis de las muestras mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de espectrometría de masas simple cuadrupolo-tiempo de vuelo (HPLC-MS-QTOF) con una mayor sensibilidad que el HPLC-DAD.

El análisis de cualquier muestra por LC-QTOF proporciona un cromatograma denominado *Total Ion Chromatogram* (TIC) y el software MassHunter permite extraer el cromatograma a una masa seleccionada denominado *Extracted Ion Chromatogram* (EIC). Se llevó a cabo un estudio dirigido hacia la búsqueda de metabolitos derivados de EC por la acción de enzimas de fase II fundamentalmente, derivados glucuronidados, sulfatados y metilados y combinación entre ellos. Así, a partir del TIC se buscaron los potenciales metabolitos mediante el valor de la masa exacta derivada del ion cuasimolecular en modo negativo, $[M-H]^-$, dando lugar a los correspondientes EIC que se recogen en la Figura 4.12. En esta figura se muestran también los espectros de ionización de masas de los metabolitos identificados tras el análisis del medio de cultivo de los compartimentos apical y basolateral, además del contenido citoplasmático de las células Caco-2 incubadas con EC.

En la Tabla 4.7. se indican las características espectroscópicas de los metabolitos identificados tras el análisis por LC-QTOF, donde se detalla el TR, la masa teórica del ion molecular buscado, la masa observada, la fórmula molecular en base a la masa observada, el *score* o probabilidad de coincidencia entre la fórmula molecular teórica y propuesta (valores próximos a 100 indican gran similitud), el *error* o diferencia entre el valor teórico y el observado (sólo se aceptan diferencias <5 ppm), el fragmento observado tras su análisis por MS/MS y la identificación tentativa del compuesto.

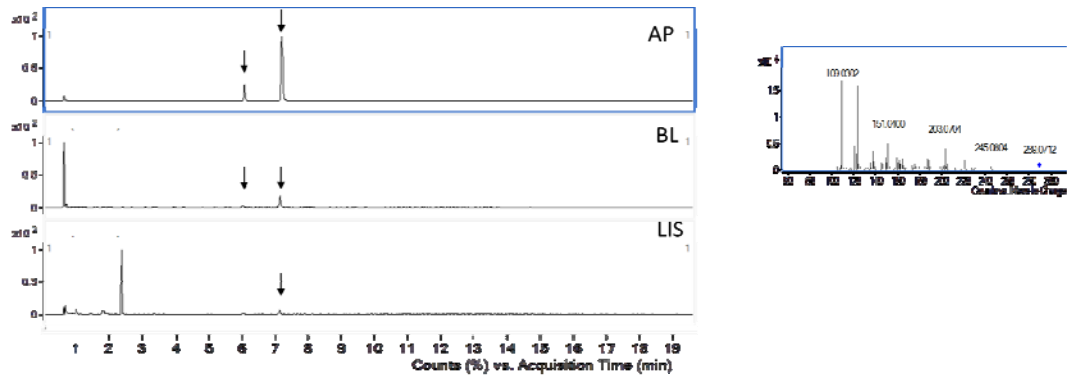
Tabla 4.7. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μ M epicatequina (EC) con células Caco-2 tras el análisis mediante LC-QTOF en modo negativo y confirmación por MS/MS.

TR (min)	Ion Molecular (M-H)		Fórmula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS ² (m/z)	Identificación Tentativa
	Masa Teórica	Masa Observada					
6,0	289,0718	289,0717	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	91,3	-4,51	245	Catequina
7,1	369,0286	369,0288	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	98,6	-0,56	289;245	Epicatequín-sulfato
7,2	289,0718	289,0724	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	93,9	-3,85	245	Epicatequina
7,5	303,0874	303,0879	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	99,0	-0,73	137	Metil-catequina
8,3	383,0402	383,0402	C ₁₆ H ₁₆ O ₉ S	98,7	-0,02	303;245;137	Metil-epicatequín-sulfato
8,5	369,0286	369,0288	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	98,6	-0,56	289;245	Epicatequín-sulfato
8,5	303,0874	303,0882	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	95,9	-2,72	137	Metil-epicatequina
8,8	383,0402	383,0402	C ₁₆ H ₁₆ O ₉ S	98,3	-0,62	303;245;137	Metil-epicatequín-sulfato
9,1	303,0874	303,0881	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	92,9	1,51	137	Metil-epicatequina

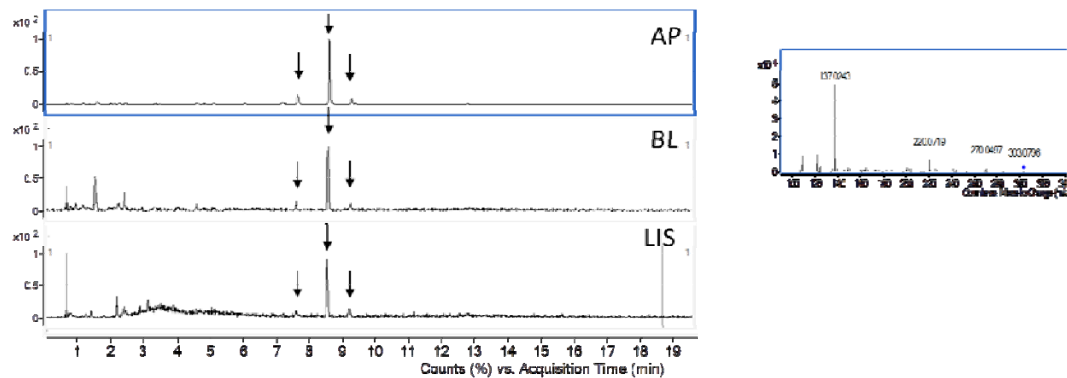
La búsqueda de la *m/z* 289,0718, correspondiente a EC y su isómero C, proporcionó dos picos a TR de 6,0 y 7,2 min, de aceptables valores de *score* y error, y fragmentación MS/MS propia de este compuesto. El análisis permitió la identificación de ambos compuestos en los compartimentos apical y basolateral, mientras que en el interior de la célula sólo se identificó EC (Figura 4.12.A.).

4. Resultados y Discusión

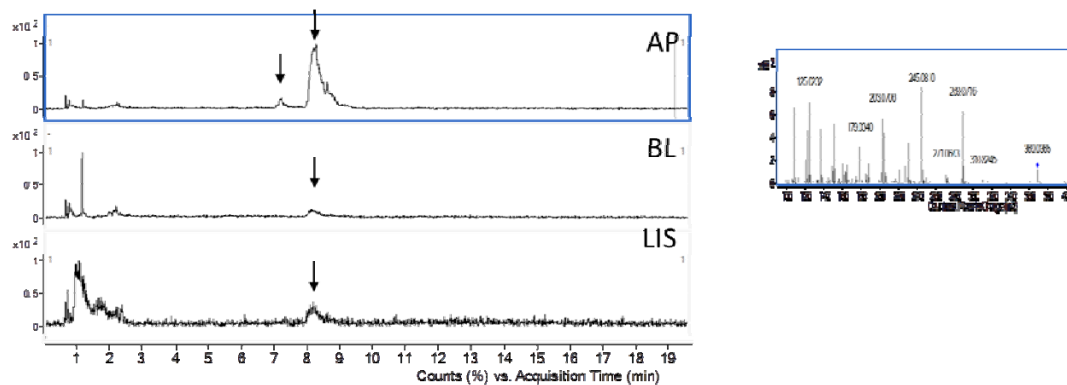
A. Catequina y Epicatequina



B. Metil-epicatequina



C. Epicatequín-sulfato



D. Metil-epicatequín-sulfato



Figura 4.12. *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación de células Caco-2 con EC y análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa. Lado apical (AP), lado basolateral (BL) y contenidos citoplasmáticos (LIS). Las condiciones de análisis se detallan en la sección 3.2.2.2.4 de Materiales y Métodos.

Igualmente, la extracción del valor m/z 303,0874, correspondiente al derivado metilado, dio lugar a tres picos cromatográficos que respondían a la masa molecular $C_{16}H_{16}O_6$ y fragmentación MS/MS ($303 \rightarrow 137$) (Figura 4.12.B.). El pico de mayor intensidad a TR 8,5 min se asignó a aquel ya caracterizado por LC-DAD, denominado EC-M1 a TR 15,9 min (Figura 4.10.AP.). El que aparece a TR posterior (9,1 min) se asignó a otro derivado metilado de la EC (EC-M2 a TR 17,5 min, Figura 4.10. AP.). Ahora bien, cabe destacar que la enzima catecol-*O*-metiltransferasa (COMT), responsable de la metilación de la EC, precisa de un grupo ortodifenólico para que tenga lugar la reacción de metilación, por lo que a partir de la molécula de EC sólo se podría justificar la formación de dos derivados metilados. La presencia de un tercer derivado metilado se justifica teniendo en cuenta el isómero identificado de la EC, la catequina, que además eluye antes que la propia EC, en consonancia con el menor TR registrado para este metabolito de todos los derivados metilados identificados (TR 7,5 min). Este compuesto no se detectó por LC-DAD al encontrarse a nivel de trazas, por debajo del límite de detección.

El análisis de las muestras por LC-QTOF también permitió identificar metabolitos sulfatados derivados de EC. La búsqueda del ion cuasimolecular a m/z 369,0286 proporcionó dos picos a TR 7,1 y 8,3 min de idéntico patrón de fragmentación al generar el ion-fragmento m/z 289 durante el análisis en modo MS/MS, que permitió confirmar la identidad de estos derivados sulfatados de la EC (Figura 4.12.C.). De la misma manera se identificó la presencia de dos derivados metil-sulfatados de la EC con gran fiabilidad, como se desprende de los parámetros de score o error, al observar dos iones a m/z 383,0402 a los TR 8,3 y 8,8 min y el ion-fragmento a m/z 303, propio del derivado metilado de EC (Figura 4.12.D.). El análisis mediante LC-DAD no permitió detectar ninguno de los derivados sulfatados identificados por LC-QTOF.

Por último, no se detectó la presencia de ningún derivado glucuronidado de EC o C.

Todos los metabolitos identificados derivados de la EC y C se detectaron tanto en el interior celular como extracelularmente en ambos compartimentos, a excepción de uno de los derivados sulfatado de EC que sólo se detectó en el compartimento apical y de la C, que no se encontró en el interior de las células (Tabla 4.8).

4. Resultados y Discusión

Tabla 4.8. Presencia extracelular (apical y basolateral) e intracelular de los distintos metabolitos de epicatequina generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.

TR (min)	Compuesto	Extracelular Apical	Extracelular Basolateral	Intracelular
6,0	Catequina	x	x	
7,1	Epicatequín-sulfato	x		
7,2	Epicatequina	x	x	x
7,5	Metil-catequina	x	x	x
8,3	Metil-epicatequín-sulfato	x	x	x
8,5	Epicatequín-sulfato	x	x	x
8,5	Metil-epicatequina	x	x	x
8,8	Metil-epicatequín-sulfato	x	x	x
9,1	Metil-epicatequina	x	x	x

Cabe mencionar que el análisis por LC-QTOF arrojó TR más pequeños que aquellos registrados mediante el análisis por LC-DAD, de acuerdo a las condiciones de análisis utilizadas y detalladas en Materiales y Métodos sección 3.2.2.2.4. Tampoco coinciden con aquellos TR obtenidos tras la caracterización de la fracción fenólica de los productos solubles de cacao, por emplear distintas condiciones cromatográficas (Ver Materiales y Métodos sección 3.2.1.3.).

Los compuestos identificados procedentes del metabolismo de EC en este tipo de células Caco-2 están en concordancia con otros resultados previamente descritos en la bibliografía. Así, en el estudio de transporte y metabolismo de EC llevado a cabo por Vaidyanathan y Walle (2001) no identificaron derivados metilados, pero en cambio caracterizaron dos metabolitos que los autores identificaron tentativamente como derivados sulfatados de EC, al responder a la hidrólisis con la enzima sulfatasa. Por otra parte, Zhang y cols. (2004) evaluaron comparativamente las catequinas presentes en el té verde (EC, ECG, epigalocatequina y epigalocatequín-galato) y caracterizaron derivados sulfatados fundamentalmente, además de derivados metilados y metilsulfatados. De acuerdo con nuestros resultados, estos autores tampoco identificaron derivados glucuronidados de EC.

El estudio del transporte de la EC a través de la monocapa de células Caco-2 permitió determinar el sentido dominante de transferencia, absorción o eflujo. A partir del coeficiente de permeabilidad aparente (Papp), expresado en cm/s, se cuantificó la velocidad de transferencia en el sentido de entrada desde el lumen intestinal a la circulación portal (sentido apical (AP)-basolateral (BL)) y de salida (BL-AP), mediante experimentos independientes, incubando el compuesto en el compartimento contrario al de la transferencia. Los valores de Papp se calcularon a partir de los datos resultantes de la incubación durante 1 h, dado que se ha descrito que tiene lugar un transporte

lineal a períodos cortos de incubación y los metabolitos, en general, representan una cantidad pequeña (Artursson y Karlsson, 1991). En la Tabla 4.9. se indican los valores del coeficiente Papp para los transportes en ambos sentidos (AP-BL y BL-AP) de la EC en células Caco-2, así como la relación entre ellos, que informa sobre el índice de absorción (IA) ($Papp_{AP-BL}/Papp_{BL-AP}$). Los resultados muestran que, aunque la EC se transporta en ambos sentidos, la mayor velocidad de salida que de entrada ($Papp_{AP-BL} < Papp_{BL-AP}$) limita la permeabilidad de la EC a través de la monocapa de células Caco-2 con un transporte preferentemente de eflujo.

Tabla 4.9. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) de entrada desde el compartimento apical al basolateral (AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (BL a AP) e índice de absorción (IA) determinado como el cociente ($Papp_{AP-BL}/Papp_{BL-AP}$).

Compuesto	AP a BL ($Papp \times 10^{-6} \text{ cm/s}$)	BL a AP ($Papp \times 10^{-6} \text{ cm/s}$)	Índice de Absorción (IA)
Epicatequina	0,15 ± 0,03	0,41 ± 0,06	0,36 ± 0,04

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 6).

Estos resultados están de acuerdo con otros previamente publicados (Vaidyanathan y Walle, 2001; Zhang y cols., 2004; Tian y cols., 2009), donde se detallaba una mayor velocidad de paso a través del epitelio hacia el lumen mediado por un mecanismo de eflujo con la intervención del transportador MRP2, tras observar la disminución del coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) cuando las células fueron incubadas con el inhibidor de MRP2, MK571.

Además de evaluar el transporte preferente de la EC a través de la monocapa de células Caco-2, se completó la cuantificación del resto de metabolitos mediante el equipo HPLC-DAD y no LC-QTOF, puesto que el objetivo inicial de este estudio fue determinar su capacidad para traspasar la barrera epitelial intestinal, y dicha transferencia tuvo lugar a niveles superiores al límite de cuantificación del HPLC-DAD. En la Tabla 4.10. se indican las cantidades de EC y metabolitos derivados cuantificados intra- y extracelularmente en los compartimentos apical y basolateral a los distintos tiempos de incubación (1, 2 y 4 horas), utilizando la recta de calibrado de EC y expresando los resultados en concentración (μM) equivalente de EC.

Tabla 4.10. Cuantificación intra- y extracelularmente de la epicatequina y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.

Compuesto		Concentración (μM)			
		0 h	1 h	2 h	4 h
Lado apical	Epicatequina	99,2 \pm 4,0	98,0 \pm 4,0	97,0 \pm 5,0	95,1 \pm 5,0
	Catequina	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2
	Metil-epicatequina	N.d.	N.d.	0,3 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1
	Metil-epicatequina	N.d.	N.d.	0,4 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2
Lado basolateral	Epicatequina		0,4 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,3
	Catequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-epicatequina		N.d.	Trazas	Trazas
	Metil-epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.
Lisados	Epicatequina		Trazas	Trazas	Trazas
	Catequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-epicatequina		N.d.	Trazas	Trazas
	Metil-epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.

Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar (n = 6). N.d.: No detectado.

Se observó una relación directa entre el tiempo de incubación y la cantidad transferida a través de la monocapa de células Caco-2 aunque, de acuerdo a la limitada permeabilidad descrita, el contenido de EC apenas alcanzó un 2% de la cantidad total en el compartimento basolateral al cabo de las 4 h. El derivado metilado apareció en mayor concentración en el lado apical que en el basolateral a 2 y 4 horas, lo que estaría indicando un posible mecanismo de eflujo en lugar de absorción. Los derivados sulfatados de EC no se recogen en esta tabla por no detectarse en el análisis por HPLC-DAD. Por último, el contenido intracelular mostró niveles por debajo del límite de detección y/o cuantificación tanto de los metabolitos como del compuesto parental, lo que sugiere la no acumulación intracelular en los tiempos de incubación analizados. De la misma manera, también Tagashira y cols, (2012) observaron una escasa acumulación intracelular para este flavanol.

4.2.3.2. Metabolismo y Transporte de Epicatequín-3-galato (ECG) por Células Caco-2

El análisis cromatográfico de ECG disuelto directamente en medio de cultivo a concentración de 100 μM previo a su incubación con las células Caco-2 dio lugar a un pico intenso a TR de 18,7 min con un espectro UV-Vis propio de un flavanol y libre de interferencias con el resto de picos inherentes del medio (Figura 4.13.). También se observan dos picos a TR 6,4 min y 11,3 min cuyas características espectroscópicas fueron

coincidentes con la C y EC estudiadas en el apartado anterior. Adicionalmente se observa un pico a TR 20,2 min, con espectro UV-Vis idéntico a ECG, sugiriendo pertenecer a la misma familia de compuestos, aunque de identidad desconocida etiquetado como X.

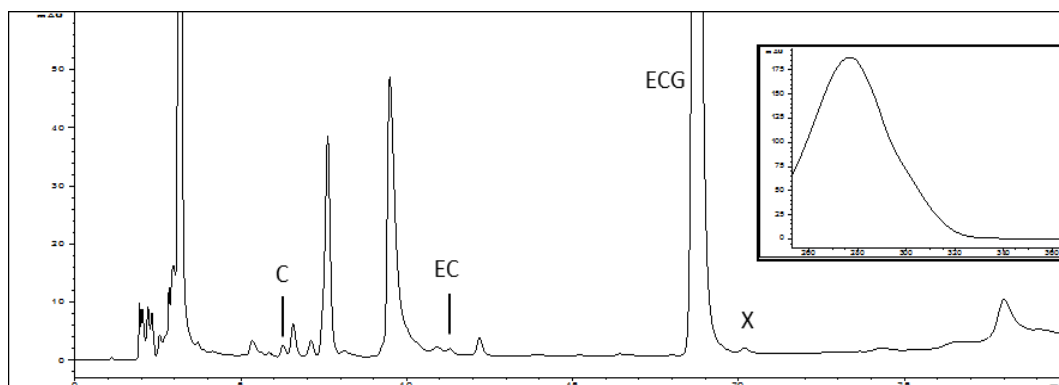


Figura 4.13. Perfil cromatográfico a λ_{max} 280 nm del compuesto epicatequín-3-galato (ECG) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar ECG (inserto).

La evaluación cromatográfica de la disolución acuosa del estándar ECG reveló la ausencia de catequina y la presencia de un 0,2% de EC, estable durante 4 h a temperatura ambiente. Cuando el patrón se disolvió en medio de cultivo y se mantuvo 4 h en las mismas condiciones de los cultivos celulares (37°C, 5% CO_2) se detectó un 0,4 y 0,2% de EC y C, respectivamente, por lo que se podría inferir una ligera inestabilidad del compuesto ECG en el medio de cultivo, además de la isomerización EC a C ya descrita en el apartado anterior con los ensayos con EC, si bien estas pequeñas diferencias entrarían dentro del margen de error en la determinación cromatográfica. El pico etiquetado como X mostró un comportamiento similar, aumentando un 1% su proporción respecto al ECG cuando se mantuvo en medio de cultivo durante 4 h, en línea con el aumento observado tras su incubación con las células (1,5%), dificultando aseverar la participación de las células en este fenómeno de transformación de ECG en X.

Para continuar con los ensayos de metabolismo y transporte de ECG por las células Caco-2, se adicionó ECG en la cámara apical del Transwell a una concentración final de 100 μM y 300 μM de ácido ascórbico para protegerlo de la oxidación. Como en los ensayos anteriores, se mantuvo en contacto con las células durante 1, 2 y 4 h, analizando las muestras generadas a todos los tiempos por HPLC-DAD. A modo de ejemplo en la Figura 4.14. se muestra el perfil cromatográfico del medio de cultivo del

compartimento apical (AP) y basolateral (BL), además del contenido citoplasmático (LIS) de las células que estuvieron en contacto con ECG durante 4 h.

En el compartimento apical, además de ECG se pueden observar dos picos a TR 6,2 min y 11,6 min (Figura 4.14.AP), ausentes tanto en el compartimento basolateral (Figura 4.14.BL) como en el contenido citoplasmático (Figura 4.14.LIS.). Estos picos presentan características espectroscópicas similares a las de C y EC ya caracterizados en el estudio del metabolismo de EC. La proporción de estos compuestos (0,5% en ambos casos) evidencia un ligero cambio del contenido de C en comparación con el registrado en la disolución de ECG en medio de cultivo (0,4 y 0,2% para el EC y C, respectivamente). Esto podría sugerir una pequeña capacidad de las células Caco-2 para hidrolizar ECG a EC y posterior isomerización a C, aunque hasta la fecha no se ha reportado la hidrólisis de ECG en contacto con células Caco-2; además, estos cambios se hallan dentro de la propia incertidumbre de los replicados, por lo que no es posible confirmar la hidrólisis de ECG por las células Caco-2.

Adicionalmente, en el compartimento basolateral aparece un pico a TR 18,7 min (Figura 4.14.BL.) de idéntico espectro al estándar ECG, lo que confirma que este flavanol traspasa la monocapa de células Caco-2, siendo esto además compatible con la detección de una cantidad significativa de este compuesto en el contenido citoplasmático (Figura 4.14.LIS.).

Por otra parte, se ha identificado un pico a TR 24,1 min etiquetado como ECG-M1, de espectro UV-Vis idéntico al estándar ECG y coincidente con aquel pico obtenido tras la síntesis *in vitro* de derivados metilados de ECG (Figura 4.15.). Aunque la incubación de ECG con COMT en presencia del donante de grupos metilo SAM dio lugar a la formación de 2 derivados metilados ECG-M1 y ECG-M2, el análisis de los medios de cultivo tras la incubación de ECG con células Caco-2 sólo rindió el pico ECG-M1.

Por último, cabe destacar la aparición del pico a TR 20,2 min, detectado tanto en el lado apical (Figura 4.14.AP.) como en el contenido citoplasmático (Figura 4.14.LIS.), así como en las muestras tras la síntesis *in vitro* de derivados metilados (Figura 4.15.). Este pico, etiquetado como X, presentaba idéntico espectro al patrón ECG, si bien no aparecía en la disolución acuosa del estándar ECG y sí en cambio al disolverlo en el medio de cultivo previo a su incubación con las células (Figura 4.13.), con un contenido semejante al identificado tras poner en contacto con las células Caco-2, por lo que podría tratarse de un artefacto ajeno al metabolismo de las células.

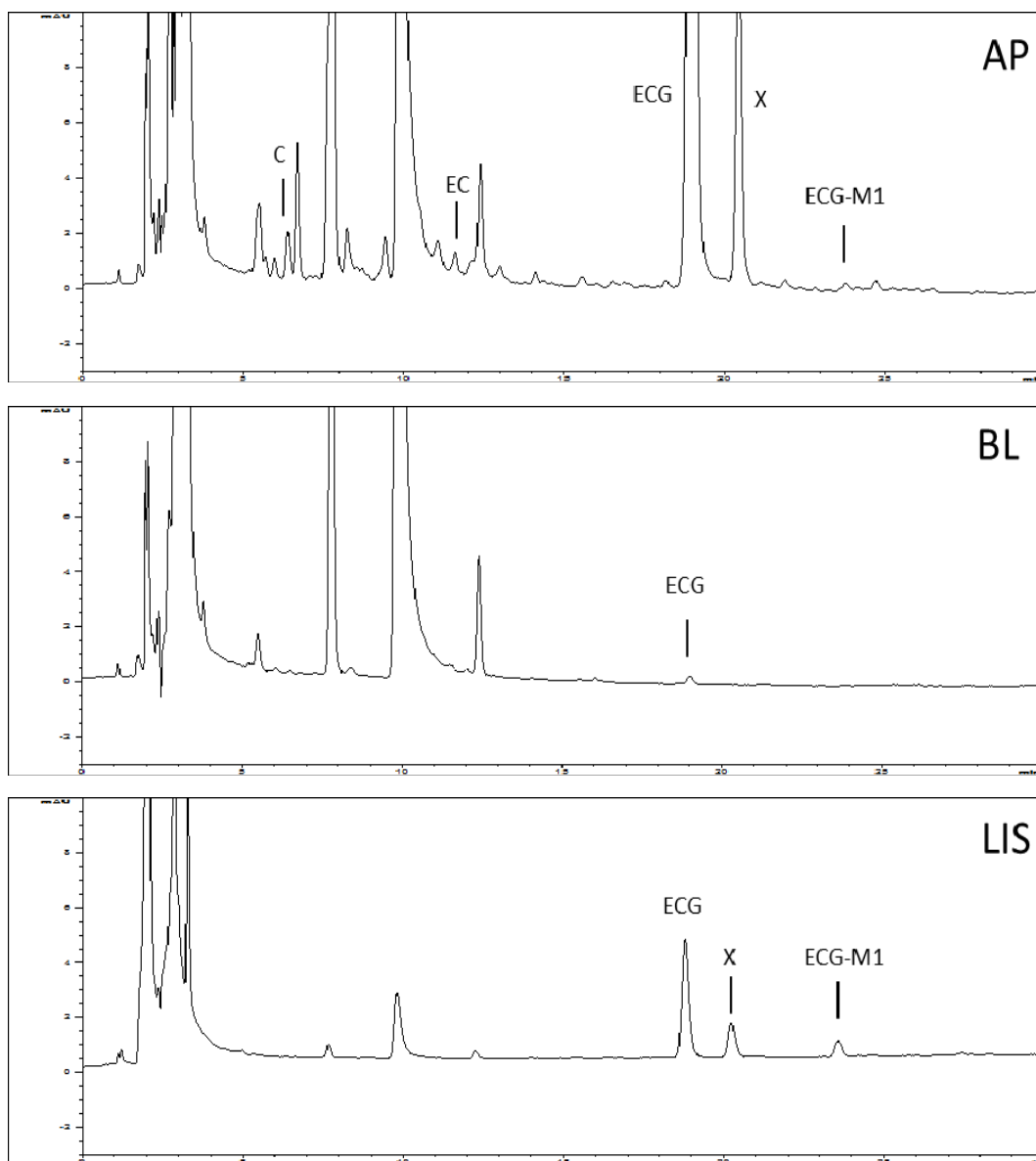


Figura 4.14. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 280 nm del compuesto ECG a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h en los compartimentos apical (AP) y basolateral (BL) y en contenido citoplasmático (LIS). Siembra en el compartimento apical. ECG: epicatequíngalato, ECG-M1: metabolito de ECG, C: catequina, EC: epicatequina, X: compuesto no identificado.

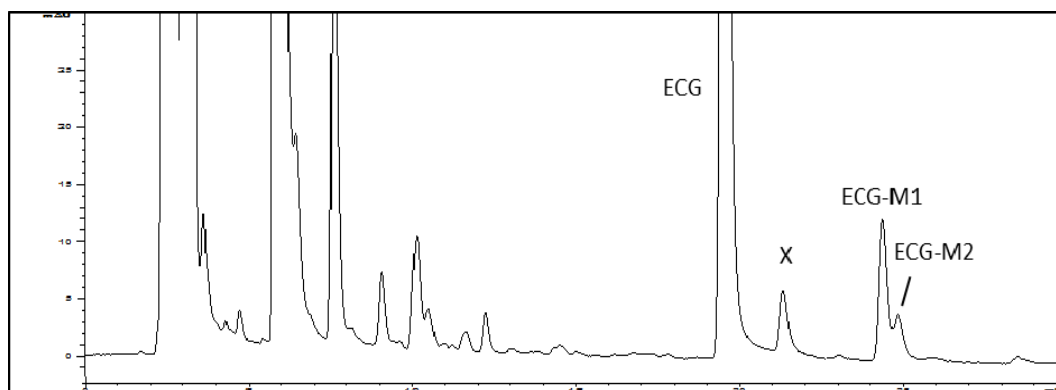
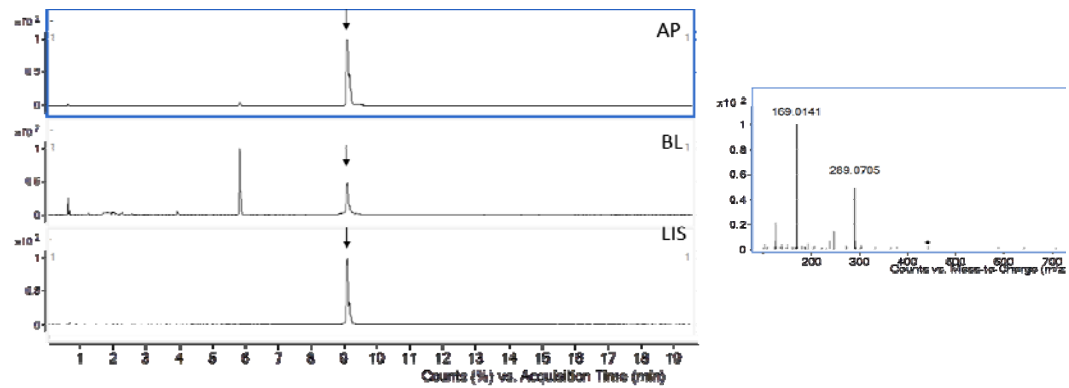


Figura 4.15. Perfil cromatográfico de la síntesis *in vitro* de los derivados metilados de epicatequín-3-galato (ECG) siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.2.2.5 de Materiales y Métodos y evaluación por HPLC-DAD a λ_{\max} 280 nm.

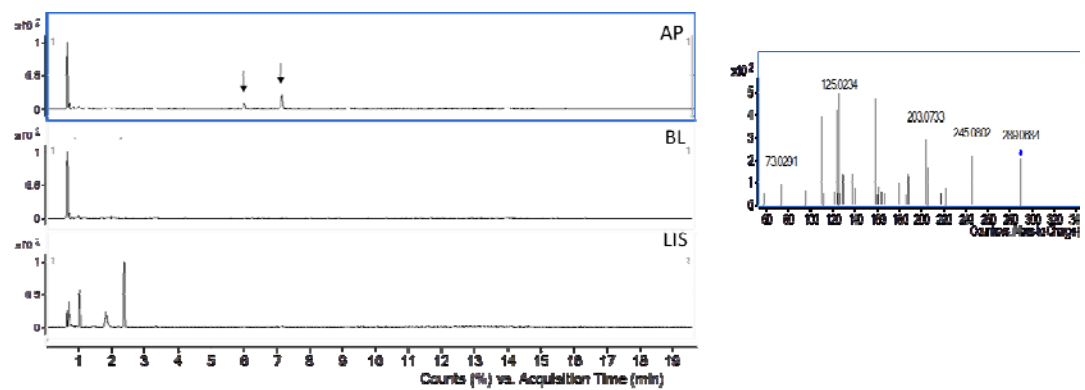
Para completar la caracterización del metabolismo de ECG se recurrió al análisis por LC-QTOF. Así, a partir del cromatograma TIC se extrajo el EIC correspondiente a los potenciales metabolitos derivados de ECG mediante la búsqueda de los iones cuasimoleculares $[M-H]^-$ en modo negativo. En las Figuras 4.16. y 4.17. se representan los EIC y espectros de ionización de masas de los metabolitos identificados tras su confirmación mediante el análisis por MS/MS que se comenta a continuación.

La búsqueda del ion cuasimolecular $[M-H]^-$ correspondiente al estándar ECG arrojó dos picos a TR de 5,9 y 9,1 min, presentes tanto extra- como intracelularmente. Sin embargo, solamente el segundo pico a TR 9,1 min fue compatible con su estructura química (iones-fragmento a m/z 289 y 169 propios de las unidades EC y ácido gálico, respectivamente) (Figura 4.16.A). El pico cuyo TR fue 5,9 min mostró una relación m/z de 440,1324 con fórmula molecular propuesta por el software MassHunter de $C_{20}H_{25}O_{11}$, *a priori* incompatible con la molécula ECG.

A. Epicatequín-3-galato



B. Catequina y epicatequina



C. Metil-epicatequín-3-galato

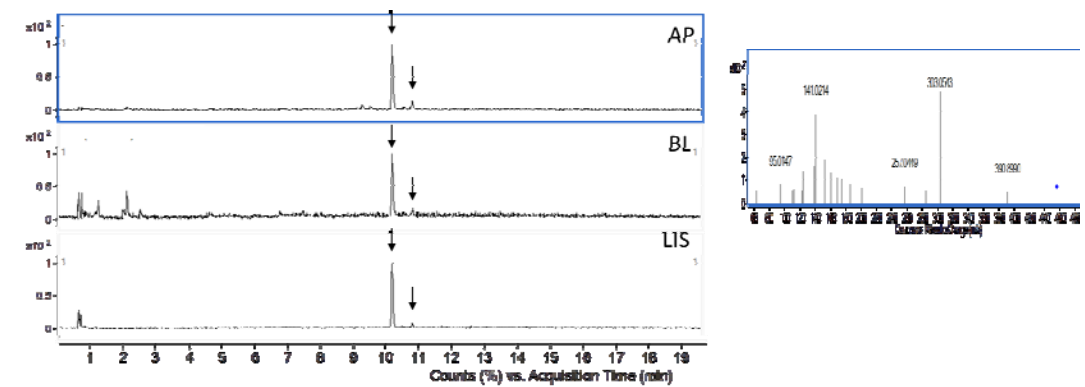
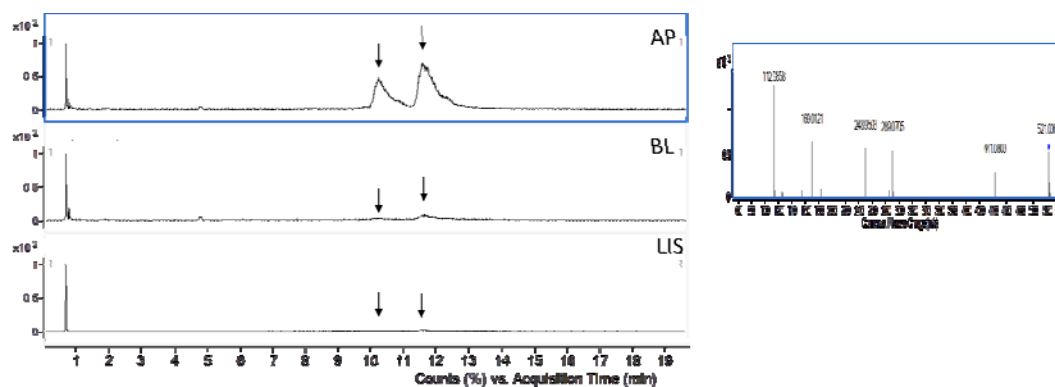


Figura 4.16. *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación de ECG con células Caco-2 y su análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa. Lado apical (AP), lado basolateral (BL) y lisados (LIS). Las condiciones de análisis se detallan en la sección 3.2.2.2.4 de Materiales y Métodos.

A. Epicatequín-3-galato-sulfato



B. Metil-epicatequín-3-galato-sulfato

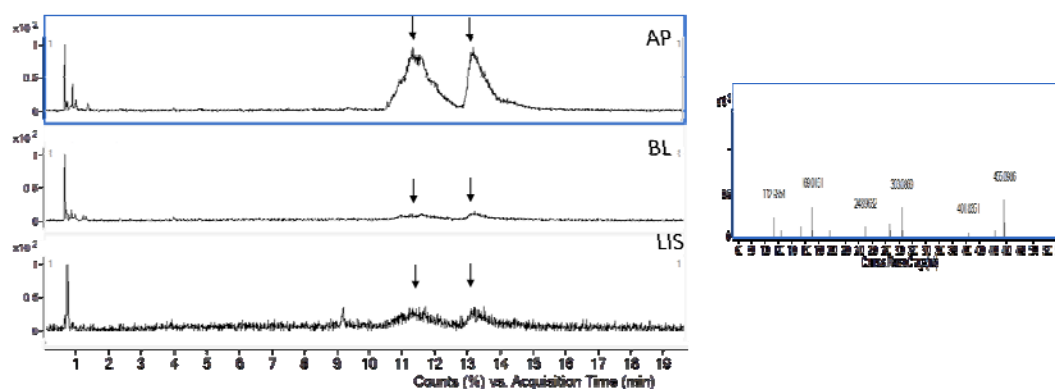


Figura 4.17. *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación de ECG con células Caco-2 y su análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa. Lado apical (AP), lado basolateral (BL) y lisados (LIS). Las condiciones de análisis se detallan en la sección 3.2.2.2.4 de Materiales y Métodos.

Por otra parte, y dado que la EC se había detectado mediante el análisis por HPLC-DAD, se extrajo el ion cuasimolecular correspondiente a m/z 289,0718 (Figura 4.16.B.). El resultado mostró dos picos con dicha relación de m/z a TR 6,0 min y 7,2 min correspondiente a los flavanoles C y EC, respectivamente, como ya se había descrito en el estudio de biodisponibilidad de EC con las células Caco-2. Estos compuestos sólo se detectaron en el lado apical de la monocapa celular. No se identificaron otros derivados conjugados de EC o C.

Otro compuesto tentativamente identificado mediante el análisis de las muestras por HPLC-DAD y la reacción de síntesis *in vitro* fue el derivado metilado de ECG. En la Figura 4.16.C. se recoge el EIC correspondiente al ion cuasimolecular m/z 455,0984, donde se pueden observar dos picos cromatográficos, uno significativamente más intenso a 10,1 min que el otro a 10,9 min, presentes tanto intra- como

extracelularmente en los compartimentos AP y BL. El software MassHunter asignó inequívocamente estos picos a los derivados metilados de ECG, coherente con el ion-fragmento de m/z 303 observado, correspondiente a la forma metilada de EC tras la pérdida del ácido gálico deshidratado (m/z 152).

El pico cromatográfico etiquetado en el análisis por HPLC-DAD como X (TR 20,2 min) mostró un valor para la relación m/z de 441,0836 y una fórmula molecular tentativa ($C_{15}H_{14}O_6$) coincidente con el propio ECG, lo que nos permitió concluir que este pico (X) podría tratarse de un isómero de ECG, compatible con su estructura química (Figura 4.16.A.). Cabe destacar que el análisis mediante LC-QTOF no ofreció una buena resolución para este pico, solapando con el propio estándar ECG, aunque el cromatograma EIC (Figura 4.16.A.) permite visualizar perfectamente que el pico ECG presenta un hombro correspondiente con X, de idéntico espectro de masas.

Aparte de los metabolitos inicialmente propuestos tras el análisis cromatográfico (HPLC-DAD) se amplió la búsqueda a otros metabolitos de ECG, tales como los derivados sulfatados y/o glucuronidados. Así, se pudo confirmar la presencia de dos derivados sulfatados de ECG (m/z 521,395), avalados por el ion-fragmento que se generó tras el análisis MS/MS a m/z 441 propio de ECG por pérdida del grupo sulfato (m/z 80). En el registro EIC (Figura 4.17.A.) se recogen los dos picos a TR 10,4 y 11,9 min de los derivados sulfatados identificados, presentes fundamentalmente en el compartimento apical, aunque también se detectaron en el compartimento basolateral y en el lisado celular.

Por último, se ha identificado la presencia de metilsulfoderivados de ECG como inequívocamente ha respaldado el análisis de los espectros de masas ($[M-H]^-$ a m/z 535,0560 e ion-fragmento a m/z 455 correspondiente con el derivado metilado de ECG tras la pérdida del grupo sulfato) y resto de parámetros como el *score* y el *error*. Estos metabolitos se identificaron tanto fuera como dentro de la célula (Figura 4.17.B.)

No se identificó ninguna forma derivada de ECG que contuviera grupos glucurónidos.

En la Tabla 4.11. se recogen las características espectroscópicas de los metabolitos derivados de ECG generados tras la incubación de ECG con las células Caco-2 e identificados mediante LC-QTOF.

Estos resultados concuerdan con aquellos previamente descritos por Zhang y cols., 2004, quienes describieron la formación de derivados metilados, sulfatados y

4. Resultados y Discusión

metilsulfatados de ECG en el mismo modelo celular, mientras que no detectaron derivados glucuronidados.

Tabla 4.11. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μ M epicatequín-3-galato (ECG) con células Caco-2 y análisis mediante LC-QTOF en modo de ionización negativa y confirmación por MS/MS.

TR (min)	Ion Molecular (M-H) ⁻		Formula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS ² (m/z)	Identificación Tentativa
	Masa Teórica	Masa Observada					
6,0	289,0718	289,0718	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	97,8	-0,13	245	Catequina
7,2	289,0718	289,0723	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	97,3	-1,94	245	Epicatequina
9,1	441,0827	441,0836	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	93,6	-2,19	289	ECG
10,1	455,0984	455,0980	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	98,1	0,31	303	Metil-ECG
10,4	521,0395	521,0390	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₃ S	99,3	0,6	441;289	ECG-sulfato
10,9	455,0984	455,0991	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	93,7	1,94	303	Metil-ECG
11,5	535,0552	535,0558	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃ S	90,9	0,8	455;303	Metil-ECG-sulfato
11,9	521,0395	521,0393	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₃ S	94,7	0,23	441;289	ECG-sulfato
13,3	535,0552	535,0560	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃ S	86,5	0,24	455;303	Metil-ECG-sulfato

En la Tabla 4.12 se indica la ubicación de todos los metabolitos derivados de ECG generados a partir del metabolismo de las células Caco-2. Tanto el estándar ECG como sus derivados conjugados metilados, sulfatados y metilsulfatados se detectaron intra- y extracelularmente en ambos compartimentos, mientras que la C y EC solamente se hallaron en el compartimento apical (Tabla 4.12.).

Tabla 4.12. Presencia extracelular (apical y basolateral) e intracelular de los distintos metabolitos de epicatequín-3-galato (ECG) generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.

TR (min)	Compuesto	Extracelular Apical	Extracelular Basolateral	Intracelular
6,0	Catequina	x		
7,2	Epicatequina	x		
9,1	ECG	x	x	x
10,1	Metil-ECG	x	x	x
10,4	ECG-sulfato	x	x	x
10,9	Metil-ECG	x	x	x
11,5	Metil-ECG-sulfato	x	x	x
11,9	ECG-sulfato	x	x	x
13,3	Metil-ECG-sulfato	x	x	x

La valoración del transporte de ECG a través de la monocapa intestinal de células Caco-2 se realizó como ya se ha explicado con el compuesto anterior, calculando el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp), expresado en cm/s, a través de la monocapa intestinal en ambos sentidos tras 60 min de incubación con las células Caco-2 (Tabla 4.13.).

Tabla 4.13. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) de entrada desde el compartimento apical al basolateral (AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (BL a AP) e índice de absorción (IA), determinado como el cociente (Papp AP-BL/PappBL-AP).

Compuesto	AP a BL	BL a AP	Índice de Absorción (IA)
	(Papp x 10 ⁻⁶ cm/s)	(Papp x 10 ⁻⁶ cm/s)	
Epicatequín-3-galato	0,18 ± 0,01	0,32 ± 0,12	0,54 ± 0,01

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 6).

Los resultados muestran una mayor velocidad de salida que de entrada y, por tanto, un índice de absorción menor que 1, lo que sugiere una limitada absorción de ECG por las células Caco-2. Estos resultados concuerdan con el mecanismo preferente de eflujo descrito para este fenol en base al menor valor para el parámetro Papp AP a BL que Papp BL a AP (Zhang y cols., 2004; Kadowaki y cols., 2008). El paso del compuesto ECG a través del enterocito fue caracterizado por Vaidyanathan y Walle (2003), quienes describieron un mecanismo de absorción mediado por el transportador MCT y de eflujo por acción de los transportadores MRP2 y P-glicoproteína. Otros autores también han apuntado un posible mecanismo de eflujo en la absorción del compuesto ECG a través de la monocapa celular (Kadowaki y cols., 2008).

En la Tabla 4.14. se indican las cantidades de ECG y metabolitos derivados a los distintos tiempos de incubación (1, 2 y 4 horas) mediante HPLC-DAD, utilizando la recta de calibrado de ECG (ver apartado 3.2.2.2.4. en Materiales y Métodos) y expresando los resultados como concentración μM equivalente de ECG.

Tabla 4.14. Cuantificación intra- y extracelularmente de epicatequín-3-galato (ECG) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.

Compuesto	Concentración (μM)				
	0 h	1 h	2 h	4 h	
Lado apical	Epicatequín-3-galato	94,4 ± 1,0	85,7 ± 8,9	79,7 ± 8,2	63,5 ± 7,5
	Isómero ECG	5,1 ± 0,8	8,3 ± 0,9	10,3 ± 1,1	12,2 ± 0,8
	Epicatequina	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	Catequina	N.d.	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	Metil-epicatequín-3-galato	N.d.	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Lado basolateral	Epicatequín-3-galato		0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,3	2,1 ± 0,3
	Isómero ECG		N.d.	N.d.	N.d.
	Epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Catequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-epicatequín-3-galato		N.d.	N.d.	N.d.
Lisados	Epicatequín-3-galato		N.d.	N.d.	2,3 ± 0,3
	Isómero ECG		N.d.	N.d.	1,3 ± 0,3
	Epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Catequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-epicatequín-3-galato		N.d.	N.d.	0,9 ± 0,2

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 6). N.d.: No detectado.

Los resultados muestran una relación directa entre el tiempo de incubación y la absorción de ECG, basado en las cantidades crecientes registradas en el compartimento basolateral para este compuesto, aunque de forma limitada como sugiere la concentración máxima de 2,1 μM de ECG al cabo de las 4 h de incubación. De todos los metabolitos identificados sólo los metil derivados presentaron valores por encima del límite de cuantificación del HPLC-DAD y sólo se han registrado en el compartimento apical, lo que pone de manifiesto un mecanismo de eflujo para los metabolitos de esta naturaleza. El creciente contenido de los monómeros EC y C a lo largo del tiempo podría sugerir la capacidad de las células de hidrolizar el compuesto ECG a EC y posterior isomerización del monómero EC a C. Sin embargo, puesto que el mantenimiento del compuesto ECG en medio de cultivo también genera unos niveles parecidos de EC y C, es difícil precisar la posible contribución de las células o su implicación en la hidrólisis del compuesto ECG. Por último, cabe destacar el alto contenido intracelular de ECG (2,8% del total de metabolitos cuantificados), significativamente mayor que el descrito para el flavanol EC (nivel de trazas). Estos resultados están de acuerdo con aquellos descritos por Tagashira y cols. (2012), quienes observaron una acumulación intracelular 1,5 veces mayor para el compuesto ECG que EC, dependiente de la concentración y el tiempo. Estos autores postularon que la unión del compuesto EC con el ácido gálico en la molécula ECG podría inhibir parcialmente al transportador de eflujo, justificando la mayor acumulación intracelular del compuesto ECG respecto al monómero EC no galoilado. También es notable la concentración del derivado metilado de ECG acumulado en el interior celular (0,9 μM).

4.2.3.3. Metabolismo y Transporte de Procianidina B2 (PB2) por Células Caco-2

Al igual que con los compuestos anteriores, se caracterizó cromatográficamente el patrón PB2 (100 μM) disuelto en medio de cultivo (Figura. 4.18.). El cromatograma muestra un pico a TR 9,5 min correspondiente a PB2 que no coelúa con el resto de los picos propios del medio de cultivo. Adicionalmente se detectó la presencia de C (6,3 min) y EC (11,3 min) en la disolución en medio de cultivo del patrón PB2. El análisis cromatográfico de la disolución acuosa de PB2 también reveló la presencia del 1,0 y 0,7% de los monómeros EC y C, respectivamente, en relación con el estándar PB2,

cantidades que aumentaban ligeramente hasta el 1,5 y 0,8% cuando el patrón de PB2 se disolvía en medio de cultivo y se mantenía durante 4 h en las condiciones experimentales (37°C y 5% de CO₂). Esas ligeras diferencias respecto a los porcentajes hallados en la solución acuosa se encuentran dentro del margen de error de las determinaciones practicadas mediante HPLC-DAD.

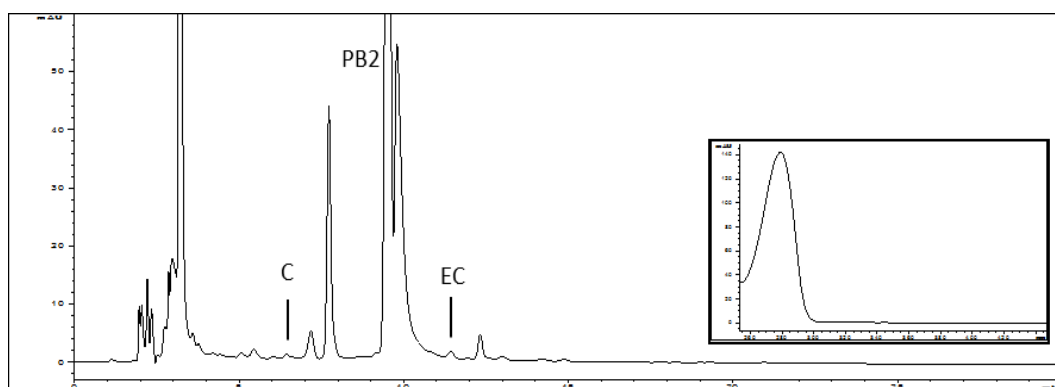


Figura 4.18. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 280 nm del compuesto procianidina B2 (PB2) a concentración de 100 μ M disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar PB2 (inserto).

Seguidamente, se desarrolló el estudio de biodisponibilidad mediante la incubación apical de 100 μ M de PB2 con la monocapa de células Caco-2 durante 1, 2 y 4 h. En la Figura 4.19. se muestra el perfil cromatográfico del medio de cultivo del compartimento apical (AP) y basolateral (BL) además del contenido citoplasmático (LIS) de las células que estuvieron en contacto con la PB2 durante 4 horas. No se observó PB2 en el lado basolateral (Figura 4.19.BL) aunque sí se detectó un pico al mismo TR y de idénticas características espectroscópicas que el dímero PB2 en el cromatograma correspondiente al análisis del contenido citoplasmático (Figura 4.19.LIS). Estos resultados señalan la capacidad de este compuesto para entrar en el interior de las células pero no de atravesar la barrera gastrointestinal, al menos en cantidades detectables y cuantificables por el HPLC-DAD. El análisis por HPLC-DAD registró los picos cromatográficos ya atribuidos a C (TR 6,3 min) y EC (TR 11,3 min) cuya proporción no aumentó significativamente con respecto a la incubación en medio de cultivo sin células, lo que excluiría una posible capacidad de las células Caco-2 de hidrolizar el dímero PB2. En cualquier caso, la presencia de C y EC en el medio permitió a las células metabolizar estos compuestos monoméricos, observándose el pico EC-M1 cuyas características espectroscópicas y TR fueron coincidentes con un derivado metilado de EC ya

caracterizado en los apartados anteriores. Adicionalmente se identificó otro pico que tentativamente se ha asignado como C-M1, es decir, metilado de C, apoyado por la información obtenida tras la caracterización del metabolismo del compuesto EC por LC-QTOF (Ver Tabla 4.7.), y como posteriormente se pudo confirmar (Tabla 4.15.).

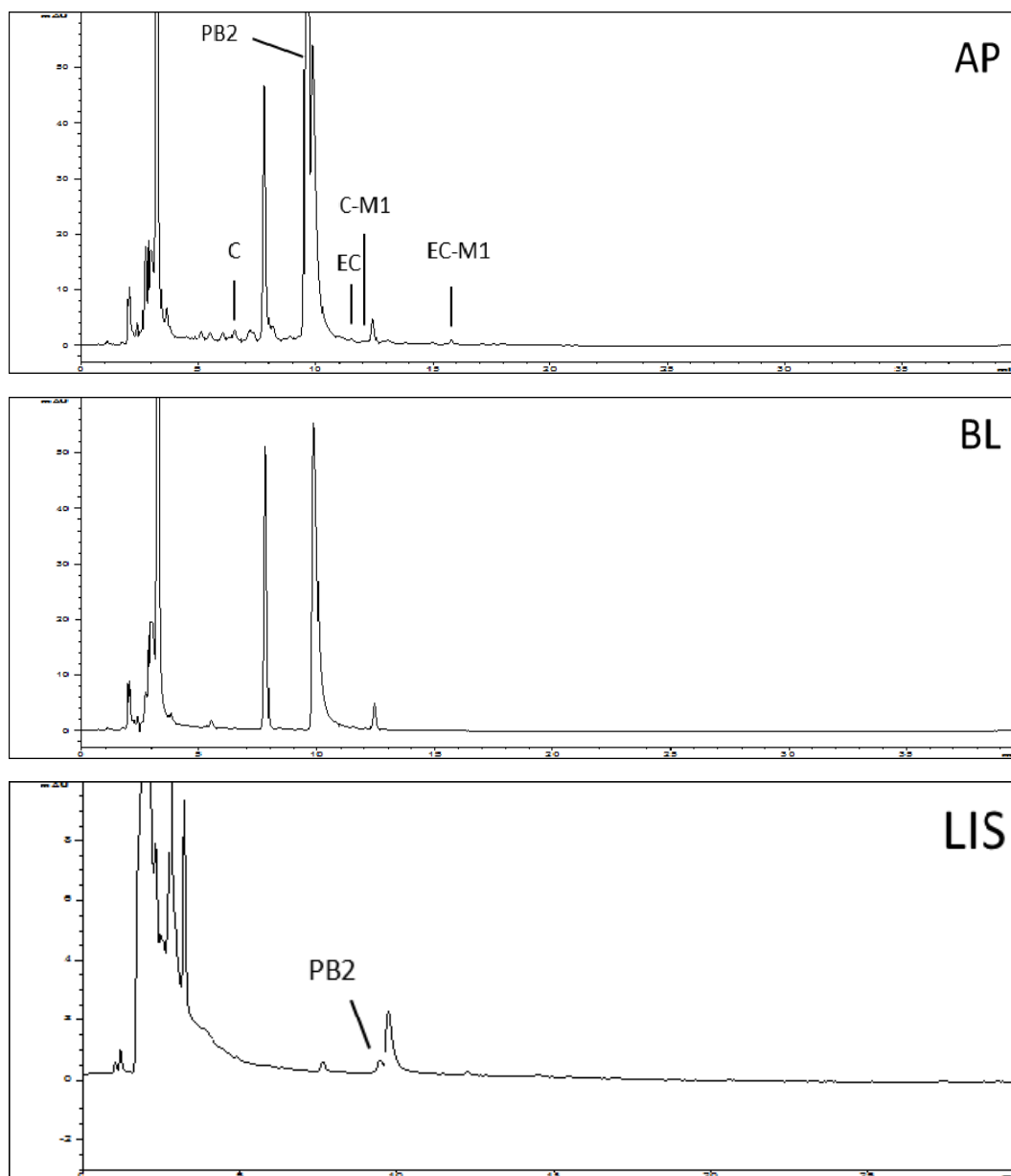


Figura 4.19. Perfil cromatográfico a λ_{max} 280 nm del compuesto PB2 a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h en los compartimentos apical (AP) y basolateral (BL) y en contenido citoplasmático (LIS). PB2: procianidina B2, C: catequina, EC: epicatequina, C-M1: metabolito de catequina, EC-M1: metabolito de epicatequina.

Seguidamente, para completar el estudio metabólico del compuesto PB2 se realizó el análisis por LC-QTOF. En la Tabla 4.15. y en la Figura 4.20. se recogen los datos espectroscópicos de los metabolitos identificados extra- e intracelularmente tras la incubación de la disolución de PB2 con las células Caco-2. En la Figura 4.20.A se recoge el cromatograma EIC correspondiente al estándar PB2 ($[M-H]^-$ a m/z 577,1351). Se observan cinco picos cromatográficos, de los cuales el que aparece a TR 6,8 min, significativamente más intenso que el resto, corresponde con el compuesto de partida PB2. Los datos espectroscópicos y el resto de parámetros arrojados por el software del LC-QTOF (fórmula molecular tentativa, fragmento observado MS^2 , *score* y error) sugieren la identificación de estos picos como isómeros de PB2. No obstante, estos compuestos también se detectaron en la disolución de PB2 en medio de cultivo mantenido durante 4 h (37°C, 5% CO_2 , datos no mostrados), lo que llevaría a descartar la contribución de las células en el fenómeno de isomerización de este compuesto. Por último, la presencia de PB2 tanto en el compartimento basolateral como en el contenido citoplasmático (Figura 4.20.A - BL y LIS) confirma la capacidad de captación y transporte de este dímero por las células intestinales, sugiriendo que este compuesto es biodisponible a nivel intestinal.

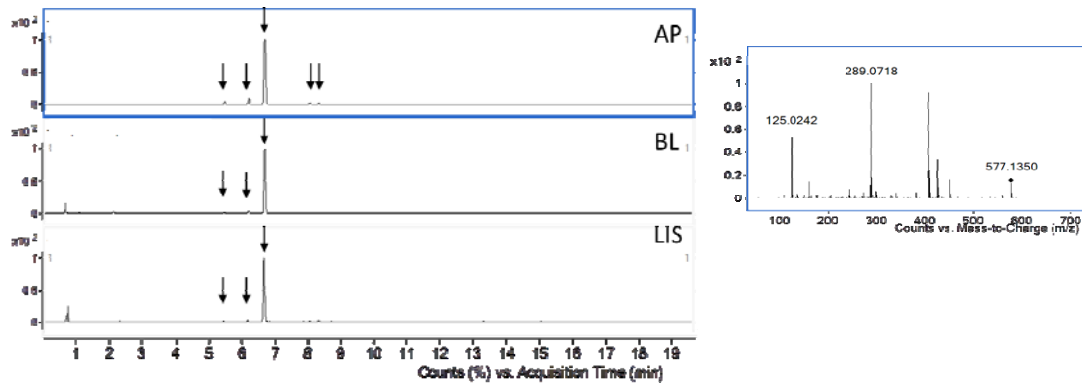
Una vez confirmada la absorción del compuesto PB2 por las células Caco-2, se indagó la presencia de otros metabolitos derivados de este compuesto por acción de las enzimas de fase II. Así, se seleccionó la m/z 591,1508 correspondiente al ion cuasimolecular del derivado metilado de PB2. En la Figura 4.20.B se observa un pico cromatográfico a TR 8,1 min en el contenido citoplasmático cuyas características espectroscópicas permitieron su identificación como un derivado metilado de PB2.

Tabla 4.15. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μ M procianidina B2 (PB2) con células Caco-2 y análisis mediante LC-QTOF en modo de ionización negativa y confirmación por MS/MS.

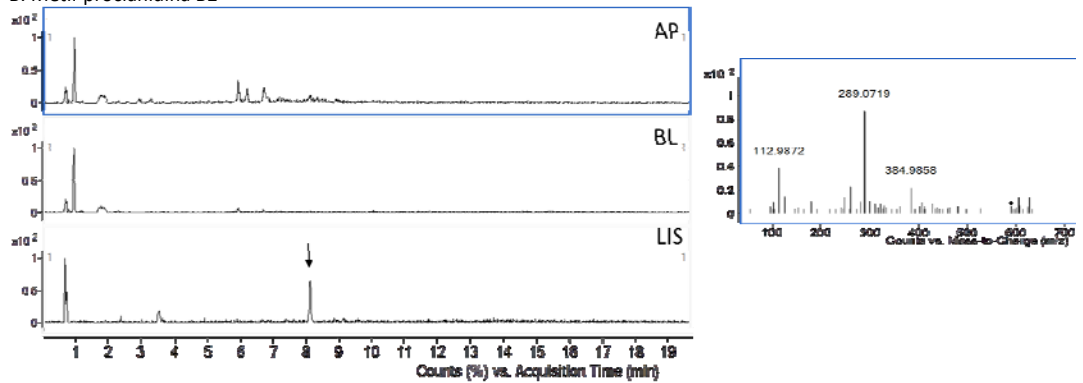
TR (min)	Ion Molecular (M-H) ⁻		Formula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS^2 (m/z)	Identificación Tentativa
	Masa Teórica	Masa Observada					
5,7	577,1351	577,1351	$C_{30}H_{26}O_{12}$	99,4	0,08	289	Procianidina dimérica
6,0	289,0718	289,0721	$C_{15}H_{14}O_6$	98,1	-1,15	245	Catequina
6,1	577,1351	577,1354	$C_{30}H_{26}O_{12}$	99,3	-0,48	289	Procianidina dimérica
6,8	577,1351	577,1378	$C_{30}H_{26}O_{12}$	97,7	-0,34	289	Procianidina B2
7,2	289,0718	289,0720	$C_{15}H_{14}O_6$	99,1	-0,87	245	Epicatequina
7,5	303,0874	303,0880	$C_{16}H_{16}O_6$	86,6	-2,26	137	Metil-catequina
8,1	591,1508	591,1559	$C_{31}H_{28}O_{12}$	88,7	3,64	289	Metil-procianidina B2
8,2	577,1351	577,1354	$C_{30}H_{26}O_{12}$	98,5	-0,4	289	Procianidina dimérica
8,5	577,1351	577,1359	$C_{30}H_{26}O_{12}$	96,1	-1,34	289	Procianidina dimérica
9,1	303,0874	303,0880	$C_{16}H_{16}O_6$	93,8	0,79	137	Metil-epicatequina

4. Resultados y Discusión

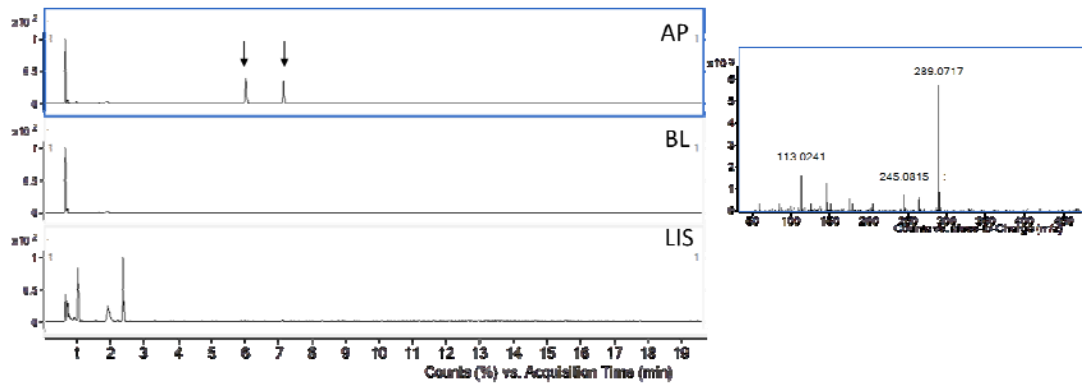
A. Prociánidina B2



B. Metil-prociánidina B2



C. Catequina y Epicatequina



D. Metil-epicatequina/catequina

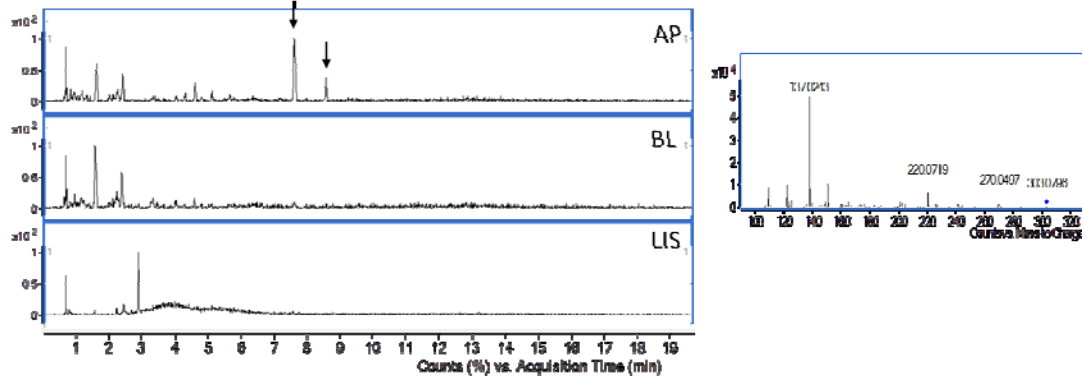


Figura 4.20. *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación de PB2 con células Caco-2 y su análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa. Lado apical (AP), lado basolateral (BL) y lisados (LIS). Las condiciones de análisis se detallan en la sección 3.2.2.2.4 de Materiales y Métodos.

Por último, el análisis LC-QTOF confirmó la presencia de los monómeros C y EC (Figura 4.20.C) y sus derivados metilados (Figura 4.20.D) en el compartimento apical, como previamente se había detallado en el análisis por HPLC-DAD (Figura 4.19). Las características espectroscópicas recogidas en la Tabla 4.15 para estos compuestos coinciden con lo descrito en el apartado 4.2.3.1 correspondiente al estudio del metabolismo del propio patrón EC.

En la Tabla 4.16 se recogen los compuestos identificados en cada una de las muestras (apical, basolateral y contenido citoplasmático) tras el desarrollo del estudio de biodisponibilidad de PB2 con las células Caco-2. El estándar PB2 y dos de sus isómeros, TR 5,7 y 6,1 min, se han identificado tanto extracelular (apical y basolateral) como intracelularmente, lo que evidencia la capacidad de las células Caco-2 para absorber este compuesto. Por otra parte, los resultados del análisis por LC-QTOF revela la presencia de derivado metilado de PB2 en el contenido citoplasmático, avalando la capacidad de las células Caco-2 para absorber y metabolizar este compuesto.

Por su parte, los monómeros EC y C presentes en la disolución original del patrón PB2, así como los derivados metilados generados por acción de las células Caco-2 tras su incubación se detectaron sólo en el compartimento apical, de acuerdo al mayor eflujo descrito para EC y su derivado metilado (apartado 4.2.3.1).

Tabla 4.16. Presencia extracelular (apical y basolateral) e intracelular de los distintos metabolitos de procianidina B2 generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.

TR (min)	Compuesto	Extracelular Apical	Extracelular Basolateral	Intracelular
5,7	Procianidina dimérica	x	x	x
6,0	Catequina	x		
6,1	Procianidina dimérica	x	x	x
6,8	Procianidina B2	x	x	x
7,2	Epicatequina	x		
7,5	Metil-catequina	x		
8,1	Metil-procianidina B2			x
8,2	Procianidina dimérica	x		
8,5	Procianidina dimérica	x		
9,1	Metil-epicatequina	x		

El hecho de no detectar el estándar PB2 en el compartimento basolateral mediante el análisis por HPLC-DAD (Figura 4.19) dificultó la caracterización de su transporte a través de las células Caco-2. En las condiciones experimentales utilizadas, 100 μ M de PB2 y 4 h, se puede afirmar que el compuesto PB2 es capaz de traspasar la

monocapa de células Caco-2 aunque la extensión de su traspaso es tan limitada que no es posible evaluar una vez dentro de la célula la vía preferente de transporte del compuesto, es decir, absorción o eflujo. Estos resultados son consistentes con los de Hemmersbach y cols. (2013), quienes hallaron un porcentaje de 0,02 y 0,05% de PB2 en los compartimentos apical y basolateral, respectivamente, tras la carga de 300 μM durante 24 h en el compartimento contrario, poniendo de manifiesto la limitada absorción del compuesto PB2 y un mecanismo preferente de eflujo. Además, estos autores reportaron una velocidad de entrada próxima a cero, $P_{\text{app}_{\text{AP-BL}}}$ de $0,001 \pm 0,000 \times 10^{-6}$ cm/s, de acuerdo a la limitada absorción. Por el contrario, Kosinska y cols. (2012) observaron una velocidad de entrada del compuesto PB2 ($P_{\text{app}_{\text{AP-BL}}}$ $3,77 \times 10^{-6}$ cm/s) muy similar a la del compuesto EC ($3,38 \times 10^{-6}$ cm/s); sin embargo, estos autores no utilizaron patrones puros, sino un extracto purificado de cacao. La mayor velocidad de entrada de PB2 en esas condiciones podría justificarse en base a un potencial efecto sinérgico que la mezcla de compuestos ejercería sobre el transporte a través de la monocapa.

Se ha caracterizado el transporte de otras procianidinas con el mismo modelo celular Caco-2. Así, Deprez y cols. (2001) observaron que el dímero procianidina B3 (catequina-(4 α →8)-catequina) y el trímero procianidina C2 (catequina-(4 α →8)-catequina-(4 α →8)-catequina) tenían una permeabilidad limitada y similar a la de la C ($P_{\text{app}_{\text{AP-BL}}}$ $0,9 \times 10^{-6}$ cm/s), si bien los oligómeros de mayor grado de polimerización no se absorbían a través del epitelio intestinal. Por su parte, Hemmersbach y cols. (2013), reportaron unos porcentajes de compuesto transferido a través de la monocapa para las procianidinas A2 (epicatequina-(2 β →7,4 β →8)-epicatequina), B2 (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina), B5 (epicatequina-(4 β →6)-epicatequina) y C1 (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina) correspondiente a 0,15%, 0,02%, 0,04% y 0,02%, respectivamente, tras una incubación de 24 h con las células Caco-2, concluyendo que la reducida permeabilidad observada para estos compuestos era compatible con la hipótesis de un transporte por difusión pasiva vía paracelular.

La cuantificación de la absorción y de los metabolitos producidos en la incubación celular con PB2 se llevó a cabo en el equipo HPLC-DAD. En la Tabla 4.17. se indican las cantidades de PB2 y metabolitos derivados a los distintos tiempos de incubación (1, 2 y 4 horas), utilizando la recta de calibrado de PB2 (ver en Materiales y Métodos, apartado 3.2.2.2.4) y expresando los resultados como concentración μM equivalente de PB2.

La limitada sensibilidad del HPLC-DAD no permite cuantificar el contenido de PB2 en el compartimento basolateral aunque sí en el contenido citoplasmático a las 4 h. La identificación intracelular del dímero PB2 es la prueba inequívoca de su absorción a través de las células epiteliales.

Tabla 4.17. Cuantificación intra- y extracelularmente de la procianidina B2 (PB2) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.

Compuesto		Concentración (µM)			
		0 h	1 h	2 h	4 h
Lado apical	Procianidina B2	98,2 ± 3,0	95,2 ± 3,3	93,3 ± 3,6	88,1 ± 5,7
	Epicatequina	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,5 ± 0,3
	Catequina	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,3	1,1 ± 0,2
	Metil-epicatequina	N.d.	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,2
	Metil-catequina	N.d.	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2
Lado basolateral	Procianidina B2		N.d.	N.d.	N.d.
	Epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Catequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-catequina		N.d.	N.d.	N.d.
Lisados	Procianidina B2		N.d.	N.d.	0,6 ± 0,04
	Epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Catequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-epicatequina		N.d.	N.d.	N.d.
	Metil-catequina		N.d.	N.d.	N.d.

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 6). N.d.: No detectado.

Además del compuesto PB2, se han cuantificado pequeñas cantidades de los monómeros EC y C. Cabe destacar que la solución acuosa de PB2 contenía un 1 y 0,7% de EC y C, respectivamente, que evolucionó al 1,5 y 0,8% tras su mantenimiento en medio de cultivo durante 4 h, 37°C y 5% CO₂ sin células. Las cantidades de monómeros registrados al cabo de las 4 h en contacto con las células Caco-2 (1,6 y 1,1 % para EC y C, respectivamente), alcanzaron valores ligeramente superiores a los descritos cuando el patrón PB2 estaba disuelto en medio de cultivo, sugiriendo una tímida capacidad de las células para hidrolizar el compuesto PB2 a EC. Respecto a la hidrólisis del dímero PB2, Spencer y cols. (2001) ya describieron la EC como el metabolito mayoritario detectado tras la perfusión de PB2 en el intestino aislado de rata. Recientemente, Hemmerbatsch y cols. (2013) detectaron la presencia de EC tras la incubación del dímero PB2 con células Caco-2, atribuyéndolo a un producto generado a partir del metabolismo de la célula, pero no consta que efectuaran estudios de estabilidad del compuesto PB2 en el medio de cultivo previos a su incubación. Sea cual fuere el origen de la EC en el medio, la célula sí es capaz de metabolizarla dando lugar a dos derivados metilados de EC y C cuya concentración fue proporcional al tiempo de incubación. Estos metabolitos fueron

cuantificados en el compartimento apical, lo que es coherente con el mecanismo preferente de eflujo ya descrito para este compuesto.

Cabe mencionar que cromatográficamente no se detectan los cuatro isómeros del compuesto PB2 identificados mediante LC-QTOF.

Por último, aunque a partir del análisis mediante LC-QTOF se ha caracterizado la presencia de un metabolito metilado de PB2, éste no se recoge en la Tabla 4.17 al no detectarse cromatográficamente. Este metabolito derivado de PB2 ya ha sido caracterizado por otros autores, si bien en modelos diferentes del utilizado en este trabajo. Así, se detectaron pequeñas cantidades del metilado de PB2 tras la perfusión a través de intestino delgado aislado de rata (Spencer y cols., 2001), así como en plasma (Shoji y cols., 2006) y en orina (Baba y cols., 2002) de ratas. Sin embargo, otros autores como Appeldoorn y cols. (2009) evaluaron la biodisponibilidad del compuesto PB2 con ratas perfundidas y no hallaron PB2 metilada. Cabe destacar que hasta la fecha no se había detectado el derivado metilado de PB2 en células Caco-2.

4.2.4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLISMO DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS POR CÉLULAS CACO-2

Se procedió al estudio del metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos mayoritarios en las bebidas de café mezcla tostado/verde y yerba mate, los ácidos clorogénico (5-CQA) y 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQA).

Se caracterizó el medio de cultivo además del contenido citoplasmático de las células Caco-2 no tratadas a 326 nm, correspondiente con el máximo de absorción de los ácidos hidroxicinámicos seleccionados (Figura 4.21.). El medio de cultivo ofreció cuatro picos cromatográficos a TR 7,5, 22,5, 28,5 y 30,2 min (Figura 4.21.a.), mientras que el cromatograma correspondiente al contenido citoplasmático mostró un perfil plano (Figura 4.21.b.), lo que facilitó la identificación de los compuestos y/o metabolitos.

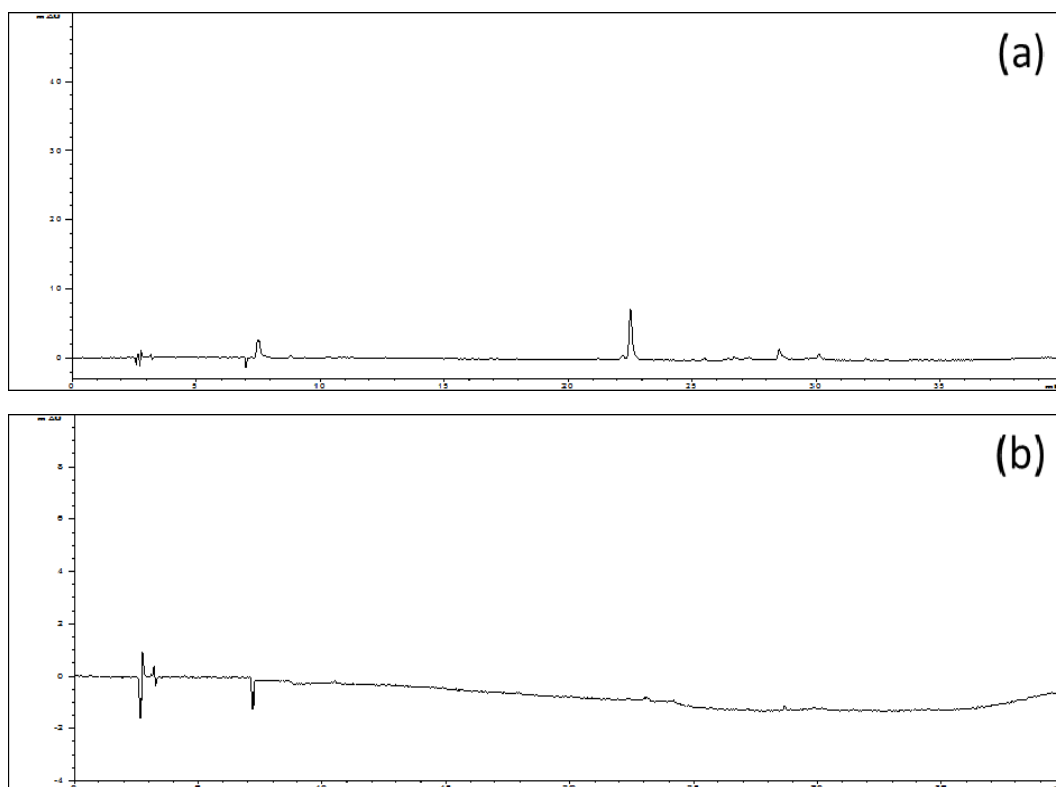


Figura 4.21. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 326 nm del medio de cultivo celular sin suero utilizado para el mantenimiento de las células Caco-2 (a) y del lisado celular (b).

4.2.4.1. Metabolismo y Transporte de Ácido Clorogénico por Células Caco-2

El ácido clorogénico (5-cafeoilquínico) es una molécula compuesta de ácido cafeico esterificado con ácido quínico (Figura 4.4.). El análisis cromatográfico de 100 μM de 5-CQA a 326 nm disuelto en medio de cultivo muestra, aparte de los picos propios del medio, proporcionó un pico mayoritario a TR 22,8 min junto con otros dos picos a 17,7 min y a 22,2 min, con idéntico espectro de absorción UV-Vis (Figura 4.22.). El pico mayoritario que aparece a TR 22,8 min correspondió al estándar 5-CQA, por comparación con la disolución acuosa madre, dónde aparecía un único pico a dicho TR. Los otros dos picos sustancialmente menos intensos y con TR más tempranos (17,7 y 22,2 min) se identificaron como isómeros del compuesto 5-CQA, los ácidos neoclorogénico (3-CQA) y criptoclorogénico (4-CQA), por comparación con la infusión de yerba mate caracterizada en el apartado 4.1.3. Cabe mencionar que las diferencias encontradas en los TR se deben a las distintas programaciones utilizadas (ver apartados de Materiales y Métodos 3.2.1.3. y 3.2.2.2.4.), aunque para asegurar la identidad de estos compuestos se evaluó tanto la infusión de la yerba mate como una muestra

generada de los estudios con células con ambas programaciones, seleccionando en cada caso aquella que ofreció los picos de mejor resolución. Estos resultados indicaron claramente que los estándares disueltos en el medio de cultivo sufren una ligera isomerización.

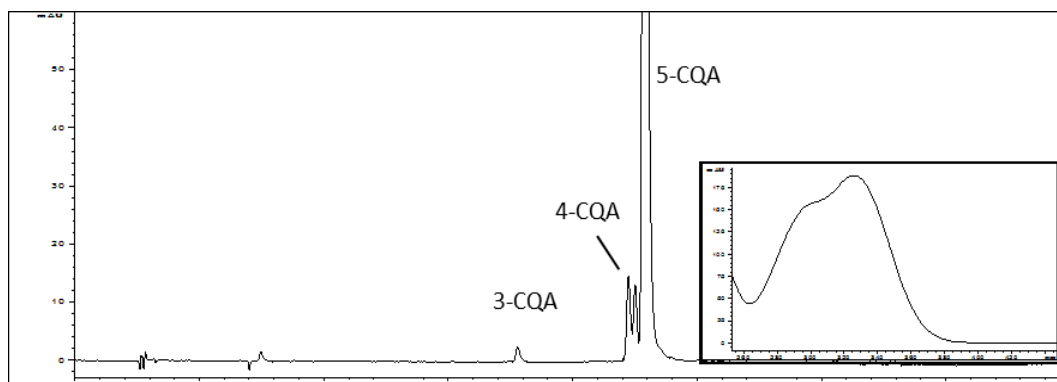


Figura 4.22. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 326 nm del ácido 5-cafeoilquinico (5-CQA) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar 5-CQA (inserto).

Ya se había descrito este fenómeno de isomerización del ácido 5-CQA disuelto en el medio de cultivo sin células (Narita e Inouye, 2013; Scherbl y cols. 2014), que mostró además una dependencia con el pH y el tiempo de incubación. En particular, Scherbl y cols. (2014) encontraron una proporción entre los isómeros de 40% 5-CQA, 18% 4-CQA y 19% 3-CQA a pH 7,4 tras 3 h de incubación y hasta un 23% de degradación del estándar. En nuestro caso particular, el pH del medio utilizado fue de 7,3 y la isomerización del ácido 5-CQA evolucionó desde 0,9% 3-CQA, 4,3% 4-CQA y 94,8% 5-CQA (Figura 4.22.) hasta 15,4% 3-CQA, 18,6% 4-CQA y 66,0% 5-CQA tras 4 horas de incubación a 37°C y 5% CO_2 .

Seguidamente, se incubó apicalmente el ácido 5-CQA con la monocapa de células Caco-2 a una concentración final de 100 μM (0,1% DMSO) y 300 μM de ácido ascórbico para protegerlo de la oxidación. Los medios de cultivo de la cámara apical y basolateral, así como el contenido citoplasmático tras la lisis celular se analizaron mediante HPLC-DAD tras 1, 2 y 4 h de incubación. En la Figura 4.23. se recogen a modo de ejemplo los resultados correspondientes a 4 h de incubación.

Como se puede observar, aparecen tanto el estándar 5-CQA a TR 22,8 min, como sus isómeros 3-CQA y 4-CQA a TR 17,7 y 22,2 min, respectivamente, en ambos

compartimentos lateral y basolateral, lo que confirma su absorción y transporte a través de la monocapa de células Caco-2.

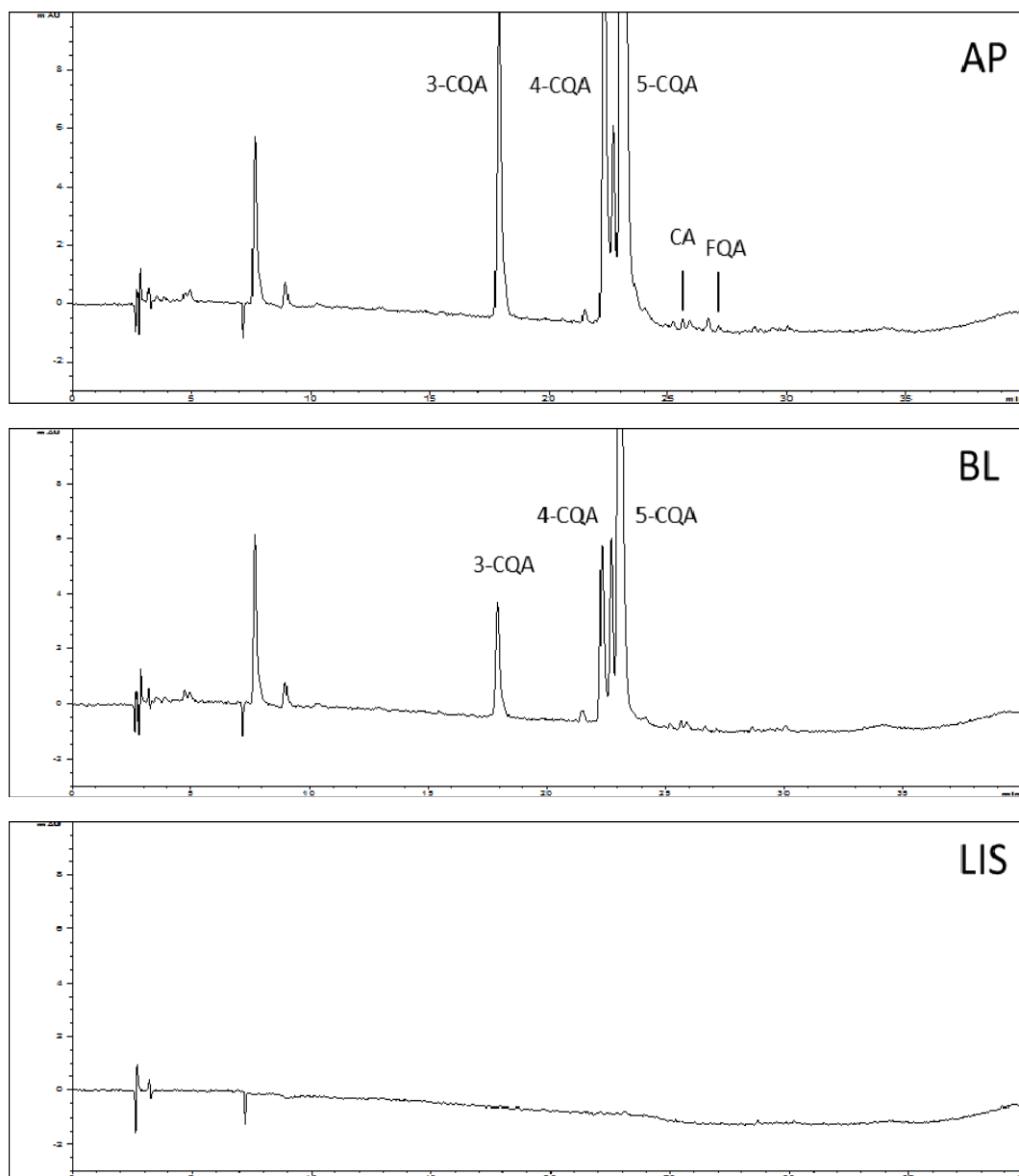


Figura 4.23. Perfil cromatográfico a λ_{max} 326 nm del compuesto 5-cafeoilquínico a concentración 100 μM tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h en los compartimentos apical (AP) y basolateral (BL), y en contenido citoplasmático (LIS). 5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico, 3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico, 4-CQA: ácido 4-cafeoilquínico, CA: ácido cafeico, FQA: ácido feruloilquínico.

La evaluación de los espectros UV-Vis del resto de picos pequeños diferentes de aquellos caracterizados en el medio de cultivo permitió identificar dos potenciales metabolitos a TR 25,3 y 26,7 min que presentaban un espectro semejante. En particular,

el pico cromatográfico a TR 25,3 min ofreció un TR y espectro idéntico al ácido cafeico (CA), evidenciando la capacidad de las células Caco-2 de hidrolizar el ácido 5-CQA.

La identificación del pico cromatográfico a TR 26,7 min, que presentaba un espectro idéntico que 5-CQA aunque con un efecto hipsocrómico de los dos máximos de absorción de 2 nm, se completó gracias al análisis mediante LC-QTOF. De la misma manera, se confirmó la identidad del resto de compuestos y/o metabolitos y se ahondó en la búsqueda de nuevos compuestos no detectables mediante HPLC-DAD. En la Figura 4.24. se representan los EIC y espectros de ionización de masas de los metabolitos identificados por LC-QTOF derivados del ácido 5-CQA, mientras que en la Tabla 4.18. se recoge la información proporcionada por el software MassHunter de los derivados conjugados de 5-CQA hallados tras la incubación con células Caco-2.

La selección del ion cuasimolecular m/z 353,0878 (Figura 4.24.A) ofreció 3 picos cromatográficos intra- y extracelularmente, propios del ácido cafeoilquínico (Tabla 4.18.), con idéntico patrón de fragmentación (MS/MS, ion-fragmento a m/z 191), lo que permitió la identificación del ácido 5-CQA y los dos isómeros antes mencionados, 3-CQA y 4-CQA. Cabe destacar que en el análisis mediante LC-QTOF de las muestras, los compuestos 4-CQA y 5-CQA mostraron un orden de elución contrario al observado en el análisis mediante LC-DAD; sin embargo, la abundancia relativa entre los distintos isómeros permitió su correcta asignación.

El análisis por LC-QTOF también permitió confirmar la presencia del ácido cafeico ($[M-H]^-$ m/z 179,0350) en los medios extracelulares y en el contenido intracelular (Figura 4.24.B., Tabla 4.18.).

La búsqueda del derivado metilado del ácido 5-CQA, el ácido feruloilquínico, de m/z 367,1035, dio lugar a dos picos a TR 9,3 y 9,9 min (Figura 4.24.C., Tabla 4.18.), presentes intra- y extracelularmente.

Por último, se identificó la presencia de ácido ferúlico ($[M-H]^-$ m/z 193,0506, ion-fragmento a m/z 134, Figura 4.24.D), más abundante intracelularmente. En dicha Figura 4.24.D se observa además del pico correspondiente al ácido ferúlico (TR 15,2 min) otro de mayor TR (18,1 min), cuyas características espectroscópicas no eran compatibles con la estructura química del ácido ferúlico ($[M-H]^-$ m/z 192,0500, $C_{10}H_{11}NOS$).

No se halló la presencia de derivados sulfatados y/o glucuronidados de los compuestos identificados.

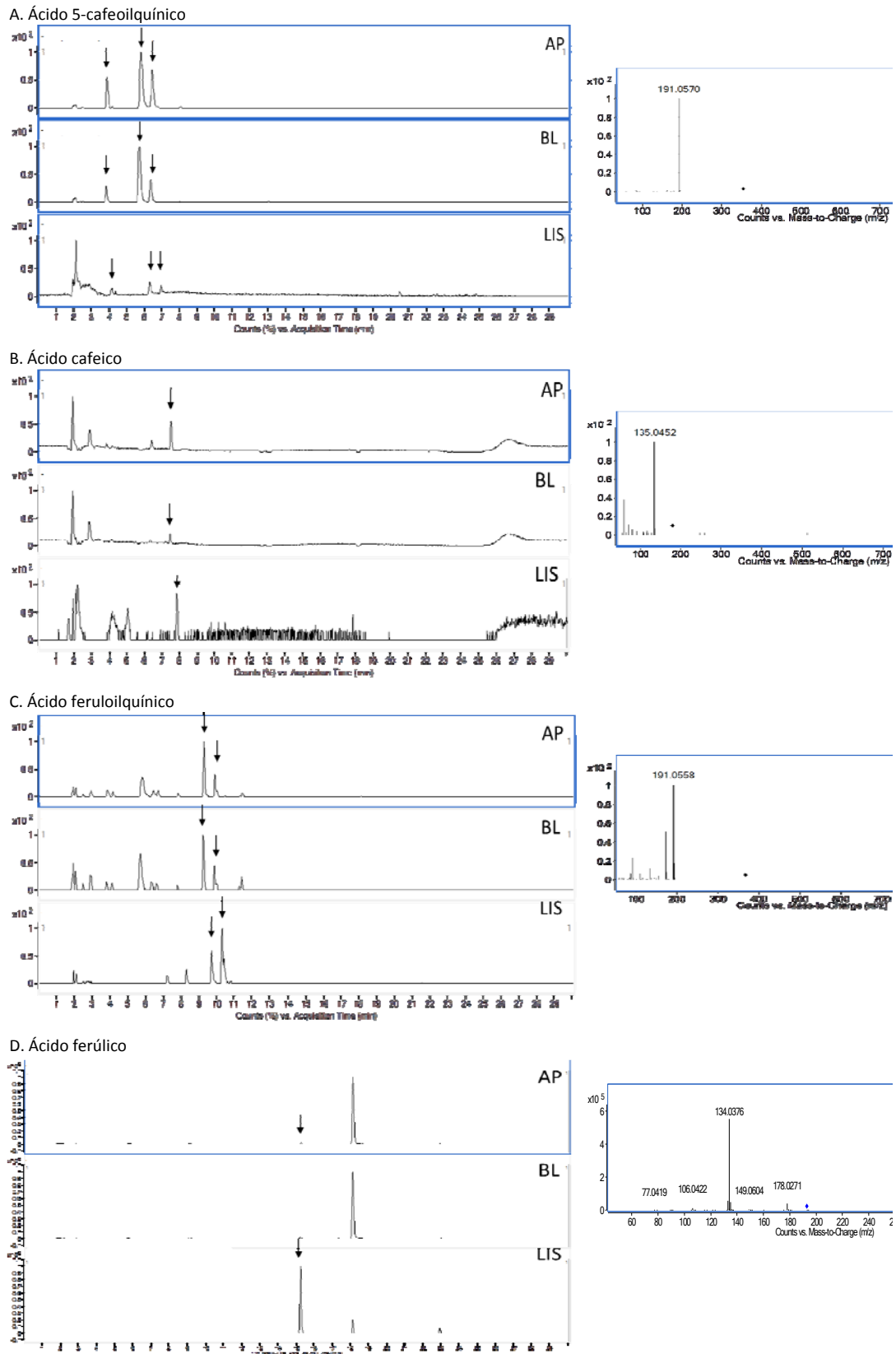


Figura 4.24. *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación de 5-CQA con células Caco-2 y análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa. Lado apical (AP), lado basolateral (BL) y lisados (LIS). Las condiciones de análisis se detallan en la sección 3.2.2.2.4 de Materiales y Métodos.

4. Resultados y Discusión

Tabla 4.18. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación de 100 μM de ácido clorogénico (5-CQA) con células Caco-2 y análisis mediante LC-QTOF en modo negativo y confirmación por MS/MS.

TR (min)	Ion Molecular(M-H) ⁻		Formula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS ² (m/z)	Identificación Tentativa
	Masa Teórica	Masa Observada					
4,0	353,0878	353,0891	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	91,5	-3,73	191	Ácido 3-cafeoilquínico
6,2	353,0878	353,0898	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	87,4	-5,56	191	Ácido 5-cafeoilquínico
6,9	353,0878	353,0895	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	89,2	-4,83	191	Ácido 4-cafeoilquínico
7,5	179,0350	179,0356	C ₉ H ₈ O ₄	85,4	-3,44	135	Ácido cafeico
9,3	367,1035	367,1036	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	83,3	0,46	191	Ácido feruloilquínico
9,9	367,1035	367,1042	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	83,3	1,1	191	Ácido feruloilquínico
15,2	193,0506	193,0509	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	86,3	-0,84	134	Ácido ferúlico

La información proporcionada por el equipo LC-QTOF ha permitido completar la ruta de biotransformación del compuesto 5-CQA a su paso por las células Caco-2. En la Tabla 4.19. se indica la presencia extra- e intracelular de los distintos metabolitos identificados a partir del metabolismo del ácido 5-CQA.

Tabla 4.19. Presencia extracelular (apical y basolateral) e intracelular de los distintos metabolitos del ácido 5-cafeoilquínico generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.

TR (min)	Compuesto	Extracelular Apical	Extracelular Basolateral	Intracelular
4,0	Ácido 3-cafeoilquínico	x	x	x
6,2	Ácido 5-cafeoilquínico	x	x	x
6,9	Ácido 4-cafeoilquínico	x	x	x
7,5	Ácido cafeico	x	x	x
9,3	Ácido feruloilquínico	x	x	x
9,9	Ácido feruloilquínico	x	x	x
15,2	Ácido ferúlico	x		x

La presencia de los ácidos cafeico y ferúlico confirma la capacidad de las células Caco-2 para hidrolizar los precursores respectivos, ácidos cafeoilquínico y feruloilquínico, por acción de las enzimas esterasas. Kern y cols, (2003b) en células Caco-2 y Lafay y cols. (2006) en un modelo de perfusión en intestino delgado de rata ya apuntaron este hecho de desesterificación del ácido 5-CQA. Por otra parte, la enzima COMT presente en el interior de las células Caco-2 sería capaz de metilar el ácido 5-CQA a feruloilquínico. A pesar de que se ha descrito la presencia de otras enzimas con capacidad de conjugación como la sulfotransferasa o glucuronosiltransferasa, no se han hallado ese tipo de metabolitos conjugados de los ácidos hidroxicinámicos en nuestras condiciones experimentales.

La valoración del transporte del ácido 5-CQA a través de la monocapa de células Caco-2 (Tabla 4.20.) ofreció velocidades de transferencia tanto de entrada como de salida muy bajas, lo que sugiere una biodisponibilidad limitada. Otros autores también detectaron un transporte limitado del ácido 5-CQA a través de la monocapa celular (Konishi y Kobayashi, 2004), apenas un 1% tras 40 min de incubación, o como Dupas y cols. (2006) que tan sólo hallaron un 1,5% en el compartimento basolateral a los 50 min. Ahora bien, aunque las velocidades de transferencias fueron pequeñas, en nuestro caso se observó una velocidad superior de entrada que de salida, como se desprende de la relación de ambas velocidades o índice de absorción superior a 1 (Tabla 4.20.), lo que sugiere que el transporte se daría preferentemente en sentido apical-basolateral. Estos resultados están de acuerdo con aquellos descritos por Farrell y cols. (2012), quienes reportaron un mecanismo preferente de absorción (IA=1,1) y atribuyeron un transporte vía paracelular para este compuesto, como ya indicaron Konishi y Kobayashi, (2004).

Tabla 4.20. Coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) de entrada desde el compartimento apical al basolateral (AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (BL a AP) e índice de absorción (IA), determinado como el cociente (Papp AP-BL/Papp BL-AP).

Compuesto	AP a BL (Papp x 10 ⁻⁶ cm/s)	BL a AP (Papp x 10 ⁻⁶ cm/s)	Índice de absorción (IA)
Ácido 5-cafeoilquínico	0,86 ± 0,18	0,78 ± 0,09	1,1 ± 0,3

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 6).

La cuantificación de la absorción y de los metabolitos producidos en la incubación celular con 5-CQA se llevó a cabo en el equipo HPLC-DAD. En la Tabla 4.21. se indican las cantidades de 5-CQA y metabolitos derivados a los distintos tiempos de incubación (1, 2 y 4 horas), utilizando la rectas de calibrado del ácido 5-CQA (ver en Materiales y Métodos, apartado 3.2.2.2.4) y expresando los resultados como concentración μM equivalente de 5-CQA.

Se observa una relación directa entre el tiempo de incubación y la absorción del ácido 5-CQA a través de las células Caco-2. A pesar de su mecanismo preferente de absorción, cuantitativamente se observa que el ácido 5-CQA es poco biodisponible, como se desprende del reducido contenido encontrado en el compartimento basolateral.

4. Resultados y Discusión

Tabla 4.21. Cuantificación intra- y extracelular del ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.

	Compuesto	Concentración (μM)			
		0 h	1 h	2 h	4 h
Lado apical	Ácido 3-cafeoilquínico	0,9 \pm 0,2	2,0 \pm 0,6	5,9 \pm 1,1	10,1 \pm 0,6
	Ácido 5-cafeoilquínico	94,8 \pm 6,0	65,7 \pm 5,7	55,0 \pm 4,3	43,3 \pm 1,7
	Ácido 4-cafeoilquínico	4,3 \pm 0,6	5,3 \pm 1,7	8,4 \pm 1,4	12,7 \pm 0,9
	Ácido cafeico	N.d.	Trazas	Trazas	Trazas
	Ácido feruloilquínico	N.d.	Trazas	Trazas	Trazas
Lado basolateral	Ácido 3-cafeoilquínico		N.d.	0,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,4
	Ácido 5-cafeoilquínico		0,4 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	2,7 \pm 0,4
	Ácido 4-cafeoilquínico		N.d.	0,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,4
	Ácido cafeico		N.d.	N.d.	N.d.
	Ácido feruloilquínico		N.d.	N.d.	N.d.
Lisados	Ácido 3-cafeoilquínico		N.d.	N.d.	N.d.
	Ácido 5-cafeoilquínico		N.d.	N.d.	N.d.
	Ácido 4-cafeoilquínico		N.d.	N.d.	N.d.
	Ácido cafeico		N.d.	N.d.	N.d.
	Ácido feruloilquínico		N.d.	N.d.	N.d.

Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar (n = 6). N.d.: No detectado.

Se puede resaltar que al cabo de las 4 h de incubación, y a pesar de haber utilizado ácido ascórbico para proteger al ácido 5-CQA frente la oxidación, sólo se recupera un 70,8% del compuesto original e isómeros, lo que sugiere una posible degradación del compuesto con el tiempo. Scherbl y cols. (2014) observaron incluso una mayor degradación del ácido 5-CQA, de hasta el 60% a las 4 h de incubación. Narita y Inouye (2013) demostraron que dicha degradación es fuertemente dependiente del pH del medio.

Por último, las proporciones obtenidas de isómeros respecto al compuesto 5-CQA en las muestras que estuvieron en contacto con las células Caco-2 alcanzaron valores (15,8% 3-CQA, 65,0% 5-CQA y 19,2% 4-CQA) similares a aquellos descritos en la disolución de este compuesto en el medio sin células, lo que no sugiere un efecto adicional de las células Caco-2 en la transformación del ácido 5-CQA en los isómeros 3-CQA y 4-CQA.

4.2.4.2. Metabolismo y Transporte de Ácido 3,5-Dicafeoilquínico por Células Caco-2

En la Figura 4.25 se muestra el cromatograma adquirido a 326 nm del estándar 3,5-diCQA disuelto en medio de cultivo, donde se observan tres picos al margen de aquellos propios del medio, uno mayoritario a TR de 28,8 min asignado al compuesto

3,5-diCQA por comparación con su disolución acuosa, y dos picos en menor concentración a 28,3 min y a 29,3 min, de idénticas características espectroscópicas que el estándar, y que no aparecían en la disolución acuosa. Los nuevos picos se asignaron tentativamente a los isómeros 3,4-diCQA y 4,5-diCQA por comparación con la infusión de yerba mate caracterizada en el apartado 4.1.3.

La aparición de estos picos indica que, al igual que ocurría con el ácido clorogénico, el compuesto 3,5-diCQA disuelto en medio de cultivo se isomeriza parcialmente a 3,4-diCQA y 4,5-diCQA, siendo el grado de transformación dependiente del tiempo de incubación. Así, los porcentajes de estos compuestos evolucionaron desde el contenido inicial de 9,7% 3,4-diCQA, 81,1% 3,5-diCQA y 9,2% 4,5-diCQA hasta 16,0% 3,4-diCQA, 69,9% 3,5-diCQA y 14,1% 4,5-diCQA tras 4 h de incubación en el medio de cultivo sin células Caco-2 (37°C y 5% CO₂).

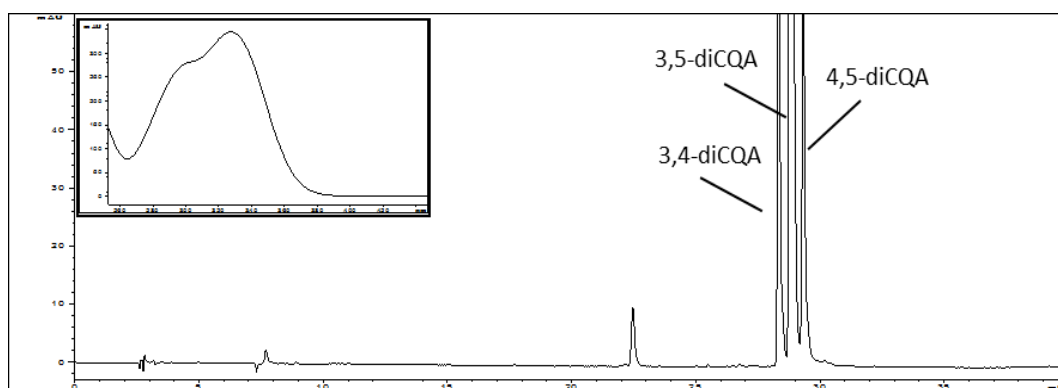


Figura 4.25. Perfil cromatográfico a λ_{max} 326 nm del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) a concentración de 100 μM disuelto en medio de cultivo y espectro de absorción UV-Vis del estándar 3,5-diCQA (inserto).

A continuación, se adicionó a la cámara apical 100 μM de 3,5-diCQA (0,1% DMSO) y 300 μM de ácido ascórbico para protegerlo de la oxidación y se mantuvo durante 1, 2 y 4 h a 37°C y 5% CO₂. En la Figura 4.26. se muestra el perfil cromatográfico del medio de cultivo del compartimento apical (AP) y basolateral (BL), además del contenido citoplasmático (LIS) de las células que estuvieron en contacto con 3,5-diCQA durante 4 horas. La presencia del compuesto 3,5-diCQA y sus isómeros en el lisado celular, así como en el compartimento basolateral confirma que estos compuestos son absorbidos por las células Caco-2 y atraviesan la barrera del epitelio intestinal, aunque en pequeña proporción.

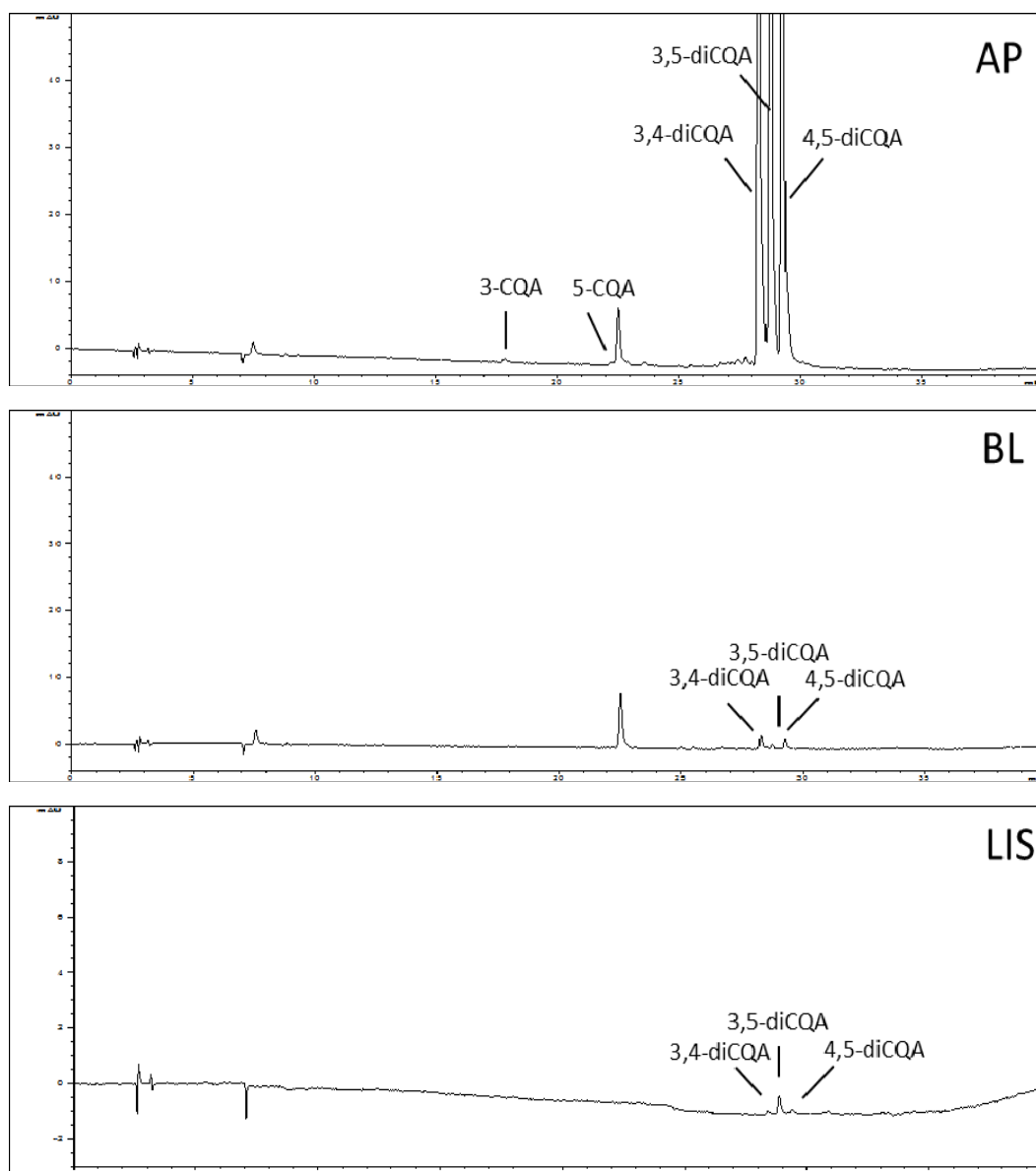


Figura 4.26. Perfil cromatográfico a λ_{\max} 326 nm del ácido 3,5-dicafeoilquínico a concentración 100 μ M tras su incubación con células Caco-2 durante 4 h en los compartimentos apical (AP) y basolateral (BL) y en contenido citoplasmático (LIS). 3,5-diCQA: ácido 3,5-dicafeoilquínico, 3,4-diCQA: ácido 3,4-dicafeoilquínico, 4,5-diCQA: ácido 4,5-dicafeoilquínico, 3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico y 5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico.

La evaluación de los espectros de todos los picos que aparecían en la muestra permitió identificar la presencia de los ácidos 3-CQA y 5-CQA a TR de 17,8 y 22,8 min, respectivamente. La caracterización se basó en la comparación con patrones comerciales, cuando fue posible y/o conocimiento previo sobre estos compuestos, al aparecer en el estudio de biodisponibilidad *in vitro* realizado con el compuesto 5-CQA o en las muestras de café mezcla tostado/verde y yerba mate.

Se completó la caracterización mediante el análisis por LC-QTOF. En la Tabla 4.22. se muestra la información de las características espectroscópicas tanto del estándar 3,5-diCQA como de los derivados conjugados hallados en el análisis del medio de incubación. En la Figura 4.27. se representan los EIC y espectros de ionización de masas de los metabolitos identificados por LC-QTOF. Se pudo observar (Figura 4.27.A) que la búsqueda del ion cuasimolecular a m/z 515,1195 proporcionaba 3 picos que respondían a la fórmula molecular del ácido dicafeoilquínico con un patrón de fragmentación coherente con su estructura química (MS/MS iones-fragmento a m/z 353, 191 y 135 propios del ácido cafeoilquínico, ácido quínico y fragmento derivado del ácido cafeico descarbolixado, respectivamente), lo que permitió ubicar el ácido 3,5-diCQA e identificar los isómeros 3,4-diCQA y 4,5-diCQA. Los tres compuestos se identificaron tanto intra- como extracelularmente (compartimentos apical y basolateral) (Tabla 4.23).

Tabla 4.22. Características espectroscópicas de los metabolitos hallados tras la incubación del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) con células Caco-2 y análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa y confirmación por MS/MS.

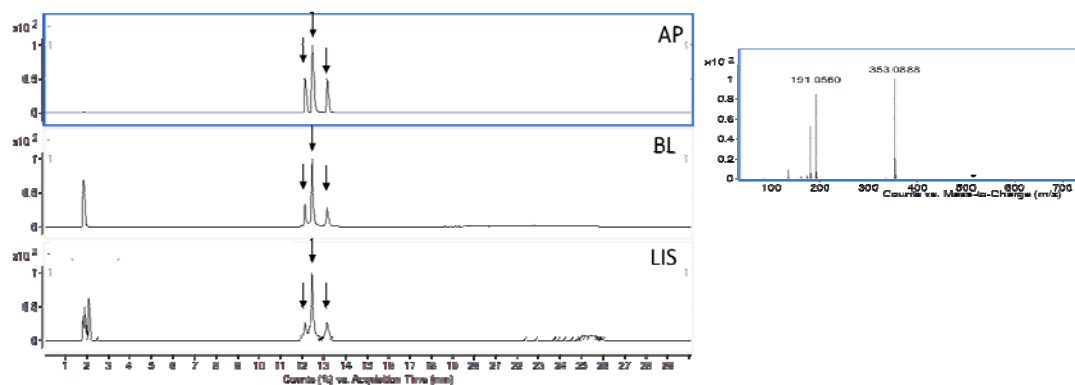
TR (min)	Ion Molecular (M-H) ⁻		Fórmula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS ² (m/z)	Identificación Tentativa
	Masa Teórica	Masa Observada					
4,0	353,0878	353,0874	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	97,7	0,24	191	Ácido 3-cafeoilquínico
6,0	353,0878	353,0869	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	97,4	-0,4	191	Ácido 5-cafeoilquínico
7,5	179,0350	179,0366	C ₉ H ₈ O ₄	73,9	2,68	135	Ácido cafeico
9,3	367,1035	367,1033	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	75,8	0,44	191	Ácido feruloilquínico
10,0	367,1035	367,1030	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	73,3	4,02	191;173	Ácido feruloilquínico
12,0	515,1195	515,1193	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	97,9	0,38	353;191;135	Ác. 3,4-dicafeoilquínico
12,4	515,1195	515,1194	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	97,5	0,21	353;191;135	Ác. 3,5-dicafeoilquínico
13,1	515,1195	515,1186	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	97,1	1,78	353;191;135	Ác. 4,5-dicafeoilquínico
15,2	193,0506	193,0507	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	85,8	-0,41	134	Ácido ferúlico

Se confirmó la presencia del ácido cafeoilquínico ya identificado mediante HPLC-DAD (Figura 4.26.) como producto de hidrólisis de los ácidos dicafeoilquínico por acción del metabolismo celular. La búsqueda del ion cuasimolecular a m/z 353,0878 (Figura 4.27.B) proporcionó varios picos de alta intensidad, aunque sólo dos de ellos, presentes en el compartimento apical (Tabla 4.23), mostraban el patrón de fragmentación esperado para el ácido cafeoilquínico, los de TR 4,0 min y 6,0 min. La aparición de derivados monocafeoilquínicos es coherente con la capacidad de la enzima esterasa del borde del cepillo de las células Caco-2 para hidrolizar el diéster dicafeoilquínico.

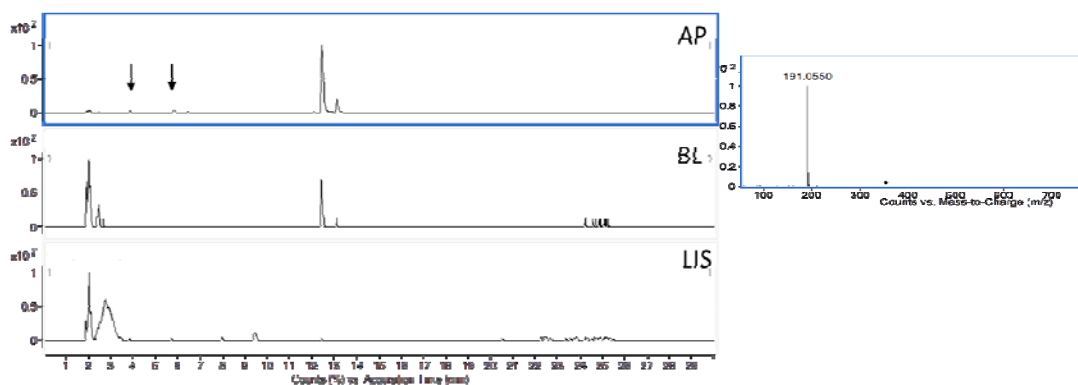
4. Resultados y Discusión

También se realizó la búsqueda de derivados metilados del ácido cafeoilquínico, los ácidos feruloilquínicos a m/z 367,1035 (Figura 4.27.C), identificando dos compuestos en el contenido citoplasmático (Tabla 4.23.), formados por acción de la enzima COMT de las células Caco-2.

A. Ácido dicafeoilquínico



B. Ácido cafeoilquínico



C. Ácido feruloilquínico

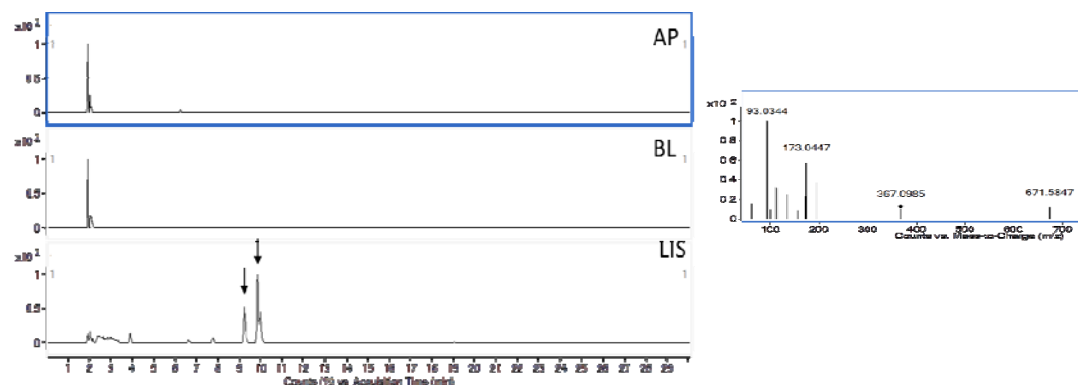
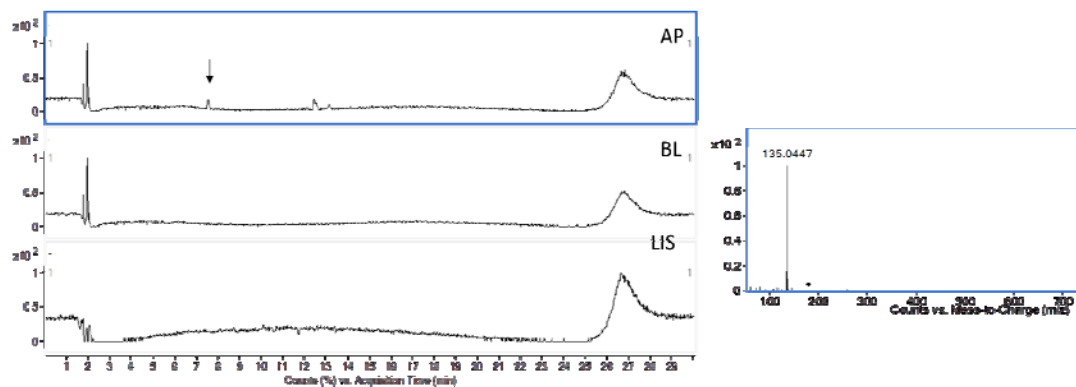


Figura 4.27. *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) con células Caco-2 y su análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa. Lado apical (AP), lado basolateral (BL) y lisados (LIS). Las condiciones de análisis se detallan en la sección 3.2.2.2.4 de Materiales y Métodos.

Por último, se confirmó la presencia de los ácidos cafeico (Figura 4.28.A) y ferúlico (Figura 4.28.B), como inequívocamente indicaron los iones cuasimoleculares $[M-H]^-$ correspondientes a m/z 179,0350 y 193,0506, respectivamente, y los iones-fragmento indicados en la Tabla 4.22. Ambos compuestos se detectaron en el compartimento apical, siendo de destacar la abundante presencia del ácido ferúlico en el contenido intracelular (Tabla 4.23.), de acuerdo a la localización de la enzima COMT para su conjugación a partir del ácido cafeico.

No se hallaron derivados diferuloilquínicos, ni otros derivados conjugados de fase II de los compuestos anteriormente descritos, lo que indica que el metabolismo de los ácidos dicafeoilquínicos conllevaría su desesterificación a ácidos monocafeoilquínicos y ácido cafeico y la metilación de éstos, pero no la metilación directa de los ácidos dicafeoilquínicos. Además, se confirma la no sulfatación ni glucuronidación de estos ácidos hidroxicinámicos por las células Caco-2.

A. Ácido cafeico



B. Ácido ferúlico

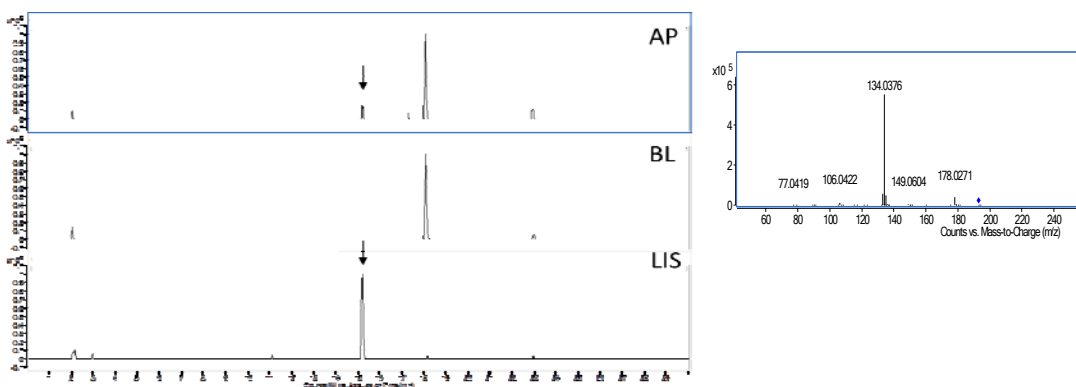


Figura 4.28. *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) y espectro de masas correspondiente a los metabolitos identificados tras la incubación del ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) con células Caco-2 y su análisis por LC-QTOF en modo de ionización negativa. Lado apical (AP), lado basolateral (BL) y lisados (LIS). Las condiciones de análisis se detallan en la sección 3.2.2.2.4 de Materiales y Métodos.

4. Resultados y Discusión

Tabla 4.23. Presencia extracelular (apical y basolateral) e intracelular de los distintos metabolitos del ácido 3,5-dicafeoilquinico generados a partir del metabolismo de las células Caco-2 tras 4 h de incubación.

TR (min)	Compuesto	Extracelular Apical	Extracelular Basolateral	Intracelular
4,0	Ácido 3-cafeoilquinico	x		
6,0	Ácido 5-cafeoilquinico	x		
7,5	Ácido cafeico	x		
9,3	Ácido feruloilquinico			x
10,0	Ácido feruloilquinico			x
12,0	Ácido 3,4-dicafeoilquinico	x	x	x
12,4	Ácido 3,5-dicafeoilquinico	x	x	x
13,1	Ácido 4,5-dicafeoilquinico	x	x	x
15,2	Ácido ferúlico	x		x

La valoración del transporte del ácido 3,5-diCQA a través de la monocapa intestinal de células Caco-2, se realizó como ya se ha explicado, calculando el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) (Tabla 4.24.). Los resultados muestran mayores velocidades de transferencia (Papp) a través de la monocapa celular comparado con el ácido 5-CQA, aunque muy bajas si se comparan con otros ácidos fenólicos como el grupo de fenoles hidroxifeniletanol presentes en el aceite de oliva (Mateos y cols., 2011). Además, el índice de absorción (IA) indica un mecanismo preferente de absorción, semejante al descrito para el derivado monoacilquinico 5-CQA, lo que confirma que el ácido 3,5-diCQA es biodisponible en este modelo celular aunque en pequeña cantidad. El porcentaje de absorción calculado para el compuesto 3,5-diCQA es de 12,2%, ligeramente superior al determinado para el ácido 5-CQA (9,9%), coherente con la mayor velocidad de transferencia a través de la monocapa celular para el derivado diacilquinico (3,5-diCQA). Asimismo, Farrell y cols. (2011) describieron un mayor índice de absorción y velocidad de transferencia del compuesto 3,4-diCQA que de 4-CQA en un modelo de epitelio gástrico.

Tabla 4.24. Coeficiente de permeabilidad aparente Papp de entrada desde el compartimento apical al basolateral (AP a BL) y de salida desde el compartimento basolateral al apical (BL a AP) e índice de absorción (IA), determinado como el cociente (Papp AP-BL/Papp BL-AP).

Compuesto	AP a BL (Papp x 10 ⁻⁶ cm/s)	BL a AP (Papp x 10 ⁻⁶ cm/s)	Índice de Absorción (IA)
Ácido 3,5-dicafeoilquinico	3,74 ± 0,16	3,46 ± 0,05	1,08 ± 0,06

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 6).

Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación del estándar y metabolitos derivados mediante HPLC-DAD. Los resultados representados en la Tabla 4.25. muestran una relación directa entre el tiempo de incubación y la cantidad absorbida a través de la monocapa celular. Aunque se confirma que el compuesto 3,5-diCQA es biodisponible, los resultados indican que su absorción es limitada. De manera similar a lo descrito en el resto de fenoles estudiados, la proporción de isómeros cuantificados tras 4 h de incubación con las células Caco-2 alcanza valores semejantes a aquellos indicados en ausencia de células (15,5% 3,4-diCQA, 65,6% 3,5-diCQA y 14,2% 4,5-diCQA), por lo que la isomerización parece un fenómeno ajeno al metabolismo de la célula.

Tabla 4.25. Cuantificación intra- y extracelularmente del ácido 3,5-dicafeoilquinico (3,5-diCQA) y sus metabolitos derivados al inicio del ensayo (0 h) y tras su incubación durante 1, 2 y 4 h con células Caco-2 mediante HPLC-DAD.

Compuesto	Concentración (µM)				
	0 h	1 h	2 h	4 h	
Lado apical	Ácido 3,4-dicafeoilquinico	9,7 ± 0,2	7,7 ± 0,2	10,4 ± 0,3	11,7 ± 0,8
	Ácido 3,5 dicafeoilquinico	81,2 ± 1,1	77,0 ± 3,8	73,5 ± 0,5	61,3 ± 1,3
	Ácido 4,5-dicafeoilquinico	9,2 ± 0,2	7,4 ± 0,2	9,3 ± 0,4	10,1 ± 0,1
	Ácido 3-cafeoilquinico	N.d.	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
	Ácido 5-cafeoilquinico	N.d.	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Lado basolateral	Ácido 3,4-dicafeoilquinico		N.d.	N.d.	3,0 ± 0,1
	Ácido 3,5 dicafeoilquinico		3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,2	2,2 ± 0,4
	Ácido 4,5-dicafeoilquinico		N.d.	N.d.	2,9 ± 0,1
	Ácido 3-cafeoilquinico		N.d.	N.d.	N.d.
	Ácido 5-cafeoilquinico		N.d.	N.d.	N.d.
Lisados	Ácido 3,4-dicafeoilquinico		N.d.	N.d.	1,0 ± 0,1
	Ácido 3,5 dicafeoilquinico		N.d.	N.d.	2,1 ± 0,4
	Ácido 4,5-dicafeoilquinico		N.d.	N.d.	1,2 ± 0,1.
	Ácido 3-cafeoilquinico		N.d.	N.d.	N.d.
	Ácido 5-cafeoilquinico		N.d.	N.d.	N.d.

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n = 6). N.d.: No detectado.

4.2.5. RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE FLAVANOLES Y ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS Y LA BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO*

Los estudios de biodisponibilidad *in vitro* en el modelo con células Caco-2 de las dos familias de compuestos fenólicos, flavanoles y ácidos hidroxicinámicos, muestran en general una escasa absorción a través de las células Caco-2 y un cierto grado de metabolización, que en la mayoría de los casos sólo ha sido posible detectar por LC-QTOF.

Una gran dificultad de este tipo de estudios *in vitro* es la inestabilidad de los compuestos en las condiciones de incubación con el medio DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle's Medium), recientemente corroborado por Xiao y Hogger (2015). Dicha inestabilidad parece ser fuertemente dependiente de la estructura química de la molécula y/o sustituyentes, o del pH del medio de cultivo (Narita e Inouye, 2013). Por tanto, se deben tener en cuenta estas consideraciones a la hora de interpretar los resultados para evitar conclusiones erróneas.

Respecto a los metabolitos identificados, se ha observado que la ruta preferencial de metabolización de los flavanoles EC y ECG ha sido la metilación seguida en menor proporción de la sulfatación, tal como se representa en las Figuras 4.29 y 4.30. También se detectaron derivados metil-sulfatados; en cambio, no se identificó ningún derivado glucuronidado, a pesar de que las células Caco-2 disponen de enzimas UDP-glucuroniltransferasas responsables de la glucuronidación de los flavonoides (Galijatovic y cols., 2001). Estos resultados están en línea con aquellos descritos por Zhang y cols. (2004), quienes identificaron derivados sulfatados, metilados y metil-sulfatados para ambos compuestos en el mismo modelo celular sin detectar derivados glucuronidados.

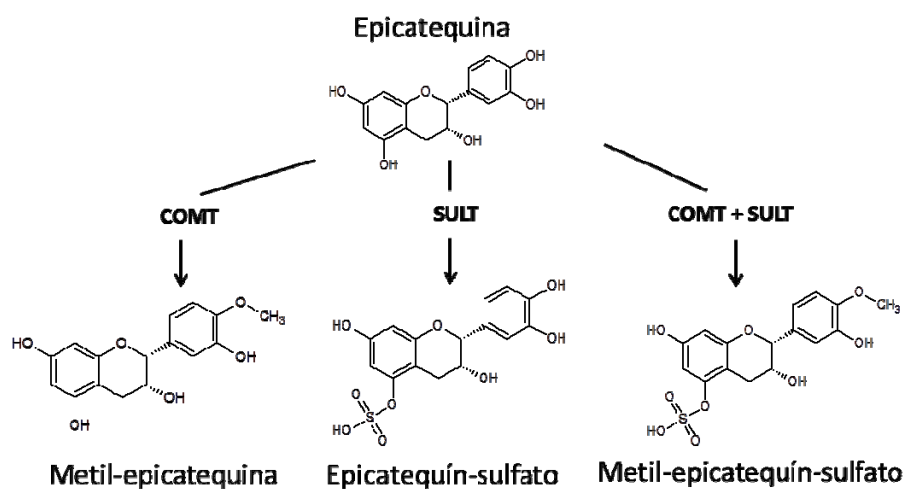


Figura 4.29. Metabolismo propuesto para la epicatequina por las células intestinales Caco-2. COMT: catecol-O-metiltransferasa. SULT: sulfotransferasa.

Adicionalmente, se ha observado un pequeño porcentaje de EC y C (0,5% en ambos casos) formados a partir del derivado galoilado ECG. Aunque las células Caco-2 disponen de las enzimas esterasas necesarias para que tenga lugar esta hidrólisis, no se puede asegurar su implicación, ya que la disolución de ECG en medio de cultivo en

ausencia de células mostró una transformación parcial de ECG en EC y C (0,4 y 0,2%, respectivamente).

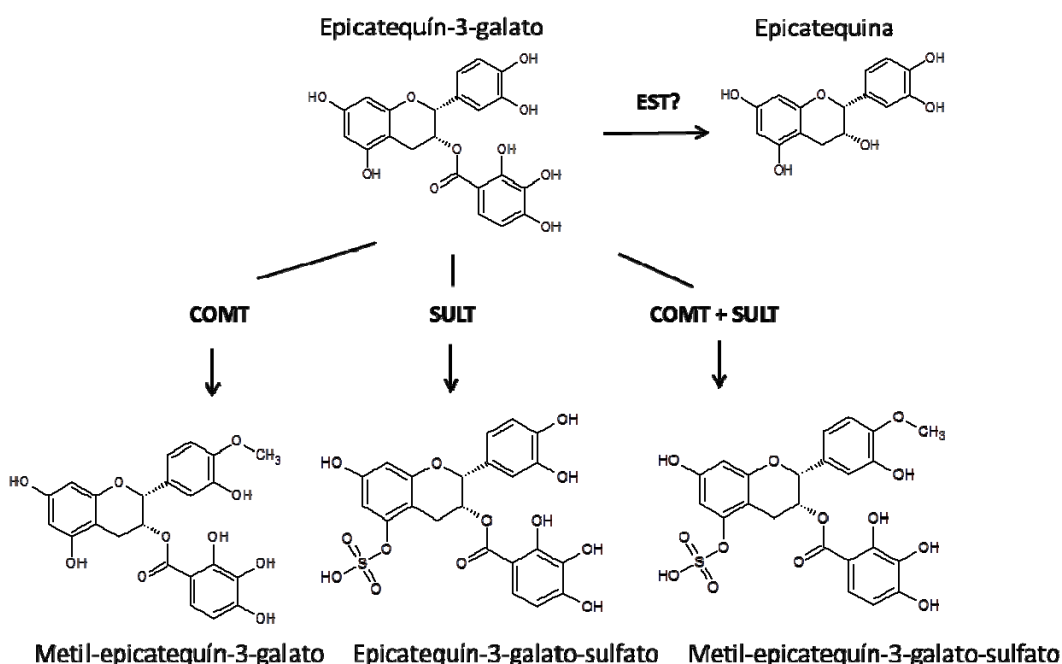


Figura 4.30. Metabolismo propuesto para el epicatequín-3-galato por las células intestinales Caco-2. COMT: catecol-*O*-metiltransferasa. SULT: sulfotransferasa. EST: esterasa.

El estudio de biodisponibilidad *in vitro* del dímero de epicatequina PB2 en contacto con las células Caco-2 generó un compuesto derivado de las enzimas de fase II, el derivado metilado de PB2. Dado que la enzima COMT, responsable de dicha metilación, se encuentra en el medio intracelular, estos resultados permiten confirmar que el flavanol PB2 traspasa la barrera epitelial intestinal y, por tanto, se absorbe, aunque mínimamente. En la Figura 4.31. se muestra la ruta metabólica propuesta. Aunque Appeldoorn y cols. (2009) no hallaron este metabolito en su estudio con ratas perfundidas, otros autores sí han descrito la formación del metilado de PB2 en un modelo de perfusión a través de intestino delgado aislado de rata (Spencer y cols., 2001), en plasma (Shoji y cols., 2006) y en orina (Baba y cols., 2002) de ratas. Sin embargo, esta es la primera vez que, en nuestro conocimiento, se identifica un derivado metilado de la procianidina B2 en este modelo celular de Caco-2. No se detectaron otro tipo de metabolitos derivados del flavanol PB2 por acción de las enzimas de fase II, glucuronidados y/o sulfatados.

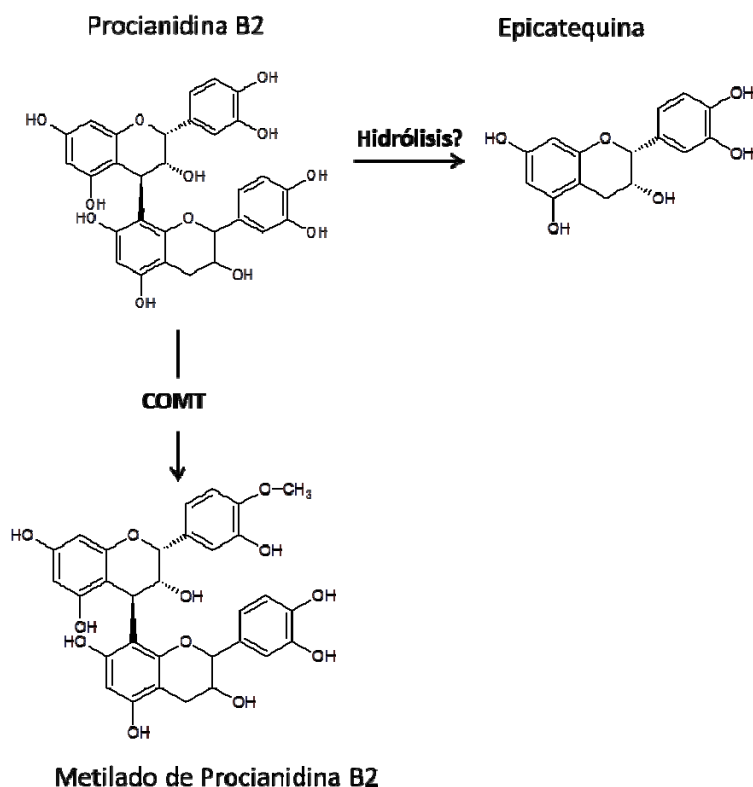


Figura 4.31. Metabolismo propuesto para la procianidina B2 por las células intestinales Caco-2. COMT: catecol-O-metiltransferasa

Otro aspecto de especial relevancia fue la potencial hidrólisis del dímero PB2 por las células Caco-2. Los resultados que aquí se presentan no permiten concluir que las células Caco-2 hidrolicen la molécula PB2 a EC, a pesar de que hay autores que sí lo han confirmado utilizando este mismo modelo celular (Hemmerbatsch y cols., 2013). Sin embargo, estos autores no comprobaron la pureza del standard utilizado ni realizaron estudios de estabilidad del compuesto PB2 en medio de cultivo antes de la incubación con las células, lo que en nuestra opinión no permite conocer el origen del flavanol EC. En nuestro caso, sí se han realizado dichos estudios de estabilidad, pudiendo detectar mediante la técnica LC-QTOF trazas de EC en la disolución del estándar PB2 en medio de cultivo, EC ausente en la disolución acuosa del patrón PB2. La cantidad de EC apenas varió tras la incubación con las células, lo que nos lleva a cuestionar que dicha hidrólisis sea mediada por los enterocitos. Por otra parte, en otro modelo diferente, Spencer y cols. (2001) detectaron la EC tras la perfusión de PB2 en el intestino aislado de rata, si bien estos autores tampoco especifican si comprobaron la pureza del compuesto PB2; además, no se debe olvidar que el metabolismo y los sistemas enzimáticos pueden

diferir entre las ratas y los humanos. Por todo lo anterior, la EC detectada tras la incubación del compuesto PB2 con las células Caco-2 sugiere tratarse más de un artefacto o de una ligera falta de estabilidad del dímero PB2 en medio de cultivo que de un producto del metabolismo celular, aunque serían necesarios estudios adicionales para su confirmación.

Respecto a la metabolización de los ácidos hidroxicinámicos, destacan fundamentalmente los metabolitos de fase I derivados de la desesterificación de los ácidos 3,5-diCQA y 5-CQA, mediados por las esterasas presentes en el borde en cepillo de las células Caco-2, liberando los ácidos cafeoilquínico y cafeico, respectivamente (Figura 4.32). Estos ácidos fueron a su vez susceptibles de la actividad de la enzima de fase II COMT, generando los ácidos feruloilquínico y ferúlico a partir de los ácidos cafeoilquínico y cafeico, respectivamente. No se detectaron derivados glucuronidados ni sulfatados de ninguno de los compuestos descritos. Igualmente, cabe destacar la no metilación del ácido 3,5-diCQA por acción de la COMT, siendo por tanto la vía preferente de metabolización la desesterificación seguida de metilación.

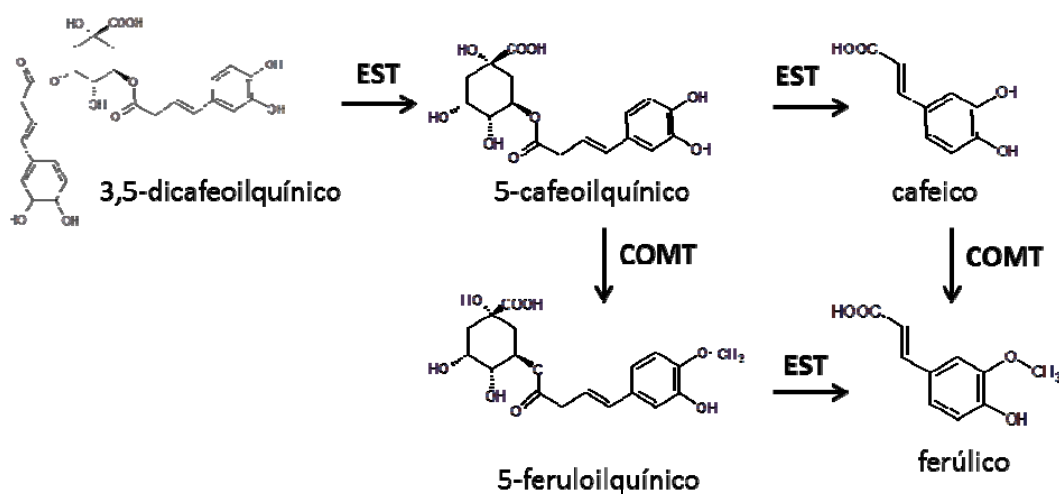


Figura 4.32. Ruta de biotransformación del ácido clorogénico y el ácido 3,5-dicafeoilquínico en las células del epitelio intestinal, Caco-2. EST: esterasa. COMT: catecol-O-metiltransferasa.

Es interesante resaltar el hecho de no haber detectado derivados glucuronidados de ninguno de los compuestos estudiados con este modelo celular, a pesar de que las células Caco-2 presentan la enzima UDP-glucuronosiltransferasa (Liu y cols., 2007).

La hidrólisis de los ácidos hidroxicinámicos (5-CQA y 3,5-diCQA) fue mínima, semejante a lo que ocurriría con el flavanol ECG. Sin embargo, los estándares disueltos en medio de cultivo no mostraron estos compuestos, confirmando así la capacidad de la célula para hidrolizar los ácidos hidroxicinámicos. Este comportamiento está de acuerdo con Farrell y cols. (2012), quienes además de describir este fenómeno de hidrólisis tras incubación con las células Caco-2, indicaron que la desesterificación no sería un factor principal en la absorción del ácido 3,5-diCQA. Igualmente, Guy y cols. (2009) etiquetaron a este compuesto como un sustrato “pobre” para la enzima esterasa, de ahí la resistencia relativa de los ácidos dicafeoilquinicos a la hidrólisis.

Cabe destacar que parte de los compuestos estudiados (flavanoles e hidroxicinámicos) que se absorben a nivel intestinal escapan de la acción enzimática de fase I y II, por lo que la molécula sin conjugar pasaría al torrente circulatorio.

Un aspecto que ha suscitado mucho debate es la capacidad de la célula para isomerizar los flavanoles EC, ECG y PB2 e hidroxicinámicos 5-CQA y 3,5-diCQA. El hecho de que el medio de cultivo afecte a la estabilidad de estas moléculas, facilitando la formación de un isómero para el caso de EC y ECG, respectivamente, cuatro para el compuesto PB2 y dos para los compuestos 5-CQA y 3,5-diCQA, respectivamente, dificultó evaluar el grado de contribución de las células. Se ha descrito que la isomerización es dependiente del pH del medio de cultivo y el metabolismo celular altera ese pH; por lo tanto, puede que la célula en sí no presente los mecanismos necesarios para isomerizar estos compuestos, sino que su efecto sea externo a ella, es decir, que modifique el pH del medio de cultivo y con ello la proporción de isómeros.

Cuando se evaluó el transporte de los fenoles se observó un comportamiento antagónico, de eflujo para los flavanoles ensayados y de absorción para los ácidos hidroxicinámicos. El mecanismo de eflujo descrito para los flavanoles EC y ECG estaría comprometiendo la absorción y, por tanto, limitando su paso al lado basolateral, equivalente al torrente sanguíneo. Los valores del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) y, por tanto, la velocidad de transferencia a través de la monocapa son muy pequeños, de acuerdo a la limitada biodisponibilidad de estos compuestos. Comparando ambos tipos de compuestos, el derivado galoilado (ECG) mostró una ligera mayor biodisponibilidad que el parental EC como se deduce de su mayor valor de índice de absorción (0,54 para ECG vs 0,36 para EC) y de porcentaje de absorción (1,5 y 2,3% para ECG y EC, respectivamente) (Figura 4.33.). Esto sugiere que la esterificación con ácido gálico del compuesto ECG mejora ligeramente el transporte y, por tanto, la

biodisponibilidad de este flavanol. También se observa una mayor acumulación intracelular de ECG comparado con EC, posiblemente debido al mecanismo de eflujo más eficiente para EC que para ECG, ya que se ha descrito que el ECG inhibe parcialmente los transportadores P-glicoproteína y MRP2 implicados en el transporte de eflujo (Kadowaki y cols., 2008), lo que dificultaría su paso a través de la membrana y facilitaría la acumulación intracelularmente. Tagashira y cols. (2012) evaluaron comparativamente la acumulación celular de EC y derivados galoilados y, de acuerdo a lo descrito, observaron que EC unida a ácido gálico mejoraba su acumulación intracelular en este mismo modelo celular.

Respecto al dímero PB2, no se pudo caracterizar su transporte, aunque otros autores, que han trabajado en condiciones más forzadas de tiempo de incubación y de concentración (Hemmersbach y cols., 2013), pudieron conocer que este compuesto sigue también un mecanismo preferente de eflujo en su proceso de absorción por las células Caco-2. Dentro del grupo de los flavanoles caracterizados, el dímero PB2 fue el menos biodisponible, de acuerdo con el estudio llevado a cabo con animales de experimentación (Baba y cols., 2002), donde se recuperó en orina al cabo de las 24 h post-ingesta tan sólo un 0,5% de la PB2 ingerida, frente al 55 y 30% para los monómeros EC y C, respectivamente.

En relación al grupo de los ácidos hidroxicinámicos ensayados, 5-CQA y 3,5-diCQA, se observa un mecanismo preferente de absorción, contrario a lo que ocurría en el grupo de los flavanoles. Aunque ambos compuestos mostraron el mismo índice de absorción, 3,5-diCQA manifestó mayor velocidad de transferencia (Papp) a través de la monocapa que 5-CQA, lo que apoyaría el mayor porcentaje recuperado en el compartimento basolateral para el derivado diacilquínico (8,0% vs 6,6% para 3,5-diCQA y 5-CQA, respectivamente). Farrell y cols. (2011) también describieron una mayor velocidad de transferencia del compuesto 3,4-diCQA que de 4-CQA en un modelo de epitelio gástrico. Adicionalmente, se ha observado una mayor acumulación intracelular del compuesto 3,5-diCQA en comparación con 5-CQA, semejante a lo que ocurría con el flavanol ECG respecto a EC. En aquella ocasión se relacionó con la capacidad del derivado galoilado ECG de inhibir los transportadores de eflujo, facilitando así su permanencia dentro de la célula. Sin embargo, esta justificación no valdría para el compuesto 3,5-diCQA, ya que su transporte preferente fue de absorción y no de eflujo.

Por último, no se debe olvidar la influencia del carácter lipofílico de la molécula en la transferencia a través de la monocapa. Diversos estudios han demostrado que la

biodisponibilidad de un compuesto guarda relación directa con el carácter apolar del compuesto (Yazdanian y cols., 1998; Mateos y cols., 2011). Esto estaría de acuerdo con la mayor biodisponibilidad de las moléculas ECG y 3,5-diCQA comparado con EC y 5-CQA, respectivamente.

En la Figura 4.33. se representan los porcentajes de absorción de los flavanoles (EC, ECG y PB2) y ácidos hidroxicinámicos (5-CQA y 3,5-diCQA) a través de la monocapa de células Caco-2, contabilizando únicamente el contenido registrado en el compartimento basolateral del Transwell. En conjunto, se puede observar que los ácidos hidroxicinámicos fueron más biodisponibles que los flavanoles. Sin embargo, el máximo porcentaje de absorción apenas alcanzó un 8% para el 3,5-diCQA, como compuesto con mayor concentración en el compartimento basolateral, de acuerdo a la reducida biodisponibilidad que se ha ido evidenciando para estos compuestos a lo largo del capítulo. A efectos fisiológicos, estos resultados sugieren que mayoritariamente los compuestos fenólicos aquí presentados no serían absorbidos en el intestino delgado, alcanzando el colon donde serían susceptibles de la acción de la microbiota colónica, la cual determinará el destino final para estos compuestos.

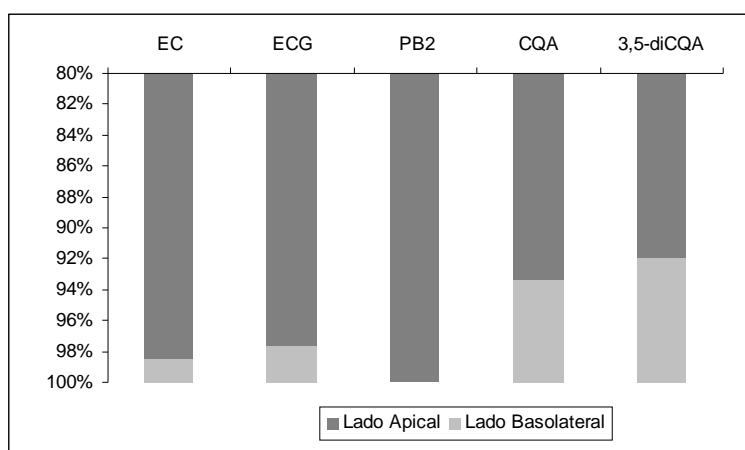


Figura 4.33. Transporte de flavanoles (EC, ECG y PB2) y ácidos hidroxicinámicos (5-CQA y 3,5-diCQ) a través de la monocapa de células Caco-2 tras 4 h de incubación.

4.3. BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN HUMANOS

4.3.1. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE LOS FLAVANOS DE DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO

4.3. BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN HUMANOS

4.3.1. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE FLAVANOLES DE LOS PRODUCTOS SOLUBLES DE CACAO

Para el estudio de la absorción y metabolismo de compuestos fenólicos de los productos solubles de cacao se recurrió a una intervención nutricional en 13 voluntarios (ver sección 3.2.3.3.1. de Material y Métodos), consistente en un estudio aleatorizado, cruzado y ciego en voluntarios sanos. Los sujetos tomaron dos productos solubles de cacao (CC y CC-PP) en dos días diferentes separados por un intervalo de dos semanas. En cada fase del estudio, cada participante bebió un producto soluble de cacao disuelto en 200 mL de leche semi-desnatada: cacao control CC (15 g) y cacao rico en polifenoles CC-PP (25 g) que proporcionaron 19,8 mg y 68,2 mg de flavanoles respectivamente. Se tomaron muestras de sangre a los voluntarios a tiempo inicial previo al consumo del producto y a los tiempos 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 h tras la ingesta de la bebida. Asimismo, se recogió la orina a los intervalos -2-0 y 0-4, 4-8, 8-12 y 12-24 h tras la ingesta de la bebida de cacao. Los dos últimos intervalos fueron colectados por los voluntarios en sus domicilios y entregados en la Unidad de Nutrición Humana del ICTAN a la mañana siguiente.

4.3.1.1. Optimización del Método de Extracción de Compuestos Fenólicos del Cacao Presentes en Muestras Biológicas (Plasma y Orina)

Para el análisis de compuestos fenólicos y metabolitos en muestras de plasma de los voluntarios se probaron distintos procedimientos de extracción: en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) y líquido-líquido.

La extracción en fase sólida es un método ampliamente utilizado en la literatura (Roura y cols., 2005; Del Rio y cols., 2010b; Ottaviani y cols., 2012), siendo la primera alternativa que se evaluó para el aislamiento de los fenoles del plasma. Así, a partir de un *pool* de plasma de varios voluntarios a tiempo 0 h (antes de la toma del producto), en el cual no se esperaba la presencia de compuestos fenólicos tras 48 h de abstención de ingesta de alimentos ricos en polifenoles, se adicionó el estándar epicatequina. Se probó el protocolo descrito por Roura y cols. (2005), quienes utilizaron cartuchos Oasis HLB 3cc

60 mg (Waters, Mildford, MA, EEUU) a base de un polímero universal, diseñado para la extracción de compuestos ácidos, básicos y neutros. Igualmente se ensayó con cartuchos Sep-Pack C18 1cc 50 mg (Waters, Mildford, MA, EEUU), que contiene un relleno hidrofóbico unido a silicio diseñado para la extracción de compuestos polares y no polares. La recuperación del compuesto epicatequina presente en el *pool* de plasma con ambos cartuchos, HLB y C18, no fue satisfactoria. También se ensayó la extracción en las placas multipocillo Ostro en formato 96 pocillos de 25 mg (Waters, Mildford, MA, EEUU), que facilita la precipitación de proteínas y la eliminación de fosfolípidos durante el aislamiento de los fenoles y sus metabolitos de las muestras biológicas, según indicaciones del fabricante. Con estas placas tampoco se recuperó nada de epicatequina, posiblemente porque en la retención de los fosfolípidos por la matriz de relleno de la placa multipocillo quedara también retenida la epicatequina.

Por todo ello, las pruebas de extracción de polifenoles y metabolitos en plasma se reorientaron a la extracción líquido-líquido. En primer lugar, se siguió el método descrito por Day y cols. (2001), seguido también por Stalmach y cols. (2009). Este método se basa en la precipitación de proteínas con acetonitrilo en presencia de ácido ascórbico y posterior extracción de los compuestos fenólicos con metanol. La recuperación del estándar adicionado fue mucho mayor que la obtenida con los métodos descritos de extracción en fase sólida, al igual que la repetibilidad. No obstante, se pudo observar que tan sólo con la precipitación proteica con acetonitrilo (3 veces) y posterior evaporación en vacío (ver Sección 3.2.3.4), los resultados eran semejantes a los obtenidos siguiendo el protocolo completo, y además su procesado requería menos tiempo. Por ello, se eligió éste último método de extracción de fenoles a partir de muestras plasmáticas generadas en el estudio con los productos solubles de cacao.

Respecto al análisis de orina, se trató de seguir la tendencia actual de evitar en lo posible las etapas de pretratamiento y concentración de la muestra (Ptolemy y cols., 2010; Martínez-López y cols., 2014a, 2014b) y se optó por su inyección directa en el equipo de análisis previa centrifugación. Sin embargo, se pudo observar un fenómeno de supresión de la señal analítica, que fue inmediatamente corregido cuando la muestra se diluyó al 50% con agua milli-Q. Por lo tanto, la muestra de orina sólo precisó su dilución al 50% con agua de milli-Q y centrifugación antes de su análisis.

Con respecto a las técnicas instrumentales utilizadas para el análisis de los compuestos fenólicos en las muestras de plasma y orina, se probó la cromatografía

líquida HPLC-DAD, así como por cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas simple cuadrupolo tras ionización en modo negativo por electrospray (LC-ESI-MS). Estas técnicas no resultaron ser lo suficientemente sensibles para la detección de metabolitos fenólicos en las muestras biológicas. Por ello, finalmente la técnica seleccionada fue la cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas simple cuadrupolo-tiempo de vuelo (LC-QTOF), por su significativa mayor sensibilidad, que permitió detectar los fenoles y metabolitos derivados tras la ingesta de dosis realistas de los productos objeto de este estudio.

La garantía que ofrece el LC-QTOF para la identificación y cuantificación de metabolitos fenólicos descartó la necesidad de practicar hidrólisis enzimática de los conjugados en plasma, ya que el conocimiento de las cantidades individuales de cada metabolito proporciona una idea más real sobre las rutas metabólicas preferentes de los fenoles de los productos solubles de cacao. Ahora bien, esta técnica no permite concretar la posición de los grupos sustituyentes típicos de los metabolitos derivados de la acción de enzimas de fase II (sulfato, metilo y/o glucurónido) en el compuesto fenólico ingerido, por lo que la identificación se completó por comparación con dos artículos recientemente publicados por Actis-Goretta y cols. (2012) y Ottaviani y cols. (2012), quienes se valieron de estándares sintéticos para la caracterización de los metabolitos generados tras el consumo de flavanoles presente en fuentes de cacao.

A continuación se describen los resultados obtenidos para el estudio de los metabolitos de fase II y los metabolitos de origen microbiano hallados en los fluidos biológicos, plasma y orina, de los voluntarios que tomaron los productos solubles de cacao.

4.3.1.2. Identificación de Metabolitos

Para la identificación de los metabolitos generados tras el consumo de fenoles presentes en los dos productos solubles de cacao (CC y CC-PP) se procedió de la misma manera a cómo se ha hecho en los estudios de biodisponibilidad *in vitro* con los modelos celulares, es decir, mediante metabolómica dirigida con búsqueda de la masa exacta y confirmación mediante el estudio de los perfiles de fragmentación molecular (MS/MS).

Para ello, se calculó la masa exacta teórica, ion cuasimolecular $[M-H]^-$ en modo negativo y la fórmula molecular teórica de los potenciales metabolitos derivados de la

fase II de los principales fenoles de los productos solubles de cacao, epicatequina y procianidina B2 (PB2), contemplando todas las posibles conjugaciones: derivados monometilados, monoglucuronidados y monosulfatados, así como combinaciones entre ellos (Tabla 4.26.)

La limitada biodisponibilidad observada para los fenoles en el intestino delgado, como se ha revisado en la introducción, sugiere que gran parte de esta fracción alcanzaría el intestino grueso y, por tanto, sería susceptible a la acción de la microbiota colónica. Por ello, se recurrió a la bibliografía publicada para conocer la identidad de los posibles metabolitos producidos por acción de la microbiota sobre los flavanoles, tomando como referencia tanto estudios *in vivo* como *in vitro* (Urpí-Sarda y cols., 2009a; Stoupi y cols., 2010, entre otros) y así determinar los datos para su identificación mediante LC-QTOF (Tabla 4.26.). Se ha evaluado la presencia de derivados del grupo de hidroxifenilvalerolactonas, alcohol propan-2-ol y ácidos valérico, hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético, hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Considerando que parte de estos metabolitos se absorben y transportan a través de la circulación sistémica hacia el hígado, adicionalmente se han incluido en la lista otros potenciales metabolitos derivados de fase II de los metabolitos microbianos, algunos de ellos reportados recientemente en la literatura (Urpí-Sarda y cols., 2009a).

La búsqueda de los iones cuasimoleculares $[M-H]^-$ de los **flavonoides epicatequina y PB2** (m/z 289,0718 y 577,1351, respectivamente) no ofreció ningún pico en el cromatograma *Extracted Ion Chromatogram* (EIC), sugiriendo una completa biotransformación o falta de sensibilidad de la técnica para su detección.

Sin embargo, cuando se seleccionó el ion cuasimolecular del derivado glucuronidado de EC (m/z 465,1038), se observó un pico a TR 7,8 min, cuyos valores de *score* y *error*, así como la fórmula molecular propuesta por el software, fueron coincidentes con el compuesto epicatequín-glucurónido. El análisis mediante MS/MS completó la caracterización de este metabolito, observando parte del ion cuasimolecular sin fragmentar (m/z 465,1038), marcado con un pequeño punto de color azul en la Figura 4.34.a., además del ion-fragmento a m/z 289 correspondiente a la epicatequina tras la pérdida del grupo glucurónido a m/z 176. Gracias a los estudios previos de otros autores (Actis-Goretta y cols., 2012; Ottaviani y cols., 2012) se pudo asignar este compuesto al derivado epicatequín-3'-glucurónido.

Tabla 4.26. Características de metabolitos de fase II y microbianos potencialmente presentes en las muestras biológicas de los voluntarios que consumieron los distintos productos de cacao.

Compuesto	Masa Exacta Teórica	Masa Ion [M-H] ⁻	Fórmula Molecular
Flavanoles			
Epicatequina	290,0790	289,0718	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Epicatequín-glucurónido	466,1111	465,1038	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂
Epicatequín-sulfato	370,0359	369,0286	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S ₁
Metil-epicatequina	304,0947	303,0874	C ₁₆ H ₁₆ O ₆
Metil-epicatequín-glucurónido	480,1268	479,1195	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂
Metil-epicatequín-sulfato	384,0515	383,0442	C ₁₆ H ₁₆ O ₉ S
Epicatequín-sulfoglucurónido	546,0679	545,0607	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₅ S
Metil-epicatequín-sulfoglucurónido	560,0836	559,0763	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₅ S
Procianidina B2 (PB2)	578,1421	577,1351	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
PB2-glucurónido	754,1745	753,1672	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₈
PB2-sulfato	658,0992	657,0920	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅
Metil-PB2	592,1581	591,1508	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₂
Derivados de hidroxifenilvalerolactona			
5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona (DHPV)	208,0736	207,0663	C ₁₁ H ₁₂ O ₄
DHPV-glucurónido	384,1056	383,0984	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀
DHPV-sulfato	288,0304	287,0231	C ₁₁ H ₁₂ O ₇ S ₁
5-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)- γ -valerolactona (MHPV)	222,0892	221,0819	C ₁₂ H ₁₄ O ₄
MHPV-glucurónido	398,1213	397,1140	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₀
MHPV-sulfato	302,0460	301,0387	C ₁₂ H ₁₄ O ₇ S
5-(3'-hidroxifenil)- γ -valerolactona (HPV)	192,0786	191,0714	C ₁₁ H ₁₂ O ₃
HPV-glucurónido	368,1107	367,1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉
HPV-sulfato	272,0355	271,0282	C ₁₁ H ₁₂ O ₆ S
Derivados de ácido valérico			
Ác. 5-(3',4'-dihidroxifenil)-valérico (DHPVal)	210,0892	209,0819	C ₁₁ H ₁₄ O ₄
DHPVal-glucurónido	386,1213	385,1140	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀
DHPVal-sulfato	290,0460	289,0387	C ₁₁ H ₁₄ O ₇ S
Ác. 5-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-valérico (MHPVal)	224,1049	223,0976	C ₁₂ H ₁₆ O ₄
MHPVal-glucurónido	400,1369	399,1297	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀
MHPVal-sulfato	304,0617	303,0544	C ₁₂ H ₁₆ O ₇ S
Ác. 5-(3'-hidroxifenil)-valérico (HPVal)	194,0949	193,0870	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
HPVal-glucurónido	370,1264	369,1191	C ₁₇ H ₂₂ O ₉
HPVal-sulfato	274,0511	273,0438	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ S
Ác. 5-(3',4'-dihidroxifenil)-5-hidroivalérico (HDHPVal)	226,0841	225,0768	C ₁₁ H ₁₄ O ₅
HDHPVal-glucurónido	402,1162	401,1089	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₁
HDHPVal-sulfato	306,0409	305,0337	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S
Ác. (E)-5-(2',4'-dihidroxifenil)-2-pentenoico (DHPen)	208,0736	207,0663	C ₁₁ H ₁₂ O ₄
DHPen-glucurónido	384,1057	383,0984	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀
DHPen-sulfato	288,0304	287,0231	C ₁₁ H ₁₂ O ₇ S
Derivados de alcohol propan-2-ol			
Alcohol 1-(3',4'-dihidroxifenil)-3-(2'',4'',6''-trihidroxifenil)-2-propanol (DHTHPOL)	292,0947	291,0874	C ₁₅ H ₁₆ O ₆
DHTHPOL-glucurónido	468,1268	467,1195	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₂
DHTHPOL-sulfato	372,0515	371,0442	C ₁₅ H ₁₆ O ₉ S
Alcohol 1-(3'-metoxi,4'-hidroxifenil)-3-(2'',4'',6''-trihidroxifenil)-2-propanol (MHTHPOL)	306,1103	305,1031	C ₁₆ H ₁₈ O ₆
MHTHPOL-glucurónido	482,1424	481,1351	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₂
MHTHPOL-sulfato	386,0672	385,0599	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ S
Alcohol 1-(3'-hidroxifenil)-3-(2'',4'',6''-trihidroxifenil)-2-propanol (HTHPOL)	276,0998	275,0925	C ₁₅ H ₁₆ O ₅
HTHPOL-glucurónido	452,1319	451,1246	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁
HTHPOL-sulfato	356,0566	355,0493	C ₁₅ H ₁₆ O ₈ S

Tabla 4.26. (continuación). Características de metabolitos de fase II y microbianos potencialmente presentes en las muestras biológicas de los voluntarios que consumieron los distintos productos de cacao.

Compuesto	Masa Exacta Teórica	Masa Ion [M-H] ⁻	Fórmula Molecular
Derivados de ácido fenilpropiónico			
Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico	182,0579	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄
Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico	196,0736	195,0663	C ₁₀ H ₁₂ O ₄
Ácido 3-hidroxifenilpropiónico	166,0630	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃
Derivados de ácido hidroxifenilacético			
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	168,0423	167,0350	C ₈ H ₈ O ₄
Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético	182,0579	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄
Ácido 3-hidroxifenilacético	152,0473	151,0401	C ₈ H ₈ O ₃
Derivados de ácido hidroxicinámico			
Ácido cumárico	164,0473	163,0401	C ₉ H ₈ O ₃
Ácido cafeico	180,0423	179,0350	C ₉ H ₈ O ₄
Ácido ferúlico	194,0579	193,0506	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Derivados de ácido hidroxibenzoico			
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (protocatéquico)	154,0266	153,0193	C ₇ H ₆ O ₄
Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (vanílico)	168,0423	167,0350	C ₈ H ₈ O ₄
Ácido 4-hidroxibenzoico/3-hidroxibenzoico	138,0317	137,0244	C ₇ H ₆ O ₃
Ácido 4-hidroxihipúrico/3-hidroxihipúrico	195,0532	194,0459	C ₉ H ₉ O ₄ N

Siguiendo con los derivados glucuronidados, se confirmó la presencia del derivado metil-epicatequín-glucurónido (m/z 479,1195). Este compuesto mostró un TR 8,0 min, mayor que el descrito para el derivado glucuronidado (TR 7,8 min), coherente con la mayor lipofilidad que aporta el grupo metilo a la molécula. El resto de parámetros (*score*, error y fórmula molecular tentativa), junto con el perfil de fragmentación MS/MS, ion cuasimolecular e ion-fragmento a m/z 303 correspondiente al compuesto metil-epicatequina (Figura 4.34.b.), permitió su inequívoca identificación (Tabla 4.27.). Previamente Actis-Goretta y cols. (2012) reportaron en orina la presencia de cuatro derivados metil-epicatequín-glucurónido; a falta de concretar la posición del grupo glucurónido, asignaron a los tres compuestos de menor TR y más abundantes como derivados 3'-metil-epicatequín-glucurónido, y aquel de mayor TR y menor concentración como 4'-metil-epicatequín-glucurónido. Por ello, el compuesto detectado en el presente trabajo se asignó tentativamente como 3'-metil-epicatequín-glucurónido, de acuerdo a la mayor abundancia descrita para estos metabolitos comparados con el derivado 4'-metil-epicatequín-glucurónido.

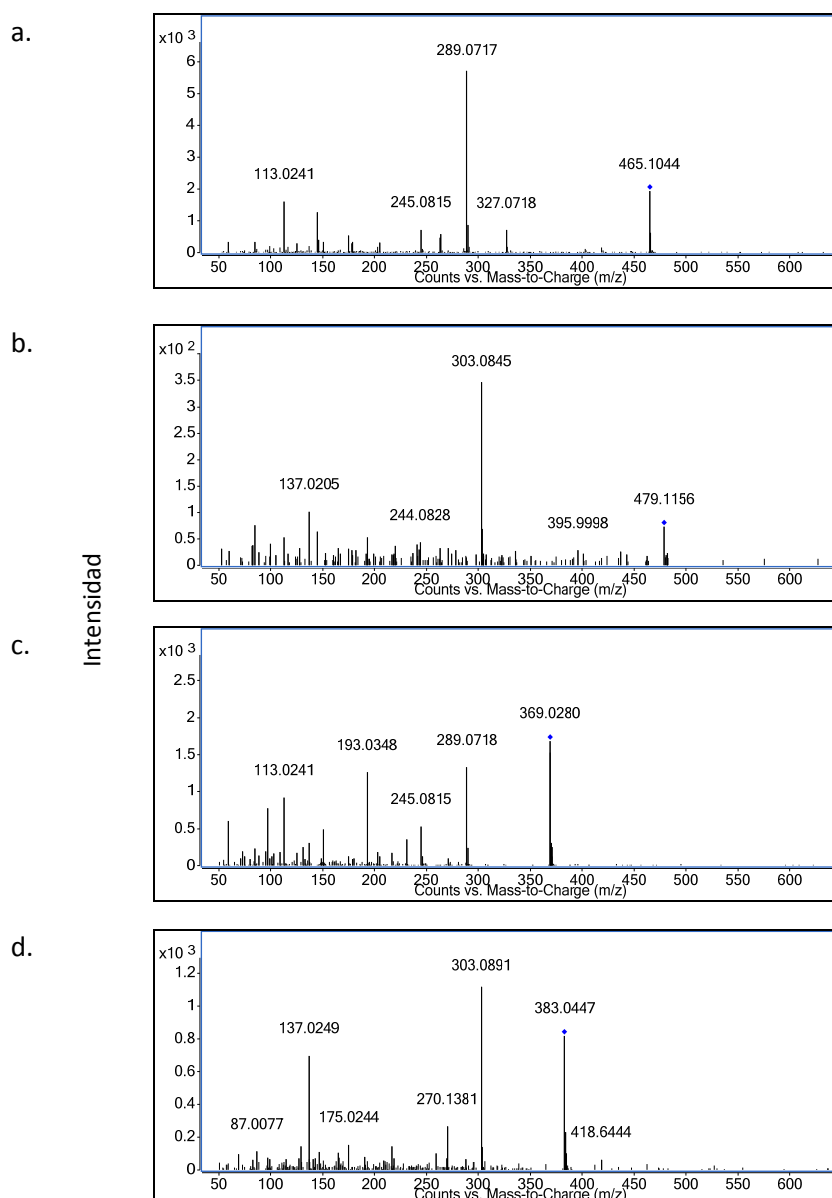


Figura. 4.34. Espectros de masas MS^2 de los metabolitos detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao: a. epicatequín-3'-glucurónido (TR: 7,8 min); b. 3'-metil-epicatequín-glucurónido (TR: 8,0 min); c. epicatequín-3'-sulfato (TR: 9,8 min); d. metil-epicatequín-sulfato (común para los tres isómeros de TR 11,0, 11,7 y 12,3 min). TR: Tiempo de Retención. El punto azul corresponde con el ion molecular.

A continuación se procedió a la caracterización de los derivados sulfatados. Se identificó por una parte el epicatequín-sulfato, pico cromatográfico a TR 9,8 min, y patrón de fragmentación (Figura 4.34.c) afín a esta estructura, con un ion cuasimolecular $[M-H]^-$ a m/z 369,0286 e ion-fragmento a m/z 289 propio de la epicatequina tras la pérdida del residuo sulfato (m/z 80). En concreto, el metabolito identificado se refiere a epicatequín-3'-sulfato como ya se ha descrito tras el consumo

de chocolate negro (Actis-Goretta y cols., 2012) y cacao (Ottaviani y cols., 2012) (Tabla 4.27.).

Por último, la búsqueda del ion cuasimolecular m/z 383,0442 ofreció tres picos cromatográficos a TR 11,0, 11,7 y 12,3 min, que se asignaron tentativamente como derivados metil-epicatequín-sulfato por los datos de *score*, error y fórmula molecular sugerida por el software MassHunter. Estos tres compuestos presentaban el mismo patrón de fragmentación (MS/MS, ion-fragmento a m/z 303 del compuesto metil-epicatequina tras perder el residuo sulfato a m/z 80), lo que permitió confirmar su identidad (Figura 4.34.d.). En base a los estudios de Actis-Goretta y cols. (2012) y Ottaviani y cols. (2012), se asignaron tentativamente a 3'-metil-epicatequín-5-sulfato, 3'-metil-epicatequín-7-sulfato y 4'-metil-epicatequín-5-sulfato (Tabla 4.27.).

Además de no detectarse el dímero PB2, tampoco se identificaron derivados glucuronidados, sulfatados o metilados del mismo.

A continuación se ahondó en la búsqueda de otros metabolitos derivados de la acción de la microflora intestinal, denominados en adelante **metabolitos microbianos**. Si bien estos metabolitos pueden provenir de otras rutas de biotransformación, recientemente ha cobrado gran relevancia un conjunto de compuestos derivados de la **hidroxifenilvalerolactona** por su implicación directa en el metabolismo de los flavanoles del cacao tras la acción del sistema enzimático microbiano (Urpí-Sarda y cols., 2009a). La búsqueda del ion cuasimolecular a m/z 207,0663 proporcionó un pico a TR 10,8 min cuyos valores de *score*, error y fórmula propuesta por el software MassHunter fueron coincidentes con 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona (DHPV). Además, su perfil de fragmentación obtenido por MS/MS (Figura 4.35.a.) mostró la pérdida de una molécula a m/z 163, de acuerdo a la fragmentación descrita por otros autores (Urpí-Sarda y cols., 2009a; Sánchez-Patán y cols., 2011) (Tabla 4.27.).

Dado que los metabolitos microbianos pueden ser absorbidos en el colon y conjugados por acción de enzimas de fase II, se planteó la búsqueda de derivados sulfatados, glucuronidados y metilados de DHPV. Así, se detectó un pico cromatográfico a TR 12,0 min que respondía a la identidad del DHPV-sulfato ($[M-H]^-$ a m/z 287,0231 e iones-fragmento a m/z 207 y 163) (Figura 4.35.c.). Atendiendo a la posición preferente de conjugación del C3', como se ha observado en los metabolitos de fase II, se identificó tentativamente como derivado DHPV-3'-sulfato. Por otra parte, se observaron dos picos a TR 7,4 y 8,4 min con patrón de fragmentación propio del compuesto DHPV-glucurónido, ($[M-H]^-$ a m/z 383,0984 e iones-fragmento a m/z 207 y 163) (Figura

4.35.b.). Se identificó tentativamente como DHPV-3'-glucurónido el metabolito de TR 8,4 min por su mayor cantidad detectada en la orina (ver apartado de cuantificación 4.3.1.4.), mientras que el compuesto que eluía a TR 7,4 min se asignó como el isómero DHPV-4'-glucurónido (Tabla 4.27.). Además, se ha descrito que en condiciones cromatográficas semejantes a las aquí utilizadas, los isómeros glucuronidados y sulfatados de la epicatequina en la posición C4' eluyen antes que los de la posición C3', contrario a lo que ocurre con los derivados metilados (Actis-Goretta y cols., 2012).

Tabla 4.27. Caracterización por LC-QTOF con ionización negativa de los metabolitos de fase II y microbianos hallados en los fluidos biológicos de los voluntarios que consumieron cacao.

TR (min)	Ion Molecular Masa Teórica (M-H)	Formula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS ² (m/z)	Identificación Tentativa	Fluido
Metabolitos fase II							
Flavanoles							
7,8	465,1038	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	92,3	3,8	289	Epicatequín-3'-glucurónido	P, O
8,0	479,1195	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	75,6	3,17	303	3'-Metil-epicatequín-glucurónido	O
9,8	369,0286	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	98,5	-0,42	289	Epicatequín-3'-sulfato	P, O
11,0	383,0442	C ₁₆ H ₁₆ O ₉ S	98,8	0,28	303	3'-Metil-epicatequín-5-sulfato	P, O
11,7	383,0442	C ₁₆ H ₁₆ O ₉ S	98,8	-0,62	303	3'-Metil-epicatequín-7-sulfato	P, O
12,3	383,0442	C ₁₆ H ₁₆ O ₉ S	92,9	2,46	303	4'-Metil-epicatequín-5-sulfato	O
Derivados de hidroxifenilvalerolactonas							
7,4	383,0984	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	95,7	-2,68	207;163	DHPV-4'-glucurónido	O
8,4	383,0984	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	95,4	2,59	207;163	DHPV-3'-glucurónido	P, O
12,0	287,0231	C ₁₁ H ₁₂ O ₇ S	94,7	-3,21	207;163	DHPV-3'-sulfato	P, O
8,6	397,1140	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₀	81,6	0,45	221	MHPV-glucurónido	P, O
12,0	301,0387	C ₁₂ H ₁₄ O ₇ S	94,8	-1,04	221	MHPV-sulfato	O
9,4	367,1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	98,5	1,17	191	HPV-3'-glucurónido	O
11,7	271,0282	C ₁₁ H ₁₂ O ₆ S	97,4	-2,92	191	HPV-3'-sulfato	P, O
Derivados de ácido valérico							
7,6	385,1140	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	91,3	-0,67	209	DHPVal-glucurónido	O
8,7	289,0387	C ₁₁ H ₁₄ O ₇ S	98,8	-1,19	209	DHPVal-sulfato	P, O
5,1	401,1089	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₁	95,7	-1,07	225	HDHPVal-glucurónido	O
7,3	305,0337	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	94,7	-3,25	225	HDHPVal-sulfato	P, O
Metabolitos microbianos							
10,8	207,0663	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	87,1	0,68	163,	DHPV	P, O
11,6	191,0714	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	92,1	-1,00	147	HPV	O
9,2	209,0819	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	87,2	-0,78	191	DHPVal	O
5,5	225,0768	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	91,1	1,15	179	HDHPVal	O
12,6	207,0663	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	75,6	-0,95		DHPen	O
8,5	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄	99,0	-0,26	137, 122	Ác. 3,4-dihidroxifenilpropiónico	P, O
10,8	195,0663	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	95,9	1,63	137	Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico	P, O
11,1	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃	82,2	5,1	121	Ácido 3-hidroxifenilpropiónico	P, O
5,6	167,0350	C ₈ H ₈ O ₄	97,9	-0,92	123	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	P, O
6,5	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄	82,9	3,2	137	Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético	O
7,4	151,0401	C ₈ H ₈ O ₃	98,5	-2,95	107	Ácido 3-hidroxifenilacético	O
12,3	193,0506	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	98,0	3,01	134	Ácido ferúlico	P, O
15,4	193,0506	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	82,3	2,41	134	Ácido isoferúlico	O
3,8	153,0193	C ₇ H ₆ O ₄	75,6	-1,87	109	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	P, O
10,7	194,0459	C ₉ H ₉ O ₄ N	86,8	1,83	100	Ácido 4-hidroxihipúrico	P, O
14,1	194,0459	C ₉ H ₉ O ₄ N	86,5	-1,73	150	Ácido 3-hidroxihipúrico	P, O
6,3	137,0244	C ₇ H ₆ O ₃	86,3	1,24	93	Ácido hidroxibenzoico	P, O

P, plasma; O, orina.

Resultados y Discusión

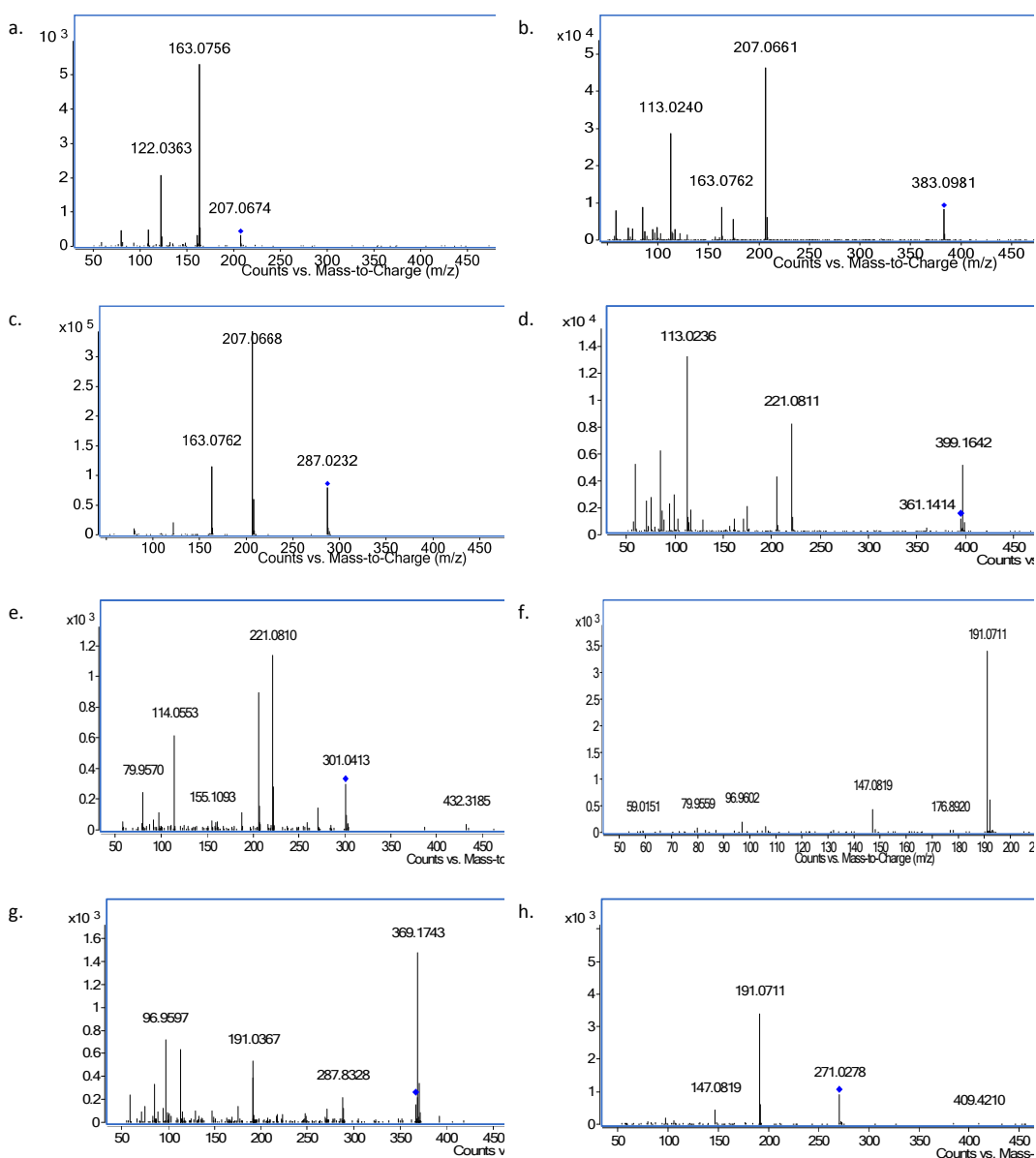


Figura 4.35. Espectros de masas MS² de los metabolitos derivados de hidroxifenilvalerolactonas detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao: a. 5-(3',4'-dihydroxifenil)- γ -valerolactona (DHPV); b. DHPV-glucurónido (ambos isómeros a TR 7,4 y 8,4 min); c. DHPV-3'-sulfato; d. 5-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)- γ -valerolactona-glucurónido (MHPV-glucurónido); e. MHPV-sulfato; f. 5-(3'-hidroxifenil)- γ -valerolactona (HPV); g. HPV-glucurónido; h. HPV-sulfato. El punto azul corresponde con el ion molecular.

Respecto al derivado metilado de DHPV, MHPV, no se detectó como tal, aunque sí sus derivados sulfatado y glucuronidado. En efecto, la búsqueda del ion [M-H]⁻ a m/z 397,1140 ofreció un pico cromatográfico a TR 8,6 min, con fragmentación propia de un derivado glucuronidado (ion-fragmento a m/z 221 generado tras la pérdida de un resto glucurónido, m/z 176) (Figura 4.35.d.), lo que permitió su identificación. Igualmente, el

derivado sulfatado se identificó gracias a la fragmentación observada durante el análisis MS/MS del pico cromatográfico a TR 12,0 min, el cual mostró un ion cuasimolecular a m/z 301,0387 e ion-fragmento a m/z 221, coherente con la pérdida del resto sulfato (m/z 80) (Figura 4.35.e.). La ausencia de estándares y referencias en la literatura para estos metabolitos dificultó precisar las posiciones de conjugación (grupos metilo y glucurónido para el compuesto MHPV-glucurónido y grupos metilo y sulfato para el compuesto MHPV-sulfato), por lo que no se hizo ninguna asignación tentativa.

Por otra parte y basado en la ruta de deshidroxilación preferente en el C4' del anillo B descrita para los flavanoles (Monagas y cols., 2010), se postuló la presencia en las muestras biológicas del compuesto 5-(3'-hidroxifenil)- γ -valerolactona (HPV) y sus metabolitos derivados de fase II. La búsqueda del ion $[M-H]^-$ a m/z 191,0714 arrojó un pico a TR 11,6 min avalado por el fragmento a m/z 147, que permitió la identificación del compuesto HPV (Figura 4.35.f.). Igualmente, los picos a TR 9,4 y 11,7 min mostraron un patrón de fragmentación coherente con un derivado glucuronidado ($[M-H]^-$ a m/z 367 y fragmento a m/z 191) y un derivado sulfatado ($[M-H]^-$ a m/z 271 y fragmento a m/z 191), respectivamente (Figura 4.35.g. y h.). De acuerdo a la posición C3' del grupo hidroxilo, estos compuestos se han identificado tentativamente como HPV-3'-glucurónido y HPV-3'-sulfato, respectivamente.

Previo a la formación de hidroxifenilvalerolactonas, el flavanol evoluciona a un compuesto intermedio con estructura derivada de un **alcohol propan-2-ol**, caracterizado recientemente en un experimento de fermentación *in vitro* centrado en el estudio comparativo de la biotransformación de epicatequina y el dímero PB2 por la microbiota fecal humana (Stoupi y cols., 2010). Por ello, se evaluó la presencia del alcohol 1-(3',4'-dihidroxifenil)-3-(2'',4'',6''-trihidroxifenil)-2-propanol (DHTHPOL), que procede de la apertura del anillo central (C) de la epicatequina y el compuesto deshidroxilado alcohol 1-(3'-hidroxifenil)-3-(2'',4'',6''-trihidroxifenil)-2-propanol (HTHPOL), clave en la ruta de biotransformación basada en la deshidroxilación en C4' descrita para los flavanoles. Igualmente, se evaluó la presencia de los derivados de fase II de DHTHPOL y HTHPOL (sulfatado, glucuronidado y metilado). La búsqueda no permitió identificar ninguno de los compuestos citados relacionados con la estructura alcohólica propan-2-ol, posiblemente por presentar una estabilidad limitada y evolución rápida a compuestos relacionados con hidroxifenilvalerolactona.

Los compuestos con estructura hidroxifenilvalerolactona evolucionan a derivados del **ácido valérico**. En el presente trabajo se han detectado y caracterizado

algunos compuestos de este grupo. Así, se ha identificado el ácido 5-(3',4'-dihidroxifenil)-valérico (DHPVal) gracias al ion cuasimolecular $[M-H]^-$ a m/z 209,0819 e ion fragmento a m/z 191 (Figura 4.36.a.), correspondiente con el pico cromatográfico a TR 9,2 min, aunque no se ha detectado el derivado deshidrolixado, ácido 5-(3'-hidroxifenil)-valérico (HPVal). Además, los resultados revelaron inequívocamente la presencia de un derivado glucuronidado (TR 7,6 min) y un derivado sulfatado de DHPVal (TR 8,7 min), que ofrecieron un ion cuasimolecular de $[M-H]^-$ a m/z 385 y 289, respectivamente, e ion-fragmento común a m/z 209, correspondiente al precursor DHPVal (Figuras 4.36.b. y c.). No se detectó ningún derivado glucuronidado y/o sulfatado del compuesto HPVal.

Por otra parte, se ha buscado un compuesto relacionado con la serie del ácido valérico, 5-(3',4'-dihidroxifenil)-5-hidroivalérico (HDHPVal), asignado tentativamente por Stoupi y cols. (2010) en el estudio de fermentación *in vitro* de epicatequina y PB2. Los resultados revelaron la presencia de un pico cromatográfico a TR 5,5 min e ion cuasimolecular $[M-H]^-$ a m/z 225,0768, con un patrón de fragmentación MS/MS coincidente con el descrito por los mencionados autores (ion-fragmento a m/z 179), y resto de parámetros ofrecidos por el software MassHunter (*score* y *error*) que vinculaba con la masa molecular $C_{11}H_{14}O_5$ propia del compuesto HDHPVal (Figura 4.36.d.). Asimismo, se identificaron sus derivados glucuronidado ($[M-H]^-$ a m/z 401 e ion-fragmento a m/z 225, correspondiente al precursor HDHPVal) y sulfatado ($[M-H]^-$ a m/z 305 e ion-fragmento a m/z 225), que eluyeron a 5,1 (Figura 4.36.e.) y 7,3 min (Figura 4.36.f.), respectivamente. Relacionado con los metabolitos de fase II, se evaluó la presencia del derivado metilado del compuesto DHPVal, el ácido 5-(3'-metoxi, 4'-hidroxifenil)-valérico (MHPVal), si bien no se identificó ni el compuesto libre ni sus derivados de fase II.

Por último, tomando de nuevo como referencia el trabajo de Stoupi y cols. (2010), se evaluó la presencia del ácido 5-(E)-(2',4'-dihidroxifenil)-2-pentenoico (DHPen) y que derivaría de la fragmentación del dímero PB2 a nivel colónico. Este compuesto presenta una fórmula molecular y, por tanto, un ion cuasimolecular idéntico ($C_{11}H_{12}O_4$ y $[M-H]^-$ de m/z 207,0663) al compuesto DHPV, aunque diferente coeficiente de polaridad ($\log P$ 1,32 y 1,99 para DHPV y DHPen, respectivamente). Así, al buscar el ion cuasimolecular 207,0663 dio lugar a dos picos cromatográficos a los TR 10,8 y 12,6 min, que se asignaron tentativamente como DHPV y DHPen, respectivamente, en base a la distinta polaridad de estas dos moléculas. Estos compuestos de igual masa molecular

tienen estructuras químicas diferentes y, por tanto, patrón de fragmentación MS/MS específica. Sin embargo, el escaso contenido en orina del metabolito DHPen, por debajo del límite de cuantificación (ver Tablas 4.29. y 4.30.), no permitió obtener su espectro MS/MS. No se detectaron derivados de fase II del compuesto DHPen.

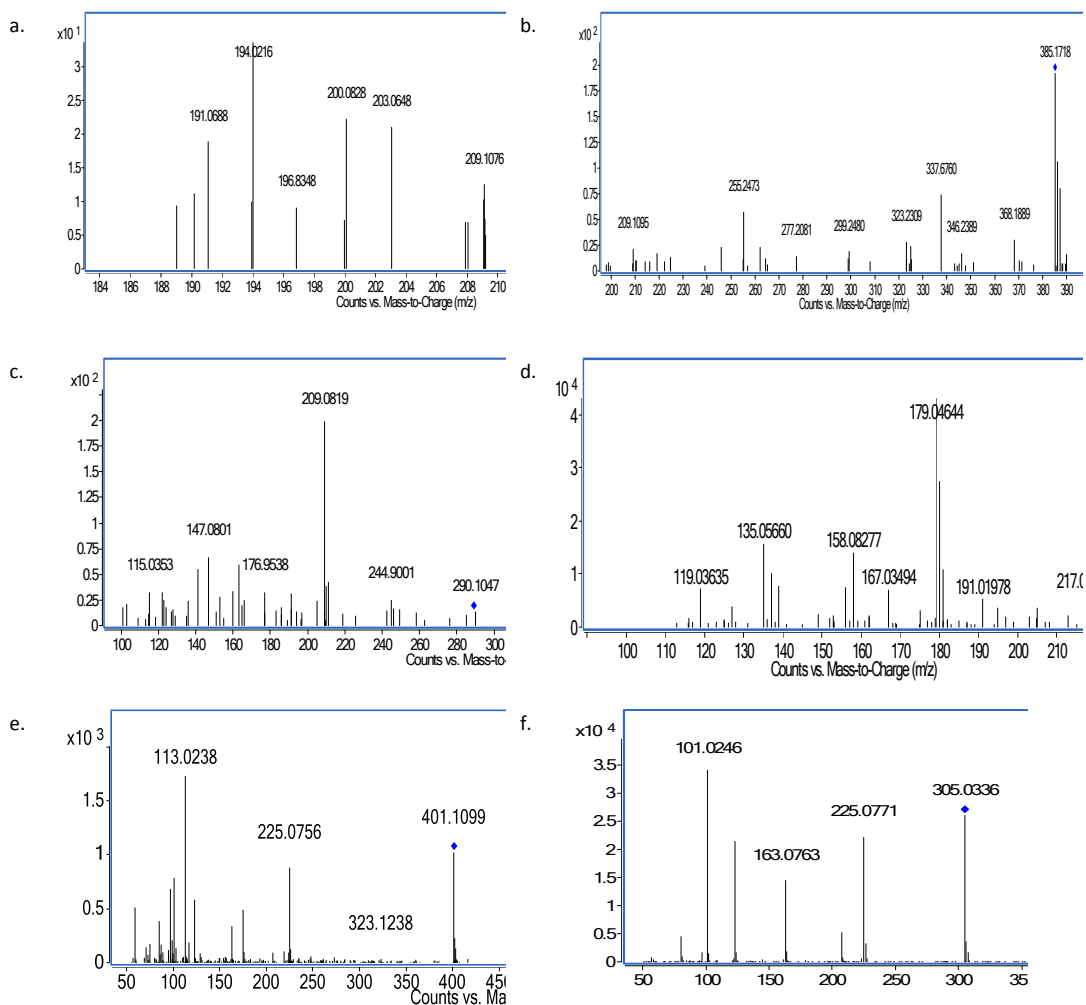


Figura 4.36. Espectros de masas MS² de los metabolitos derivados de ácido valérico detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao. a. ácido 5-(3',4'-dihydroxyfenil)-valérico (DHPVal); b. DHPVal-glucurónido; c. DHPVal-sulfato; d. ácido 5-(4-hidroxi)-(3',4'-dihydroxyfenil)-valérico (HDHPVal); e. HDHPVal-glucurónido; f. HDHPVal-sulfato. El punto azul corresponde con el ion molecular.

A continuación se procedió a la identificación de compuestos derivados del **ácido hidroxifenilpropiónico**, descritos en la ruta de biotransformación colónica de los flavanoles (Urpí-Sarda y cols., 2009a; Stoupi y cols., 2010). En el presente trabajo se han detectado los ácidos 3,4-dihydroxyfenilpropiónico, 3-metoxi-4-fenilpropiónico y 3-hidroxifenilpropiónico, cuyo patrón de fragmentación MS/MS resultó coherente con los

estándares comerciales utilizados para su caracterización (Figuras 4.37.a, b. y c., respectivamente).

De la misma manera se identificaron algunos compuestos del grupo del **ácido hidroxifenilacético**, en particular los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, 3-metoxi-4-hidroxifenilacético y 3-hidroxifenilacético (Figuras 4.37.d., e. y f., respectivamente), identificación avalada por estándares comerciales.

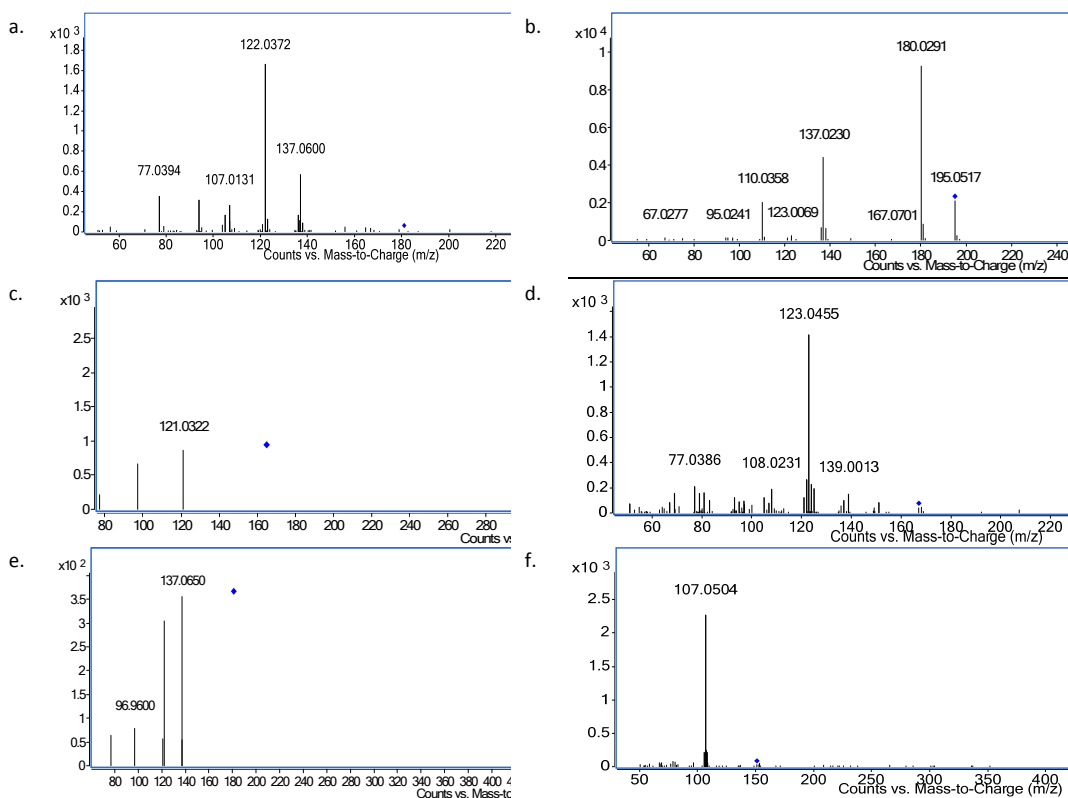


Figura 4.37. Espectros de masas MS² de los metabolitos microbianos detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao. a. ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico; b. ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico; c. ácido 3-hidroxifenilpropiónico; d. ácido 3,4-dihidroxifenilacético; e. ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético; f. ácido 3-hidroxifenilacético. El punto azul corresponde con el ion molecular.

Por último, se confirmó la presencia de otros **fenoles simples** tales como los ácidos ferúlico, isoferúlico, protocatéuico, 3-hidroxihipúrico, 4-hidroxihipúrico e hidroxibenzoico, cuyos datos proporcionados por el software MassHunter (*score*, *error* y fórmula molecular propuesta), así como el patrón de fragmentación MS/MS (Figura 4.38.) y estándares comerciales permitió su inequívoca identificación.

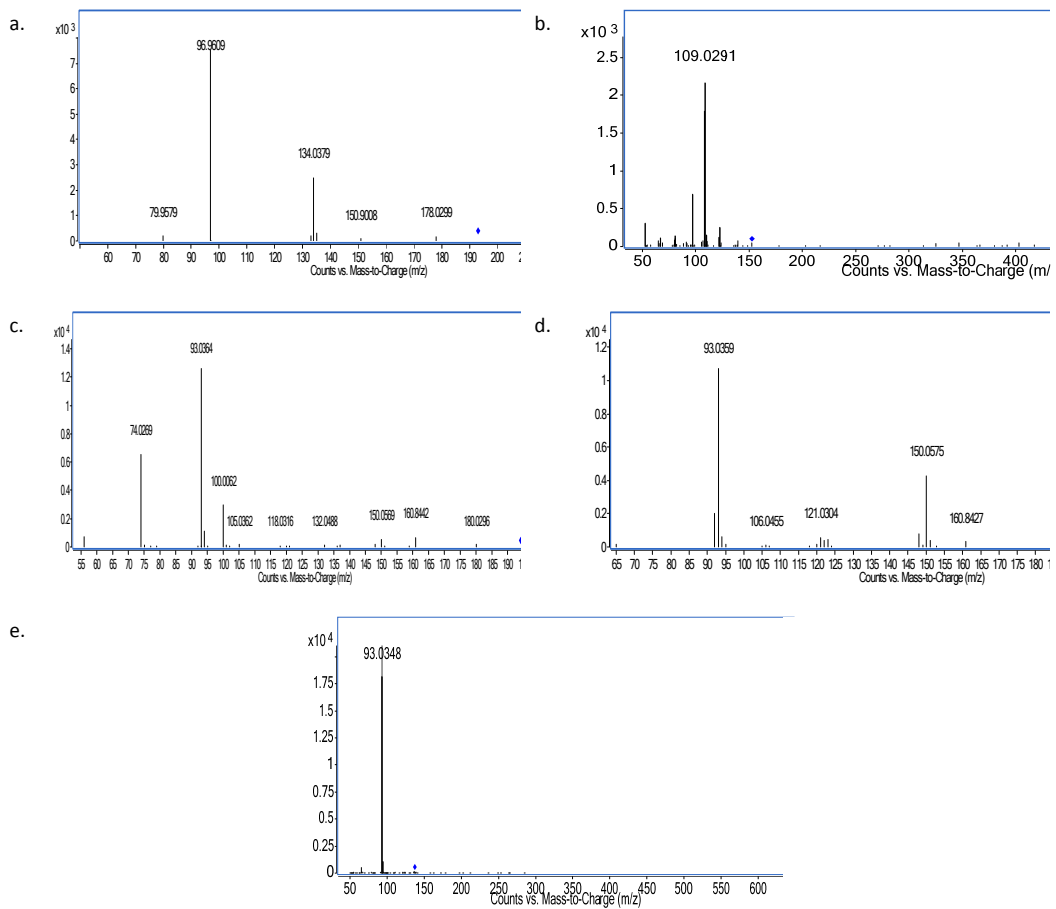


Figura 4.38. Espectros de masas MS^2 de los metabolitos microbianos detectados en orina y/o plasma de los voluntarios tras la ingesta de productos solubles de cacao. a. ácidos ferúlico/isoferúlico; b. ácido protocatéquico; c. ácido 4-hidroxihipúrico; d. ácido 3-hidroxihipúrico; e. ácido hidroxibenzoico. El punto azul corresponde con el ion molecular.

En la Tabla 4.27. se recogen los datos espectroscópicos de los compuestos identificados derivados del metabolismo de flavanoles, además de los fluidos biológicos dónde se han detectado, aunque en este apartado apenas se hace mención sobre la ubicación de cada analito ya que se hará con detalle en los apartados 4.3.1.3. (plasma) y 4.3.1.4. (orina).

4.3.1.3. Cuantificación de Metabolitos en Plasma

En el análisis de los plasma generados en los estudios de intervención con los productos solubles de cacao disueltos en leche se detectaron un total de ocho metabolitos en la etapa del cacao CC y once en la intervención con el cacao CC-PP.

Los metabolitos plasmáticos de fase II identificados tras el consumo del producto CC fueron epicatequín-3'-glucurónido, epicatequín-3'-sulfato y 3'-metil-epicatequín-5-sulfato, derivados de epicatequina. No se detectó epicatequina ni PB2 libre, tampoco otros derivados de fase II de PB2 en el plasma.

Por su parte, tras el consumo del producto rico en polifenoles, CC-PP, se detectó el compuesto 3'-metil-epicatequín-7-sulfato además de los metabolitos arriba detallados. En la intervención con CC-PP, y a pesar de haber ingerido una mayor cantidad de fenoles, tampoco se identificó epicatequina libre o el dímero PB2 ni cualquier derivado suyo de fase II en el plasma, al igual que ocurría en la intervención CC.

La cuantificación de los derivados conjugados de epicatequina se llevó a cabo con la recta de calibrado de EC para plasma (Ver en Material y Métodos, sección 3.2.3.5.) y los resultados se expresaron en μM equivalente de epicatequina. En la Figura 4.39. se representa la concentración media de cada uno de los metabolitos identificados en plasma a lo largo del tiempo (0-8 h) en los 13 voluntarios que consumieron ambos productos solubles de cacao (CC y CC-PP).

La evolución en el tiempo de los metabolitos plasmáticos mostró un comportamiento semejante, no observándose ningún compuesto a tiempo basal, con un aumento significativo entre 1 y 3 h post-ingesta, seguido de su casi completa eliminación al cabo de las 8 h (Figura 4.39.). Comparando ambas intervenciones (CC vs CC-PP), se observa una tímida relación dosis-respuesta, ya que tras la ingesta de CC-PP, aparte de generar un metabolito más que tras el consumo de CC, resultó en mayores concentraciones plasmáticas de los tres metabolitos comunes.

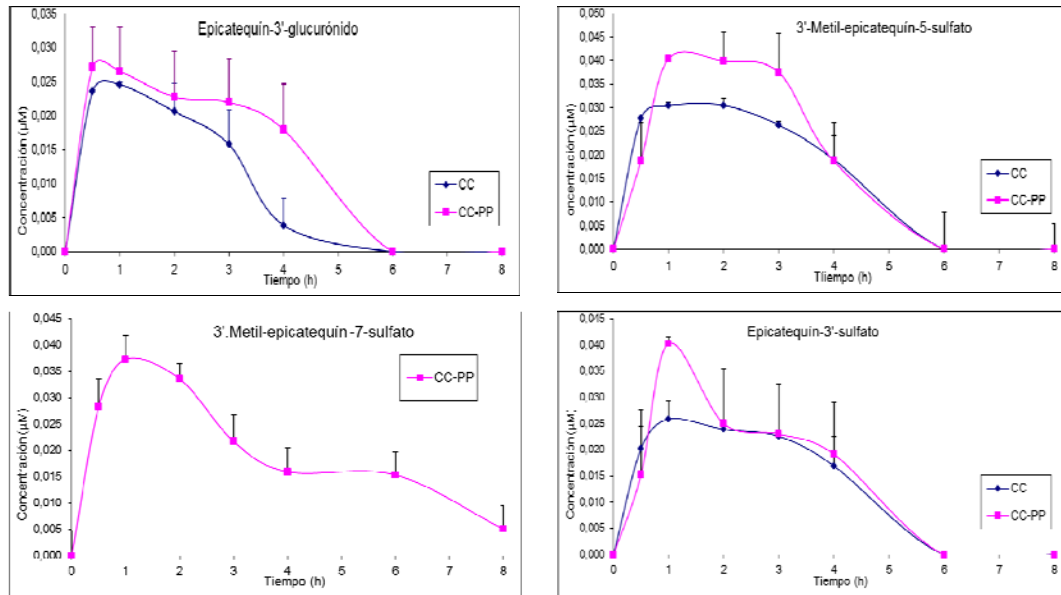


Figura 4.39. Concentración plasmática (μM) de los metabolitos de fase II derivados de la epicatequina identificados tras el consumo de los productos solubles de cacao control (CC) y rico en polifenoles (CC-PP). Los datos están expresados como el valor medio \pm error típico ($n=13$).

Como ya se ha comentado previamente, se evaluó la presencia de los derivados de dihidroxifenilvalerolactona (DHPV) (Figura 4.40.), cuya génesis se ha relacionado recientemente con el metabolismo microbiano de los flavanoles. Se ha observado en plasma la presencia de DHPV a tiempos post-ingesta mayores que los metabolitos de fase II de EC, alcanzando su máximo en torno a 5-6 h y no recuperándose los niveles basales a las 8 h post-ingesta. El hecho de no aparecer a tiempo basal sugiere una relación directa con el metabolismo de flavanoles, mientras que los mayores tiempos de aparición en el plasma evidencian su origen microbiano por fisión del anillo central o anillo C de la epicatequina (Monagas y cols., 2010), sólo posible por la acción de enzimas de la microflora intestinal. De manera similar, los metabolitos de fase II de DHPV identificados en los plasmas de ambas intervenciones, DHPV-3'-glucuronido y DHPV-3'-sulfato (Figura 4.40.), mostraron de nuevo una relación dosis-dependiente, en particular para el metabolito DHPV-3'-glucuronido. Cabe mencionar que ambos derivados de fase II mostraron una cinética similar a la del propio DHPV, lo que sugiere una rápida absorción y conjugación tras la formación del metabolito DHPV por acción de la microbiota colónica.

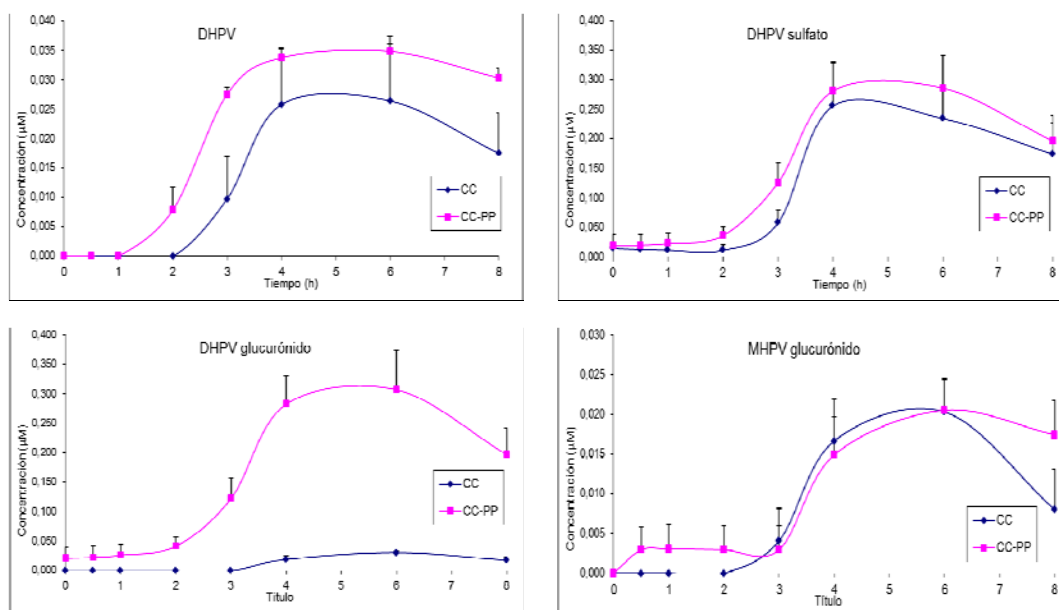


Figura 4.40. Concentración plasmática (μM) de los metabolitos de origen microbiano identificados tras el consumo de los productos solubles de cacao control (CC) y cacao rico en polifenoles (CC-PP). Los datos están expresados como el valor medio \pm error típico ($n=13$).

En plasma no se identificó el derivado metilado libre de DHPV, MHPV, pero sí el derivado metil glucuronidado, MHPV-glucurónido (Figura 4.3.7.). Respecto al derivado deshidroxilado de DHPV, HPV, sólo se identificó HPV-3'-sulfato, en mayor proporción tras la intervención CC-PP y a nivel de trazas tras el consumo de CC, manteniendo igualmente niveles plasmáticos elevados a las 8 h post-ingesta (Figura 4.41.).

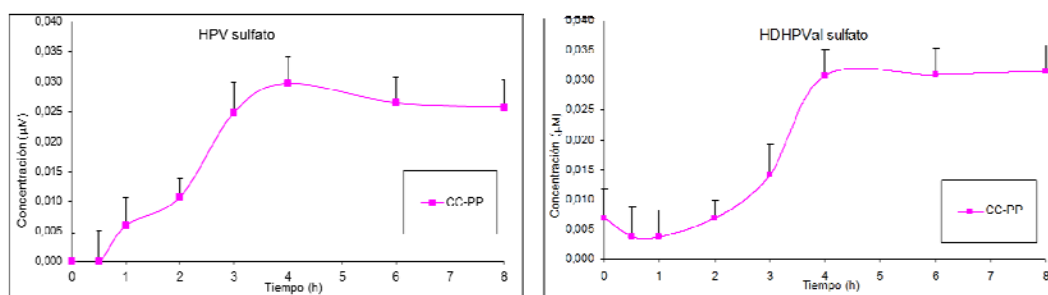


Figura 4.41. Concentración plasmática en μM de los metabolitos de origen microbiano identificados tras el consumo de los productos solubles de cacao control (CC) y cacao rico en polifenoles (CC-PP). Los datos están expresados como el valor medio \pm error típico ($n=13$).

De los dos derivados sulfatados del ácido valérico procedentes de DHPVal y de HDHPVal identificados tras la intervención con CC-PP, DHPVal-3'-sulfato se detectó a

nivel de trazas, por lo que en la Figura 4.41. sólo se representa la cinética del compuesto HDHPVal-sulfato. Todos los compuestos mencionados (DHPV-3'-glucurónido, DHPV-3'-sulfato, MPHV-glucurónido, HPV-3'-sulfato y HDHPVal-sulfato) tienen la particularidad de aparecer en el plasma a mayores tiempos que los metabolitos de fase II derivados de la epicatequina mostrados en la Figura 4.39., coherente con el origen microbiano de los primeros, y en ningún caso se retornó a los niveles basales tras 8 h. Cabe mencionar que todos los metabolitos de origen microbiano se han cuantificado empleando la recta de calibrado del ácido hidroxifenilacético (Ver en Material y Métodos, sección 3.2.3.5.) por semejanza en la estructura química y al no disponer de estándares de ninguno de estos compuestos, expresándose los resultados en concentración μM de equivalentes de dicho ácido.

Finalmente, se cuantificó la concentración de otros compuestos implicados en la biodegradación de los flavanoles por acción de la microbiota colónica (Monagas y cols., 2010), los ácidos 3,4-dihidroxifenilpropiónico, 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico, 3-hidroxifenilpropiónico, 3,4-dihidroxifenilacético, ácidos ferúlico, protocatéquico, hidroxibenzoico y dos isómeros del ácido hidroxihipúrico. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas a lo largo de las 8 h post-ingesta comparado con sus niveles presentes a tiempo basal (datos no mostrados), lo que se justifica por la intervención de estos metabolitos también en otras rutas de biotransformación de compuestos distintos de los flavonoides. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de estos metabolitos al comparar ambas intervenciones (CC vs CC-PP).

A continuación se calcularon los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos identificados en el plasma de los voluntarios a lo largo de las 8 h tras el consumo de ambos productos solubles de cacao. En la Tabla 4.28. se representan los valores de concentración máxima (C_{max}), tiempo al cual se alcanza la concentración máxima (T_{max}) y área bajo la curva (AUC), que relaciona la variación de la concentración plasmática de un metabolito con el tiempo.

Los parámetros farmacocinéticos calculados muestran una C_{max} de los metabolitos presentes en el plasma de los voluntarios del estudio con CC-PP mayores que con cacao CC, coherente con el mayor contenido de flavanoles ingeridos. Sólo se observaron diferencias significativas para los metabolitos epicatequín-3'-glucurónido, 3'-metil-epicatequín-5-sulfato, 3'-metil-epicatequín-7-sulfato, DHPV-3'-glucurónido, MPHV-glucurónido, HPV-3'-sulfato y HDHPVal-sulfato ($p < 0,05$). La ausencia de

significación estadística para el resto de metabolitos probablemente se deba a la gran diferencia interindividual. Este mismo hecho se dio para el parámetro AUC; aunque en general se observan mayores valores para los metabolitos generados tras la intervención con CC-PP que con CC, sólo se observan diferencias significativas para los compuestos 3'-metil-epicatequín-7-sulfato, HPV-3'-sulfato y HDHPVal-sulfato.

Tabla 4.28. Parámetros farmacocinéticos de los metabolitos de fase II y microbianos observados en el plasma tras el consumo de los productos solubles de cacao (CC y CC-PP).

Metabolito	C _{max} (μ M)	T _{max} (h)	AUC (μ M/h)	Valor p (CC vs CC-PP)		
				C _{max}	T _{max}	AUC
CC						
Fase II						
Epicatequín-3'-glucurónido	0,025 \pm 0,001	1,5 \pm 0,5	0,072 \pm 0,028	<0.05	N.S.	N.S.
Epicatequín-3'-sulfato	0,026 \pm 0,003	1,0 \pm 0,1	0,101 \pm 0,023	N.S.	N.S.	N.S.
3'-Metil-epicatequín-5-sulfato	0,031 \pm 0,003	1,3 \pm 0,6	0,122 \pm 0,025	<0.05	N.S.	N.S.
3'-Metil-epicatequín-7-sulfato	N.D.			<0.05	<0.05	<0.05
DHPV-3'-glucurónido	0,031 \pm 0,004	5,6 \pm 0,8	0,106 \pm 0,021	<0.05	N.S.	<0.05
DHPV-3'-sulfato	0,336 \pm 0,240	5,3 \pm 2,4	1,150 \pm 0,742	N.S.	N.S.	N.S.
MHPV-glucurónido	0,022 \pm 0,001	5,3 \pm 1,0	0,078 \pm 0,032	<0.05	N.S.	N.S.
HPV-3'-sulfato*	Trazas			<0.05	<0.05	<0.05
DHPVal-sulfato	N.D.					
HDHPVal-sulfato	N.D.			<0.05	<0.05	<0.05
Microbianos						
DHPV	0,035 \pm 0,008	6,0 \pm 1,6	0,124 \pm 0,073	N.S.	N.S.	N.S.
CC-PP						
Fase II						
Epicatequín-3'-glucurónido	0,037 \pm 0,001	1,4 \pm 0,8	0,110 \pm 0,066			
Epicatequín-3'-sulfato	0,042 \pm 0,004	1,2 \pm 0,5	0,109 \pm 0,076			
3'-Metil-epicatequín-5-sulfato	0,041 \pm 0,002	1,1 \pm 0,6	0,173 \pm 0,107			
3'-Metil-epicatequín-7-sulfato	0,041 \pm 0,004	1,3 \pm 0,5	0,145 \pm 0,107			
DHPV-3'-glucurónido	0,357 \pm 0,200	5,0 \pm 1,2	1,433 \pm 0,727			
DHPV-3'-sulfato	0,332 \pm 0,161	4,9 \pm 1,2	1,384 \pm 0,648			
MHPV-glucurónido	0,027 \pm 0,003	5,6 \pm 1,3	0,091 \pm 0,059			
HPV-3'-sulfato	0,039 \pm 0,014	5,2 \pm 2,2	0,161 \pm 0,105			
DHPVal-sulfato*	Trazas					
HDHPVal-sulfato	0,037 \pm 0,008	6,3 \pm 1,8	0,167 \pm 0,068			
Microbianos						
DHPV	0,037 \pm 0,007	5,5 \pm 1,4	0,192 \pm 0,029			

Valor medio \pm desviación estándar (n=13). El valor p hace referencia a la comparación estadística entre las etapas CC y CC-PP. *No se han podido determinar los parámetros farmacocinéticos al detectar únicamente trazas; N.D.: no detectado; N.S.: diferencias no significativas.

Con respecto al tiempo que tardan los metabolitos en alcanzar la concentración máxima en el plasma (T_{max}), se puede observar que todos los conjugados de fase II de epicatequina (derivados glucuronidados, sulfatados y metilsulfatados) alcanzaron la C_{max} entre 1,0 h y 1,5 h, lo que pone de manifiesto que la metabolización de fase II ocurre a tiempos cortos tras la ingesta de los productos solubles de cacao, muy probablemente tras su absorción en el intestino delgado. Sin embargo, tanto el metabolito DHPV como

sus derivados de fase II alcanzaron la C_{max} a un tiempo significativamente mayor (4,9-6,3 h) que los metabolitos de fase II derivados de epicatequina, consistente con un origen microbiano. Las diferencias entre ambas intervenciones siguieron el mismo patrón que en el parámetro de AUC (Tabla 4.28.).

Por otra parte, cabe mencionar que el principal metabolito en plasma tras el consumo de los productos solubles de cacao fueron los derivados de DHPV. En concreto, el DHPV-3'-sulfato alcanzó valores de C_{max} de 0,33 μM , un orden de magnitud superior a los metabolitos de fase II de la epicatequina. No obstante, la concentración plasmática fue independiente de la dosis de flavanoles consumida, pues los valores de C_{max} fueron similares tras el consumo de ambos cacaos (Tabla 4.28.). Por el contrario, DHPV-3'-glucuronido sí se vio significativamente afectado por la dosis de polifenoles de cacao consumida, con valores plasmáticos 10 veces superiores tras el consumo de CC-PP que tras CC.

Comparando las concentraciones halladas de los distintos metabolitos en el plasma, se observa una tendencia preferente a la producción de derivados sulfatados frente a metilados o glucuronidados.

4.3.1.4. Cuantificación de Metabolitos en Orina

Además de los compuestos descritos en el plasma tras la intervención con el cacao CC (epicatequin-3'-glucuronido, epicatequin-3'-sulfato y 3'-metil-epicatequín-5-sulfato), en orina se detectó también la presencia de 3'-metil-epicatequín-glucuronido, 3'-metil-epicatequín-7-sulfato y 4'-metil-epicatequín-5-sulfato. En las muestras procedentes del estudio de intervención con el cacao soluble CC-PP, con un mayor consumo neto de polifenoles, se observó el mismo número de metabolitos que los descritos en la intervención con el producto CC. Cabe destacar que no se detectó ni epicatequina ni el dímero PB2 en orina en ninguna de las intervenciones, como ya ha sido comentado (Tablas 4.29. y 4.30.).

Adicionalmente, se evaluó la presencia en ambas intervenciones de compuestos relacionados con el metabolismo microbiano, identificándose el compuesto 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona (DHPV) y su derivado deshidroxilado, HPV, así como el ácido 5-(3',4'-dihidroxifenil)-valérico (DHPVal) y sus derivados glucuronidados y sulfatados. Aunque no se identificó MHPV, sí se detectó un derivado sulfatado y otro glucuronidado de MHPV. Igualmente, se detectó la presencia de HDHPVal y sus

derivados glucuronidado y sulfatado tras el consumo de ambos cacaos (Tablas 4.29. y 4.30.), así como del compuesto DHPen, metabolito derivado exclusivamente de la degradación de PB2, siendo la primera vez que se identifica este compuesto en humanos, puesto que sólo había sido descrito previamente en el estudio de fermentación *in vitro* de PB2 por Stoupi y cols. (2010).

En ambas intervenciones se han identificado además otros compuestos fenólicos simples procedentes de etapas posteriores de biodegradación de las valerolactonas y ácidos valéricos (Tablas 4.29. y 4.30.), en concreto derivados del grupo del ácido hidroxifenilpropiónico (ácidos 3,4-dihidroxifenilpropiónico, 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico y 3-hidroxifenilpropiónico), del ácido hidroxifenilacético (ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, 3-metoxi-4-hidroxifenilacético y 3-hidroxifenilacético), ácidos hidroxicinámicos (ácidos ferúlico e isoferúlico) y del grupo del hidroxibenzoico (ácidos protocatéquico, hidroxibenzoico e hidroxihipúrico).

Los valores de la excreción de metabolitos en la orina de los voluntarios tras la ingesta de los productos solubles de cacao se presentan en las Tablas 4.29. y 4.30., expresados como μ moles totales en cada etapa de muestreo. No se detectaron metabolitos de fase II derivados de epicatequina a tiempo basal, lo que indicaría que los voluntarios siguieron correctamente la dieta libre de flavanoles. La excreción de estos compuestos aumentó significativamente en los dos primeros intervalos evaluados (0-4 y 4-8 h) tras la ingesta de ambos productos solubles de cacao. En el intervalo de 0-4 h la excreción de metabolitos de epicatequina supuso un 58,4% y un 62,0% (CC y CC-PP, respectivamente) del total de metabolitos de epicatequina recuperados en la orina durante las 24 h post-ingesta, siendo estos porcentajes del 36,0 y 34,8% en el segundo intervalo (4-8 h).

Según el tipo de conjugación, los derivados sulfatados y/o metilsulfatados contribuyeron con un 92% en ambas intervenciones, siendo por tanto la ruta preferencial de biotransformación de acuerdo a lo observado previamente en el plasma. Como cabía esperar, la excreción de los distintos metabolitos de epicatequina fue mayor tras el consumo de CC-PP que tras la ingesta de CC, siendo las diferencias estadísticamente significativas según la prueba no paramétrica de Wilcoxon ($p < 0,05$). Analizando el contenido total de metabolitos de fase II de epicatequina excretados en la orina a lo largo de las 24 h tras la ingesta, se alcanzaron valores de 8,6 y 25,2 μ mol en las intervenciones con CC y CC-PP, respectivamente, lo que muestra una clara relación dosis-dependiente teniendo en cuenta que el total de flavanoles ingeridos en ambas

etapas fue de 19,8 mg (68,3 μmol) y 68,2 mg (235,2 μmol). Estos valores suponen la excreción de un 12,6% y un 10,7% de la dosis ingerida en cada etapa, lo que sugiere una discreta recuperación y, por tanto, limitada biodisponibilidad a nivel intestinal al tasar únicamente los metabolitos de fase II derivados de la transformación directa de la epicatequina.

Por ello, es de especial interés prestar atención a la caracterización y cuantificación de metabolitos de origen microbiano, para conocer la contribución de los flavanoles absorbidos a nivel colónico en el contenido total recuperado en orina, no considerados en la mayoría de los estudios de intervención agudos llevados a cabo con productos solubles de cacao.

En ese sentido, el contenido de las valerolactonas DHPV y HPV, junto con el derivado del ácido valérico, DHPVal, fue reducido (0,1 y 1,4 μmoles en las intervenciones CC y CC-PP, respectivamente), siendo más abundante el contenido de sus derivados de fase II (15,8 y 57,2 μmoles , respectivamente). El mayor contenido excretado en la intervención CC-PP frente a CC evidencia de nuevo una relación dosis-respuesta de acuerdo al significativamente mayor contenido individual de todos los metabolitos identificados de estos grupos en el estudio CC-PP en comparación con CC según la prueba de Wilcoxon ($p < 0,05$).

Además, cabe destacar que aunque existían cantidades basales de algunos metabolitos de origen microbiano (DHPV-3'-sulfato y HDHPVal-sulfato), éstos aumentaron significativamente en las siguientes etapas, confirmando su relación con el metabolismo de flavanoles. De hecho, estos fueron los metabolitos urinarios mayoritarios en la etapa de 4-8 h, junto con 3'-metil-epicatequín-5-sulfato en la etapa de 0-4 h, de nuevo confirmando la sulfatación como ruta preferente de biotransformación a juzgar por los altos porcentajes de derivados sulfatados identificados (92% y 89% para CC y CC-PP, respectivamente) respecto al total de metabolitos urinarios. Además, mientras que los derivados de epicatequina de fase II se excretaban mayoritariamente en la primera franja urinaria, los metabolitos relacionados con los grupos de valerolactonas y ácido valérico, y sus derivados de fase II se excretaban fundamentalmente en el segundo intervalo de 4-8 h (57-52% para ambos productos), seguido de un 21-17% en el tercer intervalo (8-12 h) y un 18-24% para el cuarto intervalo (12-24 h), de acuerdo a su origen microbiano y mayor tiempo (T_{max}) calculado en los parámetros farmacocinéticos en el plasma.

Resultados y Discusión

Tabla 4.29. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo del producto soluble de cacao control (CC).

Cacao CC	Etapa					TOTAL
	Basal (μmoles)	0-4 h (μmoles)	4-8 h (μmoles)	8-12 h (μmoles)	12-24 h (μmoles)	0-24 h (μmoles)
Fase II						
Epicatequín-3'-glucuronido	N.D.	0,355 \pm 0,07	0,267 \pm 0,06	<L.C.	<L.C.	0,622 \pm 0,13*
3'-Metil-epicatequín-glucuronido	N.D.	<L.C.	<L.C.	N.D.	N.D.	<L.C.*
Epicatequín-3'-sulfato	N.D.	1,323 \pm 0,24	1,018 \pm 0,18	0,076 \pm 0,02	<L.C.	2,417 \pm 0,44*
3'-Metil-epicatequín-5-sulfato	N.D.	2,717 \pm 0,46	1,300 \pm 0,20	0,154 \pm 0,03	0,257 \pm 0,11	4,428 \pm 0,80*
3'-Metil-epicatequín-7-sulfato	N.D.	0,181 \pm 0,03	0,247 \pm 0,03	<L.C.	<L.C.	0,428 \pm 0,06*
4'-Metil-epicatequín-5-sulfato	N.D.	0,473 \pm 0,09	0,285 \pm 0,04	<L.C.	N.D.	0,758 \pm 0,12*
DHPV-4'-glucuronido	<L.C.	<L.C.	0,111 \pm 0,05	<L.C.	<L.C.	0,111 \pm 0,05*
DHPV-3'-glucuronido	<L.C.	<L.C.	0,497 \pm 0,20	0,103 \pm 0,03	<L.C.	0,600 \pm 0,23*
DHPV-3'-sulfato	0,143 \pm 0,06	0,456 \pm 0,19	5,638 \pm 1,92	1,945 \pm 0,65	1,744 \pm 0,37	9,926 \pm 3,20*
MHPV-glucuronido	<L.C.	<L.C.	0,111 \pm 0,04	<L.C.	<L.C.	0,111 \pm 0,04*
MHPV-sulfato	<L.C.	N.D.	0,085 \pm 0,03	<L.C.	<L.C.	0,085 \pm 0,03*
HPV-3'-glucuronido	N.D.	<L.C.	0,233 \pm 0,15	0,126 \pm 0,08	0,079 \pm 0,02	0,438 \pm 0,25
HPV-3'-sulfato	<L.C.	<L.C.	0,860 \pm 0,38	0,456 \pm 0,28	0,375 \pm 0,13	1,691 \pm 0,80*
HDHPVal-glucuronido	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.*
HDHPVal-sulfato	0,089 \pm 0,05	0,076 \pm 0,05	1,112 \pm 0,40	0,565 \pm 0,17	0,503 \pm 0,15	2,345 \pm 0,83*
DHPVal-glucuronido	N.D.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.
DHPVal-sulfato	<L.C.	<L.C.	0,234 \pm 0,15	0,149 \pm 0,09	0,104 \pm 0,03	0,487 \pm 0,28*
TOTAL FASE II	0,232 \pm 0,12	5,581 \pm 1,13	11,998 \pm 3,68	3,574 \pm 1,36	3,062 \pm 0,83	24,447 \pm 7,27*
Microbianos						
DHPV	<L.C.	<L.C.	0,146 \pm 0,03	<L.C.	<L.C.	0,146 \pm 0,03*
HPV	N.D.	N.D.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.*
DHPVal	N.D.	N.D.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.*
HDHPVal	N.D.	N.D.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.
DHPen	N.D.	N.D.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.
Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico	0,117 \pm 0,02	0,217 \pm 0,05	0,243 \pm 0,04	0,074 \pm 0,02	0,215 \pm 0,02	0,866 \pm 0,15
Ác. 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico	0,104 \pm 0,03	0,144 \pm 0,04	<L.C.	<L.C.	<L.C.	0,248 \pm 0,07
Ácido 3-hidroxifenilpropiónico	0,118 \pm 0,02	0,226 \pm 0,05	0,259 \pm 0,04	0,077 \pm 0,02	0,203 \pm 0,02	0,883 \pm 0,15
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	0,094 \pm 0,03	0,648 \pm 0,50	0,556 \pm 0,38	0,094 \pm 0,03	0,133 \pm 0,02	1,525 \pm 0,97
Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético	0,103 \pm 0,01	0,099 \pm 0,05	0,093 \pm 0,03	<L.C.	0,103 \pm 0,02	0,398 \pm 0,12
Ácido 3-hidroxifenilacético	0,369 \pm 0,08	0,408 \pm 0,08	0,605 \pm 0,09	0,225 \pm 0,05	0,600 \pm 0,10	2,208 \pm 0,16
Ácido ferúlico	<L.C.	<L.C.	0,094 \pm 0,01	0,099 \pm 0,06	N.D.	0,193 \pm 0,07
Ácido isoferúlico	0,170 \pm 0,14	0,086 \pm 0,03	0,096 \pm 0,04	0,088 \pm 0,07	0,082 \pm 0,02	0,522 \pm 0,29
Ác. protocatéquico	0,161 \pm 0,07	0,227 \pm 0,14	0,373 \pm 0,24	0,094 \pm 0,05	0,104 \pm 0,04	0,959 \pm 0,22*
Ác. hidroxihipúrico	0,821 \pm 0,25	0,864 \pm 0,15	1,171 \pm 0,39	0,242 \pm 0,07	0,995 \pm 0,32	4,093 \pm 1,17
Ác. hidroxihipúrico	0,075 \pm 0,03	0,085 \pm 0,04	0,082 \pm 0,05	0,075 \pm 0,03	0,077 \pm 0,05	0,394 \pm 0,21
Ác. hidroxibenzoico	0,188 \pm 0,04	0,145 \pm 0,03	0,200 \pm 0,05	0,070 \pm 0,02	0,195 \pm 0,02	0,798 \pm 0,16
TOTAL	2,320	3,150	3,918	1,138	2,707	13,233
MICROBIANOS	\pm 0,73	\pm 1,18	\pm 1,39	\pm 0,41	\pm 0,59	\pm 3,78
TOTAL METABOLITOS EXCRETADOS	2,552 \pm 0,85	8,731 \pm 2,31	15,916 \pm 5,07	4,712 \pm 1,77	5,769 \pm 1,42	37,680* \pm 11,05

Los valores se expresan como la media \pm error típico (n=13). *Indica diferencias significativas respecto a la intervención CC-PP según la prueba de Wilcoxon para un nivel de significancia $p < 0,05$. N.D. No detectado. < L.C. Menor del límite de cuantificación.

Tabla 4.30. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo del producto soluble de cacao rico en polifenoles (CC-PP).

Cacao CC-PP	Etapa					TOTAL
	Basal (μmoles)	0-4 h (μmoles)	4-8 h (μmoles)	8-12 h (μmoles)	12-24 h (μmoles)	0-24 h (μmoles)
Fase II						
Epicatequín-3'-glucuronido	N.D.	0,958 \pm 0,27	0,695 \pm 0,19	<L.C.	<L.C.	1,653 \pm 0,46*
3'-Metil-epicatequín-glucuronido	N.D.	0,121 \pm 0,04	<L.C.	<L.C.	N.D.	0,121 \pm 0,04*
Epicatequín-3'-sulfato	N.D.	3,627 \pm 0,80	3,572 \pm 0,66	0,158 \pm 0,04	<L.C.	7,357 \pm 1,52*
3'-Metil-epicatequín-5-sulfato	N.D.	8,642 \pm 1,43	3,277 \pm 0,64	0,330 \pm 0,10	0,232 \pm 0,07	12,481 \pm 2,24*
3'-Metil-epicatequín-7-sulfato	N.D.	0,566 \pm 0,15	0,557 \pm 0,12	0,077 \pm 0,02	<L.C.	1,200 \pm 0,29*
4'-Metil-epicatequín-5-sulfato	N.D.	1,702 \pm 0,24	0,652 \pm 0,15	<L.C.	<L.C.	2,354 \pm 0,40*
DHPV-4'-glucuronido	<L.C.	<L.C.	0,330 \pm 0,11	0,550 \pm 0,01	0,081 \pm 0,02	0,961 \pm 0,15*
DHPV-3'-glucuronido	<L.C.	<L.C.	1,802 \pm 0,57	0,274 \pm 0,06	0,282 \pm 0,13	2,358 \pm 0,77*
DHPV-3'-sulfato	0,332 \pm 0,16	1,965 \pm 0,64	15,979 \pm 2,96	5,386 \pm 0,93	7,656 \pm 2,12	31,318 \pm 6,82*
MHPV-glucuronido	<L.C.	<L.C.	0,340 \pm 0,07	0,084 \pm 0,01	0,131 \pm 0,05	0,555 \pm 0,13*
MHPV-sulfato	N.D.	<L.C.	0,177 \pm 0,04	<L.C.	<L.C.	0,177 \pm 0,05*
HPV-glucuronido	<L.C.	0,108 \pm 0,04	0,521 \pm 0,19	0,179 \pm 0,06	0,508 \pm 0,35	1,316 \pm 0,65
HPV-sulfato	<L.C.	0,651 \pm 0,39	4,188 \pm 1,53	1,223 \pm 0,37	1,690 \pm 0,57	7,752 \pm 2,87*
HDHPVal-glucuronido	N.D.	<L.C.	0,714 \pm 0,09	0,087 \pm 0,02	0,251 \pm 0,07	1,052 \pm 0,18*
HDHPVal-sulfato	0,089 \pm 0,03	0,584 \pm 0,22	5,018 \pm 1,09	1,798 \pm 0,38	1,987 \pm 0,57	9,476 \pm 2,29*
DHPVal-glucuronido	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<L.C.	<L.C.
DHPVal-sulfato	N.D.	0,074 \pm 0,07	0,792 \pm 0,34	0,271 \pm 0,10	1,092 \pm 0,84	2,229 \pm 1,35*
TOTAL FASE II	0,421 \pm 0,20	18,998 \pm 4,30	38,614 \pm 8,76	10,417 \pm 2,11	13,910 \pm 4,79	82,360 \pm 20,30*
Microbianos						
DHPV	<L.C.	<L.C.	0,628 \pm 0,09	0,174 \pm 0,03	0,282 \pm 0,08	1,084 \pm 0,20*
HPV	N.D.	<L.C.	0,104 \pm 0,04	<L.C.	<L.C.	0,104 \pm 0,04*
DHPVal	N.D.	N.D.	0,146 \pm 0,03	0,104 \pm 0,04	N.D.	0,250 \pm 0,07*
HDHPVal	N.D.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.
DHPen	N.D.	N.D.	<L.C.	<L.C.	<L.C.	<L.C.
Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico	0,213 \pm 0,03	0,256 \pm 0,03	0,238 \pm 0,03	0,109 \pm 0,02	0,301 \pm 0,03	1,117 \pm 0,13
Ác. 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico	0,077 \pm 0,03	0,175 \pm 0,05	<L.C.	<L.C.	0,199 \pm 0,05	0,461 \pm 0,14
Ácido 3-hidroxifenilpropiónico	0,074 \pm 0,01	0,350 \pm 0,04	0,356 \pm 0,08	0,140 \pm 0,04	0,284 \pm 0,07	1,204 \pm 0,24
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	0,109 \pm 0,01	0,751 \pm 0,06	0,556 \pm 0,10	0,198 \pm 0,04	0,539 \pm 0,20	2,153 \pm 0,40
Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético	0,198 \pm 0,07	0,188 \pm 0,03	0,124 \pm 0,05	<L.C.	0,138 \pm 0,02	0,648 \pm 0,18
Ácido 3-hidroxifenilacético	0,585 \pm 0,07	0,631 \pm 0,14	0,678 \pm 0,23	0,434 \pm 0,07	0,534 \pm 0,14	2,862 \pm 0,65
Ácido ferúlico	<L.C.	0,137 \pm 0,09	0,150 \pm 0,09	0,151 \pm 0,09	0,312 \pm 0,29	0,750 \pm 0,57
Ácido isoferúlico	<L.C.	0,164 \pm 0,04	0,160 \pm 0,07	0,152 \pm 0,09	0,210 \pm 0,15	0,686 \pm 0,36
Ácido protocatéquico	0,088 \pm 0,01	0,105 \pm 0,02	0,113 \pm 0,02	0,095 \pm 0,04	0,127 \pm 0,01	0,528 \pm 0,10*
Ácido hidroxihipúrico	0,871 \pm 0,26	0,789 \pm 0,10	0,579 \pm 0,10	0,328 \pm 0,06	0,987 \pm 0,19	3,554 \pm 0,72
Ácido hidroxihipúrico	0,086 \pm 0,01	0,090 \pm 0,01	0,082 \pm 0,01	0,075 \pm 0,06	0,129 \pm 0,02	0,462 \pm 0,11
Ác. hidroxibenzoico	0,212 \pm 0,04	0,396 \pm 0,06	0,298 \pm 0,04	0,172 \pm 0,06	0,302 \pm 0,17	1,380 \pm 0,36
TOTAL MICROBIANOS	2,513 \pm 0,56	4,032 \pm 0,66	4,212 \pm 0,96	2,132 \pm 0,65	4,344 \pm 1,22	17,233 \pm 4,23
TOTAL METABOLITOS EXCRETADOS	2,934 \pm 0,76	23,030 \pm 4,96	42,826 \pm 9,72	12,549 \pm 2,76	18,254 \pm 6,01	99,593 \pm 24,53

Los valores se expresan como la media \pm error típico (n=13). *Indica diferencias significativas respecto a la intervención CC según la prueba de Wilcoxon para un nivel de significancia $p < 0,05$. N.D. No detectado. < L.C. Menor del límite de cuantificación.

Si consideramos el contenido de estos metabolitos microbianos excretados en orina de 24 h, el contenido asciende a 24,5 y 82,3 μ moles de metabolitos para la intervención CC y CC-PP, lo que supondría una recuperación de flavanoles del 35,9% y 35,6%, respectivamente, de la cantidad ingerida.

Los compuestos pertenecientes a los grupos hidroxifenilpropiónico e hidroxifenilacético, al igual que los ácidos fenólicos más sencillos (ferúlico, isoferúlico, etc.) mostraron niveles basales relativamente elevados (Tablas 4.29. y 4.30.), lo que evidencia que estos ácidos simples comparten vías de metabolización con otros compuestos presentes en la dieta. No obstante, aunque sí se apreciaron cambios en el contenido urinario de algunos compuestos, aumentando sus niveles en los intervalos de 0-4 y 4-8 h o disminuyendo en el periodo de 8-12 h, lo cierto es que su comportamiento no apunta a un efecto claro derivado de la ingesta de los polifenoles del cacao. De hecho, la excreción total de estos compuestos durante las 24 h post-ingesta, fue de 13,1 μ mol tras la ingesta de 19,8 mg de flavanoles con el producto CC y de 15,8 μ mol tras el consumo de una dosis 3,4 veces superior con el producto rico en polifenoles (68,2 mg). Además, estos ácidos fenólicos fueron excretados en general en cantidades bajas y afectados por una gran variabilidad interindividual. Por todo ello, estos compuesto no se tuvieron en cuenta para el cómputo total de metabolitos excretados en orina.

En definitiva, la suma de metabolitos de fase II de epicatequina eliminados en orina junto con los principales metabolitos microbianos cuantificados resulta en unos valores de excreción que alcanzan un porcentaje del 35,9% de los flavanoles ingeridos tras el consumo del cacao CC y de un 35,6% tras la ingesta del cacao rico en polifenoles (CC-PP). Ello indica que, aunque las concentraciones plasmáticas y los niveles de eliminación urinaria muestran un efecto dosis-respuesta, el porcentaje relativo de absorción y metabolización de los flavanoles del cacao es similar e independiente de la dosis consumida, al menos en rangos de ingesta realistas como los ensayados en el presente estudio.

A modo de resumen, los flavanoles presentes en los productos solubles de cacao son poco biodisponibles a nivel intestinal (10-12% de la ingesta), siendo transformados preferentemente en derivados sulfatados y/o metilsulfatados frente a una menor proporción de derivados glucuronidados. El metabolismo colónico ejerce un papel crucial en la biotransformación de los flavanoles como pone de manifiesto el alto contenido de metabolitos relacionados con hidroxifenilvalerolactona y ácido valérico, así como sus derivados conjugados de fase II.

4.3.1.5. Metabolismo y Biodisponibilidad de Flavanoles de dos Productos Solubles de Cacao en Humanos Sanos

Aunque la absorción y metabolismo de los flavanoles presentes en los productos solubles de cacao ha sido objeto de numerosos estudios (revisado en Rodríguez-Mateos y cols., 2014), la particularidad del presente trabajo radica en la dosis realista administrada a los participantes, de acuerdo en todo momento a las recomendaciones de los fabricantes y a patrones de consumo habitual de estos productos en nuestra dieta.

Aunque numerosos estudios han evaluado la biodisponibilidad de los polifenoles del cacao, la mayoría se caracterizan por utilizar dosis muy altas, difíciles de alcanzar en una dieta normal. Además, muchos de estos trabajos sólo ofrecen información de los metabolitos en plasma u orina, y sólo algunos caracterizan los metabolitos en ambos fluidos biológicos. Aun así, los resultados que aquí se presentan están de acuerdo en gran medida con los resultados que se encuentran en la literatura. Respecto a los compuestos identificados en la circulación sistémica, existe total analogía con aquellos descritos por los autores Actis-Goretta y cols. (2012) y Ottaviani y cols. (2012), quienes identificaron derivados glucuronidados, sulfatados y metil-sulfatados de epicatequina en plasma. Otros trabajos más antiguos, sin embargo, sólo identificaron algunos de estos metabolitos en plasma: epicatequín-glucurónido, epicatequín-sulfato y metil-epicatequín-sulfato (Richelle y cols., 1999; Roura y cols., 2005, 2007; Mullen y cols., 2009). Adicionalmente a los compuestos identificados en el presente estudio, en nuestras condiciones experimentales no fue posible detectar compuestos como metil-epicatequina, epicatequín-sulfoglucurónido, metil-epicatequín-sulfoglucurónido y metil-epicatequín-glucurónido identificados por otros autores (Baba y cols., 2000; Schroeter y cols., 2006; Tomás-Barberán y cols., 2007) además de las agliconas epicatequina y catequina identificadas por Schroeter y cols. (2006), aunque nunca fueron reportadas posteriormente.

La disponibilidad de estándares sintéticos como compuestos de referencia ha permitido avanzar en el conocimiento de la localización de los sustituyentes en la estructura química de la epicatequina. Así, los estudios de Actis-Goretta y cols. (2012) y Ottaviani y cols. (2012) coinciden en que el consumo de cantidades relevantes de epicatequina conduce a la presencia de tres metabolitos predominantes en la circulación sistémica: (-)-epicatequín-3'-glucuronido, (-)-epicatequín-3'-sulfato y 3'-O-metil-(-)-epicatequín-5-sulfato, lo que nos permitió asignar tentativamente los

compuestos mayoritarios identificados en las muestras de ambos estudios con los productos solubles de cacao. Adicionalmente, Actis-Goretta y cols. (2012) identificaron otros compuestos minoritarios tales como (-)-epicatequín-4'-glucurónido, (-)-epicatequín-7-glucurónido, (-)-epicatequín-4'-sulfato, 3'-metil-epicatequín-4'-sulfato, 3'-metil-epicatequín-7-sulfato, 4'-metil-epicatequín-5-sulfato y 4'-metil-epicatequín-7-sulfato, mientras que Ottaviani y cols. (2012) identificaron epicatequín-5-sulfato, epicatequín-7-sulfato y 4'-metil-epicatequín-5/7-sulfato. El segundo compuesto con estructura de metil-epicatequín-sulfato identificado en nuestro estudio se asignó tentativamente a 3'-O-metil-epicatequín-7-sulfato, por comparación del orden de elución y abundancia relativa con los citados estudios tomados como referencia.

Los metabolitos identificados en orina muestran grandes analogías con otros estudios previamente publicados. Urpí-Sarda y cols. (2009a) y Actis-Goretta y cols. (2012) identificaron los mismos metabolitos que en nuestro estudio, es decir, los descritos en plasma (epicatequín-3'-glucurónido, epicatequín-3'-sulfato y 3'-metil-epicatequín-5-sulfato) más el metabolito metil-epicatequín-glucurónido, así como algunos isómeros que no han sido detectados en el presente estudio. No obstante, ha de tenerse en cuenta la mayor dosis de epicatequina administrada, 93 mg (Urpí-Sarda y cols., 2009a) y 154 mg (Actis-Goretta y cols., 2012) frente los 68 mg que como máximo se proporcionaba en el estudio con el cacao rico en polifenoles (CC-PP). Tomás-Barberán y cols. (2007) identificaron adicionalmente el derivado metil-epicatequín-sulfoglucurónido, también reportado por Baba y cols. (2000) en orina, junto con epicatequín-sulfoglucurónido, compuestos no determinados en nuestras condiciones experimentales ni observados en estudios posteriores de otros autores. Frente a estos trabajos donde se identifican metabolitos adicionales a los presentados en esta Tesis, cabe mencionar que otros autores sólo identificaron en orina algunos de los metabolitos descritos en nuestro trabajo: epicatequín-sulfato y epicatequín-glucurónido (Roura y cols., 2005 y 2008), epicatequín-sulfato y metil-epicatequina (Llorach y cols., 2009) o epicatequín-sulfato, metil-epicatequín-sulfato y epicatequín-glucurónido (Mullen y cols., 2009).

Pero además de la identificación de los distintos metabolitos en plasma y orina, su cuantificación es también un aspecto delicado que puede dificultar la comparación de los resultados obtenidos por otros autores. En la mayoría de los estudios se toma como referencia la forma desconjugada, epicatequina, como patrón para la cuantificación de los distintos metabolitos. No obstante, empieza a ser cada vez más frecuente el uso de

estándares sintéticos de algunos metabolitos, con lo que consigue minimizar el error que se puede generar por la distinta capacidad de ionización de los metabolitos en diferentes matrices cuando se utilizan métodos basados en la detección mediante MS. Sin embargo, la gran diversidad de compuestos que se generan a partir del metabolismo de flavanoles complica la obtención de todos ellos, por lo que siempre algunos metabolitos se deben cuantificar en base a otros compuestos relacionados. A pesar de los diferentes métodos utilizados para la cuantificación, los resultados determinados en este estudio están en línea con otros publicados recientemente. Las concentraciones plasmáticas de los derivados de epicatequina de fase II mayoritarios, que en nuestro trabajo se sitúan en torno a una media de 27 y 40 nM tras una dosis de 19,8 mg (producto CC) y 68,2 mg (producto CC-PP) de flavanoles de cacao (Tabla 4.28.), se elevan a valores de ~300 nM tras la ingesta de 154 mg de flavanoles contenidos en 100 g de chocolate negro (Actis-Goretta y cols., 2012) o 590 nM tras la ingesta de 1100 mg de flavanoles presentes en un producto soluble de cacao, dosis difíciles de mantener diariamente en el seno de una dieta equilibrada. Mullen y cols. (2009) realizaron su estudio con dosis acordes a las indicaciones del fabricantes (10 g de cacao) y determinaron una C_{max} comprendida entre 50 y 83 nM tras ingerir 13 mg de flavanoles, sensiblemente mayor que las concentraciones obtenidas en nuestro estudio. En cualquier caso, la evaluación conjunta de los resultados sugiere una relación dosis-respuesta a nivel de las concentraciones plasmáticas, especialmente a bajas dosis de flavanoles, lo que apoya el consumo moderado y diario de los productos solubles de cacao.

Respecto al tiempo que tardan los metabolitos en alcanzar la concentración máxima en el plasma (T_{max}), se determinaron tiempos comprendidos entre 1,1 h y 1,5 h para los conjugados de epicatequina, lo que estaría indicando que parte de la absorción de flavanoles tiene lugar en el intestino delgado. Estos resultados están de acuerdo con otros autores (Baba y cols., 2000; Roura y cols., 2005; Tomás-Barberán y cols., 2007; Mullen y cols., 2009; Ottaviani y cols., 2012), si bien son menores que los reportados por Actis-Goretta y cols. (2012) (3,2-3,8 h). En todo caso, siguen siendo tiempos que señalan al intestino delgado como punto de absorción de un limitado porcentaje de epicatequina, frente a los T_{max} superiores a 5 h para los metabolitos microbianos mayoritarios (Tabla 4.28.).

Los datos sobre la excreción de metabolitos en la orina de los voluntarios tras la ingesta de los productos solubles de cacao aumentó significativamente en los dos

primeros intervalos evaluados (0-4 y 4-8 h), dónde los derivados sulfatados y/o metilsulfatados de epicatequina contribuyeron con un 92% en ambas intervenciones, siendo por tanto la ruta preferencial de biotransformación (Figura 4.42.). Estos resultados están totalmente de acuerdo con los estudios de Mullen y cols. (2009) y Actis-Goretta y cols. (2012), quienes establecieron que la ingesta de flavanoles da lugar a la formación de tres grupos de metabolitos (sulfatados, metilsulfatados y glucuronidados), siendo sus proporciones dependientes de la ingesta de epicatequina: mayor proporción de sulfatados en todas sus formas (sulfatado libre y metil-sulfatado) a menor dosis de epicatequina y mayor proporción de derivados glucuronidados a mayor dosis de epicatequina. De hecho, en el estudio de Ottaviani y cols. (2012), quienes administraron 1100 mg de flavanoles, determinaron mayor contenido de glucuronidados que sulfatados, mientras que Mullen y cols. (2009) detectaron fundamentalmente derivados sulfatados y metilsulfatados tras la ingesta de 13 mg de flavanoles.

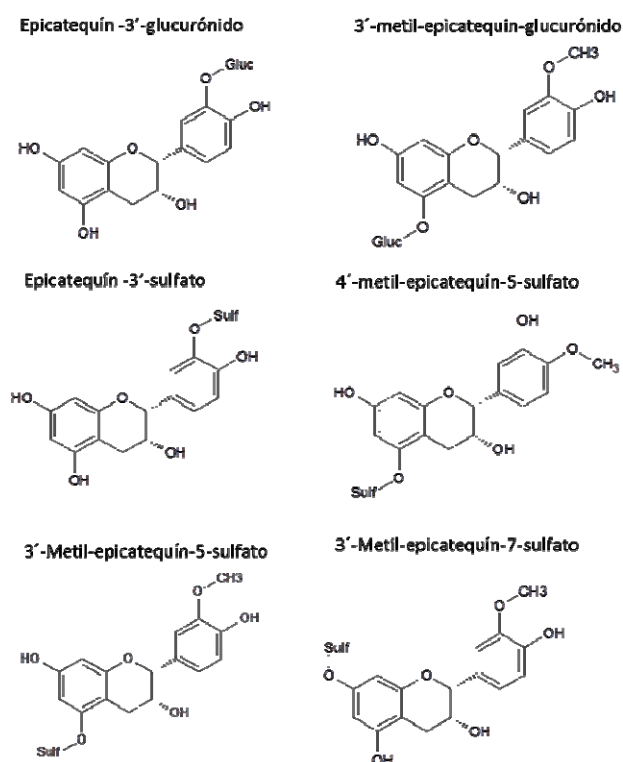


Figura 4.42. Metabolitos de fase II de la epicatequina.

La excreción urinaria total de los metabolitos de fase II producidos tras la ingesta de los dos productos de cacao CC y CC-PP fue de 8,6 y 25,2 μ moles equivalente a una recuperación de 12,6% y 10,7%, respectivamente, lo que sugiere una limitada biodisponibilidad a nivel intestinal. Existe un cierto margen de diferencia entre los datos reportados en la literatura relativo a la recuperación de flavanoles. Así, Baba y cols. (2000) hallaron una excreción urinaria de epicatequina de 29,8% y 25,3% tras la ingesta de chocolate y cacao, respectivamente, que aportaban 220 mg de flavanoles. Ito y cols. (2005) reportaron una excreción de 1,9% tras la ingesta de 289 mg de flavanoles que contenía un cacao soluble administrado con agua. Mullen y cols. (2009) tasaron la excreción en 18% y 10% tras la ingesta de una bebida que contenía 13 mg de flavanoles de cacao disuelto en agua o leche, respectivamente. Más tarde, Actis-Goretta y cols. (2012) reportaron valores de recuperación de 21,7% tras la ingesta de 100 g de chocolate negro que proporcionaba 154 mg de flavanoles. Recientemente, se ha evaluado la absorción en humanos a nivel del yeyuno con una técnica de perfusión intestinal, revelando una tasa de absorción del 46% de epicatequina en base a la recuperación en el fluido de perfusión, aunque con gran diferencia interindividual (31-90%) (Actis-Goretta y cols., 2013). En todos estos estudios existen importantes diferencias en los diseños de las intervenciones, tratamientos aplicados a las muestras antes de su análisis, método de cuantificación e incluso en la forma de administrar los flavanoles (chocolate negro, chocolate con leche, cacao en polvo disuelto en agua o leche), de modo que existen variables que pueden incidir significativamente en los resultados, haciendo difícil su comparación. De todos los factores mencionados, el efecto matriz del alimento ha sido objeto de numerosos estudios y, aunque han generado resultados muy controvertidos, son más abundantes aquellos que sugieren una interferencia de las proteínas de la leche en la absorción de los flavanoles, como han descrito Mullen y cols. (2009), entre otros. En cualquier caso, todos los estudios, incluido el que se recoge en esta Tesis, sugieren una recuperación modesta de flavanoles en orina considerando únicamente los metabolitos de fase II derivados de la epicatequina.

Todo lo anteriormente expuesto está de acuerdo con la idea de que una fracción importante de flavanoles ingeridos (70-90%) alcanzaría el intestino grueso, donde son susceptibles de la acción de la microbiota colónica (Roowi y cols., 2010; Stalmach y cols., 2010b), transformando tanto los compuestos monoméricos como oligoméricos en otros compuestos fenólicos de menor tamaño. Estas transformaciones implican

mayoritariamente reacciones de hidrólisis, reducción, descarboxilación, lactonización, desmetilación, deshidroxilación y rotura de anillos heterocíclicos que generan compuestos de bajo peso molecular (Deprez y cols., 2000; Rechner y cols., 2004; Appeldoorn y cols., 2009).

El metabolismo microbiano de los flavonoles habitualmente empieza por la apertura del anillo central C, proporcionando el alcohol difenil-2-propanol, que se transforma en 5-(3'-4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona (DHPV), que a su vez evoluciona al ácido 5-(3',4'-dihidroxifenil)-valérico tras la apertura del anillo lactona. La ruta de biotransformación de este grupo derivado del ácido valérico pasa por la formación de los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e hidroxibenzoico tras la pérdida sucesiva de un átomo de carbono de la cadena hidrocarbonada, a través de una reacción de β -oxidación (revisado en Monagas y cols., 2010, Figura 4.43.). En base a estos antecedentes y considerando la posibilidad de que estos metabolitos microbianos se absorban a nivel colónico y se transformen en derivados de fase II, en este estudio se ha buscado y finalmente identificado DHPV y 5-(3'-hidroxifenil)- γ -valerolactona (HPV) así como sus derivados glucuronidados y sulfatados. Igualmente, se han identificado dos derivados metilados de DHPV-glucurónido y DHPV-sulfato, los compuestos MHPV-glucurónido y MHPV-sulfato. Todos se han detectado en ambos fluidos biológicos analizados, excepto MHPV-sulfato y HPV-glucurónido, que no se encontraron en el plasma. Por otra parte, perteneciente al grupo de derivados del ácido valérico se ha identificado el ácido 5-(3',4'-dihidroxifenil)-valérico (DHPVal) junto con los derivados glucuronidado y sulfatado en orina, aunque en plasma sólo se detectó el compuesto DHPVal-sulfato en la intervención CC-PP a nivel de trazas. Finalmente, tomando como referencia el estudio de fermentación *in vitro* de flavanoles realizado por Stoupi y cols. (2010), se identificó en la orina de ambas intervenciones un derivado hidroxilado de DHPVal, HDHPVal, así como los conjugados glucuronidado (HDHPVal-glucurónido) y sulfatado (HDHPVal-sulfato), mientras que en plasma sólo se detectó HDHPVal-sulfato tras la ingesta de CC-PP. De nuevo, los derivados sulfatados fueron más abundantes que los glucuronidados (92% y 89% tras CC y CC-PP, respectivamente).

El origen microbiano de estos metabolitos está de acuerdo con los mayores T_{max} determinados para los metabolitos detectados en plasma, 5-6 h, significativamente mayor que aquellos determinados para los metabolitos de fase II derivados de la epicatequina (aproximadamente 1,5 h). Estos metabolitos pueden participar en otras rutas de biotransformación y, de hecho, aparecen cantidades basales de la mayoría de

ellos. Sin embargo, se observa un incremento significativo de su contenido en orina a partir del tercer intervalo (4-8 h), excretando un 52-57% del total de metabolitos microbianos excretados en 24 h. En los siguientes intervalos de recogida de orina se mantiene una elevada eliminación de estos metabolitos, aunque menos notable que en las 4-8 h, con porcentajes de excreción del 39-41% (CC y CC-PP, respectivamente) en el periodo comprendido entre las 8 y 24 h post-ingesta, coherente con su naturaleza microbiana.

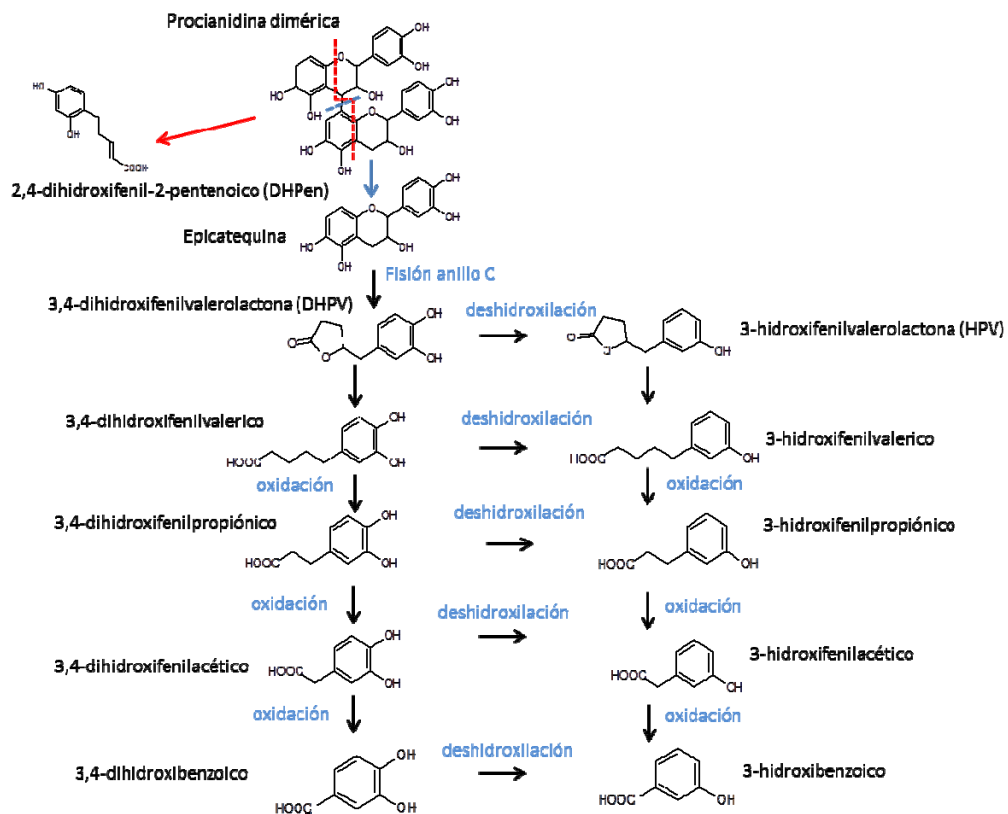


Figura 4.43. Ruta de biotransformación de la epicatequina y el dímero PB2 por acción de la microbiota intestinal-

Estos metabolitos se han identificado desde hace relativamente poco, habiéndose detectado por primera vez en ratas (Kohri y cols., 2003). Otros autores identificaron en orina DHPV, 2 isómeros de DHPV-glucurónido y DHPV-sulfato, MHPV, MHPV-glucurónido, 2 isómeros de MHPV-sulfato y HDHPVal, mientras que en plasma sólo detectaron DHPV y los derivados glucuronidados de DHPV y MHPV (Urpí-Sarda y cols., 2009a; Llorach y cols., 2010). Recientemente, Vitaglione y cols. (2013) han detectado el compuesto DHPV en orina tras la ingesta de distintos productos preparados

con crema de cacao. A la vista de los resultados previos obtenidos por otros equipos de investigación, en este trabajo se ha completado la caracterización de los compuestos microbianos del grupo de las lactonas, reportando por primera vez la serie deshidroxilada, HPV y sus derivados de fase II. Así mismo, se han detectado compuestos derivados del ácido valérico, además de compuesto HDHPVal reportado por Llorach y cols. (2010), su derivado sulfatado, y los compuestos DHPVal, DHPVal-glucurónido y DHPVal-sulfato.

Siguiendo la ruta de biotransformación descrita para los flavanoles en este estudio, se han identificado compuestos derivados del hidroxifenilpropiónico (3,4-dihidroxifenilpropiónico, 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico y 3-hidroxifenilpropiónico), hidroxifenilacético (3,4-dihidroxifenilacético, 3-metoxi-4-hidroxifenilacético y 3-hidroxifenilacético), hidroxicinámico (ferúlico, isoferúlico) e hidrogenoico (protocatéquico, hidroxihipúrico e hidroibenzoico). Algunos de estos compuestos fueron tenidos en cuenta en estudios previos de otros autores (Urpí-Sarda y cols., 2009a; Vitaglione y cols., 2013), si bien no de forma tan sistemática como en el estudio aquí realizado. Aunque en parte estos compuestos sí derivan del metabolismo de los flavanoles, pues se observaron discretos aumentos en su eliminación urinaria tras el consumo de ambos productos solubles de cacao, son metabolitos minoritarios y comunes a otras rutas de biotransformación, como indica su presencia en las orinas a tiempo basal, por lo que no ofrecen información relevante sobre el metabolismo microbiano de los flavonoides.

Por otra parte, los productos solubles de cacao evaluados contienen, además de epicatequina, pequeñas cantidades del dímero PB2. Como se ha comentado previamente, no se ha hallado PB2 libre ni sus derivados de fase II en plasma u orina. En ese sentido, cabe destacar que sólo el trabajo de Urpí-Sarda y cols. (2009b) ha descrito la presencia de PB2 tanto en orina de humanos como de ratas, aunque no se ha vuelto a identificar en estudios de biodisponibilidad con cacao. Ello sugiere que este compuesto, no absorbido en el intestino delgado, sería extensivamente metabolizado por la microbiota colónica. Por ello, algunos estudios *in vitro* como el de Stoupi y cols. (2010) han caracterizado el catabolismo del dímero PB2 mediante fermentación colónica y han postulado dos rutas posibles de degradación: una menos preferente que implica la formación del monómero epicatequina y subsiguiente transformación, y otra ruta preferente que supone la ruptura de la unidad epicatequina del compuesto PB2 para generar el ácido (E)-5-(2',4'-dihidroxifenil)-2-pentenoico (DHPen). En el presente

estudio, el compuesto DHPen se ha identificado en orina de ambas intervenciones a partir del intervalo de 4 a 8 h, aunque siempre en cantidades por debajo del límite de cuantificación. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se identifica este compuesto en un estudio de intervención en humanos.

Los metabolitos microbianos de las familias de las lactonas y del ácido valérico eliminados en orina representaron entre un 23,3% y un 24,9% (CC y CC-PP, respectivamente) de los flavonoides ingeridos. Sumados al 12,6% y 10,7% contribuido por los metabolitos de fase II de la epicatequina, elevan el porcentaje de recuperación al 36% de la ingesta. En este cálculo no se han tenido en cuenta los fenoles simples de los grupos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético, hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Además, se ha de tener presente que aún se observan cantidades importantes de alguno de estos metabolitos al cabo de las 24 h post-ingesta, indicando no haber alcanzado los niveles basales normales. Por tanto, el cálculo de recuperación que aquí se presenta subestimaría la cantidad total de flavanoles que habrían sido absorbidos directamente o tras ser metabolizados por la microbiota colónica.

El contenido excretado de DHPV-3'-sulfato al cabo de 24 h (9,9 y 31,3 μ moles en la intervención CC y CC-PP, respectivamente), representó un 26,3% y 31,6% tras la ingesta de 68,3 y 235,2 μ moles de flavanoles del cacao, respectivamente, por lo que se podría proponer como un biomarcador de consumo de cacao, dado que sus niveles incrementaron de forma directa con la dosis ingerida de flavanoles y parece presentar suficiente sensibilidad para su detección desde dosis de flavanoles tan pequeñas como 19,8 mg (producto CC).

Es importante destacar que la excreción de metabolitos microbianos varía de manera importante entre individuos, lo que podría ser debido a las diferencias en la composición de la microbiota colónica en los individuos (Stoupi y cols., 2010).

Los resultados de este trabajo muestran que los flavanoles de dos productos solubles de cacao de distinto contenido fenólico tomados en dosis realistas en la dieta son parcialmente biodisponibles a nivel intestinal, dando lugar a compuestos derivados de la acción de las enzimas de fase II, preferentemente sulfatados, además de metilsulfatados y glucuronidados. El resto alcanza el colon, donde continúan su biodegradación a derivados de lactonas y ácido valérico, que se absorben y subsiguientemente se transforman en derivados sulfatados y glucuronidados, aumentando aproximadamente un 25% la biodisponibilidad comparada con aquella determinada al considerar exclusivamente la absorción en el intestino delgado. Además,

el contenido de metabolitos determinados principalmente en orina muestra una relación dosis-respuesta con los flavanoles ingeridos en las dosis nutricionales evaluadas. Considerando la notable biodisponibilidad de los flavanoles del cacao y su extensa metabolización, es importante tener en cuenta la contribución de los metabolitos microbianos en los estudios sobre los beneficios en salud asociados al consumo de cacao.

**4.3.2. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE LOS ÁCIDOS
HIDROXICINÁMICOS DEL CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE
Y YERBA MATE**

4.3.2. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE LOS ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS DEL CAFÉ MEZCLA TOSTADO/VERDE Y YERBA MATE

En el anterior estudio se valoró la biodisponibilidad de los polifenoles de un mismo alimento, cacao soluble, diferenciándose únicamente en el contenido total de compuestos polifenólicos. En el estudio que aquí se presenta se emplearon dos productos diferentes: café verde soluble mezclado con café tostado en proporción 35:65 (p/p) para mejorar su palatabilidad, y yerba mate en infusión. Aunque se trate de dos bebidas preparadas a partir de dos especies vegetales diferentes y de distintas partes de la planta (semillas en el caso del café y hojas en el caso del mate), la composición polifenólica en ambas es muy similar, como se ha visto en los apartados 4.1.2 y 4.1.3 de Resultados. Ello justifica la realización del presente estudio con las dos bebidas en una intervención nutricional con un diseño cruzado, aleatorizado y ciego (ver sección 3.2.3.3.2. de Materiales y Métodos). Los voluntarios tomaron la bebida de café mezcla tostado/verde y de mate en dos días diferentes separados por un intervalo de lavado de tres semanas. En cada fase del estudio, cada participante tomó 3,5 g de café soluble disuelto en 250 mL de agua y una infusión de yerba mate preparada con 4,91 g de hojas secas en 250 mL de agua. Estas bebidas proporcionaron 298 mg y 396 mg de ácidos hidroxicinámicos respectivamente (ver secciones 4.1.2 y 4.1.3. de Resultados). Es importante precisar que la composición mayoritaria de las bebidas la conformaban derivados mono- y diacilquínicos, por lo que su denominación correcta atendiendo a su estructura química sería la de hidroxicinamatos, sin bien comúnmente se habla de ellos como ácidos hidroxicinámicos. Tras la ingesta de cada bebida, se tomaron muestras de sangre a los voluntarios a 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 y 12 h, y se recogió la orina a los intervalos -2-0, 0-2, 2-4, 4-8, 8-12 y 12-24 h.

4.3.2.1. Optimización del Método de Extracción de Compuestos Fenólicos de Café y Mate Presentes en Plasma y Orina

Para el análisis de compuestos fenólicos y metabolitos en las muestras de plasma se probaron distintos procedimientos de extracción, descartándose en un principio la extracción en fase sólida por los deficientes resultados obtenidos en el análisis de las muestras de plasma de los voluntarios que tomaron los productos

solubles de cacao del estudio anterior (Sección 4.3.1.1.). Al igual que en aquel caso, inicialmente se preparó un *pool* de plasma de varios voluntarios a partir de la sangre extraída a tiempo 0 (antes de que tomaran las bebidas), en el cual no se esperaba la presencia de compuestos fenólicos, y se adicionó el estándar ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico, 5-CQA) disuelto en agua. Se compararon dos procedimientos diferentes basados en la extracción líquido-líquido. Siguiendo las indicaciones de los autores Redeuil y cols. (2011), se añadieron 400 μL de plasma gota a gota sobre 1000 μL de acetonitrilo, conteniendo ácido ascórbico. A continuación, se vortexó, se centrifugó y se separó el sobrenadante del precipitado proteico, evaporándose a sequedad con corriente de N_2 a 30°C. La recuperación de 5-CQA obtenida con este método se comparó con la que resultaba tras aplicar el protocolo de Day y cols. (2001), también utilizado por Stalmach y cols. (2009) para un estudio de biodisponibilidad de los fenoles del café. Este protocolo es semejante al de Redeuil y cols. (2011), aunque constó de una fase adicional de re-extracción del pellet con metanol. El método basado en la precipitación proteica con acetonitrilo seguido de re-extracción con metanol ofreció mejores valores de recuperación del estándar 5-CQA, siendo por tanto el procedimiento utilizado para el aislamiento de metabolitos en el presente estudio.

Las muestras de orina se trataron de forma semejante a aquellas de los estudios con los productos solubles de cacao, diluyendo un 50% con agua Milli-Q y centrifugando antes de su análisis.

Las muestras de orina y plasma así preparadas se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas simple cuadrupolo-tiempo de vuelo (HPLC-MS-QTOF), ya que otros detectores como el de diodos en red (DAD) o el espectrómetro de masas simple cuadrupolo no ofrecieron la sensibilidad necesaria para los niveles de metabolitos que se generaban en este tipo de estudios.

4.3.2.2. Identificación de Metabolitos Derivados del Café Mezcla Tostado/Verde y la Yerba Mate

La identificación de metabolitos se llevó a cabo mediante búsqueda dirigida de la masa exacta y confirmación mediante el estudio de los perfiles de fragmentación molecular (MS/MS), tal como se ha detallado en el estudio de biodisponibilidad con los productos solubles de cacao.

En la Tabla 4.31. se indican la masa exacta teórica, la masa teórica del ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ en modo negativo y la fórmula molecular teórica de los potenciales compuestos derivados del metabolismo de los fenoles del café y del mate buscados en las muestras de plasma y orina.

Tabla 4.31. Características de los metabolitos potencialmente presentes en las muestras biológicas de los voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.

Compuesto	Masa Exacta Teórica	Masa Teórica $[M-H]^-$	Fórmula Molecular
Metabolitos potencialmente presentes tras la ingesta de café y yerba mate			
Grupo del ácido cafeico			
Ácido cafeoilquinico	354,0951	353,0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Ácido cafeoilquinico-glucurónido	530,1272	529,1199	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₅
Ácido cafeoilquinico-sulfato	434,0519	433,0446	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₂ S
Ácido cafeico	180,0423	179,0350	C ₉ H ₈ O ₄
Ácido cafeico-glucurónido	356,0743	355,0671	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀
Ácido cafeico-sulfato	259,9991	258,9918	C ₉ H ₈ O ₇ S
Ácido dihidrocafeico	182,0579	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄
Ácido dihidrocafeico-glucurónido	358,0900	357,0827	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀
Ácido dihidrocafeico-sulfato	262,0147	261,0074	C ₉ H ₁₀ O ₇ S
Ácido dihidrocafeoilquinico	356,1107	355,1035	C ₁₆ H ₂₀ O ₉
Ácido dihidrocafeoilquinico-glucurónido	532,1428	531,1355	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₅
Ácido dihidrocafeoilquinico-sulfato	436,0676	435,0603	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₂ S
Ácido cafeoilsiquimico	372,1057	371,0984	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀
Ácido cafeoilsiquimico-glucurónido	548,1377	547,1305	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₆
Ácido cafeoilsiquimico-sulfato	452,0625	451,0552	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₃ S
Ácido dihidrocafeoilsiquimico	374,1213	373,1540	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀
Ácido dihidrocafeoilsiquimico-glucurónido	550,1534	549,1461	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₆
Ácido dihidrocafeoilsiquimico-sulfato	454,0781	453,0708	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₃ S
Ácido dicafeoilquinico	516,1268	515,1195	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂
Ácido dicafeoilquinico-glucurónido	692,1588	691,1516	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₈
Ácido dicafeoilquinico-sulfato	596,0836	595,0763	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅ S
Ácido dihidrocafeoilquinico	518,1424	517,1351	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₂
Ácido dihidrocafeoilquinico-glucurónido	694,1745	693,1672	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₈
Ácido dihidrocafeoilquinico-sulfato	598,0992	597,0920	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₅ S
Ácido tetrahidrocafeoilquinico	520,1581	519,1508	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₂
Ácido tetrahidrocafeoilquinico-glucurónido	696,1902	695,1829	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₈
Ácido tetrahidrocafeoilquinico-sulfato	600,1149	599,1076	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₅ S
Cafeoilglicina	237,0637	236,0564	C ₁₁ H ₁₁ O ₅ N
Grupo del ácido ferúlico			
Ácido feruloilquinico	368,1107	367,1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉
Ácido feruloilquinico-glucurónido	534,0645	533,0573	C ₂₃ H ₁₈ O ₁₅
Ácido feruloilquinico-sulfato	448,0675	447,0603	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₂ S
Ácido ferúlico	194,0579	193,0506	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Ácido ferúlico-glucurónido	370,0900	369,0827	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀
Ácido ferúlico-sulfato	274,0147	273,0074	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S
Ácido dihidroferúlico	196,0735	195,0663	C ₁₀ H ₁₂ O ₄
Ácido dihidroferúlico-glucurónido	372,1056	371,0984	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀
Ácido dihidroferúlico-sulfato	276,0303	275,0231	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S
Ácido dihidroferuloilquinico	370,1263	369,1191	C ₁₇ H ₂₂ O ₉
Ácido dihidroferuloilquinico-glucurónido	546,1585	545,1512	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₅
Ácido dihidroferuloilquinico-sulfato	450,0832	449,0759	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₂ S
Feruloilglicina	251,0794	250,0721	C ₁₂ H ₁₃ O ₅ N

Tabla 4.31. (Continuación). Características de los metabolitos potencialmente presentes en las muestras biológicas de los voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.

Compuesto	Masa Exacta Teórica	Masa Teórica [M-H]	Fórmula Molecular
Metabolitos potencialmente presentes tras la ingesta de café y yerba mate			
Grupo de los ácidos cafeico y ferúlico			
Ácido cafeoilferuloilquinico	530,1424	529,1352	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂
Ác. cafeoilferuloilquinico-glucurónido	706,1741	705,1672	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₈
Ácido cafeoilferuloilquinico-sulfato	610,0992	609,0919	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₅ S
Ácido dihidrocafeoilferuloilquinico	532,1581	531,1508	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂
Ácido cafeoidihidroferuloilquinico	532,1581	531,1508	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂
Ácido dihidrocafeoilferuloilquinico-glucurónido	708,1902	707,1829	C ₃₂ H ₃₆ O ₁₈
Ácido cafeoidihidroferuloilquinico-glucurónido	708,1902	707,1829	C ₃₂ H ₃₆ O ₁₈
Ácido dihidrocafeoilferuloilquinico-sulfato	612,1149	611,1076	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅ S
Ácido cafeoidihidroferuloilquinico-sulfato	612,1149	611,1076	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅ S
Ácido dihidrocafeoidihidroferuloilquinico	534,1737	533,1664	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂
Ácido dihidrocafeoidihidroferuloilquinico-glucurónido	710,2058	709,1985	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₈
Ácido dihidrocafeoidihidroferuloilquinico-sulfato	614,1305	613,1233	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅ S
Grupo del ácido cumárico			
Ácido cumaroilquinico	338,1002	337,0929	C ₁₆ H ₁₈ O ₈
Ácido cumaroilquinico-sulfato	418,0570	417,0497	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₁ S
Ácido cumaroilquinico-glucurónido	514,1323	513,1250	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₄
Ácido cumárico	164,0473	163,0401	C ₉ H ₈ O ₃
Ácido cumárico-glucurónido	340,0794	339,0722	C ₁₅ H ₁₆ O ₉
Ácido cumárico-sulfato	244,0042	242,9969	C ₉ H ₈ O ₆ S
Ácido dihidrocumárico	166,0630	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃
Ácido dihidrocumárico-glucurónido	342,0951	341,0878	C ₁₅ H ₁₈ O ₉
Ácido dihidrocumárico-sulfato	246,0198	245,0125	C ₉ H ₁₀ O ₆ S
Ácido dihidrocumaroilquinico	340,1158	339,1085	C ₁₆ H ₂₀ O ₈
Ác. dihidrocumaroilquinico-glucurónido	516,1479	515,1406	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄
Ác. dihidrocumaroilquinico-sulfato	420,0726	419,0654	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₁ S
Derivados del ácido hidroxifenilpropiónico			
Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico (dihidrocafeico)	182,0579	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄
Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico (dihidroferúlico)	196,0736	195,0663	C ₁₀ H ₁₂ O ₄
Ácido 3-hidroxifenilpropiónico	166,0630	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃
Derivados del ácido hidroxifenilacético			
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	168,0423	167,0350	C ₈ H ₈ O ₄
Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético	182,0579	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄
Ácido 3-hidroxifenilacético	152,0473	151,0401	C ₈ H ₈ O ₃
Derivados del ácido hidroxibenzoico			
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (protocatéquico)	154,0266	153,0193	C ₇ H ₆ O ₄
Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (vanílico)	168,0423	167,0350	C ₈ H ₈ O ₄
Ácido 4-hidroxibenzoico/3-hidroxibenzoico	138,0317	137,0244	C ₇ H ₆ O ₃
Ácido 4-hidroxihipúrico/3-hidroxihipúrico	195,0532	194,0459	C ₉ H ₈ O ₄ N
Otros			
1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol)	126,0317	125,0244	C ₆ H ₆ O ₃
Metabolitos potencialmente presentes tras la ingesta de café			
Grupo del ácido dimetoxicinámico			
Ácido dimetoxicinamoilquinico	382,1464	381,1191	C ₁₈ H ₂₂ O ₉
Ácido dihidrodimetoxicinamoilquinico	384,1420	383,1348	C ₁₈ H ₂₄ O ₉
Ácido 3,4-dimetoxicinámico	208,0735	207,0652	C ₁₁ H ₁₂ O ₄
Ácido dihidrodimetoxicinámico	210,0892	209,0819	C ₁₁ H ₁₄ O ₄
Grupo de lactonas			
Cafeoilquinicolactona	336,0845	335,0761	C ₁₆ H ₁₆ O ₈
Cafeoilquinicolactona-glucurónido	512,1166	511,1093	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₄
Cafeoilquinicolactona-sulfato	416,0413	415,0330	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁ S
Dihidrocafeoilquinicolactona	338,1002	337,0929	C ₁₆ H ₁₈ O ₈
Dihidrocafeoilquinicolactona-glucurónido	514,1323	513,1250	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₄
Dihidrocafeoilquinicolactona-sulfato	418,0570	417,0497	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₁ S
Feruloilquinicolactona	350,1001	349,0929	C ₁₇ H ₁₈ O ₈
Feruloilquinicolactona-glucurónido	526,1323	525,1261	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₄
Feruloilquinicolactona-sulfato	430,0570	429,0557	C ₁₇ H ₁₈ O ₁₁ S
Dihidroferuloilquinicolactona	352,1158	351,1158	C ₁₇ H ₂₀ O ₈
Dihidroferuloilquinicolactona-glucurónido	528,1479	527,1406	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₄
Dihidroferuloilquinicolactona-sulfato	432,0726	431,0654	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₁ S

Tabla 4.31. (Continuación). Características de los metabolitos potencialmente presentes en las muestras biológicas de los voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.

Compuesto	Masa Exacta Teórica	Masa Teórica [M-H]	Fórmula Molecular
Metabolitos potencialmente presentes tras la ingesta de yerba mate			
Flavonoles			
Rutina	610,1534	609,1461	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Quercetín-3-O-glicósido	464,0955	463,0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Quercetina	302,0427	301,0354	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Quercetín-glucurónido	478,0747	477,0674	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃
Quercetín-diglucurónido	654,1068	653,0996	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₉
Metil-quercetín-diglucurónido	668,1225	667,1152	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₉
Quercetín-sulfato	381,9995	380,9922	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₀ S
Quercetín-sulfoglucurónido	558,0316	557,0243	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₆ S
Isoramnetina-3-O-ramnoglucósido	623,1612	622,1539	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆
Isoramnetina/Tamarixetina	316,0583	315,0510	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
Metil-quercetín-glucurónido	492,0904	491,0831	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃
Metil-quercetín-sulfato	396,0151	395,0078	C ₁₆ H ₁₂ O ₁₀ S
Taxifolina (dihydroquercetina)	304,0583	303,0510	C ₁₅ H ₁₂ O ₇
Taxifolín-glucurónido	480,0904	479,0831	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃
Taxifolín-sulfato	384,0151	383,0078	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S
Metil-taxifolina	318,0740	317,0667	C ₁₆ H ₁₄ O ₇
Kaempferol-3-O-ramnoglucósido	594,1585	593,1512	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
Kaempferol	286,0477	285,0405	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Kaempferol-glucurónido	462,0798	461,0726	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂
Kaempferol-diglucurónido	638,1119	637,1046	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₈
Kaempferol-sulfato	366,0045	364,9973	C ₁₅ H ₁₀ O ₉ S
Kaempferol-sulfoglucurónido	542,0366	541,0294	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₅ S

En primer lugar se realizó la búsqueda de los principales compuestos presentes en las bebidas, hidroxicinamatos (ácidos cafeoilquínico, feruloilquínico, cumaroilquínico, cafeoilsiquímico, dicafeoilquínico y cafeoilferuloilquínico) y de sus posibles productos de hidrólisis (ácidos cafeico, ferúlico y cumárico), así como de los correspondientes derivados glucuronidados, metilados y sulfatados (metabolitos de fase II).

Por otra parte, se realizó la búsqueda de metabolitos de origen microbiano, tanto de algunos ya descritos anteriormente en la bibliografía (Stalmach y cols., 2009; Redeuil y cols., 2011; Renouf y cols., 2014, entre otros), como de otros potenciales metabolitos postulados en el presente estudio. Así, se ha evaluado la presencia de derivados hidrogenados de fenoles sencillos (ácidos cafeico, ferúlico y cumárico) y de ácidos monoacilquínicos (cafeoilquínico, feruloilquínico, cumaroilquínico y cafeoilsiquímico) y diacilquínicos (dicafeoilquínico y cafeoilferuloilquínico), y de los correspondientes derivados de fase II. Igualmente, se incluyó en este grupo otros metabolitos con estructuras derivadas de los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e hidroxibenzoico, y compuestos como floroglucinol (Tabla 4.31.).

Esta lista de compuestos se completó con la búsqueda de dimetoxicinamoilquínico y lactonas derivados de hidroxicinámicos (cafeoilquínico-lactona y feruloilquínico-lactona) (Farah y cols. 2005), productos de deshidratación de compuestos monoacíclicos aportados por el café tostado, así como derivados del metabolismo de los flavonoles presentes en el mate. Se trató de identificar los compuestos pertenecientes a estos grupos (dimetoxicinamoilquínico, lactonas y flavonoles) sin metabolizar, sus agliconas (ácido dimetoxicinámico) y sus derivados de fase II. Asimismo, se amplió la búsqueda hacia metabolitos derivados de estos compuestos de origen microbiano. Respecto al grupo del ácido dimetoxicinamoilquínico y de las lactonas, se valoró la presencia de dihidroderivados (dihidrodimetoxicinamoilquínico, dihidrometoxicinámico, dihidrocafeoilquínicolactona y dihidroferuloilquínicolactona) y sus metabolitos de fase II. Por lo que respecta al grupo de los flavonoles, y atendiendo a la limitada biodisponibilidad intestinal reconocida para la rutina (Jaganath y cols., 2009), componente mayoritario de la yerba mate, se evaluó la taxifolina o dihidroquercetina y sus derivados de fase II, tras su potencial absorción colónica.

En la Tabla 4.32. se detalla la lista de metabolitos finalmente detectados en plasma y/u orina. Así, en primer lugar se valoró la absorción de **ácidos cafeoilquínicos**. La búsqueda del ión cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 353,0878 ofreció tres picos cromatográficos a TR 4,0; 6,2 y 10,1 min, cuyo patrón de fragmentación mostró el ion-fragmento de m/z 191, correspondiente al ácido quínico (Figura 4.44.a.). Atendiendo a la abundancia y conocimiento previo se asignaron como ácidos 3-, 5-, y 4-cafeoilquínico, respectivamente. Todos fueron hallados en orina y sólo el ácido 5-cafeoilquínico se detectó en plasma de la intervención con café, mientras que en la intervención con mate se detectaron los ácidos 3- y 5-cafeoilquínico en orina. No se detectó ningún derivado glucuronidado y/o sulfatado de estos ácidos.

Seguidamente se evaluó la presencia del **ácido cafeico** procedente de la hidrólisis del cafeoilquínico, detectándose a TR 7,9 min un compuesto coincidente con el estándar cafeico (Figura 4.44.b.), únicamente hallado en orina tras la ingesta de café. No se detectó ningún derivado glucuronidado, aunque sí un derivado sulfatado a TR 10,7 min, con $[M-H]^-$ de m/z 258,9918 e iones-fragmento de m/z 179,035 tras la pérdida del grupo sulfato y dióxido de carbono, respectivamente (Figura 4.44.c.). Otros autores identificaron dos derivados sulfatados en un estudio de biodisponibilidad con café (Stalmach y cols., 2009; Redeuil y cols., 2011), reportando mayor contenido para el

compuesto sulfatado en posición C3, por lo que en nuestro caso se asignó tentativamente como cafeico-3-sulfato. Este compuesto se encontró en orina de ambas intervenciones y en plasma tras la ingesta de mate.

Tabla 4.32. Caracterización por LC-QTOF con ionización negativa de los metabolitos de fase II y microbianos hallados en los fluidos biológicos de los voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.

TR (min)	Ion Cuasi-molecular [M-H] ⁻	Fórmula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS ² (m/z)	Identificación Tentativa	Fluidos	
							Café	Mate
Grupo del ácido cafeico								
4,0	353,0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	97,0	-0,37	191	Ác. 3-cafeoilquinico	O	O
6,2	353,0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	80,7	-1,38	191	Ác. 5-cafeoilquinico	P, O	O
10,1	353,0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	98,2	-1,47	191	Ác. 4-cafeoilquinico	O	
7,9	179,0350	C ₉ H ₈ O ₄	83,0	0,9	135	Ác. cafeico	O	
10,7	258,9918	C ₉ H ₈ O ₇ S ₁	95,1	-1,65	179; 135	Ác. cafeico-3-sulfato	O	P, O
7,0	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄	87,0	5,48	137	Ác. dihidrocafeico	P, O	P, O
6,5	357,0827	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	82,9	-1,14	181; 137	Ác. dihidrocafeico-3-glucurónido	O	O
7,8	261,0074	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	99,6	-0,7	181	Ác. dihidrocafeico-4-sulfato	P, O	P, O
10,4	261,0074	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	95,0	-3,6	181	Ác. dihidrocafeico-3-sulfato	O	O
8,5	355,1035	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	82,9	-1,74	181	Ác. 3-dihidrocafeoilquinico	O	O
13,1	355,1035	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	47,1	1,13	181	Ác. 5-dihidrocafeoilquinico	O	
14,8	355,1035	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	55,7	1,27	181	Ác. 4-dihidrocafeoilquinico	O	
11,3	531,1355	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₅	64,78	0,97	355; 181	Ác. dihidrocafeoilquinico-glucurónido	O	
Derivados del ácido ferúlico								
7,1	367,1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	97,0	-0,37	191	Ác. 3-feruloilquinico	O	O
9,6	367,1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	81,0	1,25	191	Ác. 5-feruloilquinico	P, O	O
10,2	367,1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	95,3	-1,99	191	Ác. 4-feruloilquinico	P, O	O
11,4	193,0506	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	77,6	3,55	134	Ác. ferúlico	P	
12,9	193,0506	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	97,2	0,11	134	Ác. isoferúlico	P	O
8,4	369,0827	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	90,4	-2,05	193	Ác. ferúlico-4-glucurónido	P, O	P, O
9,2	369,0827	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	96,8	-1,61	193	Ác. isoferúlico-glucurónido	O	O
8,7	273,0074	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	71,2	-0,7	193	Ác. ferúlico-4-sulfato	P, O	P, O
10,4	273,0074	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	74,9	-0,54	193	Ác. isoferúlico-sulfato	O	
10,8	195,0663	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	99,6	0,91	136	Ác. dihidroferúlico	P, O	P, O
11,6	195,0663	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	86,9	1,31	136	Ác. dihidroisoferúlico	P, O	P, O
6,5	371,0984	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	96,9	-1,25	195; 136	Ác. dihidroferúlico-4-glucurónido	P, O	P, O
8,4	371,0984	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	90,9	-3,76	195; 136	Ác. dihidroisoferúlico-3-glucurónido	P, O	P, O
8,8	275,0231	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S ₁	70,8	4,17	195; 136	Ác. dihidroferúlico-4-sulfato	P, O	P, O
10,4	275,0231	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S ₁	96,8	-1,87	195; 136	Ác. dihidroisoferúlico-3-sulfato	P, O	P, O
15,1	369,1191	C ₁₇ H ₂₂ O ₉	98,6	-0,44	195	Ác. 3-dihidroferuloilquinico	P, O	P, O
15,4	369,1191	C ₁₇ H ₂₂ O ₉	97,9	-1,09	195	Ác. 5-dihidroferuloilquinico	P, O	P, O
15,6	369,1191	C ₁₇ H ₂₂ O ₉	98,6	-0,44	195	Ác. 4-dihidroferuloilquinico	O	
8,8	250,0721	C ₁₂ H ₁₃ O ₅ N	99,4	-0,62	191; 134	Feruloílglicina	P, O	P, O
9,5	250,0721	C ₁₂ H ₁₃ O ₅ N	77,1	-2,46	191; 134	Isoferuloílglicina	O	O
Derivados del ácido cumárico								
16,4	337,0929	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	95,5	-0,11	163	Ác. <i>p</i> -cumaroilquinico	O	P, O
12,3	339,0722	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	73,5	2,01	163	Ác. <i>p</i> -cumárico-4-glucurónido	P, O	
12,9	339,0722	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	82,9	-2,2	163	Ác. <i>m</i> -cumárico-3-glucurónido	O	
18,5	242,9969	C ₉ H ₈ O ₆ S	77,3	-1,3	163	Ác. <i>p</i> -cumárico-4-sulfato	P	
8,5	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃	85,5	3,05	119	Ác. dihidrocumárico	O	O
6,8	341,0878	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	80,6	0,07	165	Ác. dihidro- <i>p</i> -cumárico-4-glucurónido	O	O
10,6	245,0125	C ₉ H ₁₀ O ₆ S	98,1	1,87	165	Ác. dihidro- <i>p</i> -cumárico-4-sulfato	O	O
14,8	339,1085	C ₁₆ H ₂₀ O ₈	95,6	-2,4	165	Ác. dihidro- <i>p</i> -cumaroilquinico	P, O	O
15,3	339,1085	C ₁₆ H ₂₀ O ₈	98,2	-2,1	165	Ác. dihidro- <i>m</i> -cumaroilquinico	P, O	O
Derivados del ácido dimetoxicinámico								
15,1	207,0652	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	78,3	-2,5	103; 131	Ác. dimetoxicinámico	P	
13,8	209,0819	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	65,4	-2,1		Ác. dihidrodimetoxicinámico	P, O	

O: orina; P: plasma.

Recientemente se ha descrito una batería de compuestos procedentes de la reducción de ácido cafeico y posterior metabolización por acción de enzimas de fase II, correspondiente con el ácido dihidrocafeico y sus derivados (Redeuil y cols., 2011). En nuestro caso se pudo detectar el ácido dihidrocafeico a TR 7,0 min, presente tanto en plasma como en orina de ambas intervenciones y cuya caracterización se apoyó en la disponibilidad del estándar comercial (Figura 4.44.d.). También se identificó un derivado glucuronidado y dos sulfatados del ácido dihidrocafeico. El compuesto glucuronidado se asignó a un pico cromatográfico que eluyó a TR 6,5 min y que ofreció tras la ionización un ion cuasimolecular $[M-H]^-$ de m/z 357,0827 e iones-fragmento de m/z 181 y 137, generados tras la pérdida del ácido glucurónico y de dióxido de carbono, respectivamente (Figura 4.44.e.). El patrón de fragmentación, junto con la fórmula molecular sugerida por el software Mass Hunter, permitió confirmar su identidad como ácido dihidrocafeico-glucurónido. Basado en el trabajo de Redeuil y cols. (2011) y atendiendo a la posición C3 como la posición preferente de conjugación para este tipo de compuestos, se asignó tentativamente como ácido dihidrocafeico-3-glucurónido. Este compuesto se ha detectado en orina de ambas intervenciones con café y mate, aunque no en plasma. Por otra parte, los derivados sulfatados ofrecieron un comportamiento en el análisis mediante LC-QTOF coherente con su estructura química, $[M-H]^-$ de m/z 261,0074 e ion-fragmento de m/z 181,0506, propio del ácido dihidrocafeico tras la pérdida de m/z 80 (Figura 4.44.f.), siendo asignados tentativamente como ácidos dihidrocafeico-4-sulfato (TR 7,8) y dihidrocafeico-3-sulfato (TR 10,4) en base al citado trabajo de Redeuil y cols. (2011), apareciendo el primero en plasma y orina, mientras que el segundo sólo se detectó en orina de ambas intervenciones.

Siguiendo con esta línea de metabolización (formación de dihidroderivados), se evaluó la presencia de **ácidos dihidrocafeoilquinicos**. La búsqueda del ion cuasimolecular $[M-H]^-$ de m/z 355,1035 dio lugar a tres picos cromatográficos con patrón de fragmentación MS^2 coherente con su estructura química (ion-fragmento de m/z 181,0506) (Figura 4.44.g.). Los picos cromatográficos que eluyeron a TR 8,5, 13,1 y 14,8 min se asignaron a los ácidos 3-, 5- y 4-dihidrocafeoilquinico, respectivamente, por comparación con el orden de elución de los isómeros 3-, 5- y 4-cafeoilquinico. Los tres compuestos se hallaron en orina tras el consumo de café, mientras que sólo el primero en orina de la intervención con yerba mate. Ninguno se detectó en plasma. De la búsqueda de los derivados glucuronidados y sulfatados sólo se confirmó la presencia de un derivado glucuronidado a TR 11,3 min, con un espectro MS/MS afín a su estructura

química ($[M-H]^-$ a m/z 531,1355 e iones-fragmento a m/z 355 y 181 correspondiente a los ácidos dihidrocafeoilquínico y dihidrocafeico desprotonados, respectivamente (Figura 4.44.h.)). Para este compuesto, detectado únicamente en orina de la intervención con café, no se disponen de referencias para hacer una asignación tentativa de la posición del grupo glucurónido, pues es la primera vez que se describe.

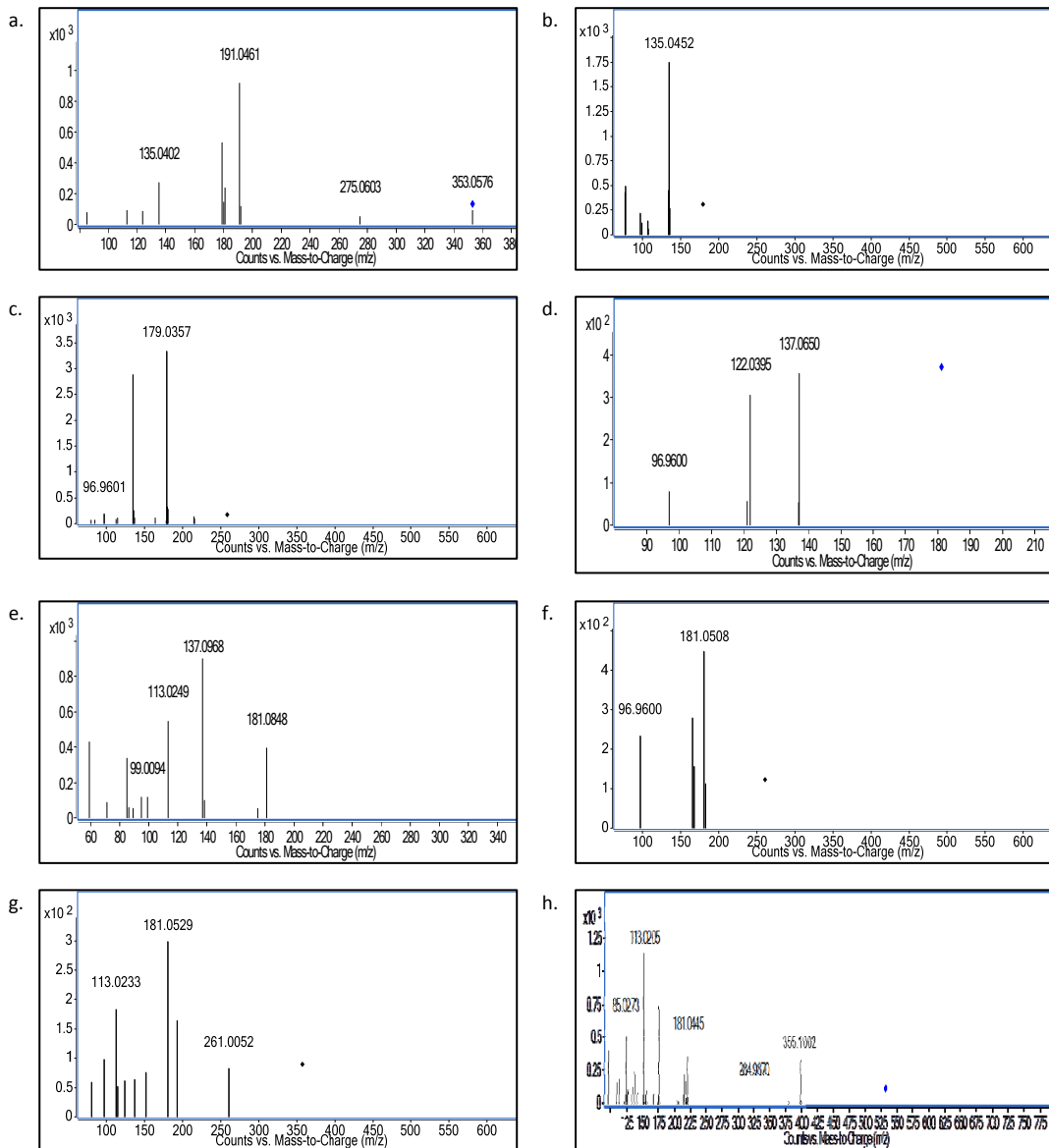


Figura 4.44. Espectros de masas MS^2 correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate. a. ácido clorogénico, b. ácido cafeico, c. ácido cafeico-3-sulfato, d. ácido dihidrocafeico, e. ácido dihidrocafeico-3-glucurónido, f. ácido dihidrocafeico-3-sulfato/dihidrocafeico-4-sulfato, g. ácido dihidrocafeoilquínico, h. ácido dihidrocafeoilquínico-glucurónido.

Dentro de los compuestos hidroxicinámicos que contienen el resto cafeico en su estructura química se encuentran los **ácidos cafeoilsiquímico**, presentes en ambas bebidas de café y mate. La búsqueda del ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 371,0984 arrojó dos picos cromatográficos a TR 6,5 y 8,4 min, cuya fragmentación MS/MS proporcionó un ion-fragmento de m/z 195,0665, distinto del que correspondería al ácido cafeico desprotonado tras la pérdida del ácido siquímico (m/z 179,0350). Curiosamente el ácido cafeoilsiquímico presentaba la misma fórmula molecular que el ácido dihidroferúlico-glucurónido ($C_{16}H_{20}O_{10}$), cuya estructura química sí soportaba el ion-fragmento de m/z 195 correspondiente al precursor dihidroferúlico desprotonado tras la pérdida del resto glucurónido. Por tanto, el ion-fragmento de m/z 195 descartó que estos compuestos fueran dos isómeros del ácido cafeoilsiquímico y sí del ácido dihidroferúlico-glucurónido. Por otra parte, no se detectó ningún derivado de fase II del ácido cafeoilsiquímico.

Ante la detección de la serie de ácidos dihidrocafeoilquínico, y postulando que gran parte del compuesto cafeoilsiquímico podría alcanzar el colon y ser susceptible a la actividad de enzimas microbianas, se tanteó la presencia de la serie de los compuestos dihidrocafeoilsiquímico y sus derivados de fase II, tras su absorción colónica. No se detectó ninguno de ellos ni en plasma ni en orina.

Tanto el café como el mate presentan cantidades relevantes de **ácidos dicafeoilquínicos**, 10,8% y 26,5% de la composición total de la fracción fenólica, respectivamente. Por ello, primero se evaluó la presencia del compuesto sin metabolizar y después de sus derivados de fase II, no detectándose ninguno de ellos. Siguiendo el razonamiento aplicado a la serie de derivados monoacilquínicos, se planteó la búsqueda de ácidos dihidrodicafeoilquínico y/o tetrahidrocafeoilquínico como metabolitos formados por acción de la flora bacteriana, así como sus derivados de fase II generados tras su potencial absorción a nivel colónico, si bien tampoco se halló ninguno de estos compuestos en ninguno de los fluidos biológicos evaluados.

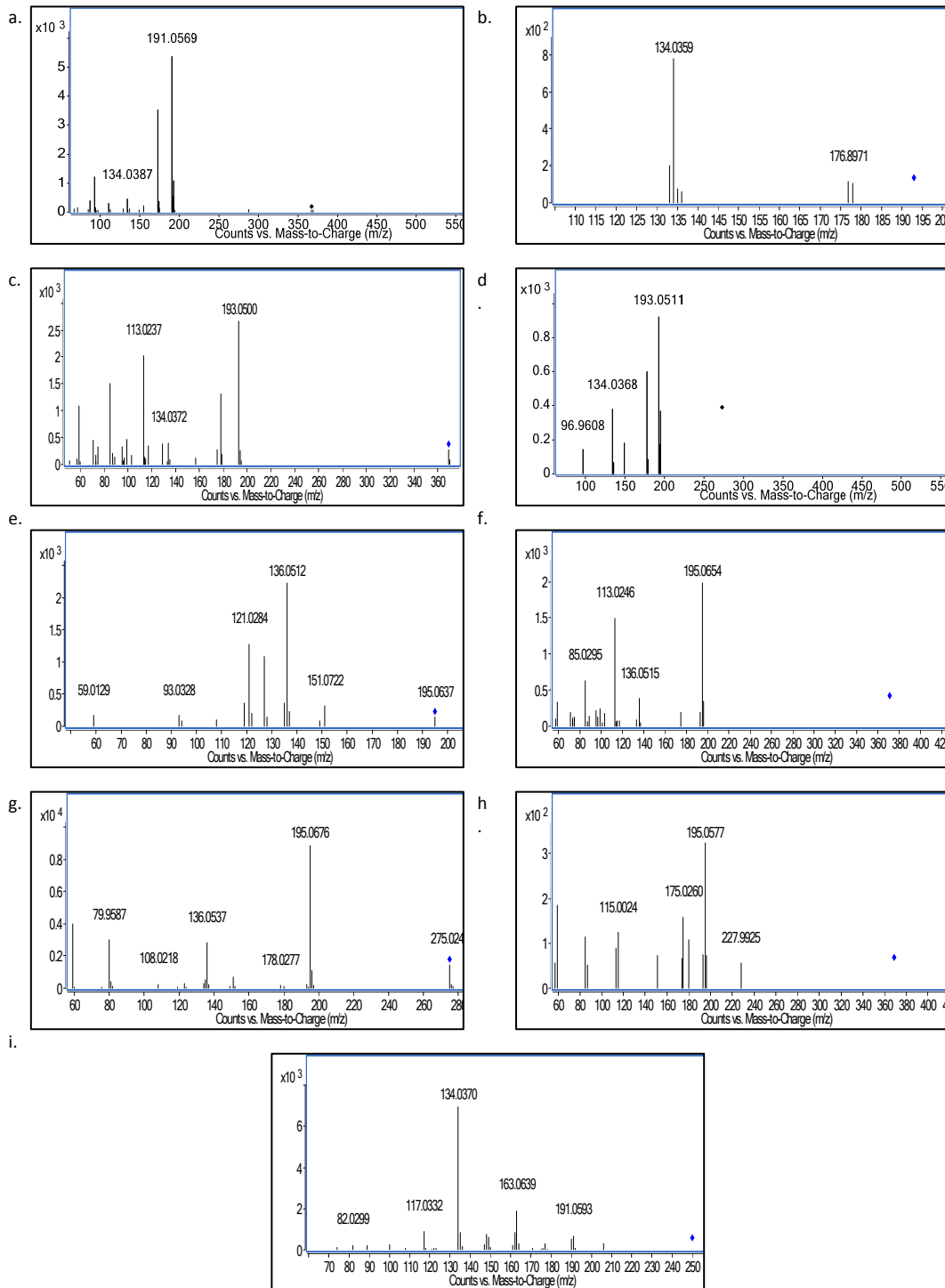


Figura 4.45. Espectros de masas MS² correspondiente a los metabolitos identificados en plasma y/u orina de voluntarios que consumieron café mezclado tostado/verde y yerba mate. a. ácido feruloilquínico, b. ácido ferúlico, c. ácido ferúlico-glucurónido, d. ácido ferúlico-sulfato, e. ácido dihidroferúlico, f. ácido dihidroferúlico-glucurónido, g. ácido dihidroferúlico-sulfato, h. ácido dihidroferuloilquínico, i. feruloilglicina. Los espectros son extensivos al ácido *isoferúlico* e isómeros moleculares que contengan el resto *isoferúlico*.

Por otra parte, bien porque el café y el mate contienen **ácidos feruloilquínicos**, bien por la actividad de la enzima COMT que cataliza la reacción de metilación de los compuestos relacionados con el ácido cafeico para generar la serie derivada del ácido ferúlico, se planteó la búsqueda del ion cuasimolecular $[M-H]^-$ de m/z 367,1035 propio del ácido feruloilquínico. El resultado ofreció tres picos cromatográficos a TR 7,1, 9,6 y 10,2 min cuyo espectro MS/MS mostró el ion-fragmento de m/z 191 propio del ácido quínico desprotonado tras la pérdida del ácido ferúlico, lo que permitió su identificación (Figura 4.45.a.). En base al estudio de Redeuil y cols. (2011) se asignaron como los isómeros 3-, 5- y 4-feruloilquínico, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron derivados glucuronidados y/o sulfatados del ácido feruloilquínico. Todos aparecieron en orina de ambas intervenciones, mientras que los ácidos 4- y 5-feruloilquínico sólo se detectaron en plasma de la intervención con café.

La identificación del **ácido ferúlico** a TR 11,4 min se apoyó en la disponibilidad del estándar comercial. Sin embargo, la búsqueda del ión cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 193,0506 mostró además del pico a TR 11,4 min otro que eluyó a TR 12,9 min y cuyo patrón de fragmentación y datos espectroscópicos (masa molecular propuesta, *score* y error) coincidían con ácido ferúlico. En base al trabajo de Redeuil y cols. (2011) se pudo identificar como ácido *isoferúlico* (Figura 4.45.b.). Ambos se hallaron en plasma de la intervención de café y el ácido *isoferúlico* se identificó en orina de la intervención con yerba mate.

A continuación, se trató de caracterizar a sus respectivos derivados de fase II. Por una parte, el ion cuasi-molecular de m/z 369,0827 ofreció dos picos cromatográficos cuyo MS/MS (ion-fragmento de m/z 193 coincidente con la pérdida del grupo glucurónido) permitió identificar los ácidos ferúlico-4-glucurónido e *isoferúlico*-3-glucurónido a los TR 8,4 y 9,2 min, respectivamente (Figura 4.45.c.). De la misma manera, se identificaron los compuestos ferúlico-4-sulfato e *isoferúlico*-3-sulfato a los TR 8,7 y 10,4 min, con un patrón de fragmentación MS/MS ($[M-H]^-$ de m/z 273,0074 e ion-fragmento de m/z 193) coherente con un derivado sulfatado (Figura 4.45.d.). Los isómeros sustituidos en posición C4 (ácidos ferúlico-4-glucurónido y ferúlico-4-sulfato) se detectaron tanto en plasma como en orina de ambas intervenciones. El ácido *isoferúlico*-3-glucurónido se identificó en orina de ambas intervenciones pero no en plasma, mientras que el ácido *isoferúlico*-3-sulfato sólo se detectó en orina de la intervención con café.

El ácido dihidrocafeico es un compuesto de relevancia en el metabolismo del ácido cafeico y, por semejanza, se evaluó la presencia del **ácido dihidroferúlico**. Al explorar el ion cuasi-molecular 195,0663 se obtuvieron dos picos cromatográficos a TR 10,8 y 11,6 min, cuyo MS/MS mostró un ion-fragmento de m/z 136 tras la pérdida de dióxido de carbono y, por tanto, coherente con la estructura del ácido dihidroferúlico (Figura 4.45.e.). En base al orden de elución de los ácidos ferúlico e *isoferúlico* (11,4 y 12,9 min, respectivamente), los picos de TR 10,8 y 11,6 min se asignaron a los ácidos dihidroferúlico y dihidro*isoferúlico*, respectivamente. Ambos se han detectado en plasma y orina de las dos intervenciones. Adicionalmente, se ha evaluado la presencia de los derivados glucuronidados y sulfatados, y se han identificado dos isómeros de cada uno de ellos. Así, dos picos cromatográficos a TR 6,5 y 8,4 min mostraron el ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de valor m/z 371,0984 e iones-fragmento de m/z 195 y 136, tras la pérdida del resto glucurónido y éste junto con una molécula de dióxido de carbono (Figura 4.45.f.). Los resultados permitieron asignar ambos picos por orden de elución como los ácidos dihidroferúlico-4-glucurónido y dihidro*isoferúlico*-3-glucurónido. Ambos compuestos se detectaron en orina y plasma de las dos intervenciones. De manera semejante se abordó la identificación de los derivados sulfatados; así, los picos cromatográficos que eluyeron a TR 8,8 y 10,4 min ofrecieron un patrón de fragmentación afín a su estructura química ($[M-H]^-$ de m/z 275,0231 e iones-fragmento de m/z 195 y 136) (Figura 4.45.g.). Considerando que el ácido ferúlico eluye antes que su isómero *isoferúlico*, los picos a TR 8,8 y 10,4 min se asignaron a los ácidos dihidroferúlico-4-sulfato y dihidro*isoferúlico*-3-sulfato, respectivamente. Ambos compuestos se detectaron tanto en orina como en plasma de la intervención de café y mate.

A continuación se evaluó la presencia de **ácidos dihidroferuloilquinicos**, buscándose con éxito el ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 369,1191, apareciendo tres picos cromatográficos a TR 15,1, 15,4 y 15,6 min con ion-fragmento de m/z 195 (Figura 4.45.h.) en orina y, los dos primeros, en plasma de la intervención con café. En el ensayo con yerba mate sólo se detectaron los dos primeros isómeros, tanto en plasma como en orina. Sin embargo, no se detectó ningún derivado glucuronidado ni sulfatado de estos compuestos.

Como último compuesto relacionado con el ácido ferúlico se evaluó la presencia de **feruloilglicina**, previamente reportada por Stalmach y cols. (2009) en orina. En ese sentido, dos picos cromatográficos a TR 8,8 y 9,5 min con $[M-H]^-$ de m/z 250,0721 e

iones-fragmento de m/z 191 y 134 (Figura 4.45.i.) permitieron su identificación, asignándose por orden de elución a los metabolitos feruloilglicina e *isoferuloilglicina*. Mientras el compuesto feruloilglicina se detectó tanto en plasma como en orina de ambas intervenciones, el isómero *isoferuloilglicina* sólo se identificó en orina, también en ambas intervenciones.

Otro grupo de compuestos presentes en las bebidas ensayadas son los **ácidos cumaroilquínicos**, aunque su contenido apenas alcanzó el 1,3% y 0,6% para café mezcla tostado/verde y yerba mate, respectivamente. Aun así, se evaluó la presencia de compuestos derivados de su metabolismo. Primero se estudió la absorción directa del propio cumaroilquínico. La búsqueda ofreció un pico cromatográfico a los 16,4 min coherente con la estructura química de este compuesto ($[M-H]^-$ de m/z 337,0929 e ion-fragmento de m/z 163) (Figura 4.46.a.), sólo presente en plasma de la intervención con yerba mate y en orina de ambas intervenciones. Sin embargo, no se detectaron sus derivados de fase II (glucuronidado o sulfatado). A continuación, se evaluó la existencia del ácido cumárico, producto de hidrólisis del ácido cumaroilquínico, y sus derivados potenciales de fase II. No se detectó ácido cumárico libre y sí en cambio sus derivados glucuronidado y sulfatado. En concreto, dos picos cromatográficos a TR 12,3 y 12,9 min ofrecían el ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 339,0722 e ion-fragmento de m/z 163 tras perder el resto glucurónido (Figura 4.46.b.). Cabe destacar que el ácido cumárico sólo presenta un grupo hidroxilo en su estructura fenólica lo que impide la formación de isómeros glucuronidados. Sin embargo, tanto en café como en mate se identificaron dos isómeros de ácido cumaroilquínico, uno más abundante y que eluía a menor TR que el otro, que correspondieron a los ácidos *p*- y *m*-cumaroilquínico, respectivamente. Teniendo esto en cuenta, los picos cromatográficos a TR 12,3 y 12,9 min se asignaron tentativamente a los compuestos *p*-cumárico-4-glucurónido y *m*-cumárico-3-glucurónido, respectivamente, los cuales se detectaron en orina mientras que en plasma sólo se halló el isómero más abundante, *p*-cumárico-4-glucurónido, en la intervención con café. Respecto a los derivados sulfatados, sólo se identificó un pico a TR 18,5 min presente en plasma y ausente en orina tras la intervención con café, con un patrón de fragmentación ($[M-H]^-$ de m/z 242,9969 e ion-fragmento de m/z 163) (Figura 4.46.c.) y resto de parámetros propuestos por el software Mass Hunter (fórmula molecular propuesta, *score* y *error*) coherentes con la estructura del ácido *p*-cumárico-4-sulfato. En la intervención con yerba mate no se detectó ningún derivado de fase II del ácido cumárico.

Siguiendo con la sistemática aplicada para otros grupos de compuestos, se evaluó la existencia del ácido dihidrocumárico, compuesto que se genera como resultado de una reacción de reducción de su precursor, el ácido cumárico. Se confirmó la presencia de **ácido dihidrocumárico** en orina de ambas intervenciones, cuyo espectro MS/MS se recoge en la Figura 4.46.d. ($[M-H]^-$ de m/z 165,0557 e ion-fragmento de m/z 116). Por otra parte, el espectro de masas correspondiente a un ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 341,0878 e ion-fragmento de m/z 165 (Figura 4.46.e.), como consecuencia de la pérdida del resto glucurónico, permitió identificar un isómero en orina de ambas intervenciones, no presente en plasma, que eluyó a TR 6,8 min y se asignó tentativamente como ácido dihidro-*p*-cumárico-4-glucurónico, dado que el *p*-cumárico era más abundante que el isómero *m*-cumárico. Asimismo, el espectro de masas que ofreció un ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 245,0125 e ion-fragmento de m/z 165, tras perder el resto sulfato (Figura 4.46.f.), señaló un pico cromatográfico a TR 10,6 min en las muestras de orina de ambas intervenciones, a TR 10,6 min, que tentativamente se identificó como ácido dihidro-*p*-cumárico-4-sulfato.

También se pudieron identificar los derivados hidrogenados del ácido cumaroilquínico, los **ácidos dihidrocumaroilquínicos**. En particular, los picos cromatográficos a TR 14,8 y 15,3 min evidenciaron tras la interpretación de los datos del espectro de masas un ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 339,1085 e ion-fragmento de m/z 165 (Figura 4.46.g.) que permitió la identificación de dos isómeros (dihidro-*p*-cumaroilquínico y dihidro-*m*-cumaroilquínico), presentes tanto en plasma como en orina de la intervención con café y sólo en orina de los voluntarios que tomaron mate. No se detectaron derivados de fase II de los ácidos dihidrocumaroilquínico.

El café mezcla tostado/verde contiene niveles de **ácido dimetoxicinamoilquínico** detectables mediante LC-QTOF aunque no por LC-DAD. No se detectó dicho ácido pero sí el producto de su hidrólisis en plasma, el ácido dimetoxicinámico, avalado por la disponibilidad del estándar, con $[M-H]^-$ de m/z 207,0652 e iones-fragmento de m/z 131 y 103, ya sugerido por Nagy y cols. (2011) (Figura 4.47.a.). Adicionalmente se ha identificado en plasma y orina el compuesto resultante de su reducción, el ácido dihidrodimetoxicinámico, compuesto que eluyó a TR 13,8 min y con un ión cuasimolecular de $[M-H]^-$ de m/z 209,0819. Dada la escasa cantidad hallada en la orina de los voluntarios, no se pudo obtener su espectro MS/MS. Su identificación se basó en los datos proporcionados por el software Mass Hunter (fórmula molecular tentativa, *score* y *error*).

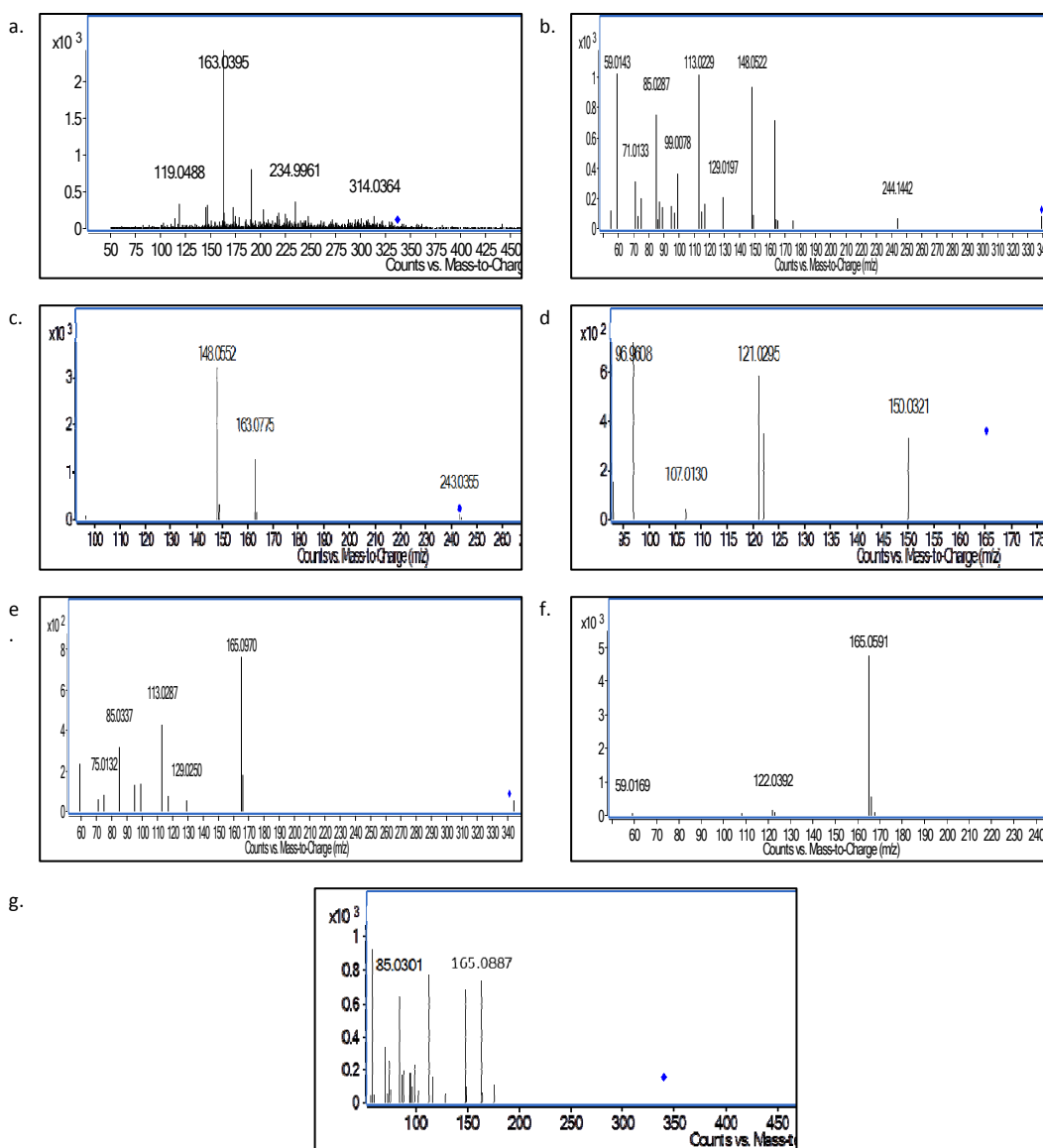


Figura 4.46. Espectros de masas MS² correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate. a. ácido cumaroilquínico, b. ácido cumárico-glucurónido, c. ácido cumárico-sulfato, d. ácido dihidrocumárico, e. ácido dihidrocumárico-glucurónido, f. ácido dihidrocumárico-sulfato, g. ácido dihidrocumaroilquínico. *Los espectros (b) y (g) son extensivos a los dos isómeros que se han detectado.

Por otra parte, se valoró la existencia de metabolitos relacionados con lactona, productos generados durante el tostado del café (3-cafeoilquínico-1,5-lactona y 5-cafeoilquínico-1,5-lactona) y que contenía el producto administrado a los voluntarios. No se detectó cafeoilquínico-lactona sin metabolizar aunque sí tres isómeros del compuesto cafeoilquínicolactona-sulfato a los TR 11,8, 12,3 y 13,5 min, como efectivamente confirman los espectros MS/MS ([M-H]⁻ de *m/z* 415,0330 e ion-fragmento de *m/z* 335

tras la pérdida del resto sulfato) (Figura 4.47.b.). Sólo se detectaron en orina de los voluntarios que habían tomado café mezcla tostado/verde. Relacionado con este grupo de compuestos, también se identificó en plasma niveles trazas de feruloilquínicolactona-glucurónido, que eluyó a 12,0 min y mostró un patrón de fragmentación afín a su estructura química ($[M-H]^-$ de m/z 525,1261 e ion-fragmento de m/z 349 tras liberar el fragmento glucurónido) (Figura 4.47.c.). Sorprendentemente, aunque *a priori* no se esperaba ningún compuesto de esta naturaleza en los fluidos biológicos procedentes de la intervención con yerba mate, se detectó en orina un isómero del compuesto cafeoilquínico-lactona-sulfato, en concreto el que eluía a TR 12,3 min. Su origen se podría justificar por la presencia de cafeoilquínico-lactona en yerba mate, como efectivamente se ha confirmado en su análisis mediante LC-MS, aunque en niveles inferiores al límite de detección del equipo LC-DAD, probablemente generadas por el proceso de secado de las hojas con temperatura elevada.

La yerba mate contiene una pequeña proporción de **flavonoles**, en particular rutina además de quercetín-3-*O*-glicósido y kaempferol-3-*O*-ramnoglicósido, cuyo contenido asciende a un 4,1% del contenido total de la fracción fenólica de esta bebida. Se valoró la existencia de las formas agliconas de cada azúcar (quercetina y kaempferol) así como sus derivados de fase II. Se identificó un metilglucuronidado de quercetina, un pico cromatográfico que eluyó a 16,6 min con espectro MS/MS correspondiente a un ion cuasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 491,0831 e ion-fragmento de m/z 315 propio del compuesto metil-quercetina (Figura 4.47.d.). Por otra parte, se caracterizó un derivado glucuronidado de kaempferol, asociado a un pico cromatográfico de TR 12,6 min y espectro MS/MS coherente con su naturaleza química ($[M-H]^-$ de m/z 461,0726 e ion-fragmento de m/z 285 propio de kaempferol tras la pérdida del resto glucurónido) (Figura 4.47.e.). Ambos compuestos se detectaron tanto en plasma como en orina tras la ingesta de yerba mate.

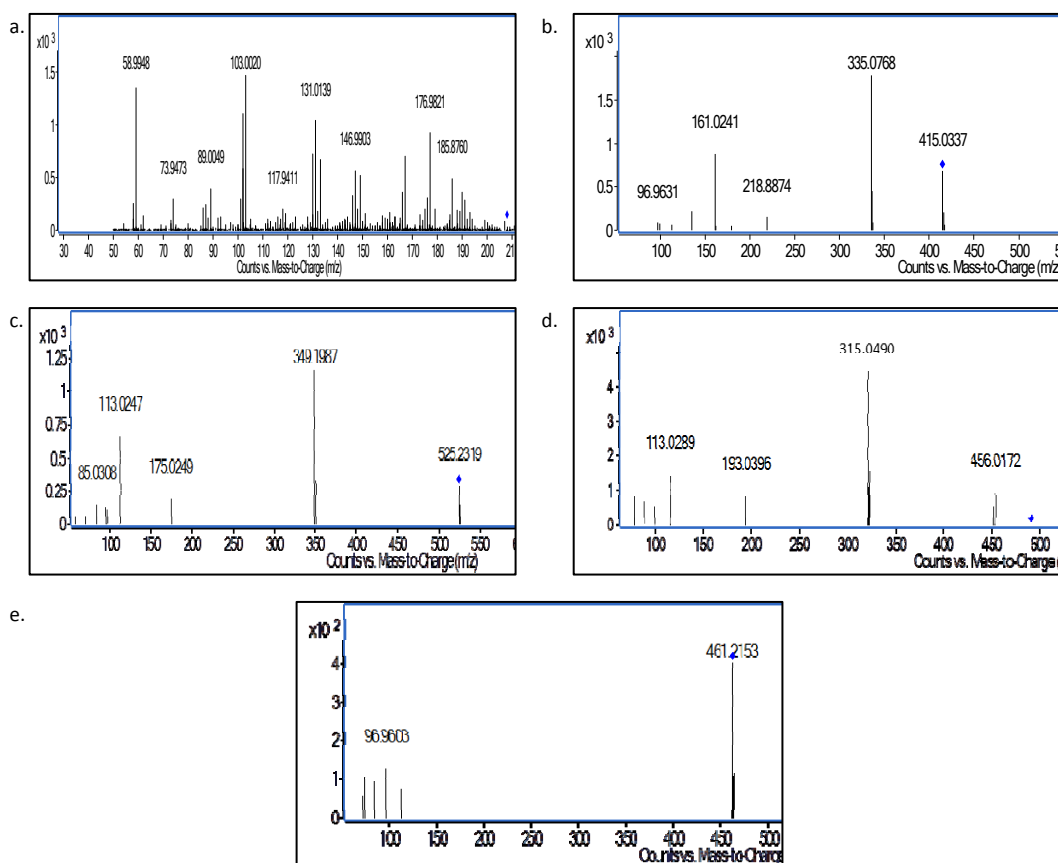


Figura 4.47. Espectros de masas MS² correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate. a. ácido dimetoxicinámico, b. ácido cafeoilquínico-lactona-sulfato, c. ácido feruloilquínico-lactona-glucurónido, d. metil-quercetín-glucurónido, e. kaempferol-glucurónido.

Por último, se evaluó la presencia de una batería de **fenoles simples** pertenecientes a las familias de los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético, hidroxibenzoico y otros como 1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol), por su participación en las rutas de biotransformación de los principales grupos fenólicos identificados en estas bebidas. En la Tabla 4.33. se recogen los principales compuestos identificados, cuya caracterización se ha apoyado en la mayor parte de ellos por la disponibilidad de estándares comerciales y/o resultados publicados por otros autores. En la Figura 4.48. se reportan los espectros MS/MS.

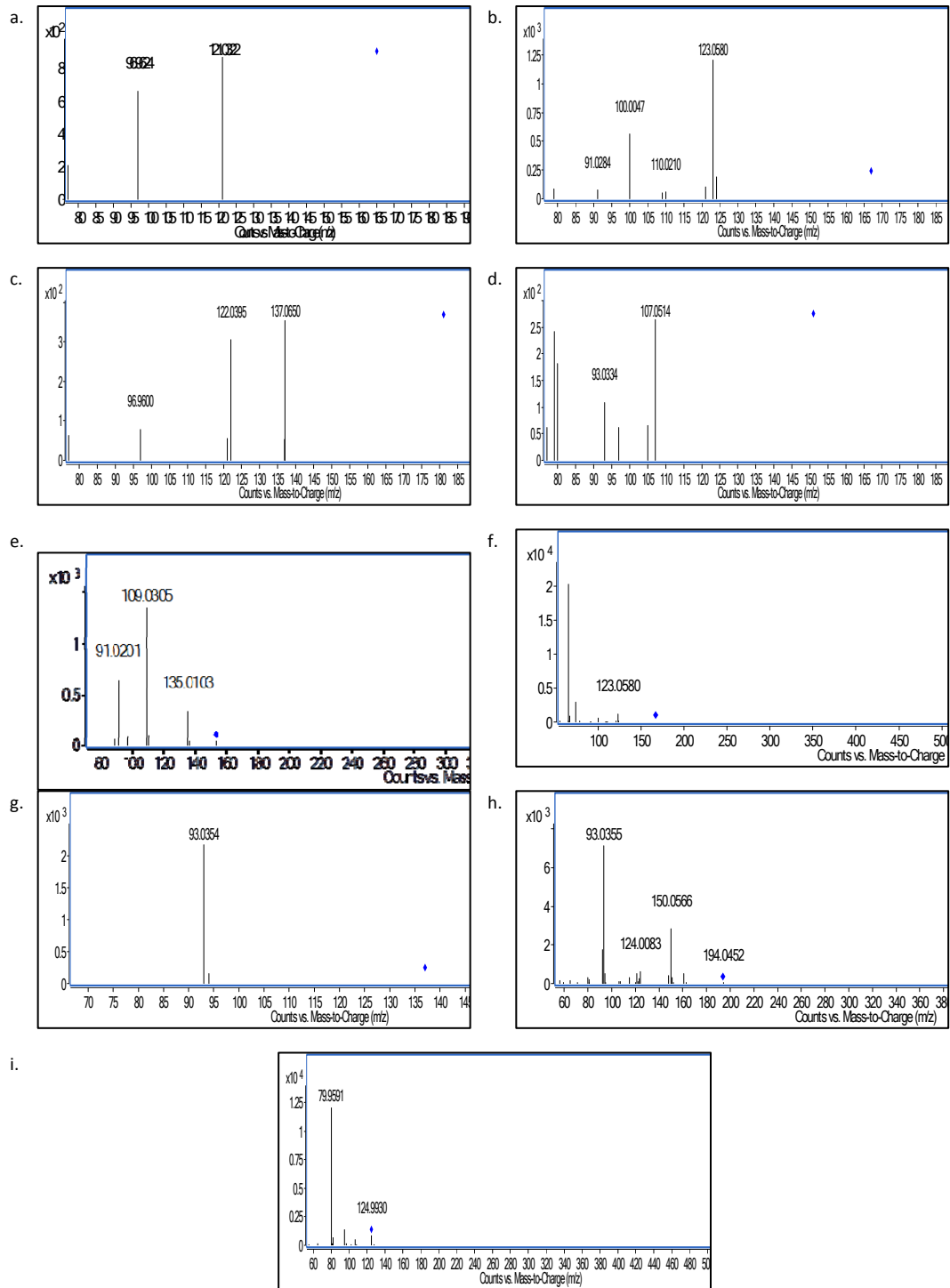


Figura 4.48. Espectros de masas MS^2 correspondiente a los metabolitos identificados en orina y/o plasma de voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate. a. ácido 3-hidroxifenilpropiónico, b. ácido 3,4-dihidroxifenilacético, c. ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético, d. ácido 3-hidroxifenilacético, e. ácido 3,4-dihidroxibenzoico, f. ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico, g. ácido 3-hidroxibenzoico, h. ácido hidroxihipúrico, i. floroglucinol. *El espectro (b) es extensivo a los dos isómeros que se han detectado para esta molécula.

Tabla 4.33. Caracterización de los metabolitos de la fase II y microbianos por detección de espectrometría de masas en modo negativo hallados en los fluidos biológicos de los voluntarios que consumieron café mezcla tostado/verde y yerba mate.

TR (min)	Ion Cuasi-molecular [M-H]	Fórmula Molecular Tentativa	Score (%)	Error (ppm)	Fragmento Observado MS ² (m/z)	Identificación Tentativa	Fluidos Café	Fluidos Mate
Derivados de lactonas								
11,8	415,0330	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁ S	90,7	-1,33	335	Cafeoilquinolactona-sulfato	O	
12,3	415,0330	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁ S	97,3	-0,79	335	Cafeoilquinolactona-sulfato	O	O
13,5	415,0330	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁ S	94,9	-1,59	335	Cafeoilquinolactona-sulfato	O	
12,0	525,1261	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₄	95,7	-1,35	349	Feruloilquinolactona-glucurónido	P	
Derivados de flavonoles								
16,6	491,0831	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	47,6	-0,16	315	Metil-quercetín-glucurónido	--	P, O
12,6	461,0726	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	77,1	-0,42	285	Kaempferol-glucurónido	--	P, O
Ácidos fenólicos								
11,1	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃	81,2	6,5	121	Ác. 3-hidroxifenilpropiónico	P, O	P, O
5,6	167,0350	C ₈ H ₈ O ₄	72,3	9,75	123	Ác. 3,4-dihidroxifenilacético	P, O	P, O
7,5	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄	97,0	2,07	137,122	Ác.3-metoxi-4-hidroxifenilacético	P, O	P, O
8,8	181,0506	C ₉ H ₁₀ O ₄	84,5	2,17	137,122	Ác.4-metoxi-3-hidroxifenilacético	P, O	P, O
7,4	151,0401	C ₈ H ₈ O ₃	86,6	-0,65	107	Ác.3-hidroxifenilacético	P, O	P, O
3,8	153,0193	C ₇ H ₆ O ₄	81,0	0,17	109	Ác.3,4-dihidroxibenzoico (protocatéquico)	P, O	P, O
4,5	167,0350	C ₈ H ₈ O ₄	87,1	-1,12	123	Ác.3-metoxi-4-hidroxibenzoico (vanílico)	P, O	P, O
6,1	137,0244	C ₇ H ₆ O ₃	87,4	-0,02	93	Ác.hidroxibenzoico	P, O	P, O
11,0	194,0459	C ₉ H ₉ O ₄ N	81,6	-0,08	150	Ác.3-hidroxihipúrico	P, O	P, O
14,2	194,0459	C ₉ H ₉ O ₄ N	79,0	0,43	150	Ác.4-hidroxihipúrico	P, O	P, O
6,5	125,0244	C ₆ H ₆ O ₃	86,4	-3,08	79	Floroglucinol	P, O	P, O

O: orina; P: plasma.

4.3.2.3. Cuantificación de Metabolitos del Café en Plasma

En el análisis de los plasma generados en el estudio de intervención con el café mezcla tostado/verde se detectaron un total de veinticinco metabolitos.

Entre ellos, se ha detectado una pequeña cantidad de ácidos monoacilquínicos sin metabolizar, el 5-cafeoilquínico y dos ácidos feruloilquínicos, que representaron una minoría frente al resto de compuestos distintos de los presentes originalmente en el café mezcla tostado/verde, clasificados en metabolitos de fase I, fase II y microbianos en función del tipo de sistema enzimático implicado en su formación. Así, los compuestos plasmáticos identificados tras el consumo de café pertenecientes al grupo de **metabolitos de fase I** son los ácidos ferúlico/*isoferúlico* y dimetoxicinámico, generados por acción de la enzima esterasa del intestino delgado que hidrolizaría los derivados monoacilquínicos correspondientes, al no contener la bebida que tomaron los voluntarios estos compuestos. Aunque la cantidad de ácido dimetoxicinamoilquínico observada en el café estaba por debajo del límite de cuantificación del HPLC-DAD, cabe

destacar su rápida hidrólisis y absorción, detectándose en concentraciones apreciables (8 nM) en plasma.

Clasificados como **metabolitos de fase II** se han identificado derivados glucuronidados y sulfatados de los ácidos ferúlico/*isoferúlico* y cumárico (ferúlico-4-glucurónido, ferúlico-4-sulfato, *p*-cumárico-4-glucurónido y *p*-cumárico-4-sulfato). También se ha detectado, aunque en niveles trazas, feruloilquínolactona-glucurónido. Dentro de este grupo de metabolitos se han incluido unos compuestos formados por acción de enzimas de fase II, aunque con origen microbiano, el ácido dihidrocafeico-4-sulfato, y derivados glucuronidados y sulfatados de los ácidos dihidroferúlico y dihidro*isoferúlico*.

Además, se ha identificado otro conjunto de **compuestos de origen netamente microbiano**, entre los que se encuentran los derivados dihidrogenados de los ácidos cafeico y ferúlico (dihidrocafeico, dihidroferúlico y dihidro*isoferúlico*). Adicionalmente, se ha identificado feruloilglicina, metabolito de origen microbiano formado por acción de la coenzima A (Stalmach y cols., 2009). Por último, en base al trabajo de Tomás-Barberán y cols. (2014), quienes describieron la formación del ácido dihidrocafeoilquínico en un estudio *in vitro* de fermentación colónica del ácido clorogénico, se han detectado los homólogos dihidroferuloilquínico y dihidrocumaroilquínico.

La cuantificación de estos metabolitos se llevó a cabo mediante el empleo de distintas rectas de calibrado según el grupo de compuestos. En particular, se empleó el ácido clorogénico para la cuantificación de los ácidos cafeoilquínicos, y las rectas de los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico para valorar el contenido de los ácidos respectivos y sus derivados de fase II y microbianos (Ver en Material y Métodos, sección 3.2.3.5.). Los ácidos feruloilquínicos se han cuantificado en base a la recta del ácido ferúlico. Los resultados se han expresado en concentración μM .

En la Figura 4.49. se representa la evolución de la concentración media de cada uno de los metabolitos identificados en plasma a lo largo del tiempo (0-12 h) en los 12 voluntarios que consumieron el café mezcla tostado/verde.

Los derivados monoacilquínicos mostraron el máximo de concentración entre 0,9 y 1,5 h post-ingesta (Figura 4.49.a.), semejante a lo que sucede con sus productos de hidrólisis (ácidos *isoferúlico* y dimetoxicinámico; Figura 4.49.b.) y los derivados glucuronidados y sulfatados de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico (Figura 4.49.c.). Estos metabolitos, con tiempos tan tempranos de aparición en plasma, desaparecieron

completamente al cabo de las 4-5 h, excepto el ácido dimetoxicinámico y los derivados de fase II del ácido ferúlico, que mostraron cinéticas bifásicas, esto es, presencia de un segundo máximo aunque menos intenso al cabo de las 4-6 h y subsiguiente desaparición a las 10-12 h post-ingesta. Destacar la presencia de feruloilquínico-lactona-glucurónido, cuyo perfil no se pudo representar por encontrarse en niveles de trazas, aunque se detectó de forma más intensa en el intervalo comprendido entre 1 y 1,5 h.

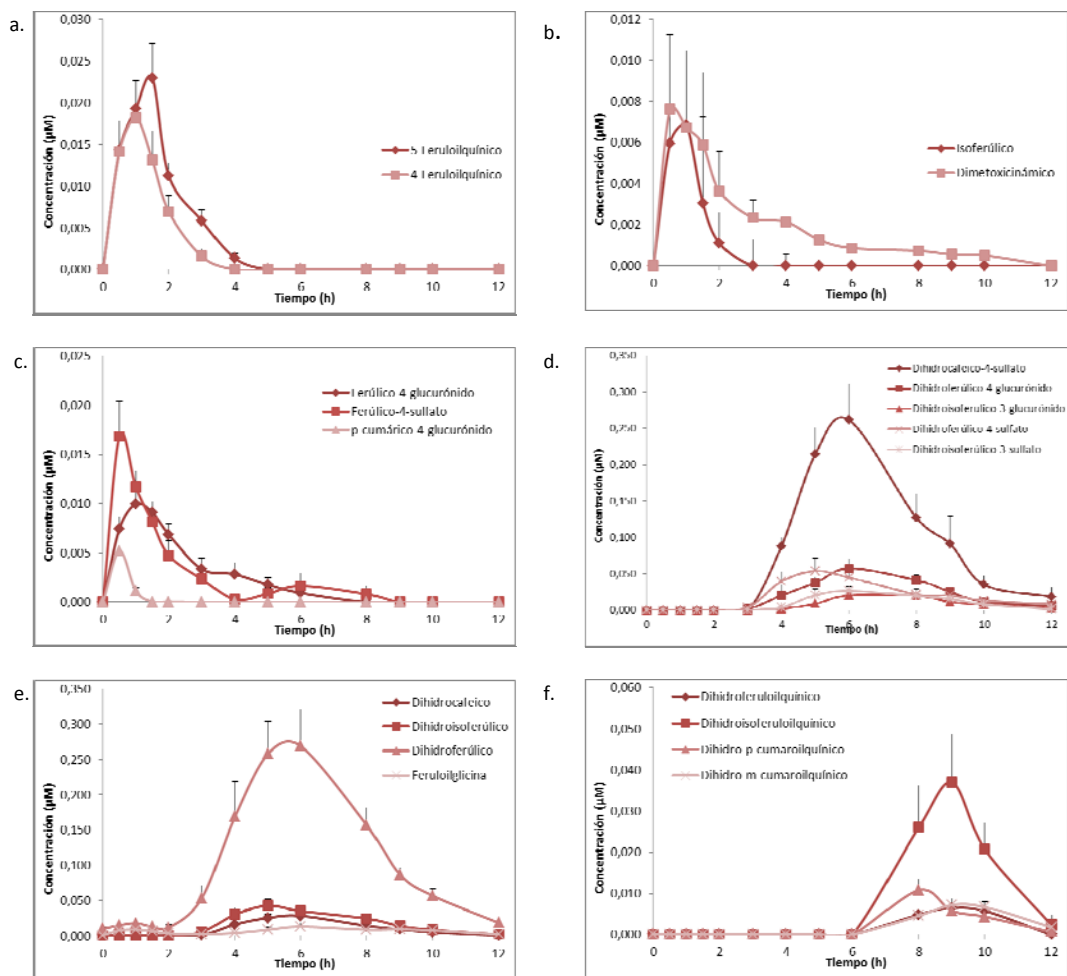


Figura 4.49. Concentración plasmática expresada en μM de los metabolitos derivados de los hidroxicinámicos identificados tras el consumo del café mezcla tostado/verde. Los datos están expresados como el valor medio \pm error típico ($n=12$).

Otro grupo de metabolitos identificados con concentraciones destacadas son los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico/dihidroisoferúlico (Figura 4.49.e.), así como sus derivados de fase II (ácidos dihidrocafeico-4-sulfato, dihidroferúlico-4-glucurónido, dihidroisoferúlico-3-glucurónido, dihidroferúlico-4-sulfato y dihidroisoferúlico-3-sulfato)

(Figura 4.49.d.). Estos compuestos mostraron una cinética un poco más tardía, donde los máximos de concentración se alcanzaron a tiempos post-ingesta más altos (5,6-6,8 h), lo que dificulta la recuperación de valores basales al cabo de las 12 h como se observa en las gráficas. Además, cabe destacar que algunos metabolitos como el dihidrocafeico-4-sulfato o el dihidro*iso*ferúlico y dihidroferúlico-4-sulfato mostraron un ligero repunte entre las 8 y 9 h, sugerente de una cinética bifásica. Adicionalmente, se ha detectado en plasma el ácido dihidrocínámico; aunque su perfil plasmático no se ha podido determinar por encontrarse a nivel de trazas, aparecía fundamentalmente en el intervalo de tiempo 5-6 h post-ingesta. La feruloilglicina presentó un perfil semejante a los compuestos relacionados con los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico, es decir, máximo a las 7 h y retorno a los valores basales al cabo de 12 h (Figura 4.49.e.).

Respecto a los derivados monoacilquínicos reducidos, dihidroferuloilquínico y dihidrocumaroilquínico, presentan una cinética aún más tardía que aquellos que derivan de los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico, es decir, con máximo de concentración comprendido entre 8,4 y 9,4 h post-ingesta y parcial aclaramiento al cabo de las 12 h (Figura 4.49.f.).

En la Tabla 4.34. se representan los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos identificados en plasma a lo largo de las 12 h tras el consumo del café.

Del análisis de los valores de C_{max} y AUC se observa que los metabolitos mayoritarios son aquellos relacionados con los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico/dihidro*iso*ferúlico y sus derivados de fase II, principalmente los ácidos dihidroferúlico (312 nM) y dihidrocafeico-4-sulfato (262 nM). Especial relevancia presenta el ácido 5-dihidroferuloilquínico, hasta ahora no considerado en estudios previos realizados por otros autores y que, sin embargo, alcanza concentraciones de hasta 42 nM. Contribuyendo a la fracción biodisponible de los fenoles del café se encuentran el ácido 3-dihidroferuloilquínico y dos isómeros del ácido dihidrocumaroilquínico, con concentraciones comprendidas entre 9 y 11 nM. También se han detectado cantidades importantes de feruloilglicina (22 nM), de los compuestos monoacíclicos 5- y 4-feruloilquínico (21-24 nM), del ácido *iso*ferúlico y de derivados de fase II del ácido ferúlico, con concentraciones comprendidas entre 8 y 11 nM. Por último, el ácido *p*-cumárico-4-glucurónido mostró un C_{max} de 5 nM, en línea con el bajo contenido detectado en el café mezcla tostado/verde.

Finalmente, se detectaron y cuantificaron todos los metabolitos relacionados con las familias de los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e

hidroxibenzoico, no observándose diferencias significativas en su concentración plasmática a lo largo de las 12 h post-ingesta (datos no mostrados), probablemente por su implicación en otras rutas de biotransformación de otros compuestos.

Tabla 4.34. Parámetros farmacocinéticos de los compuestos sin metabolizar y metabolitos de fase I, fase II y microbianos observados en el plasma tras el consumo del café mezcla tostado/verde. Valor medio \pm desviación estándar (n=12).

Metabolito	C _{max} (μ M)	T _{max} (h) ó (Franja)*	AUC (μ M/h)
Sin metabolizar			
Ácido 5-cafeoilquínico	Trazas**	(1,0 – 1,5)*	-
Ácido 5-feruloilquínico	0,024 \pm 0,013	1,2 \pm 0,4	0,043 \pm 0,018
Ácido 4-feruloilquínico	0,021 \pm 0,010	0,9 \pm 0,3	0,031 \pm 0,018
Fase I			
Ácido ferúlico	Trazas**	(1,0 – 1,5)*	-
Ácido isoferúlico	0,008 \pm 0,001	0,9 \pm 0,2	0,107 \pm 0,220
Ácido dimetoxicinámico	0,008 \pm 0,002	0,7 \pm 0,3	0,022 \pm 0,017
Fase II			
Ácido ferúlico-4-glucurónido	0,011 \pm 0,004	1,1 \pm 0,5	0,030 \pm 0,015
Ácido ferúlico-4-sulfato	0,018 \pm 0,010	0,7 \pm 0,2	0,029 \pm 0,018
Ácido <i>p</i> -cumárico-4-glucurónido	0,005 \pm 0,002	0,5 \pm 0,1	0,003 \pm 0,001
Ácido <i>p</i> -cumárico-4-sulfato	Trazas**	(1,0 – 1,5)*	-
Feruloilquínolactona-glucurónido	Trazas**	(1,0 – 1,5)*	-
Ácido dihidrocafeico-4-sulfato	0,262 \pm 0,098	6,0 \pm 0,1	1,047 \pm 0,423
Ácido dihidroferúlico-4-glucurónido	0,062 \pm 0,039	6,2 \pm 1,2	0,248 \pm 0,185
Ácido dihidroisoferúlico-3-glucurónido	0,024 \pm 0,013	6,8 \pm 1,3	0,100 \pm 0,078
Ácido dihidroferúlico-4-sulfato	0,089 \pm 0,049	5,6 \pm 0,7	0,384 \pm 0,207
Ácido dihidroisoferúlico-3-sulfato	0,027 \pm 0,015	5,8 \pm 0,5	0,123 \pm 0,178
Microbianos			
Ácido dihidrocafeico	0,027 \pm 0,014	5,6 \pm 1,4	0,119 \pm 0,079
Ácido dihidroferúlico	0,312 \pm 0,140	5,8 \pm 1,2	1,340 \pm 0,571
Ácido dihidroisoferúlico	0,050 \pm 0,026	5,4 \pm 1,3	0,196 \pm 0,107
Ácido dihidrometoxicinámico	Trazas**	(6,0-8,0)*	0,013 \pm 0,004
Feruloilglicina	0,022 \pm 0,012	7,0 \pm 1,8	0,086 \pm 0,064
Ácido 3-dihidroferuloilquínico	0,009 \pm 0,004	9,2 \pm 0,8	0,019 \pm 0,010
Ácido 5-dihidroferuloilquínico	0,042 \pm 0,025	9,3 \pm 0,5	0,109 \pm 0,076
Ácido dihidro- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,011 \pm 0,008	8,4 \pm 0,7	0,029 \pm 0,023
Ácido dihidro- <i>m</i> -cumaroilquínico	0,009 \pm 0,005	9,4 \pm 0,7	0,026 \pm 0,013

* Se indica el intervalo de tiempo dónde el metabolito mostró los valores de concentración más altos. No se indica la media al tratarse de un compuesto que se detecta a niveles de trazas. **No se ha podido determinar los parámetros farmacocinéticos al detectar únicamente trazas.

Los tiempos a los cuales se alcanzan las concentraciones máximas (T_{max}) están de acuerdo a lo visualizado en las representaciones de la evolución de las concentraciones plasmáticas de los metabolitos (Figura 4.49.), con valores de T_{max} comprendidos entre 0,5 y 1,5 h para los compuestos absorbidos directamente y/o sujetos a metabolismo de fase I y II, y tiempos mayores (5,6-9,4 h) para los metabolitos de origen microbiano y sus derivados conjugados de fase II.

4.3.2.4. Cuantificación de Metabolitos de la Yerba Mate en Plasma

En el análisis de los plasma generados en el estudio de intervención con yerba mate se detectaron un total de diecinueve metabolitos.

Entre los derivados monoacilquínicos sólo se detectaron trazas del ácido cumaroilquínico. El resto de metabolitos identificados fueron derivados de la acción de enzimas de fase II y de la flora microbiana, de manera semejante a lo que sucedía con el café. Así, se detectó ácido cafeico-4-sulfato, ausente en las muestras de plasma de la intervención con café, y los ácidos ferúlico-4-glucurónido y ferúlico-4-sulfato (Figura 4.50.a.).

Dentro del conjunto de metabolitos de origen microbiano se han identificado los ácidos dihidrocafeico, dihidroferúlico y dihidroisoferúlico, junto con sus metabolitos glucuronidados y sulfatados, así como el compuesto feruloilglicina. Al igual que sucedía en la intervención con café, también se han identificado dos isómeros de los ácidos dihidroferuloilquínico y dihidrocumaroilquínico.

Por último, se han detectado dos metabolitos de fase II derivados de los flavonoles presentes en el mate, el kaempferol-glucurónido y metilquercetín-glucurónido.

La cuantificación de estos metabolitos se llevó a cabo mediante el empleo de rectas de calibrado de los ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y de rutina para valorar el contenido de compuestos relacionados con cada uno de estos compuestos (Ver en Material y Métodos, sección 3.2.3.5.). Los resultados se han expresado en concentración μM .

En la Figura 4.50. se representa la evolución de la concentración media de cada uno de los metabolitos identificados en plasma a lo largo del tiempo (0-12 h) en los 12 voluntarios que consumieron la yerba mate.

El ácido cumaroilquínico, único monoacilquínico detectado en plasma, no se pudo representar por cuantificarse en niveles trazas, aunque sí se pudo conocer el intervalo dónde resultó ser más abundante (1-1,5 h), de acuerdo a lo descrito para compuestos de esta naturaleza en la intervención de café. Los derivados de fase II de los ácidos cafeico y ferúlico (cafeico-4-sulfato, ferúlico-4-glucurónido y ferúlico-4-sulfato) también alcanzaron la concentración máxima a tiempos muy cortos post-ingesta (0,6-2,1 h) (Figura 4.50.a.). De la misma manera a lo observado con el café, los conjugados del

ácido ferúlico presentaron un perfil biséfico, con un segundo máximo entre 4 y 5 h, y aclarado a las 8-10 h.

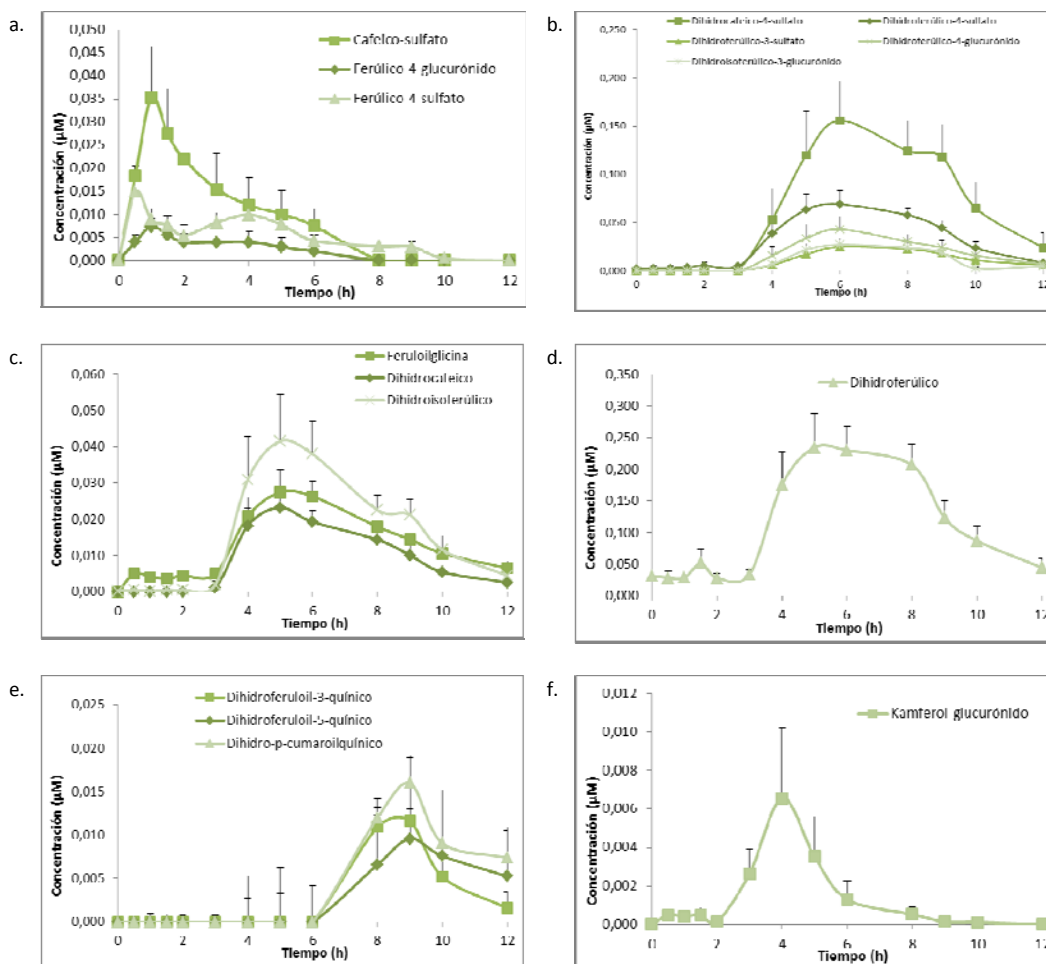


Figura 4.50. Concentración plasmática expresada en μM de los metabolitos derivados de los hidroxicinámicos identificados tras el consumo de yerba mate. Los datos están expresados como el valor medio \pm error típico ($n=12$).

Otro grupo de metabolitos identificados de gran relevancia son los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico/dihidroisoferúlico (Figuras 4.50.c. y d.) así como sus derivados de fase II (ácidos dihidrocafeico-4-sulfato, dihidroferúlico-4-glucurónido, dihidroisoferúlico-3-glucurónido, dihidroferúlico-4-sulfato y dihidroisoferúlico-3-sulfato) (Figura 4.3.17.b.). Este grupo alcanza la concentración máxima a tiempos post-ingesta más altos (5,7 y 7,5 h), no recuperando valores basales al cabo de las 12 h como se observa en las gráficas (Figuras 4.50.b., c. y d.). Cabe destacar que los niveles plasmáticos se mantuvieron elevados durante bastante tiempo, en algunos casos observándose un repunte en torno a las 9 h como ocurrió con dihidrocafeico-4-sulfato o

dihidroisoferúlico, al igual que lo observado con el café. Por otra parte, la feruloilglicina mostró un perfil semejante a los compuestos relacionados con los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico, es decir, máximo a las 6,3 h y recuperación parcial de los valores basales al cabo de 12 h (Figura 4.50.c.).

Respecto a los dihidroderivados monoacilquínicos, dihidroferuloilquínico y dihidrocumaroilquínico presentan un perfil cinético aún más tardío que aquellos que derivan de los ácidos desesterificados, con un máximo de concentración comprendido entre 8,9 y 9,1 h post-ingesta y parcial aclaramiento al cabo de las 12 h (Figura 4.50.e.).

Por último, se ha representado la evolución del único compuesto plasmático relacionado con el metabolismo de flavonoles con niveles superiores al límite de cuantificación, el kaempferol-glucurónido (Figura 4.50.f.). Este compuesto mostró su máxima concentración a tiempos post-ingesta de 4 h y completa eliminación a las 10 h. Con un comportamiento semejante se detectó el metil-quercetín-glucurónido, aunque su contenido a nivel de trazas no permitió representar la evolución en el tiempo; sin embargo, sí se pudo conocer que las máximas concentraciones se registraron también a las 4 horas post-ingesta. Es notable el diferente perfil cinético de los flavonoles respecto a los derivados hidroxicinámicos, con un aclarado más rápido y menor permanencia en circulación.

En la Tabla 4.35. se representan los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos identificados en el plasma de los voluntarios a lo largo de las 12 h tras el consumo de la yerba mate.

Del análisis de los valores de C_{max} y AUC se observa que los metabolitos más abundantes son los ácidos dihidroferúlico (306 nM) y dihidrocafeico-4-sulfato (188 nM), seguidos de los ácidos dihidroferúlico y dihidroisoferúlico y sus derivados de fase II (11-56 nM) y el ácido dihidrocafeico (27 nM), detectándose también cantidades importantes de feruloilglicina (33 nM). Contribuyendo a la fracción biodisponible de los fenoles de la yerba mate y no descrito por otros autores hasta la fecha se encuentra el ácido 5-dihidroferuloilquínico, con una concentración máxima de 42 nM, además de los ácidos 3-dihidroferuloilquínico y *p*-cumaroilquínico con niveles de 19 y 22 nM, respectivamente. Especial relevancia presentan el ácido cafeico-sulfato (37 nM) además del kaempferol-glucurónido (12 nM), no identificados en el plasma en el ensayo con el café mezcla tostado/verde.

Por último, la cuantificación de los metabolitos relacionados con las familias de los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e hidroxibenzoico (apartado ácidos

fenólicos de la Tabla 4.33.) mostró, igual que tras la ingesta del café, la ausencia de diferencias significativas en su contenido a lo largo de las 12 h post-ingesta (datos no mostrados).

Tabla 4.35. Parámetros farmacocinéticos de los metabolitos sin metabolizar, de fase II y microbianos observados en el plasma tras el consumo de yerba mate. Valor medio \pm desviación estándar (n=12).

Metabolito	Cmax (μ M)	Tmax (h) ó (Franja)*	AUC (μ M/h)
Sin metabolizar			
Ácido cumaroilquinico	Trazas**	(1,0-1,5)*	-
Fase II			
Ácido cafeico-4'-sulfato	0,037 \pm 0,036	0,8 \pm 0,3	0,106 \pm 0,141
Ácido ferúlico-4'-glucurónido	0,011 \pm 0,004	2,1 \pm 1,5	0,044 \pm 0,009
Ácido ferúlico-4'-sulfato	0,019 \pm 0,009	0,6 \pm 0,2	0,061 \pm 0,023
Ácido dihidrocafeico-4'-sulfato	0,188 \pm 0,127	7,1 \pm 1,8	0,834 \pm 0,516
Ácido dihidroferúlico-4'-glucurónido	0,056 \pm 0,046	7,5 \pm 1,6	0,216 \pm 0,190
Ácido dihidroisoferúlico-3'-glucurónido	0,033 \pm 0,018	7,4 \pm 2,2	0,132 \pm 0,078
Ácido dihidroferúlico-4'-sulfato	0,084 \pm 0,047	6,7 \pm 1,6	0,387 \pm 0,196
Ácido dihidroisoferúlico-3'-sulfato	0,031 \pm 0,017	7,5 \pm 1,4	0,134 \pm 0,073
Kaemferol-glucurónido	0,012 \pm 0,008	4,0 \pm 1,5	0,028 \pm 0,017
Metil-queracetín-glucurónido	Trazas**	(4,0 – 5,0)*	-
Microbianos			
Ácido dihidrocafeico	0,027 \pm 0,014	5,7 \pm 1,6	0,113 \pm 0,058
Ácido dihidroferúlico	0,306 \pm 0,158	6,7 \pm 1,4	1,548 \pm 0,727
Ácido dihidroisoferúlico	0,052 \pm 0,039	6,6 \pm 1,8	0,198 \pm 0,149
Feruloilglicina	0,033 \pm 0,017	6,3 \pm 1,9	0,166 \pm 0,061
Ácido 3-dihidroferuloilquinico	0,019 \pm 0,009	9,1 \pm 1,3	0,037 \pm 0,032
Ácido 5-dihidroferuloilquinico	0,047 \pm 0,029	8,9 \pm 1,2	0,117 \pm 0,091
Ácido dihidro- <i>p</i> -cumaroilquinico	0,022 \pm 0,009	8,9 \pm 2,2	0,091 \pm 0,068
Ácido dihidro- <i>m</i> -cumaroilquinico	Trazas**	(8,0 – 9,0)*	-

* Se indica el intervalo de tiempo dónde el metabolito mostró los valores de concentración más altos. No se indica la media al tratarse de un compuesto que se detecta a niveles de trazas. **No se ha podido determinar los parámetros farmacocinéticos al detectar únicamente trazas.

Los tiempos a los cuales se alcanzan las concentraciones máximas están de acuerdo a lo visualizado en las representaciones de la evolución de las concentraciones plasmáticas de los metabolitos (Figura 4.50.).

4.3.2.5. Cuantificación de Metabolitos del Café en Orina

El perfil metabólico de los ácidos hidroxicinámicos en orina guarda estrecha relación con el observado en plasma, aunque se detectaron más metabolitos, lo que ayuda a conocer con mayor detalle las rutas de biotransformación que sufre la fracción fenólica del café mezcla tostado/verde.

Respecto a la fracción sin metabolizar, además de ácido 5-cafeoilquínico se cuantificaron cantidades apreciables de 3- y 4-cafeoilquínico, no detectados en plasma. Igual sucede con la serie del feruloilquínico, al cuantificar los tres isómeros (3-, 4- y 5-feruloilquínico) en cantidades relevantes, mientras que en el plasma sólo se detectaron los dos últimos isómeros (4- y 5-feruloilquínico). Además, se identificó otro monoacilquínico no detectado en plasma, el ácido *p*-cumaroilquínico, que se absorbería sin metabolizar. Estos compuestos representan un 3,3% del total de los metabolitos identificados en orina. En el conjunto de los derivados monoacilquínicos, los más abundantes son los ácidos feruloilquínicos (86%) seguidos de los ácidos cafeoilquínicos (7,6%) y el ácido *p*-cumaroilquínico (6,4%). Cabe destacar que la composición inicial del café mezcla tostado/verde fue de un 67,5% de cafeoilquínicos frente al 10% de la serie feruloilquínico, contrario al porcentaje determinado en orina. Esto sugiere que, aunque parte de los ácidos feruloilquínicos se absorbería sin metabolizar, la mayor parte se generaría a partir de los ácidos cafeoilquínicos por acción de la enzima COMT presente en el intestino delgado, donde previsiblemente ocurre la absorción, de acuerdo a los tiempos relativamente cortos a los que se alcanza la concentración plasmática máxima (0,9-1,5 h) e intervalos urinarios (0-2 y 2-4 h) donde se excreta el mayor porcentaje de estos derivados metilados (Tabla 4.36.).

A continuación se evaluó la presencia de los ácidos fenólicos simples (ácidos cafeico, ferúlico, *isoferúlico*, *p*-cumárico y dimetoxicinámico) que se generarían de la hidrólisis de los derivados monoacilquínicos, además de sus conjugados de fase II. En orina se detectó el ácido cafeico y su derivado sulfatado en muy pequeña proporción, lo que justificaría su ausencia en plasma. Los compuestos relacionados con el ácido ferúlico de nuevo mostraron mayor contenido que los relacionados con el ácido cafeico. No se detectaron los ácidos ferúlico e *isoferúlico* en orina, al contrario de lo que ocurría en plasma, sino transformados en derivados glucuronidados y sulfatados, siendo significativamente más abundantes los ácidos ferúlico-4-glucurónido y ferúlico-4-sulfato que los correspondientes isómeros del ácido *isoferúlico*; esto estaría de acuerdo a lo

observado en el plasma, dónde sólo se detectaron los derivados del ácido ferúlico. En relación con el ácido *p*-cumárico, se detectaron dos isómeros glucuronidados en orina, no observándose la presencia de ningún derivado sulfatado, al contrario de lo observado en plasma, donde se identificó en ácido *p*-cumárico-4-sulfato en cantidades traza. Lo mismo ocurrió para el ácido dimetoxicinámico, no detectándose en orina a pesar de haber sido observado en plasma en concentraciones nM, aunque se pudieron detectar trazas de ácido dihidrodimetoxicinámico. Este compuesto procedería de la actividad de enzimas reductasas de origen microbiano sobre el ácido dimetoxicinamoilquinico no absorbido en el intestino delgado, lo que no justifica la no identificación del ácido dimetoxicinámico observado en plasma.

Siguiendo con la identificación de metabolitos producidos por la acción de reductasas bacterianas, se cuantificaron importantes cantidades de los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico (2,4 y 9,4 μmol a lo largo de las 24 h). Al igual que lo observado en plasma, fue mayor el contenido de ácido dihidroferúlico. Nuevamente, no se pudo detectar en orina un metabolito detectado en plasma, el ácido dihidroisoferúlico. En cambio, sí se determinó una pequeña cantidad de ácido dihidrocumárico. Este conjunto de compuestos presentan el denominador común de excretarse mayoritariamente en el tercer intervalo de orina (4-8 h), seguido del cuarto intervalo (8-12 h), de acuerdo a su formación y absorción colónica. Por otra parte, se identificó una pequeña cantidad de un derivado glucuronidado del ácido dihidrocafeico, ausente en el plasma, así como dos derivados sulfatados; de éstos, el metabolito que eluyó más tarde y que tentativamente se ha asignado al compuesto dihidrocafeico-3-sulfato, alcanzó una excreción total de 31,4 μmoles al cabo de las 24 horas. Cabe notar que en plasma fue mayoritario el derivado sulfatado en posición 4, dihidrocafeico-4-sulfato, con un valor de C_{max} de 0,262 μM , mientras que el conjugado en posición C3 no se detectó en este fluido.

En línea con estos resultados, se han detectado dos derivados glucuronidados y dos sulfatados del ácido dihidroferúlico, especialmente abundantes. En particular, se han excretado cantidades de 7,7 y 13,5 μmoles de los ácidos dihidroferúlico-4-glucurónido y dihidroferúlico-4-sulfato, respectivamente, aunque los correspondientes derivados del ácido dihidroisoferúlico también presentaron cantidades relevantes (3,9 y 2,8 μmoles para los ácidos dihidroferúlico-3-glucurónido y dihidroferúlico-3-sulfato, respectivamente). En general, se observó una correlación directa entre las cantidades

excretadas y las concentraciones máximas determinadas para estos metabolitos en plasma.

Respecto a los derivados reducidos del ácido *p*-cumárico, se detectaron dos isómeros (*p*- y *m*-dihidrocumárico) en cantidades cercanas a 1 μmol (Tabla 4.36.). Asimismo, se observaron pequeñas cantidades de un conjugado glucuronidado del ácido dihidro-*p*-cumárico. Sin embargo, se hallaron niveles importantes del derivado sulfatado (8,4 μmoles al cabo de las 24 horas). Ninguno de estos metabolitos había sido detectado en plasma. Al igual que sucedía con otros metabolitos de origen microbiano, este conjunto de compuestos se excretaron fundamentalmente y de forma equitativa entre el tercer y cuarto intervalo de recogida de orina (4-8 h y 8-12 h).

Dado el gran rendimiento de los metabolitos derivados de los enzimas reductasas de la microbiota y tomando como referencia el reciente trabajo publicado por Tomás-Barberán y cols. (2014), dónde se caracterizó la formación *in vitro* del ácido dihidroclorogénico tras su fermentación colónica, se ahondó en la búsqueda de estos compuestos y los correspondientes para los ácidos cafeoilquínico, feruloilquínico, cumaroilquínico y dimetoxicinamoilquínico. En ese sentido, se identificaron tres isómeros del ácido cafeoilquínico (3-, 5- y 4-dihidrocafeoilquínico, atendiendo al orden de elución) con abundancias relativas de 0,6, 0,2 y 0,3 μmoles a lo largo de las 24 horas post-ingesta. También se detectaron los dihidroderivados del ácido feruloilquínico, 3-, 5- y 4-dihidroferuloilquínico, en cantidades mayores que para la serie del ácido cafeico, 0,9, 5,9 y 0,2 μmoles , respectivamente, a lo largo de las 24 horas. Asimismo, se detectaron dos isómeros del ácido dihidrocumaroilquínico (dihidro-*p*-cumaroilquínico y dihidro-*m*-cumaroilquínico), excretando 1,0 y 0,7 μmoles , respectivamente, al cabo de las 24 horas. No se detectó ninguno de estos compuestos en el plasma y, de acuerdo a su origen microbiano, se excretaron extensivamente en el cuarto intervalo (8-12 h). Siguiendo con el razonamiento aplicado para el resto de compuestos, se evaluó la presencia de derivados de fase II para este grupo de metabolitos. Se detectaron cantidades mínimas del ácido dihidrocafeoilquínico-glucurónido (0,1 μmoles a lo largo de las 24 h), excretado fundamentalmente en el cuarto intervalo (8-12 h). Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se caracteriza este grupo de metabolitos en un estudio de intervención con café en humanos.

Aunque el café mezcla tostado/verde contiene un 35% de semillas de café verde, la parte correspondiente al café tostado proporciona una pequeña cantidad de derivados lactonas (4 mg/g de ácidos cafeoilquínico-lactona), generados durante el

proceso de tostado por deshidratación de los ácidos hidroxicinámicos. Así, se cuantificó una cantidad equivalente a 0,3, 0,6 y 0,3 μ moles para los tres isómeros de fase II, ácido cafeoilquínicolactona-sulfato, que se excretaron completamente en los dos primeros intervalos (0-2 h y 2-4 h), lo que apoya su absorción a nivel intestinal (Tabla 4.36.). Cabe destacar que estos isómeros de cafeoilquínicolactona-sulfato, excretados en cantidades apreciables (1,32 μ moles en 24 h), no fueron detectados en plasma, donde sí se identificaron trazas de feruloilquínicolactona-glucurónido (Tabla 4.34.), siendo un ejemplo más de discrepancias entre el perfil metabólico en plasma y orina.

En este trabajo, además de feruloilglicina se ha caracterizado otro isómero, tentativamente identificado como *isoferuloilglicina*. Cuantitativamente, la feruloilglicina resultó ser el segundo metabolito urinario más abundante (14,1 μ moles), tras el ácido dihidrocafeico-sulfato (31,4 μ moles) y seguido del ácido dihidroferúlico-sulfato (13,5 μ moles). De acuerdo con la mayor abundancia de la serie del ácido ferúlico respecto al *isoferúlico*, sólo se hallaron 0,2 μ moles de *isoferuloilglicina*. Estos compuestos se excretaron mayoritariamente entre el tercer y cuarto intervalo (4-8 h y 8-12 h), de acuerdo también al tiempo al cual se detectó en plasma la máxima concentración para feruloilglicina (7,0 h), lo que se justificaría al tratarse de un metabolito de origen microbiano y absorción por el epitelio colónico.

Por otra parte, se ahondó en la caracterización de otro conjunto de compuestos de origen microbiano por excelencia, los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético, hidroxibenzoico, hidroxihipúrico y el floroglucinol, que derivarían de la subsiguiente biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos simples (agrupados como "Microbianos 2" en la Tabla 4.36.). Del grupo de los ácidos hidroxifenilpropiónicos, ya se han descrito y cuantificado los ácidos dihidrocafeico (3,4-dihidroxifenilpropiónico) y dihidroferúlico (3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico). Atendiendo a la posibilidad de deshidroxilación del ácido cafeico, se evaluó la evolución en el tiempo del ácido 3-hidroxifenilpropiónico, observando un aumento de su contenido de un 73% en el cuarto intervalo (8-12 h), lo que apoyaría la implicación de este compuesto en la ruta de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos.

Respecto a la serie del ácido hidroxifenilacético, se detectaron los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, 3-metoxi-4-hidroxifenilacético, 4-metoxi-3-hidroxifenilacético y 3-hidroxifenilacético. Excepto el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico, todos estos compuestos fueron detectados en las muestras de orina basal (-2-0 h) y mantuvieron niveles constantes a lo largo de las 24 horas de recolección de orina, mostrando un

discreto aumento en el cuarto intervalo (8-12 h). No así el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético, cuyo contenido aumentó significativamente en los intervalos comprendidos entre 4-8 h y 8-12 h, alcanzando cantidades de 1,4 y 0,9 μ moles, respectivamente, coherente con el gran contenido registrado para su precursor el ácido dihidroferúlico (5,5 y 2,5 μ moles en esos mismos intervalos), del cual derivaría tras la acción de la enzima descarboxilasa.

A continuación, se evaluó el grupo de compuestos relacionados con el ácido hidroxibenzoico (ácidos vanílicico, protocatéquico e hidroxibenzoico). Todos partían de valores basales notables previos a la ingesta de café (Tabla 4.36.), niveles que se mantuvieron constantes hasta el intervalo 8-12 h en que aumentaron su eliminación urinaria. En particular el ácido vanílicico (ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico) aumentó notablemente en ese intervalo, al igual que ocurrió con su precursor el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilpropiónico.

Por último, se evaluó la recuperación del ácido hidroxihipúrico, que se forma a partir del ácido hidroxibenzoico por acción de la enzima CoA, identificándose dos isómeros, 3- y 4-hidroxihipúrico únicamente en el cuarto intervalo (8-12 h), lo que evidencia su implicación en la ruta de biodegradación de los ácidos hidroxicinámicos.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con aquellos de la intervención con yerba mate, dado que el ácido 1,3,5-trihidroxibenzoico (floroglucinol) se ha relacionado con la ruta de biotransformación de flavonoles, se valoró la presencia de este compuesto en la orina de los voluntarios tras la ingesta del café. Al igual que con los ácidos fenólicos arriba descritos, se observaron cantidades apreciables de floroglucinol en las orinas basales, descendiendo en las siguientes horas y con un ligero aumento en los últimos intervalos (8-12 h y 12-24 h) que no supuso un incremento real en su eliminación urinaria, toda vez que en estos periodos era mayor el tiempo de recolección de orinas. Por tanto, cabe descartar una posible participación de este compuesto en la ruta de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos.

El análisis de los porcentajes de los distintos grupos de compuestos eliminados en orina permite conocer el sitio preferente de absorción, así como la reacción de biotransformación prioritaria, dando información valiosa sobre su biodisponibilidad.

Los derivados monoacilquínicos sumaron un 4,1% del total de metabolitos excretados en la orina en los dos primeros intervalos (0-2 h y 2-4 h), derivados de la absorción directa (0,4% ácidos cafeoilquínicos y *p*-cumaroilquínico) y/o metilación (2,9% ácidos feruloilquínicos) o sulfatación (0,8% cafeoilquínico lactona-sulfato).

Resultados y Discusión

Tabla 4.36. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo del café mezcla tostado/verde. Los valores se expresan como la media \pm error típico ($n=12$). N.D. No detectado. < L.C. Menor del límite de cuantificación.

Café	Etapa (μmoles)						TOTAL
	Basal	0-2 h	2-4 h	4-8 h	8-12 h	12-24 h	μmoles
Metabolito (TR)							
Sin metabolizar							
Ác. 3-cafeoilquinico(4)	N.D.	0,014 \pm 0,00	0,023 \pm 0,00	0,007 \pm 0,00	N.D.	N.D.	0,044 \pm 0,01
Ác. 5-cafeoilquinico (5,8)	N.D.	0,056 \pm 0,01	0,140 \pm 0,05	0,013 \pm 0,01	N.D.	N.D.	0,209 \pm 0,07
Ác. 4-cafeoilquinico (10,1)	N.D.	0,042 \pm 0,01	0,032 \pm 0,01	0,017 \pm 0,01	0,021 \pm 0,01	N.D.	0,112 \pm 0,04
Ác. 3-feruloilquinico (7,1)	N.D.	0,235 \pm 0,03	0,267 \pm 0,06	0,126 \pm 0,02	0,092 \pm 0,03	0,147 \pm 0,02	0,867 \pm 0,17
Ác. 5-feruloilquinico (9,6)	N.D.	0,408 \pm 0,07	0,710 \pm 0,14	0,214 \pm 0,04	0,155 \pm 0,02	0,008 \pm 0,01	1,495 \pm 0,28
Ác. 4-feruloilquinico (10,2)	N.D.	0,442 \pm 0,05	0,559 \pm 0,07	0,150 \pm 0,03	N.D.	N.D.	1,151 \pm 0,15
Ác. <i>p</i> -cumaroilquinico (16,4)	N.D.	N.D.	0,041 \pm 0,01	0,057 \pm 0,01	0,094 \pm 0,00	0,068 \pm 0,02	0,260 \pm 0,04
Total sin metabolizar	N.D.	1,197 \pm 0,18	1,772 \pm 0,34	0,584 \pm 0,12	0,362 \pm 0,07	0,223 \pm 0,05	4,138 \pm 0,75
Fase I							
Ácido cafeico (7,9)	N.D.	0,025 \pm 0,01	0,044 \pm 0,02	0,103 \pm 0,04	0,170 \pm 0,01	0,107 \pm 0,01	0,449 \pm 0,09
Fase II							
Ác. cafeico-3'-sulfato (10,7)	N.D.	0,354 \pm 0,11	1,203 \pm 0,22	0,724 \pm 0,11	0,297 \pm 0,05	N.D.	2,578 \pm 0,48
Ác. ferúlico 4-glucurónido (8,4)	N.D.	0,319 \pm 0,06	0,595 \pm 0,13	0,712 \pm 0,11	0,628 \pm 0,04	0,014 \pm 0,01	2,268 \pm 0,35
Ác. <i>iso</i> ferúlico -3-glucuronido (9,3)	N.D.	0,172 \pm 0,03	0,070 \pm 0,02	N.D.	N.D.	N.D.	0,242 \pm 0,05
Ác. ferúlico-4-sulfato (8,7)	N.D.	0,899 \pm 0,28	2,147 \pm 0,45	2,186 \pm 0,25	2,322 \pm 0,34	0,037 \pm 0,04	7,591 \pm 1,36
Ác. <i>iso</i> ferúlico-3-sulfato (15,7)	N.D.	1,644 \pm 0,16	0,046 \pm 0,03	N.D.	N.D.	N.D.	1,690 \pm 0,19
Ác. <i>p</i> -cumárico-4-glucurónido (12,3)	N.D.	0,105 \pm 0,02	0,105 \pm 0,03	0,015 \pm 0,01	N.D.	N.D.	0,225 \pm 0,06
Ác. <i>m</i> -cumárico-3-glucurónido (12,9)	N.D.	0,074 \pm 0,01	0,031 \pm 0,02	N.D.	N.D.	N.D.	0,105 \pm 0,04
Ác. dihidrocafeico-3-glucurónido (6,3)	N.D.	N.D.	0,053 \pm 0,02	0,227 \pm 0,04	0,337 \pm 0,03	0,013 \pm 0,01	0,630 \pm 0,10
Ác. dihidrocafeico-4-sulfato (7,8)	0,364 \pm 0,07	0,140 \pm 0,04	0,058 \pm 0,03	N.D.	N.D.	N.D.	0,562 \pm 0,14
Ác. dihidrocafeico -3-sulfato (10,4)	N.D.	0,149 \pm 0,07	1,375 \pm 0,41	12,500 \pm 3,10	14,782 \pm 3,18	2,652 \pm 1,19	31,456 \pm 7,94
Ác.dihidrocafeoilquinico-glucurónido (11,3)	N.D.	N.D.	N.D.	0,010 \pm 0,01	0,089 \pm 0,01	0,003 \pm 0,00	0,102 \pm 0,01
Ác. dihidroferúlico-4-glucurónido (6,5)	0,015 \pm 0,01	0,024 \pm 0,02	0,477 \pm 0,16	3,466 \pm 0,78	3,537 \pm 0,53	0,223 \pm 0,05	7,742 \pm 1,56
Ác. dihidro <i>iso</i> ferúlico-3-glucuronido (8,4)	N.D.	0,010 \pm 0,01	0,427 \pm 0,17	1,546 \pm 0,50	1,792 \pm 0,25	0,156 \pm 0,03	3,931 \pm 0,96
Ác. dihidroferúlico-4-sulfato (10,4)	N.D.	0,438 \pm 0,27	1,343 \pm 0,52	6,152 \pm 1,00	5,437 \pm 1,05	0,098 \pm 0,07	13,468 \pm 2,91
Ác. dihidro <i>iso</i> ferúlico-3-sulfato (11,4)	N.D.	N.D.	0,111 \pm 0,06	0,966 \pm 0,20	1,509 \pm 0,20	0,204 \pm 0,06	2,790 \pm 0,52
Ác. dihidro- <i>p</i> -cumárico-4-glucuronido (6,8)	N.D.	0,093 \pm 0,01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,093 \pm 0,01
Ác. dihidro- <i>p</i> -cumárico-4-sulfato (10,6)	N.D.	0,046 \pm 0,05	0,194 \pm 0,04	0,699 \pm 0,16	3,103 \pm 0,78	4,340 \pm 1,41	8,382 \pm 2,43
Ác.cafeoilquinicolactona-sulfato (11,8)	N.D.	0,175 \pm 0,07	0,143 \pm 0,14	N.D.	N.D.	N.D.	0,318 \pm 0,21
Ác.cafeoilquinicolactona-sulfato (12,3)	N.D.	0,336 \pm 0,06	0,361 \pm 0,08	N.D.	N.D.	N.D.	0,697 \pm 0,13
Ác.cafeoilquinicolactona-sulfato (13,5)	N.D.	0,128 \pm 0,02	0,159 \pm 0,03	N.D.	N.D.	N.D.	0,287 \pm 0,04
Total Fase I y Fase II	0,379 \pm 0,08	5,131 \pm 1,31	8,942 \pm 2,58	29,306 \pm 6,30	34,003 \pm 6,46	7,847 \pm 2,88	85,608 \pm 19,63

Tabla 4.36. (Continuación). Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo del café mezcla tostado/verde. Los valores se expresan como la media \pm error típico ($n=12$). N.D. No detectado. < L.C. Menor del límite de cuantificación.

Café	Etapa (μmoles)						TOTAL
	Basal	0-2 h	2-4 h	4-8 h	8-12 h	12-24 h	μmoles
Metabolito (TR)							0-24 h
Microbianos							
Ácido dihidrocafeico (7,0)	N.D.	0,061 \pm 0,01	0,237 \pm 0,06	1,208 \pm 0,23	0,842 \pm 0,15	0,056 \pm 0,02	2,404 \pm 0,47
Ácido dihidroferúlico (10,8)	N.D.	0,092 \pm 0,03	1,232 \pm 0,43	5,475 \pm 0,99	2,541 \pm 0,72	0,030 \pm 0,03	9,370 \pm 2,21
Ác. dihidrocafeoilquinico (8,5)	N.D.	N.D.	0,054 \pm 0,02	0,129 \pm 0,02	0,310 \pm 0,04	0,151 \pm 0,03	0,644 \pm 0,11
Ác. dihidrocafeoilquinico (13,1)	N.D.	N.D.	N.D.	0,008 \pm 0,01	0,142 \pm 0,01	0,035 \pm 0,01	0,185 \pm 0,03
Ác. dihidrocafeoilquinico (14,8)	N.D.	N.D.	N.D.	0,014 \pm 0,01	0,244 \pm 0,01	0,036 \pm 0,01	0,294 \pm 0,03
Ác. dihidroferuloilquinico (15,1)	N.D.	N.D.	N.D.	0,035 \pm 0,04	0,835 \pm 0,27	0,024 \pm 0,02	0,895 \pm 0,33
Ác. dihidroferuloilquinico (15,4)	N.D.	N.D.	N.D.	0,079 \pm 0,05	5,405 \pm 3,21	0,448 \pm 0,07	5,932 \pm 3,33
Ác. dihidroferuloilquinico (15,6)	N.D.	N.D.	N.D.	0,025 \pm 0,02	0,180 \pm 0,04	0,012 \pm 0,01	0,217 \pm 0,08
Ác. dihidrocumárico (8,5)	0,012 \pm 0,01	0,037 \pm 0,02	0,155 \pm 0,03	0,296 \pm 0,05	0,231 \pm 0,07	0,017 \pm 0,02	0,748 \pm 0,21
Ác. dihidro- <i>p</i> -cumaroilquinico (14,8)	N.D.	0,009 \pm 0,01	0,128 \pm 0,08	0,131 \pm 0,05	0,726 \pm 0,26	0,047 \pm 0,01	1,041 \pm 0,41
Ác. dihidro- <i>m</i> -cumaroilquinico (15,3)	N.D.	N.D.	N.D.	0,059 \pm 0,04	0,507 \pm 0,07	0,164 \pm 0,03	0,730 \pm 0,14
Ác. dihidrometoxicinámico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Trazas
Feruloilglicina (8,8)	0,336 \pm 0,07	0,541 \pm 0,09	1,351 \pm 0,24	9,135 \pm 2,28	2,074 \pm 1,10	0,628 \pm 0,08	14,066 \pm 0,85
Isoferuloilglicina (9,5)	N.D.	N.D.	0,006 \pm 0,01	0,094 \pm 0,02	0,111 \pm 0,01	N.D.	0,211 \pm 0,03
Total Microbianos 1	0,348 \pm 0,08	0,740 \pm 0,16	3,163 \pm 0,88	16,688 \pm 3,82	14,148 \pm 5,96	1,648 \pm 0,35	36,735 \pm 11,23
Ác. 3-hidroxifenilpropiónico (11,1)	N.D.	0,024 \pm 0,00	0,036 \pm 0,00	0,096 \pm 0,02	0,258 \pm 0,06	0,075 \pm 0,01	0,489 \pm 0,10
Ác. 3,4-dihidroxifenilacético (5,6)	0,041 \pm 0,01	0,050 \pm 0,02	0,050 \pm 0,03	0,031 \pm 0,01	0,043 \pm 0,02	0,056 \pm 0,03	0,271 \pm 0,12
Ác. 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (7,5)	N.D.	0,026 \pm 0,01	0,226 \pm 0,11	1,443 \pm 0,40	0,943 \pm 0,26	N.D.	2,638 \pm 0,78
Ác. 4-metoxi-3-hidroxifenilacético (8,8)	0,138 \pm 0,04	0,183 \pm 0,03	0,161 \pm 0,04	0,188 \pm 0,02	0,339 \pm 0,03	0,162 \pm 0,03	1,171 \pm 0,18
Ác. 3-hidroxifenilacético (7,4)	0,192 \pm 0,04	0,214 \pm 0,03	0,228 \pm 0,03	0,383 \pm 0,08	0,647 \pm 0,08	0,352 \pm 0,07	2,016 \pm 0,33
Ác. hidroxibenzoico (protocatéquico) (3,8)	0,063 \pm 0,02	0,054 \pm 0,01	0,043 \pm 0,01	0,028 \pm 0,01	0,072 \pm 0,02	0,081 \pm 0,02	0,341 \pm 0,09
Ác. 4-hidroxihipúrico (11,0)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,088 \pm 0,01	N.D.	0,088 \pm 0,01
Ác. 3-hidroxihipúrico (14,2)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,078 \pm 0,01	N.D.	0,078 \pm 0,01
Ác. hidroxibenzoico (6,1)	0,100 \pm 0,03	0,062 \pm 0,01	0,113 \pm 0,02	0,105 \pm 0,01	0,154 \pm 0,01	0,293 \pm 0,08	0,826 \pm 0,16
Ác. 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (3,0)	0,169 \pm 0,03	0,096 \pm 0,02	0,107 \pm 0,02	0,136 \pm 0,02	0,505 \pm 0,23	0,335 \pm 0,06	1,348 \pm 0,38
Floroglucinol (6,5)	0,104 \pm 0,01	0,043 \pm 0,02	0,058 \pm 0,02	0,089 \pm 0,02	0,172 \pm 0,02	0,221 \pm 0,05	0,687 \pm 0,14
Total Microbianos 2	0,807 \pm 0,18	0,752 \pm 0,15	1,022 \pm 0,28	2,49 \pm 0,604	3,299 \pm 0,76	1,575 \pm 0,63	9,954 \pm 2,32

La hidrólisis de los ácidos monoacilquinicos ocurrirá preferentemente en el intestino delgado, junto con la conjugación (metilación, glucuronidación y sulfatación) de los ácidos fenólicos simples formados tras la desesterificación, dado que estos

metabolitos son rápidamente eliminados (intervalos 0-2 h y 2-4 h). Los derivados glucuronidado y sulfatado del ácido ferúlico mantienen unos altos niveles de excreción en los dos siguientes intervalos (4-8 h y 8-12 h), de manera similar a lo observado en plasma, con un perfil bifásico y un segundo máximo en torno a las 4-6 h (Figura 4.49.c) sugerente de una recirculación enterohepática. Considerando que parte del ácido ferúlico y sus derivados podrían derivar de la metilación del ácido cafeico por acción del enzima COMT, la metilación constituiría la reacción preferente de metabolización, seguida de sulfatación y, en último lugar, de glucuronidación. El conjunto de metabolitos relacionados con los ácidos fenólicos simples y sus derivados de fase II comprende un 11,2% del total de los metabolitos identificados en orina.

Dihidrocafeico, dihidroferúlico, dihidroisoferúlico, dihidrocumárico y sus derivados de fase II, representan el grupo mayoritario de metabolitos urinarios, con un 64,6% del total excretado, preferentemente en el tercer y cuarto intervalo (4-8 h y 8-12 h), de acuerdo a su origen microbiano. De nuevo, las rutas de metilación y sulfatación fueron rutas de biotransformación dominantes frente la glucuronidación.

Cabe destacar los dos isómeros de feruloilglicina, excretados extensivamente en el tercer intervalo (4-8 h) y cuya contribución sobre el total de metabolitos identificados fue relevante, alcanzando un 10,3%.

Por último, se ha identificado por primera vez un lote de compuestos que podríamos denominar como dihidroderivados de los ácidos monoacilquínicos (dihidrocafeoilquínico, dihidroferuloilquínico y dihidrocumaroilquínico), que se excretaron preferentemente en el cuarto intervalo (8-12 h), y cuya cantidad comprende un 6,5% del total excretado.

Del resto de metabolitos microbianos, derivados de los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e hidroxibenzoico principalmente, mostraron diferencias pequeñas a lo largo de 24 h, si bien la mayoría aumentó su contenido en el cuarto intervalo (8-12 h); esta baja respuesta y su aparición a nivel basal sugerían su participación en otras rutas de metabolización, por lo que no se han considerado para el cómputo de la recuperación.

Por tanto, el contenido total de metabolitos (sin modificar, fase I, fase II y microbianos) cuantificados en orina a lo largo de las 24 h post-ingesta alcanzó un total de 125,1 μ moles. Teniendo en cuenta la ingesta de \sim 816 μ moles de fenoles a partir de 250 mL de café mezcla tostado/verde, la recuperación de ácidos hidroxicinámicos ascendió a un 15,4% respecto de la cantidad ingerida.

4.3.2.6. Cuantificación de Metabolitos de la Yerba Mate en Orina

Al igual que lo descrito con el café mezcla tostado/verde, el perfil metabólico de los ácidos hidroxicinámicos en la orina de los voluntarios que ingirieron la infusión de yerba mate guarda estrecha relación con el ofrecido en plasma.

Respecto a la fracción sin metabolizar (Tabla 4.37.), además del ácido 5-cafeoilquínico se identificó cierta cantidad de isómero 3-cafeoilquínico, no detectado en el plasma. Se pudieron cuantificar los tres isómeros 3-, 4- y 5-feruloilquínico en cantidades relevantes, mientras que en el plasma no estaban presentes. También se identificó en orina otro ácido monoacilquínico detectado en cantidades de traza en el plasma, el ácido *p*-cumaroilquínico, que se absorbe sin metabolizar. Estos compuestos sin metabolizar representaron un 1,6% del total de los metabolitos identificado en la orina y se excretaron principalmente en los dos primeros intervalos (0-2 h y 2-4 h) (Tabla 4.37.). En el conjunto de los ácidos monoacilquínicos, los más abundantes fueron los ácidos feruloilquínicos (64,5%) seguido del ácido *p*-cumaroilquínico (22,0%) y los ácidos cafeoilquínicos (13,4%). Esta cuantificación no siguió el porcentaje obtenido en la composición fenólica de la yerba mate, en la que los ácidos cafeoilquínicos supusieron el 55,2%, seguido de los ácidos feruloilquínicos con un 4,0% y del ácido *p*-cumaroilquínico contribuyendo con 0,6% a la composición de la infusión. Al igual que lo observado en la orina del estudio con café. Este fenómeno sugiere que el ácido cafeoilquínico es absorbido sin metabolizar a partir de la infusión de mate, siendo metilado por acción de la COMT en el epitelio del intestino delgado. Igualmente, el ácido *p*-cumaroilquínico se absorbería sin metabolizar tras el consumo de la infusión de yerba mate.

También se observó la eliminación de 0,1 μ moles de cafeoilquínicolactona-sulfato en la orina de los voluntarios que bebieron la yerba mate (<0,1% del total de metabolitos urinarios), cuya excreción fue mayoritaria en el intervalo 0-2 h, de acuerdo a su absorción intestinal.

Estos compuestos que serían absorbidos sin metabolizar y, a lo sumo, conjugados por acción de enzimas de fase II representaron un 1,7% del total de los metabolitos identificados en la orina, excretándose todos ellos en los dos primeros intervalos (Tabla 4.37.).

Al contrario de lo observado con el café, donde sólo se detectaba el ácido cafeico en orina (Tabla 4.37.), tras la ingesta de mate sólo se identificó el ácido isoferúlico (Tabla 4.3.12.) en cantidades superiores al cafeico (1,28 vs. 0,45 μ moles en 24

h, respectivamente). Sí se pudieron detectar el ácido cafeico-4-sulfato y el ácido ferúlico-4-sulfato en grandes cantidades (5 y 8 μ moles, respectivamente), así como los ácidos ferúlico-4-glucurónido (3 μ moles) e *isoferúlico* glucuronidado (0,3 μ moles). Estos valores son comparables a lo excretado con el café, si bien no se observó la presencia de *isoferúlico*-3-sulfato en la orina del estudio con mate. Igualmente, los resultados son coherentes con la cuantificación obtenida en plasma, donde los metabolitos más abundantes fueron los ácidos cafeico-4-sulfato y ferúlico-4-sulfato seguidos del ácido ferúlico-4-glucurónido. No se detectaron derivados conjugados del ácido *p*-cumárico al igual que ocurrió en el plasma, sí presentes en la orina de la intervención con café. Este conjunto de metabolitos relacionados con los ácidos fenólicos simples y sus derivados de fase II representaron un 12% del total de los cuantificados en orina.

Respecto a los metabolitos derivados de la acción de reductasas microbianas, se registraron importantes cantidades de los ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico (2,4 y 6,6 μ mol a lo largo de las 24 h), en línea con lo descrito en el plasma. Por el contrario, a pesar de sus altas concentraciones plasmáticas, en orina no se detectó el ácido dihidro*isoferúlico*, al igual que ocurrió en el estudio con café. Por acción de las enzimas reductasas también se justifica la presencia de una cierta cantidad de ácido dihidro*cumárico* (1 μ mol). Al igual que en el caso del café, este conjunto de dihidroderivados de los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-*cumárico* presentan el denominador común de excretarse mayoritariamente en el tercer y cuarto intervalo de recogida de orina (4-8 h y 8-12 h).

Por otra parte, los derivados sulfatados del ácido dihidrocafeico fueron excretados en elevadas cantidades (40 μ moles en 24 h) en comparación con el metabolito glucuronidado (0,53 μ moles en 24 h), confirmando la sulfatación como ruta metabólica preferente. Al igual que ocurrió con el café, el metabolito mayoritario en orina fue el ácido dihidrocafeico-3-sulfato, frente al dihidrocafeico-4-sulfato predominante en plasma.

También fue significativa la eliminación urinaria de conjugados de los ácidos dihidroferúlico (26,3 μ moles) y dihidro*isoferúlico* (8,3 μ moles en 24 h). Se observó una correlación directa entre las cantidades excretadas y las concentraciones máximas determinadas para estos metabolitos en plasma, como ya se observó en el estudio del café mezcla tostado/verde. Igualmente, se cuantificaron niveles importantes de los derivados dihidro-*p*-*cumárico*-glucurónido (0,5 μ moles en 24 h) y dihidro-*p*-*cumárico*-sulfato, este último mucho más abundante (8,5 μ moles en 24 h).

Los dihidroderivados de los ácidos cafeico, ferúlico, *isoferúlico* y cumárico, así como sus derivados de fase II representan un 63,2% del total de los metabolitos cuantificados en orina.

Respecto a los dihidroderivados de los ácidos monoacilquínicos, se determinó la eliminación de 0,5 μ moles de ácido 3-dihidrocafeoilquínico, 5,1 μ moles de los ácidos dihidroferuloilquínicos y 2,7 μ moles de los ácidos *p*- y *m*-dihidrocumaroilquínico al cabo de 24 h tras la ingesta de yerba mate. Estos compuestos fueron mayoritariamente excretados en los intervalos 8-12 h, lo que es consistente con su absorción colónica. Ninguno de estos compuestos fue detectado en plasma, al igual que ocurrió en el caso del café. La cantidad total excretada tras 24 h representó un 5,7% del total de metabolitos cuantificados en orina.

Por otra parte, se detectaron dos isómeros de feruloilglicina, excretándose 26,4 μ moles mayoritariamente en los intervalos 4-8 h y 8-12 h. Estos compuestos representaron un porcentaje sobre el total de metabolitos urinarios de aproximadamente un 18%.

La yerba mate contenía un 4,1% de flavonoides, ausentes en el café mezcla tostado/verde (Ver apartado 4.1.3.). Derivados de esos compuestos, se detectaron en orina los mismos conjugados observados en plasma, kaempferol-glucurónido (0,3 μ moles tras 24 h, siendo su excreción máxima entre 4-8 h) y trazas de metilquercetín-glucurónido, representando en su conjunto menos del 0,2% del total de metabolitos urinarios.

Del resto de metabolitos de origen microbiano, esto es, derivados de los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e hidroxibenzoico, principalmente ("Microbianos 2" en la Tabla 4.37.), mostraron diferencias pequeñas a lo largo de 24 h, si bien la mayoría aumentó su contenido en el cuarto intervalo (8-12 h), aunque su presencia a tiempo basal sugiere que participan en otras rutas del catabolismo de otros compuestos. Por ello, no se consideraron para el cómputo total de la recuperación.

Especial atención merece el floroglucinol por los antecedentes que le relacionan con el metabolismo de la rutina (Jaganath y cols., 2009; Calani y cols., 2012). Se observó un aumento notorio de su contenido en los intervalos cuarto y quinto (8-12 h y 12-24 h) en comparación con los intervalos anteriores y también con la intervención de café mezcla tostado/verde (Tabla 4.36.), aunque la variabilidad y los altos niveles observados en la orina a tiempo basal no permite extraer ninguna conclusión al respecto.

Resultados y Discusión

Tabla 4.37. Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo de la infusión de yerba mate. Los valores se expresan como la media \pm error típico ($n=12$). N.D. No detectado. < L.C. Menor del límite de cuantificación.

Yerba mate	Etapa (μmoles)						TOTAL
	Basal	0-2 h	2-4 h	4-8 h	8-12 h	12-24 h	μmoles
Metabolito (TR)							
Sin metabolizar							
Ác. 3-cafeoilquinico (4,0)	0,013 \pm 0,01	0,068 \pm 0,02	0,109 \pm 0,03	0,021 \pm 0,02	N.D.	N.D.	0,212 \pm 0,08
Ác. 5-cafeoilquinico (5,8)	0,010 \pm 0,01	0,036 \pm 0,01	0,054 \pm 0,01	0,011 \pm 0,01	N.D.	N.D.	0,111 \pm 0,03
Ác. 3-ferulolquinico (7,1)	0,049 \pm 0,03	0,106 \pm 0,02	0,177 \pm 0,02	0,036 \pm 0,01	0,006 \pm 0,01	0,009 \pm 0,01	0,383 \pm 0,10
Ác. 5-ferulolquinico (9,6)	0,020 \pm 0,02	0,159 \pm 0,02	0,308 \pm 0,06	0,138 \pm 0,01	0,042 \pm 0,02	N.D.	0,667 \pm 0,13
Ác. 4-ferulolquinico (10,2)	0,024 \pm 0,02	0,186 \pm 0,03	0,283 \pm 0,05	0,013 \pm 0,01	N.D.	N.D.	0,506 \pm 0,11
Ác. <i>p</i> -cumaroilquinico (16,4)	0,021 \pm 0,01	0,010 \pm 0,01	0,017 \pm 0,01	0,087 \pm 0,03	0,245 \pm 0,04	0,149 \pm 0,03	0,529 \pm 0,13
Total Sin metabolizar	0,137 \pm 0,11	0,565 \pm 0,10	0,948 \pm 0,18	0,306 \pm 0,09	0,293 \pm 0,07	0,158 \pm 0,04	2,408 \pm 0,58
Fase I							
Ác. <i>isoferulico</i> (12,9)	N.D.	0,120 \pm 0,08	0,063 \pm 0,06	0,075 \pm 0,07	0,870 \pm 0,87	0,153 \pm 0,11	1,281 \pm 1,19
Fase II							
Ác. cafeico-3-sulfato (10,7)	0,263 \pm 0,26	1,273 \pm 0,26	1,839 \pm 0,42	0,855 \pm 0,18	0,587 \pm 0,12	0,032 \pm 0,02	4,849 \pm 1,27
Ác. ferulico-4-glucuronido (8,4)	N.D.	0,224 \pm 0,03	0,700 \pm 0,14	0,987 \pm 0,30	0,892 \pm 0,28	0,164 \pm 0,03	2,967 \pm 0,78
Ác. <i>isoferulico</i> -3-glucuronido (9,3)	0,159 \pm 0,16	0,051 \pm 0,05	0,101 \pm 0,05	0,022 \pm 0,02	0,016 \pm 0,02	N.D.	0,349 \pm 0,30
Ác. ferulico-4-sulfato (8,7)	N.D.	0,485 \pm 0,15	1,744 \pm 0,54	2,651 \pm 0,68	3,076 \pm 1,19	0,196 \pm 0,13	8,152 \pm 2,69
Ác. dihidrocafeico-3-glucuronido (6,3)	N.D.	0,008 \pm 0,00	0,052 \pm 0,02	0,226 \pm 0,03	0,226 \pm 0,06	0,018 \pm 0,01	0,530 \pm 0,13
Ác. dihidrocafeico-4-sulfato (7,8)	0,161 \pm 0,06	0,216 \pm 0,05	0,360 \pm 0,13	N.D.	0,126 \pm 0,09	0,519 \pm 0,16	1,382 \pm 0,49
Ác. dihidrocafeico-3-sulfato (10,4)	N.D.	N.D.	3,739 \pm 1,96	15,432 \pm 4,02	15,723 \pm 3,27	3,887 \pm 2,82	38,781 \pm 12,07
Ác. dihidroferulico-4-glucuronido (6,5)	N.D.	0,047 \pm 0,02	0,600 \pm 0,15	2,708 \pm 0,83	2,614 \pm 0,59	0,393 \pm 0,09	6,362 \pm 1,68
Ác. dihidroisoferulico-3-glucuronido (8,4)	0,137 \pm 0,05	0,145 \pm 0,08	0,314 \pm 0,10	2,135 \pm 0,70	1,486 \pm 0,24	0,324 \pm 0,05	4,541 \pm 1,23
Ác. dihidroferulico-4-sulfato (10,4)	0,824 \pm 0,41	1,350 \pm 1,02	2,697 \pm 1,08	5,986 \pm 1,82	7,074 \pm 1,51	1,950 \pm 0,48	19,882 \pm 6,32
Ác. dihidroisoferulico-3-sulfato (11,4)	N.D.	N.D.	0,316 \pm 0,21	1,577 \pm 0,52	1,718 \pm 0,32	0,159 \pm 0,07	3,770 \pm 1,12
Ác. dihidro- <i>p</i> -cumárico-4-glucuronido (6,8)	0,016 \pm 0,01	0,004 \pm 0,00	0,059 \pm 0,02	0,126 \pm 0,02	0,236 \pm 0,03	0,075 \pm 0,02	0,516 \pm 0,10
Ác. dihidro- <i>p</i> -cumárico-4-sulfato (10,6)	0,102 \pm 0,05	0,135 \pm 0,04	0,249 \pm 0,06	0,932 \pm 0,35	2,683 \pm 0,45	4,345 \pm 1,22	8,446 \pm 2,18
Cafeoilquinicolactona-sulfato (12,3)	N.D.	0,075 \pm 0,05	0,041 \pm 0,01	N.D.	N.D.	N.D.	0,116 \pm 0,05
Kaemferol-glucuronido (12,6)	N.D.	N.D.	0,072 \pm 0,01	0,196 \pm 0,02	N.D.	N.D.	0,268 \pm 0,03
Total Fase I y Fase II	1,662 \pm 1,12	4,133 \pm 1,84	12,946 \pm 4,96	33,908 \pm 9,56	37,327 \pm 9,31	12,215 \pm 5,23	102,191 \pm 32,02

Tabla 4.37. (Continuación). Cantidad de metabolitos excretados en la orina de 0 a 24 h expresado en μmol tras el consumo de la infusión de yerba mate. Los valores se expresan como la media \pm error típico ($n=12$). N.D. No detectado. < L.C. Menor del límite de cuantificación.

Yerba mate	Etapa (μmoles)						TOTAL
	Basal	0-2 h	2-4 h	4-8 h	8-12 h	12-24 h	μmoles 0-24 h
Metabolito (TR)							
Microbianos							
Ac. dihidrocafeico (7,0)	N.D.	0,014 \pm 0,01	0,295 \pm 0,07	0,941 \pm 0,15	1,013 \pm 0,38	0,077 \pm 0,04	2,339 \pm 0,65
Ac. dihidroferúlico (10,8)	N.D.	0,083 \pm 0,03	1,041 \pm 0,27	3,264 \pm 0,71	2,129 \pm 0,38	0,145 \pm 0,05	6,663 \pm 1,45
Ac. dihidrocafeoilquinico (8,5)	0,027 \pm 0,01	0,018 \pm 0,01	0,024 \pm 0,01	0,086 \pm 0,03	0,192 \pm 0,09	0,145 \pm 0,06	0,493 \pm 0,22
Ac. dihidroferuloilquinico (15,1)	0,011 \pm 0,01	0,008 \pm 0,01	0,091 \pm 0,03	0,111 \pm 0,03	0,947 \pm 0,42	0,170 \pm 0,04	1,338 \pm 0,54
Ac. dihidroferuloilquinico (15,6)	0,026 \pm 0,01	0,007 \pm 0,01	0,102 \pm 0,08	0,109 \pm 0,03	2,864 \pm 0,39	0,651 \pm 0,18	3,759 \pm 0,71
Ac. dihidrocumárico (8,5)	0,034 \pm 0,01	0,041 \pm 0,02	0,144 \pm 0,02	0,316 \pm 0,06	0,397 \pm 0,07	0,122 \pm 0,02	1,054 \pm 0,20
Ac. dihidrocumaroilquinico (14,8)	0,055 \pm 0,03	0,070 \pm 0,01	0,182 \pm 0,04	0,381 \pm 0,14	0,848 \pm 0,13	0,197 \pm 0,03	1,733 \pm 0,38
Feruloilglicina (8,8)	0,381 \pm 0,09	0,321 \pm 0,06	2,461 \pm 0,90	10,606 \pm 2,56	10,740 \pm 4,15	1,258 \pm 0,47	25,768 \pm 8,23
Isoferuloilglicina (9,5)	N.D.	N.D.	\pm 0,03	\pm 0,07	\pm 0,08	0,014 \pm 0,01	0,643 \pm 0,19
Metilquercetiín-glucurónido (16,6)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<L.C.	<L.C.	Trazas
Total Microbianos 1	0,534 \pm 0,17	0,562 \pm 0,15	4,410 \pm 1,47	16,139 \pm 3,78	19,352 \pm 6,07	2,779 \pm 0,91	43,790 \pm 12,57
Ác. 3-hidroxifenilpropiónico (11,1)	0,019 \pm 0,01	0,003 \pm 0,00	0,047 \pm 0,01	0,262 \pm 0,11	0,552 \pm 0,14	0,100 \pm 0,02	0,983 \pm 0,28
Ác. 3,4-dihidroxifenilacético (5,6)	0,097 \pm 0,02	0,071 \pm 0,03	0,062 \pm 0,02	0,060 \pm 0,01	0,029 \pm 0,02	0,057 \pm 0,02	0,376 \pm 0,12
Ác. 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (7,5)	N.D.	<L.C.	0,444 \pm 0,18	1,471 \pm 0,32	0,404 \pm 0,13	0,062 \pm 0,04	2,381 \pm 0,68
Ác. 4-metoxi-3-hidroxifenilacético (8,8)	0,172 \pm 0,04	0,134 \pm 0,04	0,152 \pm 0,04	0,241 \pm 0,03	0,552 \pm 0,06	0,237 \pm 0,03	1,488 \pm 0,25
Ác. 3-hidroxifenilacético (7,4)	0,256 \pm 0,05	0,164 \pm 0,21	0,317 \pm 0,06	0,359 \pm 0,07	0,761 \pm 0,15	0,387 \pm 0,07	2,244 \pm 0,60
Ác. hidroxibenzoico (protocatéquico) (3,8)	0,065 \pm 0,02	0,034 \pm 0,01	0,035 \pm 0,01	0,041 \pm 0,01	0,059 \pm 0,01	0,057 \pm 0,01	0,291 \pm 0,06
Ác. 4-hidroxihipúrico (11,0)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,086 \pm 0,01	N.D.	0,086 \pm 0,01
Ác. 3-hidroxihipúrico (14,2)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,084 \pm 0,01	N.D.	0,084 \pm 0,01
Ác. hidroxibenzoico (6,1)	0,046 \pm 0,01	0,091 \pm 0,03	0,168 \pm 0,10	0,085 \pm 0,01	0,143 \pm 0,02	0,162 \pm 0,04	0,695 \pm 0,21
Ác. 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (3,0)	0,153 \pm 0,04	0,072 \pm 0,01	0,130 \pm 0,03	0,139 \pm 0,02	0,288 \pm 0,04	0,282 \pm 0,05	1,064 \pm 0,20
Floroglucinol (6,5)	0,285 \pm 0,06	0,122 \pm 0,03	0,155 \pm 0,03	0,184 \pm 0,03	0,311 \pm 0,05	0,458 \pm 0,12	1,515 \pm 0,32
Total Microbianos 2	1,093 \pm 0,24	0,691 \pm 0,37	1,510 \pm 0,48	2,842 \pm 0,62	3,269 \pm 0,63	1,802 \pm 0,41	11,207 \pm 2,75

El contenido total de metabolitos (sin modificar, fase I, fase II y microbianos) cuantificados en orina a lo largo de las 24 h post-ingesta alcanzó un total de 147,5 μmoles . Teniendo en cuenta la ingesta de 1118 μmoles de fenoles a partir de 250 mL de infusión yerba mate, la recuperación metabolitos de los ácidos hidroxicinámicos ascendió a un 14,3% respecto de la cantidad ingerida, ligeramente inferior a la descrita para la intervención con café mezcla tostado/verde.

4.3.2.7. Metabolismo y Biodisponibilidad de los Ácidos Hidroxicinámicos de Café Mezcla Tostado/Verde y Yerba Mate en Humanos Sanos

La absorción y metabolismo de ácidos hidroxicinámicos presentes en café instantáneo han sido evaluados por algunos autores (Stalmach y cols., 2009, 2014; Redeuil y cols., 2011; Renouf y cols., 2014; Marmet y cols., 2014, entre los más recientes y completos), mientras que hasta la fecha no existen estudios que aborden la biodisponibilidad de la fracción fenólica de yerba mate, de gran similitud a la del café. Los estudios con ambas bebidas aquí presentados se basaron en dosis realistas (3,5 g de café soluble mezcla tostado/verde disueltos en 250 mL de agua y 4,91 g de hojas de yerba mate infusionadas en 250 mL de agua) y proporcionaron 298 mg y 396 mg de compuestos fenólicos, respectivamente. Los resultados revelaron que los ácidos hidroxicinámicos de ambas bebidas son absorbidos parcialmente y se metabolizan de forma extensiva, con gran implicación de la microbiota colónica.

En el estudio de biodisponibilidad de café en voluntarios sanos se han caracterizado un total de 59 metabolitos en la orina, aunque sólo los más abundantes (34) alcanzaron los límites de detección en plasma. Dado el gran número de compuestos identificados y con el fin de facilitar la comprensión de nuestros resultados y situarlos en el contexto de los últimos avances realizados en este campo, se ofrecerá una visión conjunta del plasma y orina.

Los metabolitos identificados abarcan desde derivados monoacíclicos (3-,4-,5-caffeoilquinico, 3-,4-,5-feruloilquinico y *p*-cumaroilquinico) presentes en la propia bebida, hasta productos de su metabolismo de origen bien distinto. Entre éstos últimos se ha caracterizado la presencia de ácidos fenólicos simples (cafeico, ferúlico/*iso*ferúlico y dimetoxicinámico) y sus derivados de fase II: sulfatados de los ácidos cafeico, ferúlico/*iso*ferúlico y cumárico, así como glucuronidados de ácidos ferúlico/*iso*ferúlico y cumárico. En la Figura 4.51. se muestra un esquema de las principales reacciones metabólicas de los ácidos hidroxicinámicos a nivel intestinal. Además, en el metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos adquirieron especial relevancia los dihidroderivados de los ácidos fenólicos simples (dihidrocafeico, dihidroferúlico, dihidrocumárico y dihidrodimetoxicinámico) en particular los derivados glucuronidados y sulfatados de los tres primeros. También se ha identificado cafeoilquinicolactona-sulfato y feruloilquinicolactona-glucurónido procedentes de la pequeña cantidad de cafeoilquinicolactona que contenía el café por tratarse de una mezcla con 65% de café

tostado, y dos isómeros de feruloilglicina, uno notoriamente más abundante que el otro, que tentativamente se identificaron como feruloilglicina e *isoferuloilglicina*, respectivamente. La mayoría de estos compuestos habían sido previamente reportados por otros grupos de investigación con alguna excepción que se detallará a continuación.

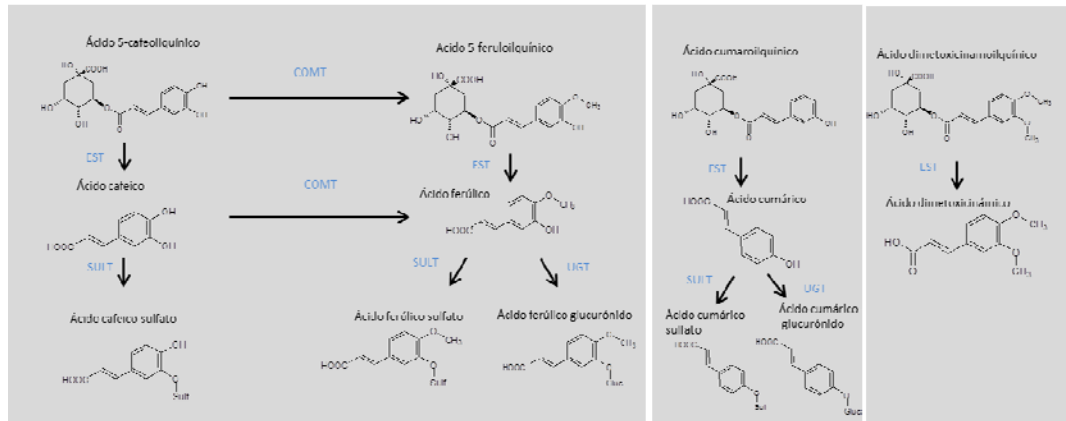


Figura 4.51. Metabolismo de fase II propuesto para los ácidos hidroxicinámicos presentes en café mezcla tostado/verde. Las enzimas implicadas en las reacciones de biotransformación se presentan en color azul. COMT: catecol-*O*-metil transferasa, SULT: sulfotransferasa, UGT: UDP-glucuronosil transferasa, EST: esterasa.

Los primeros estudios de biodisponibilidad de fenoles del café datan del año 2005 en un trabajo en el que apenas se identificaron cinco compuestos en orina (ácidos clorogénico, cafeico y *m*-cumárico, además de enterodiol y enterolactona) tras la ingesta de 250-290 mg de ácidos hidroxicinámicos de café en polvo descafeinado (Ito y cols., 2005). Más tarde, Matsui y cols. (2007) identificaron en plasma cantidades discretas de ácidos monoacilquinicos (3-, 4-, 5-caffeoilquinico y 3-, 4-, 5-feruloilquinico), además de ácido ferúlico y trazas de ácido dicafeoilquinico tras la ingesta de un extracto de café verde conteniendo 300 mg de ácidos hidroxicinámicos. Por otra parte, dos estudios muy controvertidos abordados por el mismo equipo de investigación caracterizaron cantidades relevantes en plasma tanto de derivados monoacilquinicos (ácidos 3-, 4-, 5-caffeoilquinico) como diacilquinicos (3,4-dicafeoilquinico, 3,5-dicafeoilquinico y 4,5-dicafeoilquinico) tras la ingesta de 1200 mg (Monteiro y cols., 2007) y 170 mg (Farah y cols., 2008) de ácidos hidroxicinámicos. Cabe destacar que éstos son los únicos trabajos que han reportado la presencia de ácidos diacilquinicos en plasma. Estos autores también detectaron en plasma los ácidos cafeico, ferúlico/*isoferúlico* y *p*-cumárico, mientras que en la orina detectaron mayoritariamente ácidos hidroxicinámicos simples

junto con algún isómero del ácido cafeoilquínico y un derivado dihidrogenado del ácido cafeico.

Más tarde, Stalmach y cols. (2009) desarrollaron un estudio que ofreció una caracterización metabólica de los hidroxicinamatos más completa y que sentó un precedente para los estudios de biodisponibilidad de café desarrollados posteriormente. Así, tras la ingesta de un café instantáneo que contenía 146 mg de ácidos hidroxicinámicos, caracterizaron en plasma ácidos monoacilquínicos (cafeoil- y feruloilquínicos), derivados sulfatados de los ácidos cafeico y ferúlico, junto con dihidroderivados y dihidroderivados-sulfatados de los ácidos cafeico y ferúlico. Adicionalmente, reportaron un derivado sulfatado de un producto característico del café tostado, cafeoilquínicolactona. En la orina detectaron los mismos metabolitos que en plasma, además de feruloilglicina y derivados glucuronidados de dihidrocafeico y dihidroferúlico.

Posteriormente, Redeuil y cols. (2011) caracterizaron en plasma un total de 34 metabolitos, principalmente formas reducidas, sulfatadas y metiladas de los ácidos cafeico y cumárico, así como ácidos feruloilquínicos y un abanico amplio de compuestos relacionados con derivados de lactonas (feruloilquínicolactonas, derivados sulfatados de cafeoil- y feruloilquínicolactonas, y derivados glucuronidados de feruloilquínicolactonas). Entre ellos, estos autores identificaron por primera vez 19 compuestos relacionados con los derivados de lactonas y ácido cumárico, principalmente.

Por último, Marmet y cols. (2014) desarrollaron un método analítico capaz de detectar 56 metabolitos en plasma (24 ácidos fenólicos, 4 lactonas, 15 sulfatos y 13 glucurónidos) tras la ingesta de un café soluble instantáneo, cuyo contenido en derivados hidroxicinámicos no especificaron.

Considerando todos los compuestos caracterizados por otros autores a partir del metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos de café, en este trabajo se ha identificado por primera vez ácido *p*-cumaroilquínico e *isoferuloilglicina*, ambos presente en la orina de los voluntarios participantes. Igualmente, tomando como referencia un estudio *in vitro* de fermentación colónica de ácido clorogénico (Tomás-Barberán y cols., 2014), donde se caracterizó el ácido dihidroclorogénico como intermedio de su biotransformación por acción de la flora microbiana, se han detectado cantidades relevantes de dihidroderivados de los ácidos monoacilquínicos, tal como dihidrocafeoilquínico, dihidroferuloilquínico y dihidrocumaroilquínico, descritos por primera vez en un estudio en humanos (Tablas 4.3.11. y 4.3.12.).

Adicionalmente, es importante remarcar que en este trabajo no se ha detectado ácidos diacilquínicos en ninguno de los fluidos biológicos evaluados, al contrario de lo reportado en los estudios de Monteiro y cols. (2007) y Farah y cols. (2008), y de acuerdo con los últimos trabajos (Stalmach y cols., 2009; Redeuil y cols., 2011; Marmet y cols., 2014, entre otros).

Para completar la ruta de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos y atendiendo a los antecedentes previos que señalaban una contribución importante de la microbiota, se ha identificado otro conjunto de compuestos de la familia hidroxifenilpropiónico (ácidos dihidrocafeico y dihidroferúlico) generados por acción de reductasas a partir de cafeico y ferúlico, respectivamente, y que por acción de la enzima descarboxilasa mediada por la coenzima A da lugar a derivados de hidroxifenilacético, que subsiguientemente se transformaron en derivados de hidroxibenzoico por la actividad de la misma enzima. Igualmente, se completó la ruta de biodegradación de los ácidos hidroxicinámicos con la caracterización de las correspondientes series deshidroxiladas, catalizadas por la enzima deshidrogenasa (Figura 4.52.).

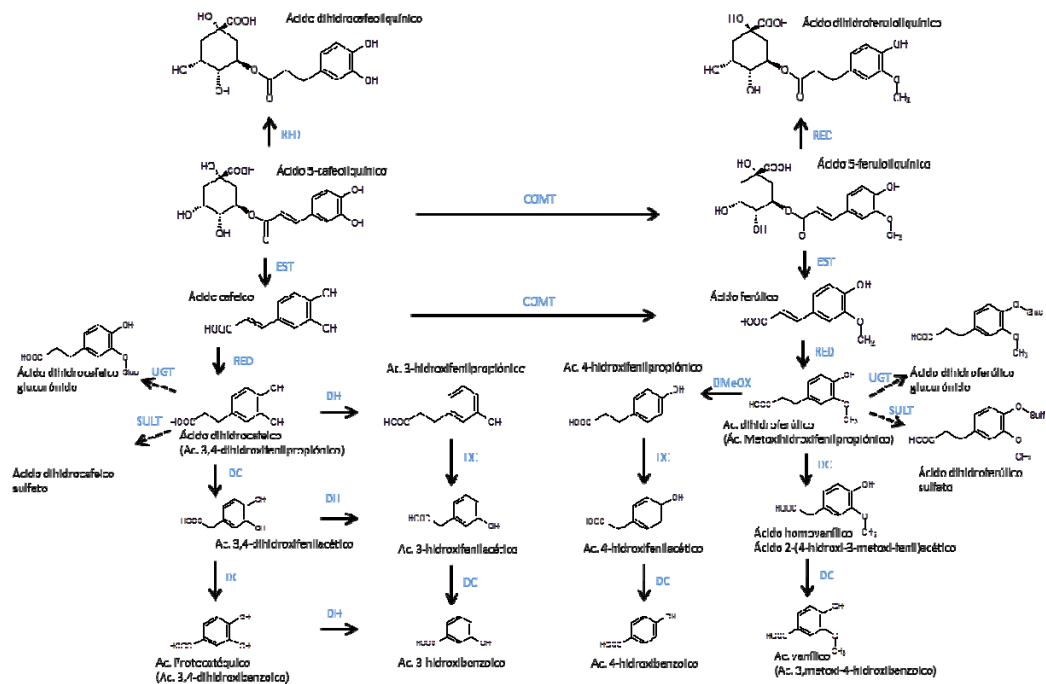


Figura 4.52. Metabolismo microbiano propuesto para los ácidos hidroxicinámicos presentes en el café. También se representa el metabolismo de fase II de los metabolitos microbianos formados. Las enzimas implicadas en las reacciones de biotransformación se presentan en color azul. RED: reductasa; EST: esterasa, DC: descarboxilasa, DH: deshidrogenasa, DMeOX: demetoxiesterasa, COMT: catecol-*O*-metiltransferasa, UGT: UDP-dlucuronosil transferasa, SULT: sulfotransferasa.

Cabe destacar la actividad esterasa de algunas bacterias como *Escherichia coli* y algunas especies de bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Rechner y cols., 2004) presentes en el colon. Los estudios de biodisponibilidad en humanos, llevados a cabo hasta el momento no suelen considerar estos compuestos (Stalmach y cols., 2009; Redeuil y cols., 2011; Renouf y cols., 2013; Marmet y cols., 2014) y, aunque están implicados en otras rutas de biotransformación, su caracterización y cuantificación puede proporcionar información de interés, como ya anticipó Ludwig y cols. (2013) en un estudio *in vitro* de fermentación colónica con café expreso.

La cuantificación es un aspecto crítico en este tipo de estudios por el abultado número de metabolitos identificados y estándares no siempre disponibles, recurriéndose en la mayor parte de los casos a la cuantificación con relación a la forma aglicona correspondiente. No obstante, los resultados aquí presentados muestran valores en línea con otros estudios, concretamente con los reportados por Stalmach y cols. (2014), quienes sí utilizaron estándares sintéticos de los metabolitos mayoritarios.

Los datos farmacocinéticos calculados a partir de los metabolitos plasmáticos, junto con los contenidos excretados en orina a lo largo de las 24 h siguientes a la ingesta, permiten elucidar gran parte de los mecanismos implicados y las vías preferentes en la biotransformación de la fracción fenólica del café.

Así, una fracción minoritaria del 1,5% de los compuestos identificados en orina está formada por ácidos monoacilquínicos (cafeoil-, feruloil- y cumaroilquínicos), lo que indica que preferentemente estos compuestos se metabolizan tras su ingestión. Además, esta fracción alcanzó su concentración máxima plasmática a tiempos relativamente cortos (máximo 1,5 h) y se excretaron antes de las 4 h, de acuerdo a su absorción preferente en el intestino delgado. Estos resultados están de acuerdo con lo hallado por otros autores (Stalmach y cols., 2009; Redeuil y cols., 2011; Renouf y cols., 2013). A esta fracción habría que sumar los derivados sulfatados de las lactonas de los ácidos cafeoilquínicos, también con rápida eliminación urinaria, representando un 0,8% del total de metabolitos urinarios tras el consumo del café mezcla tostado/verde.

Comparando con la fracción de hidroxicinamatos absorbidos sin hidrolizar tras la ingesta de mate (1,6% de cafeoil-, feruloil- y cumaroilquínicos más 0,1% de cafeoilquínicolactona-sulfato), se aprecia una mayor absorción directa de hidroxicinamatos tras el consumo de café. Esto se refleja también en los metabolitos circulantes, con apenas trazas de ácido cumaroilquínico en el plasma de los voluntarios tras el consumo de mate (Tabla 4.35.) frente a concentraciones máximas de

aproximadamente 45 nM de ácidos feruloilquínicos tras el consumo de café (Tabla 4.34.), con presencia incluso de lactonas en plasma (feruloilquínicolactona-glucurónido).

Los ácidos fenólicos libres y sus derivados de fase II, detectados tanto en plasma como en orina, son producto de la hidrólisis de los correspondientes derivados monoacilquínicos y subsiguiente transformación por la actividad de enzimas de fase II. Atendiendo al corto tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima plasmática (8-18 nM, 0,5-1,5 h en el estudio con café; 11-37 nM, 0,6-2,1 h en la intervención con mate), así como el mayor contenido excretado en las primeras franjas evaluadas en orina, se estima que la hidrólisis tiene que tener lugar preferentemente en el intestino delgado por la acción de enzimas esterases. En ese sentido, Andreasen y cols. (2001) describieron la capacidad del epitelio intestinal humano para hidrolizar derivados acílicos de esta naturaleza, mediada por la actividad de dicha enzimas. Al contrario que con los hidroxicinamatos, tras el consumo de mate fueron mayores los niveles plasmáticos de ácidos hidroxicinámicos (sumando hasta 67 nM) que tras el café (suma de C_{max} aproximadamente 50 nM), a pesar de identificarse más metabolitos diferentes en el caso de este último. Además, la excreción de este grupo de metabolitos fue similar en las dos intervenciones (15,1 μ moles vs. 17,6 μ moles en 24 h tras café y mate, respectivamente), siendo en ambos casos los metabolitos mayoritarios los ácidos ferúlico-4-sulfato y ferúlico-4-glucurónido.

Precisamente, el mayor contenido de la serie del ácido ferúlico frente al ácido cafeico sugiere que parte de este ácido procede de la metilación del ácido cafeico, que se uniría a aquel generado de la hidrólisis de los correspondientes ácidos feruloilquínicos, contribuyendo a un *pool* general de compuestos relacionados con el ácido ferúlico.

Especial atención merece el ácido dimetoxicinámico por haber sido detectado en grandes concentraciones plasmáticas (380 nM) al cabo de 60 min post-ingesta (Nagy y cols., 2011), sugiriendo que este ácido, bien presente en café o bien generado por hidrólisis del precursor dimetoxicinamoilquínico, se absorbería a nivel intestinal por difusión pasiva (Farrell y cols., 2012). En ese sentido, cabe destacar que, aunque se ha descrito un contenido variable de ácido dimetoxicinámico libre en función de la variedad del grano de café, menor de 0,7 g/Kg (Andrade y cols., 1998), el producto utilizado en este trabajo no lo contenía o no se ha detectado en nuestras condiciones de análisis. Sin embargo, mediante análisis por LC-QTOF se detectó la presencia de su derivado acílico, el ácido dimetoxicinamoilquínico, aunque no se pudo facilitar su contenido al mostrar

niveles inferiores al límite de detección del equipo LC-DAD. Por lo tanto, el ácido dimetoxicinámico detectado en plasma procedería de la hidrólisis del ácido dimetoxicinamoilquínico, siendo su contenido sustancialmente inferior al descrito por los citados autores (Nagy y cols., 2011; Farrell y cols., 2012). Otros estudios tomados como referencia tampoco han descrito la presencia de estos derivados en fluidos biológicos tras el consumo de café (Stalmach y cols., 2009; Redeuil y cols., 2011; Marmet y cols., 2014, entre otros).

Este conjunto de ácidos fenólicos libres o transformados en derivados de fase II comprende el 11,2% de la fracción de metabolitos excretados en orina tras el consumo de café, alcanzando el 12% en el caso del mate (Figura 4.53.). Este bajo porcentaje indica que la hidrólisis de los ácidos mono- y diacilquínicos, y su subsiguiente transformación en derivados de fase II, no es la ruta preferente de biotransformación de estos compuestos.

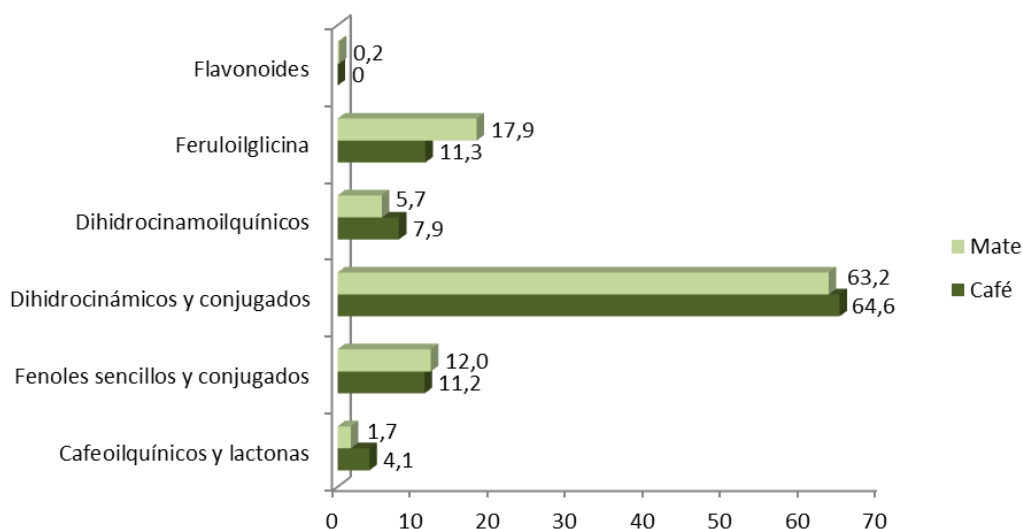


Figura 4.53. Comparación del porcentaje de eliminación urinaria de los principales grupos de metabolitos identificados en los estudios con café mezcla tostado/verde y yerba mate.

El papel clave que la microbiota del colon ejerce en el metabolismo y absorción de los ácidos mono- y diacilquínicos presentes en el café se puso claramente de manifiesto en el estudio desarrollado por Stalmach y cols. (2010) con individuos ileostomizados. Así, el contenido total de metabolitos excretados a lo largo de las 24 h siguientes a la ingesta de café instantáneo cayó un 70% en comparación con el registrado en un estudio con individuos con colon funcional (Stalmach y cols., 2009). Por

tanto, en base a estos resultados se desprende que sólo la tercera parte de los fenoles del café se absorberían en el intestino delgado, mientras que las dos terceras partes restantes alcanzarían el colon, lo que apoya el mayor contenido de metabolitos de origen microbiano registrados en este estudio.

En el grupo de metabolitos microbianos destacan los dihidroderivados de los ácidos cafeico y cumárico junto a sus derivados de fase II. Los compuestos más abundantes fueron los ácidos dihidroferúlico (312 nM con café, 306 nM con mate) y dihidrocafeico-sulfato (262 nM con café, 188 nM con mate). En ambas intervenciones, la sumade este grupo de metabolitos alcanzó concentraciones máximas cercanas a 1 μ M (854 nM con café y 759 nM con mate). Curiosamente, aunque ambas bebidas se tomaron disueltas en agua y sin acompañamiento de otros alimentos, cabe notar que los tiempos en que se alcanzaron las concentraciones plasmáticas máximas de estos metabolitos fueron mayores con el mate (T_{\max} 6,6-7,5 h, Tabla 4.3.10.) que con el café (T_{\max} 5,4-6,8 h, Tabla 4.34.). Estos compuestos, junto al resto de derivados de fase II fueron los metabolitos mayoritarios en orina, representando un contenido total equivalente al 64,6% en el estudio con café y 63,2% en la intervención con mate (Figura 4.53.).

Cabe destacar la significativa eliminación urinaria de los dihidroderivados de los hidroxicinamatos descritos en el presente trabajo por primera vez, los ácidos dihidrocafeoilquínico, dihidroferuloilquínico y dihidrocumaroilquínico. Estos metabolitos microbianos supusieron el 7,9% del total de compuestos eliminados en orina tras el consumo de café y el 5,7% tras la ingesta de mate (Figura 4.53.). Estos resultados de nuevo apoyan el papel clave del colon en la metabolización de los ácidos hidroxicinámicos del café.

A la vista de los contenidos individuales que se han ido indicando para los metabolitos de fase II, se desprende que la reacción de sulfatación seguida de la metilación fueron las rutas preferentes de metabolización, ocurriendo la reacción de glucuronidación en menor proporción, al igual que observaron Marmet y cols. (2014).

Se ha observado un comportamiento bifásico en las cinéticas plasmáticas de algunos metabolitos, entre los que destacan los ácidos dimetoxicinámico, ferúlico-4-glucurónido, ferúlico-4-sulfato, dihidroferúlico-4-glucurónido y dihidroferúlico-4-sulfato, lo que está de acuerdo con los resultados descritos por otros autores (Redeuil y cols., 2011). Habitualmente se suele relacionar este comportamiento con una recirculación

enterohepática, aumentando el tiempo de permanencia de estos compuestos en nuestro organismo, con el consiguiente beneficio en salud.

Un metabolito que merece especial interés por su abundancia en orina de los voluntarios es la feruloilglicina (14 μ moles tras 24 h en la intervención con café y hasta 26 μ moles tras el consumo de mate), cuya excreción con el minoritario isómero *isoferuloilglicina* representan el 11,3% y 17,9% de los metabolitos urinarios en las intervenciones con café y mate, respectivamente (Figura 4.53.). Considerando el contenido total de ácidos hidroxicinámicos ingeridos, estos valores representan el 2% y el 2,4% del total de la dosis de ácidos hidroxicinámicos tras el café y el mate, respectivamente. Estos valores están en línea con el 4% determinado por Stalmach y cols. (2014). Por ello, se ha propuesto a la feruloilglicina, junto con el ácido dihidrocafeico-3-sulfato (31,5 y 38,8 μ moles en 24 h con café y mate, respectivamente), como biomarcadores urinarios de ingesta de ácidos hidroxicinámicos, porque su alto contenido determinado en orina permitiría detectarlo incluso tras la ingesta de pequeñas cantidades de dichos compuestos. Otros metabolitos no mayoritarios, como los derivados de lactonas, se han propuesto como biomarcadores de consumo de café (tostado), dado que sus niveles incrementan significativamente y se correlacionan positivamente con la dosis ingerida de ácidos hidroxicinámicos (Stalmach y cols., 2014).

Para terminar con las rutas de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos, en este estudio se han identificado compuestos fenólicos más sencillos producto del catabolismo microbiano. Estos compuestos, relacionados con los ácidos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e hidrobenczoico (Figura 4.52.), no se han considerado para el cómputo total de metabolitos excretados por participar en otras vías de catabolismo, como se desprende de los valores basales de muchos de ellos, lo que supondría una sobreestimación de los metabolitos excretados. Así mismo, la cuantificación de estos compuestos suele implicar un gran sesgo debido a la gran variación interindividual, asociada a la microbiota intestinal propia de cada participante. No obstante, el ácido 3-hidroxihipúrico podría ser más específico del metabolismo de los compuestos fenólicos, dado que solamente derivaría de compuestos fenólicos que tienen un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo aromático, como el ácido cafeico y sus derivados, o flavanoles, entre otros (Rechner y cols., 2001).

Por último, la presencia de derivados de flavonoles en los fluidos biológicos tras el consumo de la yerba mate, kaempferol-glucurónido y metilquercetín-glucurónido, procedentes de kaempferol-ramnoglucósido y quercetín-ramnoglucósido (rutina),

respectivamente, mostraron la limitada biodisponibilidad de estos compuestos, que alcanzaron su máxima concentración plasmática (12 nM) a partir de las 4 h y se excretaron mayoritariamente en el intervalo de 4 a 8 h, lo que pone de manifiesto la implicación de la microbiota en la generación de las agliconas. Esto es coherente con la incapacidad de las enzimas β -glucosidasa del intestino delgado para hidrolizar el azúcar ramnosa, el cual sólo es liberado por la actividad de enzimas α -ramnosidasas, presentes en la microbiota intestinal. Cabe destacar el contenido tan pequeño determinado tanto en plasma como en orina de kaempferol-glucurónido y metilquercetín-glucurónido, a pesar de ingerir el equivalente a 16,2 mg de flavanoles con la infusión de yerba mate. A este respecto, Jaganath y cols. (2009) caracterizaron mediante un estudio *in vitro* una ruta preferente de biotransformación de rutina a quercetina, y ésta a compuestos más sencillos relacionados con el ácido hidroxifenilacético y floroglucinol. El trabajo mencionado avalaría el pequeño contenido de metilquercetín-glucurónido y el ligero aumento de compuestos relacionados con fenoles simples en el intervalo de 8 a 12 h, en particular floroglucinol. Por tanto, nuevamente destaca el papel clave de la microbiota colónica en el metabolismo de los flavonoles de la yerba mate. Cabe mencionar que, al contrario de lo observado para los ácidos hidroxicinámicos, en el caso de los flavonoles la ruta preferencial de metabolización fue la glucuronidación.

Valorando el total de metabolitos excretados en orina, se han cuantificado 126,4 μ moles para el estudio del café y 147,6 μ moles para el estudio de la yerba mate, lo que corresponde con el 15,4% y 13,2% respecto a la dosis ingerida de cada bebida (~818 μ moles para el café soluble mezcla tostado/verde y ~1118 μ moles para la yerba mate, respectivamente). En este cómputo, al igual que en el caso del cacao, no se tuvieron en cuenta aquellos fenoles simples incluidos en los grupos hidroxifenilpropiónico, hidroxifenilacético e hidroxibenzoico por considerar que su origen no es exclusivo de los ácidos hidroxicinámicos. El porcentaje excretado en la orina de los voluntarios del estudio de café se encuentra en línea con otros estudios similares en cuanto a dosis ingerida y diseño experimental (Stalmach y cols., 2009, 2014).

La ligera menor recuperación observada en la orina del estudio con yerba mate se podría atribuir al mayor contenido de derivados diacilquínicos (27,8% y 10,3% para mate y café, respectivamente). En ese sentido y como ya se ha comentado, estos compuestos no son biodisponibles a nivel intestinal, aunque no están libres de ser hidrolizados por acción de las esterasas del intestino delgado. Sin embargo, dicha hidrólisis no es la ruta preferente de metabolización de los hidroxicinamatos, que

mayoritariamente alcanzan el colon dónde, en particular los derivados diacilquínicos, podrían participar en otras rutas de biodegradación cuyos catabolitos no se estén teniendo en cuenta, con la consiguiente merma de su recuperación. Por otra parte, la yerba mate contiene un 4,1% de flavonoles, fundamentalmente rutina, no biodisponibles en el intestino delgado y que alcanzarían el colon, lo que en parte justificaría también la menor recuperación observada en la intervención con la yerba mate, no pudiéndose descartar que los flavonoles presentes en la yerba mate puedan interferir en la absorción de los ácidos hidroxicinámicos.

A la vista de los resultados se puede resumir que los ácidos hidroxicinámicos contenidos en el café soluble mezcla tostado/verde y en la yerba mate son parcialmente biodisponibles y extensamente metabolizados a derivados sulfatados y metilados, con especial contribución de la microbiota colónica en su metabolismo.

5. DISCUSIÓN GENERAL

La biodisponibilidad de los compuestos en el tracto gastrointestinal humano, entendida como la fracción del compuesto ingerido que aparece en la circulación sanguínea, bien como la molécula original, bien como metabolitos derivados de la misma, se considera un aspecto clave para el estudio y comprensión de los efectos de los componentes de los alimentos en la salud.

El objeto final de cualquier estudio de biodisponibilidad es conocer qué ocurre con los compuestos en el organismo humano una vez son ingeridos. Aunque los ensayos en humanos son el objetivo final de los estudios de biodisponibilidad, pueden no proporcionar una información completa, lo que hace necesario su complemento con otros modelos alternativos, como los modelos *in vitro*. Estos modelos permiten estudiar los mecanismos a nivel celular y molecular implicados en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. En la misma línea, Kay (2010) argumentaba que la investigación nutricional en compuestos bioactivos como los flavonoides, requiere un enfoque multidisciplinar, implicando estudios epidemiológicos, de intervención y celulares/moleculares. Este autor, además, incidía en la importancia del estudio de la farmacocinética y el metabolismo de los compuestos circulantes en el organismo tras el consumo del alimento, con objeto de testar mediante modelos *in vitro* los metabolitos mayoritarios y potencialmente bioactivos, que en la mayoría de las ocasiones son distintos a la forma natural presente en el alimento.

En la presente Tesis se ha pretendido aportar nuevos datos acerca de la biodisponibilidad de los flavanoles de cacao y de los ácidos hidroxicinámicos de café y yerba mate. Para ello, se han realizado dos aproximaciones que incluyen un abordaje *in vitro* con un modelo de células epiteliales de colon y un acercamiento *in vivo* mediante estudios de intervención agudos con voluntarios sanos. Previamente, se caracterizaron los productos que los voluntarios participantes en los estudios de intervención beberían para conocer su composición fenólica y poder relacionarla con la naturaleza de los metabolitos producidos, su farmacocinética y recuperación urinaria.

De esta manera, en primer lugar se caracterizaron los compuestos fenólicos presentes en las tres bebidas estudiadas: productos de cacao soluble, café mezcla tostado/verde y yerba mate. Tanto los productos solubles de cacao como el café son ampliamente consumidos en nuestro país. Por su parte, la yerba mate, extensamente consumida en países latinoamericanos, es una bebida que está aumentando su aceptación en nuestras latitudes al relacionarse con algunos efectos beneficiosos en

salud. Estas tres bebidas han mostrado tener una elevada concentración de compuestos fenólicos, lo que permite considerarlas como fuentes importantes de estos compuestos en la dieta. Los productos solubles de cacao, muy populares en nuestro país y que, consumidos en dosis nutricionales, aportan cantidades notables de polifenoles, mayoritariamente flavanoles. Además, la incorporación de productos como café mezcla tostado/verde y la yerba mate en la dieta habitual puede suponer un incremento de la ingesta de compuestos fenólicos en general y de ácidos hidroxicinámicos en particular, que podría tener efectos beneficiosos sobre la salud de la población.

A pesar de la riqueza de estos alimentos en compuestos fenólicos, su biodisponibilidad se perfila como aspecto clave para poder explicar sus efectos positivos en salud. Por ello, se comenzó con la realización de un estudio *in vitro* de transporte y metabolismo intestinal utilizando la línea celular Caco-2. Estas células se diferencian en cultivo dando lugar a una monocapa polarizada con las características morfológicas y funcionales de los enterocitos maduros (Hidalgo y cols., 1989), con expresión de transportadores similar cualitativamente a la del intestino delgado (Maubon y cols., 2007), por lo que su uso como modelo predictor en el estudio de absorción y metabolismo de fármacos (y xenobióticos) está muy extendido. Para este trabajo se han utilizado los flavanoles y ácidos hidroxicinámicos más representativos de las bebidas ricas en compuestos fenólicos estudiadas. Así, se escogieron flavanoles de cacao con distintas estructuras químicas, como la epicatequina (monomérica) y procianidina B2 (dimérica) y otro flavanol, el epicatequín-3-galato, que, aunque no está presente en el cacao, su esterificación con ácido gálico podría ser de interés en la comprensión de la absorción y metabolismo de estos compuestos. También se seleccionaron los ácidos hidroxicinámicos 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico) y el diéster 3,5-dicafeoilquínico.

Aunque las células Caco-2 representan un modelo fiable para afrontar este tipo de estudios, el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), utilizado para el mantenimiento de las células, influye negativamente en la estabilidad de los polifenoles, como se ha comentado a lo largo de este trabajo, afectando de distinta forma en función de la estructura química de cada compuesto (Xiao y Hogger, 2015) y el pH del medio (Narita y Inouye, 2013). En ese sentido, se ha demostrado que el medio de cultivo favorece la isomerización de los compuestos estudiados, lo que ha dificultado conocer la implicación de las células en este proceso. De la misma manera, la presencia de epicatequina junto con el dímero PB2 en la misma disolución acuosa y su evolución en las condiciones experimentales en ausencia de células sugirió la incapacidad de las

células Caco-2 para hidrolizar este compuesto, contrario a lo que habían descrito otros autores (Hemmerbach y cols., 2013).

Aparte de estos fenómenos, principalmente atribuidos al medio de cultivo, se observó una metabolización relativamente escasa en el modelo de epitelio intestinal, con una ruta preferencial de metilación y sulfatación en el caso de los flavanoles, mientras que para los ácidos hidroxicinámicos las rutas prioritarias fueron de desesterificación seguida de la metilación. No se detectaron metabolitos glucuronidados para ninguno de estos compuestos; tampoco se identificaron derivados sulfatados de los ácidos hidroxicinámicos, a pesar de que las células cuentan con los sistemas enzimáticos necesarios para ello (Galijatovic y cols., 2001). En general, se observó un rendimiento reducido en las reacciones de metabolización y una escasa captación por los enterocitos, lo que sugiere que la mayor parte de los compuestos alcanzarían segmentos posteriores del tracto digestivo como el colon, donde serían susceptibles a la acción de la microbiota, modificando tanto la estructura química como su bioactividad. Por último, el estudio de transporte mostró un mecanismo de eflujo preferente para los flavanoles y de absorción para los ácidos hidroxicinámicos. El mecanismo de eflujo para los flavanoles podría comprometer su absorción, limitando su paso a la circulación sistémica.

Una vez caracterizada la absorción y metabolización de los polifenoles en modelos *in vitro*, se procedió a evaluar la biodisponibilidad de los flavanoles y ácidos hidroxicinámicos en ensayos *in vivo*, mediante estudios de intervención agudos en voluntarios humanos sanos. Estos estudios contribuyeron a la comprensión de cómo los compuestos fenólicos objeto de estudio en el seno de alimentos que naturalmente los contienen, se absorben, metabolizan y excretan en orina.

El consumo de los dos productos de cacao, uno de mayor contenido fenólico que el otro (CC y CC-PP, respectivamente), ofreció un perfil metabólico equivalente al contenido de **flavanoles** ingeridos, con una ligera respuesta dosis-dependiente. Considerando únicamente los metabolitos de fase II, se detectaron preferentemente derivados sulfatados y/o metilados del monómero epicatequina, seguidos de derivados glucuronidados. Este conjunto de compuestos mostraron su máxima concentración en plasma a un tiempo relativamente corto (1,0-1,5 h), siendo excretados mayoritariamente antes de las 4 h post-ingesta de acuerdo a una absorción en el intestino delgado. Sin embargo, la recuperación apenas alcanzó un 11-13% (productos CC-PP y CC, respectivamente). Estos resultados están de acuerdo con lo hallado en los

estudios *in vitro*, en cuanto a la naturaleza preferente de los metabolitos caracterizados y la reducida absorción a nivel intestinal (transporte preferencial de eflujo en el modelo de células Caco-2). Cabe destacar que la proporción de los metabolitos glucuronidados en el estudio *in vivo* apenas alcanzó un 0,7% del total de los metabolitos identificados. Esta baja proporción de derivados glucuronidados justifica la no detección de los mismos en el modelo *in vitro*, bien porque de formarse a nivel intestinal lo haría en cantidades mínimas, por debajo del límite de detección, bien porque la reacción de glucuronidación se dé preferentemente a nivel hepático. Otro aspecto relevante al comparar los estudios *in vitro* e *in vivo* fue la presencia de epicatequina libre en el compartimento basolateral en los primeros, mientras que no se detectó como tal en los estudios *in vivo*. Sin perder de vista que los modelos *in vitro* son una simplificación de los organismos, estos resultados nos podría estar indicando que la epicatequina se metabolizaría extensivamente en otros órganos como el hígado o riñón.

En cualquier caso, ambos estudios coincidieron en señalar al colon como punto clave en la biotransformación de los flavanoles del cacao. En ese sentido, algunos trabajos han aportado datos sobre la caracterización de metabolitos de origen microbiano derivados de los flavanoles como las hidroxifenilvalerolactonas (Urpí-Sarda y cols., 2009a) y sus subsiguientes productos de transformación en derivados del ácido hidroxifenilvalérico (Llorach y cols., 2009) en estudios con humanos. Además de estos metabolitos ya descritos, en el presente trabajo se han identificado por primera vez otros metabolitos pertenecientes a las familias hidroxifenilvalerolactona e hidroxifenilvalérico, así como derivados de fase II formados tras su absorción colónica. También se caracterizó otra familia de compuestos procedentes de la deshidroxilación en el C4' del anillo B del flavanol, así como sus derivados conjugados de fase II. Estos compuestos mostraron cinéticas plasmáticas más tardías, como señalaban los T_{max} en torno 5-6 h tras el consumo de cacao, con excreción abundante en el intervalo de 4 a 8 h post-ingesta, señalano a su origen colónico. Aunque muchos de estos compuestos estuvieron presentes en orina a tiempo basal, su contenido aumentó significativamente tras la ingesta de cacao, lo que evidenció su implicación en el metabolismo de los flavanoles ingeridos con ambos productos de cacao. Por ello, habría que considerar este grupo de metabolitos para obtener un valor de biodisponibilidad de flavanoles más acorde con la realidad, al contrario de lo que viene ocurriendo en este tipo de estudios, dónde el cálculo de recuperación se basa estrictamente en los metabolitos de fase II de origen intestinal (derivados sulfatados, metilados y glucuronidados de epicatequina)

(Actis-Goretta y cols., 2010 y Ottaviani y cols., 2010). En este trabajo se ha estimado una recuperación adicional de aproximadamente un 25% al tener en cuenta este conjunto de metabolitos, lo que sumado al porcentaje aportado por los metabolitos de fase II derivados de epicatequina supone una recuperación de en torno al 36% de los flavanoles ingeridos con el cacao soluble.

Acorde también con los resultados obtenidos en el modelo celular, donde apenas se observaba una mínima captación y metilación del dímero PB2 por las células intestinales pero no su transporte al compartimento basolateral, en el estudio *in vivo* no se observó PB2 en los fluidos biológicos. Por tanto, este dímero no sería absorbido en el tracto gastrointestinal, aunque sería objeto de metabolismo por la microflora colónica, como evidenció la identificación en orina del ácido 2,4-dihidroxifenil-2pentenoico (DHPen), metabolito procedente exclusivamente de la degradación de procianidina dimérica y que se describe aquí por primera vez en un estudio en humanos. Igualmente, el resto de metabolitos microbianos descritos pueden proceder no sólo de la epicatequina libre no absorbida en tramos intestinales superiores, sino también de la producida tras la hidrólisis de las procianidinas diméricas del cacao (Figura 4.3.10.).

La biodisponibilidad de **ácidos hidroxicinámicos** se estudió tras la ingesta de dos bebidas ricas en estos fenoles, café soluble mezcla tostado/verde y una infusión de yerba mate. Estos alimentos mostraron una gran coincidencia en cuanto a la naturaleza de los componentes constituyentes de la fracción fenólica, lo que dio lugar a semejantes perfiles metabólicos tras la ingesta de ambas bebidas.

En contra de lo observado con los flavanoles de los productos solubles de cacao, una pequeña proporción de ácidos monoacilquínicos se absorbió sin sufrir transformación alguna, alcanzando en orina porcentajes de 3,3% y 1,6% referido al total de metabolitos tras el consumo de café y mate, respectivamente. El resto de metabolitos que se identificaron en plasma y orina se encontraban preferentemente como derivados sulfatados y/o metilados, siendo minoritarias las formas glucuronidadas. Al igual que ocurrió con los flavanoles del cacao, los productos derivados de la absorción intestinal, y metabolismo exclusivamente por acción de enzimas de fase I y II generando ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico y *p*-cumarico) y sus derivados glucuronidados y sulfatados, alcanzaron rápidamente (T_{max} 0,5-1,2 h) la concentración máxima y se excretaron en tiempos relativamente cortos tras la ingesta (preferentemente en el intervalo de 0 a 4 h), consistente con su absorción en el intestino delgado. Este conjunto de metabolitos representaron un 11,2% y 12% del

total de metabolitos tras el consumo de café y mate, respectivamente. A esta cifra hay que sumar los porcentajes correspondientes a las lactonas, absorbidas intactas y excretadas como derivados sulfatados de cafeoilquínico-lactonas, aunque representaron porcentajes minoritarios (0,8% y 0,1% en café y mate, respectivamente).

Se observaron semejanzas entre estos resultados y aquellos obtenidos con las células Caco-2. En el modelo *in vitro* también se comprobó la absorción directa del ácido 5-cafeoilquínico junto a su hidrólisis a ácido cafeico y metilación a ácido feruloilquínico. Por el contrario, se comprobó que el ácido 3,5-dicafeoilquínico es capaz de atravesar la barrera del epitelio intestinal; el no haber detectado compuestos diacilquínicos en orina o plasma, hecho que está de acuerdo con estudios recientes (Stalmach y cols., 2009, 2014; Redeuil y cols., 2011), indicaría que bien estos compuestos se hidrolizan en otros órganos tras su absorción intestinal, menos probable pues hasta la fecha no se ha descrito la presencia de enzimas esterases en otros órganos aparte del intestino delgado y colon (Williamson y cols., 2011), o bien que la interacción con otros fenoles en el alimento favorece su hidrólisis frente la absorción directa del ácido 3,5-dicafeoilquínico. Adicionalmente, junto al ácido 3,5-dicafeoilquínico se detectaron los ácidos cafeoilquínico, feruloilquínico, cafeico y ferúlico en el estudio *in vitro*, de acuerdo a las reacciones de desesterificación y metilación preferentes para estos compuestos en el intestino delgado. Ninguno de los ácidos mono- y diacilquínicos dio lugar a la forma de derivados glucuronidados ni sulfatados, éstos últimos predominantes en el estudio *in vivo*. Puesto que todas las muestras de los estudios *in vitro* e *in vivo* se analizaron mediante LC-QTOF, se pueden descartar diferencias atribuibles al método de análisis. Además, las células Caco-2 disponen de los sistemas enzimáticos necesarios para estas reacciones de conjugación, como se ha visto en el estudio con flavanoles. Por tanto, los resultados *in vitro* sugieren que las reacciones de glucuronidación y sulfatación de ácidos hidroxicinámicos ocurrirían preferentemente en otros órganos como el hígado y/o riñón. Por último, cabe destacar que la escasa tasa de transferencia a través de las células Caco-2 puso de manifiesto una limitada absorción intestinal, como efectivamente se pudo confirmar en el estudio *in vivo*, donde fueron mayoritarios los metabolitos microbianos.

Precisamente la búsqueda de metabolitos de origen microbiano llevó a la caracterización de un amplio grupo de ácidos dihidrocinámicos (dihidrocafeico, dihidroferúlico y dihidrocumárico) y sus derivados de fase II junto con feruloilglicina, todos ellos con T_{\max} entre 5,4 y 7,5 h. Estos compuestos fueron ampliamente excretados

(76-81% del total de los metabolitos urinarios) en el intervalo comprendido entre 4 y 8 h post-ingesta, siendo los ácidos dihidrocafeico-3-sulfato, dihidroferúlico, dihidroferúlico-4-sulfato y feruloilglicina los metabolitos mayoritarios. Finalmente, se ha de destacar el hecho de que por primera vez en un estudio *in vivo* se ha caracterizado un grupo de compuestos en orina procedentes de la reducción microbiana de los compuestos monoacilquínicos, los ácidos dihidroferuloil-, dihidrocafeoil- y dihidro-*p*-cumaroilquínico, siendo excretados fundamentalmente entre las 8 y 12 h tras la ingesta de ambas bebidas (café y mate), y que supusieron hasta un 8% del total de los metabolitos microbianos.

El 4,1% de la yerba mate la compone un grupo de fenoles, flavonoles, principalmente rutina y pequeñas cantidades de kaempferol-ramnoglucósido. Dado que el intestino delgado carece de la enzima ramnoglucosidasa necesaria para la hidrólisis de estos compuestos, su destino principal es el colon, dónde, ante la presencia de los sistemas enzimáticos adecuados, se hidrolizarían para generar quercetina y kaempferol. Estas agliconas serían mínimamente biodisponibles, como lo demuestra los contenidos tan pequeños detectados de glucuronidados de ambos compuestos junto con metilquercetín-glucurónido, siendo extensivamente biotransformados en moléculas más sencillas relacionadas con el ácido hidroxifenilacético y floroglucinol.

El cómputo total de metabolitos en ambas intervenciones dio lugar a una recuperación de 15,4% y 13,2% referido a los fenoles ingeridos de café mezcla tostado/verde y yerba mate, respectivamente. La diferencia es pequeña, atendiendo a las variaciones interindividuales tan acusadas en estos tipos de estudios.

Comparando los estudios de biodisponibilidad de flavanoles de los productos de cacao con los ácidos hidroxicinámicos de café y mate, sin considerar el metabolismo microbiano, sino únicamente aquellos metabolitos de fase II generados tras su absorción intestinal, se observó mayor recuperación para los flavanoles que para los ácidos hidroxicinámicos, contrario al comportamiento de eflujo descrito para los primeros en los modelos *in vitro*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que durante la absorción *in vivo* intervienen múltiples factores de interacción que alteran el comportamiento individual observado en los modelos *in vitro* y que podrían facilitar la absorción de flavanoles descrita en los estudios *in vivo*.

Respecto a la mencionada diferencia interindividual, es importante mencionar la existencia de polimorfismos genéticos de las enzimas de fase I (citocromo P-450) y de fase II (catecol-*O*-metiltransferasa, UDP-glucuronosiltransferasa y sulfotransferasa) (Scalbert y Williamson, 2000), así como de los sistemas de transporte en el epitelio

intestinal humano (Manach y cols., 2004), lo que podría justificar parte de esas diferencias en la producción de metabolitos. Asimismo, la microbiota, clave en el metabolismo de los fenoles, es específica de cada individuo y muy vulnerable a cambios inducidos por la dieta, estilo de vida y/o cambios fisiológicos (edad, sexo, estado de salud), lo que condiciona significativamente la producción de unas familias de metabolitos microbianos frente a otras (Cueva y cols., 2013) y, por tanto, justifica en parte las diferencias interindividuales observadas en estos estudios.

Por otra parte, las recuperaciones reportadas siguen siendo modestas, por lo que al margen de la excreción urinaria no se podría descartar otras vías de eliminación como la excreción biliar. En ese sentido, se ha señalado una eliminación predominante vía biliar para algunos compuestos fenólicos como la quercetina (Krogholm y cols., 2010). La bioactividad de estos compuestos vendría condicionada por su distribución y biodisponibilidad tisular que, aunque mínimamente, podría compensar parte del compuesto no recuperado en orina; sin embargo, este aspecto precisaría estudios adicionales para valorar cuantitativamente lo que supone esta fracción de compuestos bioactivos tisulares. Además, gran parte de los metabolitos identificados, en particular los microbianos, no recuperaron los niveles basales al cabo de las 24 h, lo que indica la necesidad de tomar muestras de sangre a tiempos más largos tras la ingesta, así como de prolongar la recogida de orina a fin de completar el perfil de metabolitos en plasma y orina y determinar la recuperación urinaria con mayor precisión. No debemos olvidar que estos estudios se han basado en un enfoque metabolómico “dirigido”, por lo que no se puede descartar la existencia de metabolitos que, derivando de los fenoles ingeridos, no se hayan considerado en el cálculo de la recuperación. Por último, parte de los compuestos no absorbidos se eliminarán a través de las heces, por lo que su recogida y evaluación debería contribuir a completar el conocimiento sobre la biodisponibilidad y metabolización de los fenoles.

Los resultados de ambos estudios revelan, en general, una metabolización exhaustiva de los compuestos fenólicos, siendo extensivamente transformados en derivados conjugados de fase II, incluidos aquellos de origen microbiano.

Aunque la metabolización de los compuestos fenólicos por acción de las enzimas de fase II es una herramienta que nuestro organismo emplea para rebajar la toxicidad de los xenobióticos, existe controversia acerca de si estos metabolitos mantienen o no la actividad biológica que se asocia a sus precursores presentes en los alimentos. Así, según Cren-Olive y cols. (2003) algunos metabolitos metilados de catequina mostraron

menor capacidad frente a la oxidación de LDL que la propia catequina. También otros estudios con metabolitos de epicatequina muestran menor capacidad antioxidante (Dueñas y cols., 2010). Numerosas evidencias *in vitro* han descrito una mayor actividad biológica para la quercetina que para su derivado glucuronidado, el metabolito más abundante en sangre (revisado en Pérez-Vizcaíno y cols., 2012). Si este fenómeno ocurriera así en el organismo humano, no permitiría explicar los efectos en salud observados tras el consumo de dietas ricas en compuestos fenólicos. Aunque los resultados *in vitro* a veces distan de lo que realmente ocurre *in vivo*, se han postulado mecanismos de desconjugación *in vivo* que podrían justificar el efecto biológico asignado a ciertos polifenoles (Menéndez y cols., 2011; Tomás-Barberán y Andrés-Lacueva, 2012). De la misma manera, Pérez-Vizcaíno y cols. (2012) han propuesto que el proceso de conjugación-desconjugación en los tejidos es un ciclo reversible, que permite justificar la hidrólisis del glucuronidado de la quercetina a la aglicona, el compuesto activo y con propiedades vasodilatadoras, facilitando así su acumulación en los tejidos. De la misma manera, recientemente se ha descrito una disminución de las formas conjugadas de hidroxitirosol en paralelo al aumento del propio hidroxitirosol en los glóbulos rojos de ratas hasta las seis horas de la ingesta de un extracto rico en fenoles del alperujo, sugiriendo una hidrólisis intracelular a la forma desconjugada (Rubio y cols., 2014a).

Se han postulado diferentes compuestos derivados del metabolismo microbiano como posibles biomarcadores de la ingesta tanto de cacao como de café. Los biomarcadores, en un contexto nutricional, son indicadores de procesos biológicos o respuestas metabólicas a una intervención nutricional y su utilización podrían ayudar en la estimación de un consumo dietético (Bingham, 2002). En el caso de los compuestos fenólicos, el empleo de encuestas dietéticas no es un medio fiable para la estimación del consumo de un alimento concreto (Spencer y cols., 2008). Por ello, cada vez es más habitual recurrir a la monitorización de un producto metabólico, relacionado de forma indiscutible con el alimento, para controlar sin sesgo el consumo o no de un determinado alimento. Así, los productos microbianos como dihidroxifenilvalerolactona, procedente de la epicatequina, o el ácido dihidrocafeico-sulfato y la feruloilglicina generados por metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos, se han postulado como posibles biomarcadores del consumo de cacao (Urpí-Sarda y cols., 2009a) y de café (Stalmach y cols., 2009), respectivamente. Para el caso particular del café tostado, se han propuesto como biomarcadores de consumo los derivados de lactonas, dado que

sus niveles incrementan de forma directa a la dosis ingerida de ácidos hidroxicinámicos (Stalmach y cols., 2014).

Considerando lo anteriormente expuesto, se puede aceptar que el modelo de absorción y metabolización *in vitro* con células Caco-2 es una aproximación a los estudios en humanos que facilita la comprensión de la biodisponibilidad local de los fenoles de manera sustancialmente más económica y sencilla. Sin embargo, los resultados que se obtienen de cualquier estudio *in vitro* conllevan un cierto margen de discrepancia, por la imposibilidad de cubrir todas las variables que habitualmente intervienen en un estudio *in vivo*.

Finalmente, con la realización de esta Tesis Doctoral se ha pretendido aportar conocimiento sobre la metabolización y la biodisponibilidad de algunos compuestos fenólicos, así como la identificación de los metabolitos producidos tras la ingesta de alimentos con reconocidas propiedades en salud, metabolitos que probablemente sean responsables de los efectos beneficiosos reportados en estudios epidemiológicos. En líneas generales, a partir de estos estudios se desprende que tanto los flavanoles del cacao como de los ácidos hidroxicinámicos del café y yerba mate son parcialmente biodisponibles y extensivamente metabolizados a compuestos originados en su gran mayoría por acción de la microbiota colónica.

A pesar de los avances realizados en esta temática, todavía se hace necesario desarrollar más estudios de intervención en humanos, tanto *agudos* para terminar de comprender las lagunas que quedan acerca de su biodisponibilidad, como *crónicos* para conocer realmente sus efectos biológicos a largo plazo.

Respecto a los estudios de biodisponibilidad, sería aconsejable abordarlos con un enfoque metabolómico “no dirigido”, con objeto de completar el perfil metabólico de estos compuestos e identificar nuevos biomarcadores útiles a nivel individual y poblacional.

Otro aspecto crítico en el desarrollo de estos estudios es la no homogeneidad de métodos analíticos para la caracterización de fenoles, tanto en alimentos como en fluidos biológicos, por lo que la estandarización de protocolos permitiría una comparación más exacta entre datos de los componentes de los alimentos y de los metabolitos producidos.

Los estudios con animales de experimentación como aproximación intermedia entre los estudios en humanos y los estudios *in vitro*, considerando que la extrapolación de los resultados ha de ser cautelosa por las diferencias entre las especies, se perfilan

como una herramienta muy útil para la elucidación de la distribución preferente de los metabolitos en los tejidos, permitiendo identificar órganos diana de dichos metabolitos y caracterizar su bioactividad.

Por otra parte, más estudios *in vitro* con combinaciones de compuestos fenólicos u otros componentes de los alimentos (fibra, grasa, proteínas, etc.), como sistemas modelo de la propia matriz alimentaria, podrían explicar fenómenos sinérgicos o antagónicos relacionados con la absorción.

Una vez caracterizados los metabolitos mayoritarios derivados de los polifenoles de los alimentos, se requiere el desarrollo de estudios para evaluar su *bioactividad*, responsable de los efectos positivos tras la ingesta de alimentos ricos en compuestos fenólicos en la prevención de ciertas patologías.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de los resultados de la presente Tesis Doctoral se recogen a continuación.

PRIMERA

La caracterización de la fracción fenólica de dos productos solubles de cacao [cacao control (CC) y cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP)], el café mezcla tostado/verde y la yerba mate mediante métodos complementarios, ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu y cromatografía líquida (HPLC-DAD y LC-MS), pone de manifiesto la importancia de estos productos como fuentes dietéticas de compuestos fenólicos, en concreto de flavanoles para los productos solubles de cacao (hasta 2,7 mg/g en el cacao rico en polifenoles) y de ácidos hidroxicinámicos para el café mezcla tostado/verde (85,1 mg/g) y la yerba mate (80,6 mg/g), conteniendo ésta hasta 3,3 mg/g de flavanoles.

SEGUNDA

En un modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano con células Caco-2 se ha observado que la diferente estructura química de los flavanoles (epicatequina, epicatequín-3-galato y procianidina B2) y ácidos hidroxicinámicos (ácidos 5-cafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico) afecta a su transporte y metabolización. El transporte a través de la monocapa celular es limitado (1% epicatequina, 2% epicatequín-3-galato, 5% ácido 5-cafeoilquínico y 8% ácido 3,5 dicafeoilquínico) y se ve modulado por un mecanismo de eflujo para los flavanoles y de absorción para los ácidos hidroxicinámicos. Los compuestos epicatequina y epicatequín-3-galato han seguido principalmente vías metabólicas de metilación y en menor medida de sulfatación. Los ácidos 5-cafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico han sido principalmente desesterificados y metilados por las células Caco-2. La procianidina B2 no se hidroliza, aunque se absorbe mínimamente en su forma libre y es metabolizada a su derivado metilado.

En general, los flavanoles y ácidos hidroxicinámicos son escasamente absorbidos en el modelo *in vitro* de epitelio intestinal y son susceptibles a la acción de enzimas de fase II.

TERCERA

El consumo de dos productos solubles de cacao [cacao control (CC) y cacao enriquecido en polifenoles (CC-PP)] por voluntarios sanos muestra que los flavanoles son parcialmente biodisponibles en el intestino delgado y extensivamente metabolizados a derivados de fase II sulfatados y/o metilados, siendo minoritaria la glucuronidación. Los metabolitos plasmáticos de epicatequina han mostrado una relación dosis-dependiente, cuyas concentraciones máximas se alcanzan a tiempos cortos tras la ingesta (1,0-1,5 h). Estos compuestos se excretan mayoritariamente antes de las 4 h post-ingesta, acorde a su absorción preferentemente intestinal, y representan el 13% y 11% del total de los metabolitos excretados tras la ingesta de CC y CC-PP, respectivamente.

CUARTA

La microflora colónica juega un papel clave en el metabolismo de los flavanoles del cacao. Se han caracterizado los metabolitos microbianos de las series derivadas de la hidroxifenilvalerolactona y del ácido valérico, junto con sus derivados de fase II, siendo el compuesto más abundante dihidroxifenilvalerolactona-3'-sulfato. Estos compuestos han mostrado cinéticas plasmáticas cuyos T_{max} fueron más tardíos, en torno a 5-6 h post-ingesta, y eliminación urinaria mayoritaria en el intervalo de 4 a 8 h, de acuerdo con su origen colónico.

El contenido total de estos metabolitos en orina (24,6 y 83,8 μ moles para CC y CC-PP, respectivamente) evidencia una relación dosis-dependiente y su consideración en el cálculo de la excreción total de metabolitos supone una recuperación total de 35,9% y 35,6%, respectivamente, de la dosis ingerida de flavanoles.

QUINTA

Los ácidos hidroxicinámicos presentes en el café mezcla tostado/verde y la yerba mate son parcialmente biodisponibles y extensivamente metabolizados. Se han identificado en los fluidos biológicos (plasma y orina) derivados monoacilquínicos sin metabolizar (ácidos cafeoil-, feruloil-, *p*-cumaroilquínico), productos derivados de su hidrólisis (ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico), así como derivados de fase II (sulfatados, metilados y, en menor medida, glucuronidados). Además, se han identificado derivados sulfatados de

lactonas del ácido cafeoilquínico. Estos metabolitos han alcanzado su concentración máxima en plasma tras 0,5-2,1 h post-ingesta, y se han excretado mayoritariamente antes de las 4 h post-ingesta. Este conjunto de metabolitos resultantes de la absorción en el intestino delgado representa un 15,3% y 13,7% del total de metabolitos excretados tras la ingesta de café y mate, respectivamente.

SEXTA

La microbiota también tiene un papel predominante en el metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos. Así, los derivados reducidos de los ácidos hidroxicinámicos (dihidrocafeico, dihidroferúlico y dihidrocumárico) y sus conjugados de fase II, además de feruloilglicina e isoferuloilglicina, son los metabolitos mayoritarios. Estos compuestos alcanzan su concentración plasmática máxima entre 5,4 y 7,5 h, y se excretan ampliamente en el intervalo comprendido entre 4 y 8 h post-ingesta, siendo los metabolitos mayoritarios (75,9% y 81,2% del total de los metabolitos urinarios tras la ingesta de café y mate, respectivamente). Los principales compuestos eliminados en orina fueron los ácidos dihidrocafeico-3-sulfato, dihidroferúlico, dihidroferúlico-4-sulfato y feruloilglicina.

Además, por primera vez en un estudio *in vivo*, se han identificado los ácidos dihidroferuloil-, dihidrocafeoil- y dihidro-*p*-cumaroilquínico, excretados en orina fundamentalmente entre las 8 y 12 h tras la ingesta de café mezcla tostado/verde y yerba mate, suponiendo un 7,9% y 5,7%, respectivamente, del total de los metabolitos urinarios.

Adicionalmente, se han identificado derivados de fase II de flavonoles (kaempferol y quercetina) generados tras el consumo de yerba mate y cuyos parámetros farmacocinéticos confirman su origen microbiano.

La excreción urinaria total de los ácidos hidroxicinámicos (126,4 y 147,6 μ moles respectivamente) correspondió con una recuperación del 15,4% para el café mezcla tostado/verde y del 13,2% para la yerba mate, respecto a las dosis de polifenoles ingeridas de cada bebida.

CONCLUSION GENERAL

Los compuestos fenólicos naturalmente presentes en cacao, café mezcla tostado/verde y yerba mate, o suplementadas en un producto de cacao, son parcialmente biodisponibles y extensivamente metabolizados tras la ingesta de dosis nutricionales y realistas, con una especial implicación de la microbiota colónica en su metabolismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Actis-Goretta, L., Leveques, A., Giuffrida, F., Romanov-Michailidis, F., Viton, F., Barron, Dueñas-Paton, M., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Williamson, G., Dionisi, F. (2012). Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radical Biology & Medicine*, *53*(4), 787–795.
- Actis-Goretta, L., Leveques, A., Rein, M.T., Teml, A., Schafer, C., Hofmann, U., Li, H., Schwab, M., Eichelbaum, M., Williamson, G. (2013). Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (-) epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. *American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(4), 924–933.
- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, *2*(4), 875–877.
- Alakomi, H.L., Puupponen-Pimia, R., Aura, A.M., Helander, I.M., Nohynek, L., Oksman-Caldentey, K.M., Saarela, M. (2007). Weakening of salmonella with selected microbial metabolites of berry-derived phenolic compounds and organic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(10), 3905–3912.
- Albarraçín, S.L., Stab, B., Casas, Z., Sutachan, J.J., Samudio, I., González, J., Gonzalo, L., Capani, F., Morales, L., Barreto, G.E. (2012). Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutritional Neuroscience*, *15*(1), 1–9.
- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science.
- Almoosawi, S., Fyfe, L., Ho, C., Al-Dujaili, E. (2010). The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *British Journal of Nutrition*, *103*(6), 842–850.
- Alonso-Salces, R.M., Guillou, C., Berrueta, L.A. (2009). Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collision induced dissociation and tandem mass spectrometry on a triple quadrupole for the on – line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *23*(3), 363–383.
- Andersen, T., Fogh, J. (2001). Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, *14*(3), 243–250.
- Andrade, P.B., Leitao, R., Seabra, R.M, Oliveira, M.B., Ferreira, A. (1998). ,3,4-Dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Food Chemistry*, *61*(4), 511–514.

- Andreasen, M.F., Kroon, P.A., Williamson, G., García-Conesa, M.T. (2001). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5679–5684.
- Andrés-Lacueva, C., Monagas, M., Khan, N., Izquierdo-Pulido, M., Urpí-Sarda, M., Permanyer, J., Lamuela-Raventós, R.M. (2008). Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3111–3117.
- Andújar, I., Recio, M.C., Giner, R.M., Ríos, J.L. (2012). Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, Article ID 906252, 1–23.
- Appeldoorn, M.M., Vincken, J.P., Aura, A.M., Hollman, P.C., Gruppen, H. (2009). Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 1084–1092.
- Arranz, S., Valderas-Martínez, P., Chiva-Blanch, G., Casas, R., Urpí-Sarda, M., Lamuela-Raventós, R.M., Estruch, R. (2013). Cardioprotective effects of cocoa: clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(6), 936–947.
- Arts, I.C., Hollman, P.C., Bueno de Mesquita, H.B., Feskens, E.J., Kromhout, D. (2001). Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *International Journal of Cancer*, 92(2), 298–302.
- Arts, I.C., Jacobs, D.R.Jr., Gross, M., Harnack, L.J., Folsom, A.R. (2002). Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control*, 13(4), 373–382.
- Arts, I.C., Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 317S–325S.
- Artursson, P. (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(6), 476–482.
- Artursson, P., Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3), 880–885.

- Artursson, P., Borchardt, R. (1997). Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharmaceutical Research*, *14*(12), 1655–1657.
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *46*(1-3), 27–43.
- Audus K.L., Bartel, R.L., Hidalgo, I.J. Borchardt R.T. (1990). The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Research*, *7*(5), 435–451.
- Auvichayapat, P., PrapoChanung, M., Tunkamnerdthai, O., Sripanidkulchai, B.O., Auvichayapat, N., Thinkhamrop, B., Kunhasura, S., Wongpratoom, S., Sinawat, S., Hongprapas, P. (2008) Effectiveness of green tea on weight reduction in obese Thais: a randomized, controlled trial. *Physiology and Behavior*, *93*(3), 486–491.
- Azorín-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M.J., Vallejo, F., Pallarés, F.J., Larrosa, M., Lucas, R., Morales, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., Espín, J.C. (2011). Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(8), 1154-1168.
- Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Terao, J. (2000). Bioavailability of (-)epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radical Research*, *33*(5), 635–641.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T., Terao, J. (2001). Absorption and urinary excretion of (-)epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (-)epicatechin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(12), 6050–6056.
- Baba, S., N, Osakabe, N., Natsume, M., Terao, J. (2002). Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-4b-8)-epicatechin] in rats. *Free Radical Biology & Medicine*, *33*(1), 142–148.
- Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A., Nakamura, Y., Tamura, T., Osakabe, N., Kanegae, M., Kondo, K. (2007). Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *The Journal of Nutrition*, *137*(6), 1436–1441.
- Baker, J.A., Beehler, G.P., Sawant, A.C., Jayaprakash, V., McCann, S.E., Moysich, K.B. (2006). Consumption of coffee, but not black tea, is associated with decreased risk of premenopausal breast cancer. *The Journal of Nutrition*, *136*(1), 166–171.

- Bayard, V., Chamorro, F., Motta, J., Norman K., Hollenberg, N.K. (2007). Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. *International Journal of Medical Sciences*, 4(1), 53–58.
- Bingham, S.A. (2002). Biomarkers in nutritional epidemiology. *Public Health Nutrition*, 5(6A), 821–827.
- Bonita J.S., Mandarano, M., Shuta, D., Vinson, J. (2007). Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, 55(3), 187–198.
- Boutron-Ruault, M.C., Senesse, P., Faivre, J., Chatelain, N., Belghiti, C., Méance, S. (1999). Foods as risk factors for colorectal cancer: a case-control study in Burgundy (France). *European Journal of Cancer Prevention*, 8(3), 229–235.
- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 378–384.
- Bravi, F., Scotti, L., Bosetti, C., Gallus, S., Negri, E., La Vecchia, C., Tavani, A. (2009). Coffee drinking and endometrial cancer risk: a meta-analysis of observational studies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200(2), 130–135.
- Bravo, L., Abia, R., Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on *in vivo* and *in vitro* properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481–1487.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Bravo, L., Goya, L., Lecumberri, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40(3), 393–405.
- Bravo, L., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Martínez-López, S., Mateos, R. (2010). Posibles beneficios del consumo de café verde en salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 17(3), 79–87.
- Buijsse, B., Feskens, E.J., Kok, F.J., Kromhout, D. (2006). Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of Internal Medicine*, 166(4), 411–417.

- Buijsse, B., Weikert, C., Drogan, D., Bergmann, M., Boeing, H. (2010). Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *European Heart Journal*, 31(13), 1616–23.
- Buscemi, S., Verga, S., Batsis, J.A., Tranchina, M.R., Belmonte, S., Mattina, A., Re, A., Rizzo, A. (2009). Dose-dependent effects of decaffeinated coffee on endothelial function in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(10), 1200–1205.
- Buscemi, S., Verga, S., Batsis, J.A., Donatelli, M., Tranchina, M.R., Belmonte, S., Mattina, A., Re, A., Cerasola, A. (2010). Acute effects of coffee on endothelial function in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 483–489.
- Calani, L., Dall'Asta, M., Derlindati, E., Scazzina, F., Bruni, R., Del Rio, D. (2012). Colonic metabolism of polyphenols from coffee, green tea, and hazelnut skins. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46 (Suppl 1), 95–99.
- Camenisch, G., Alsenz, J., van de Waterbeemd, H., Folkers, G. (1998). Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayer using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 313–319.
- Carnevale, R., Loffredo, L., Pignatelli, P., Nocella, C., Bartimoccia, S., Di Santo, S., Martino, F., Catasca, E., Perri, L., Violi, F. (2012). Dark chocolate inhibits platelet isoprostanes via NOX2 down-regulation in smokers. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(1), 125–132.
- Cavin, C., Holzhaeuser, D., Scharf, G., Constable, A., Huber, W.W., Schilter, B. (2002). Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), 1155–1163.
- Centro de Información de Café y Salud (CICAS), www.cicas.es/cifras/%E2%80%9Chabitos-y-actitudes-de-los-espanoles-frente-al-consumo-de-cafe%E2%80%9D
- Chan, L.M., Lowes, S., Hirst, B.H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 25–51.
- Chang, W.C., Chen, C.H., Lee, M.F., Chang, T., Yu, Y.M. (2010). Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules up-regulation in IL-1 β -treated endothelial cells. *European Journal of Nutrition*, 49(5), 267–275.

- Chen, C.C., Wei, B.L., Loke, S.H., Chiou, W.F. (2007). 3,4-Di-O-Caffeoylquinic acid protects endothelial cells against oxidative stress and restores endothelium-dependent vasodilatation. *Journal of Chinese Medicine*, 18(1-2), 89–100.
- Chen, J.R., Lazarenko, O., Wu, X., Kang, J., Blackburn, M.L., Shankar, K., Badger, T.M., Ronis, J.J. (2010). Dietary-induced serum phenolic acids promote bone growth via p38 MAPK/ β -catenin canonical Wnt signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(11), 2399–2411.
- Chen, S., Zhou, N., Zhang, Z., Li, W. (2015). Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457(4), 608–613.
- Cherniack, E.P. (2011). Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition*, 27(6), 617-623.
- Chiou, W.F., Chen, C.C., Wei, B.L. (2011). 3,4-Di-O-caffeoylquinic acid inhibits angiotensin-II-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by down regulating the JNK and PI3K/AKT signaling pathways. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 634502, 1–8.
- Chu, Y.F., Chen, Y., Black, R.M., Brown, P.H., Lyle, B.J., Liu, R.H., Ou, B. (2011). Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF- κ B inhibition, and stimulation of glucose uptake. *Food Chemistry*, 124(3), 914–920.
- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I., Lacroix, C. (2006). New three-stage *in vitro* model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(2), 324–336.
- Clifford, M.N., Jarvis, T. (1988). The chlorogenic acids content of green robusta coffee beans as a possible index of geographic origin. *Food Chemistry*, 29(4), 291–298.
- Clifford, M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362–372.
- Clifford, M.N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1118–1125.
- Clifford, M.N., Knight, S., Surucu, B., Kuhnert, N. (2006a). Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acid in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54(6), 1957–1969.

- Clifford, M.N., Marks, S., Knight, S., Kuhnert, N. (2006b). Characterization by LC–MSⁿ of four new classes of p-coumaric acid-containing diacyl-chlorogenic acids in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(12), 4095–4101.
- Cooper, K.A., Campos-Giménez, E., Jiménez-Álvarez, D., Nagy, K., Donovan, J.L., Williamson, G. (2007). Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(8), 2841–2847.
- Cooper, K.A., Donovan, J.L., Waterhouse, A.L., Williamson, G. (2008). Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*, *99*(1), 1–11.
- Cornelis, M.C., El-Soheemy, A. (2007). Coffee, caffeine, and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, *18*(1), 13–19.
- Corti, R., Binggeli, C., Sudano, I., Spieker, L., Hänseler, E., Ruschitzka, F., Chaplin, W.F., Lüscher, T.F., Noll, G. (2002). Coffee acutely increases sympathetic nerve activity and blood pressure independently of caffeine content: role of habitual versus nonhabitual drinking. *Circulation*, *106*(23), 2935–2940.
- Corti, R., Flammer, A.J., Hollenberg, N.K., Luscher, T.F. (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, *119*(10), 1433–1441.
- Coughtrie, M.W., Johnston, L.E. (2001). Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases—molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metabolism and Disposition*, *29*(4Pt2), 522–528.
- Covas, M.I., Nyyssonen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.J., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Baumler, H., Nascetti, S., Salonen, J.T., Fito, M., Virtanen, J., Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, *145*(5), 333–341.
- Cren-Olivé, C.C., Teissier, E., Duriez, P., Rolando, C. (2003). Effect of catechin O-methylated metabolites and analogues on human LDL oxidation. *Free Radical Biology & Medicine* *34*(7), 850–855.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*, *26*(8), 1001–1043.
- Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*(6), 446–467.
- Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G.E., Gibson, G.R., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V. (2013). In vitro fermentation of grape

seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, *83*(3), 792–805.

Curtis, P.J., Sampson, M., Potter, J., Dhataria, K., Kroon, P.A., Cassidy, A. (2012). Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes A 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care*, *35*(2), 226–232.

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321–1342.

Davison, K., Coates, A.M., Buckley, J.D., Howe, P.R.C. (2008). Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *International Journal of Obesity*, *32*(8), 1289–1296.

Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J.C., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters*, *436*(1), 71–75.

Day, A.J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M.R., Williamson, G. (2001). Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radical Research*, *35*(6), 941–952.

Day, A.J., Gee, J.M., DuPont, M.S., Johnson, I.T., Williamson, G. (2003). Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology*, *65*(7), 1199–1206.

De Morais, E.C., Stefanuto, A., Klein, G.A., Boaventura, B.C., de Andrade, F., Wazlaki, E., Di Pietro, P.F., Maraschin, M., da Silva, E.L. (2009). Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(18), 8316–8324.

Del Rio, D., Costa, L.G., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2010a). Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, *20*(1), 1–6.

Del Rio, D., Calani, L., Cordero, C., Salvatore, S., Pellegrini, N., Brighenti, F. (2010b). Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition*, *26*(11), 1110–1116.

- Del Rio, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892.
- Deladino, L., Teixeira, A. S., Reta, M., García, A. D. M., Navarro, A. S., Martino, M. N. (2013). Major phenolics in Yerba Mate extracts (*Ilex paraguariensis*) and their contribution to the total antioxidant capacity, 4(8A), 154–162.
- Deprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapiere, C., Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2733–2738.
- Deprez, S., Mila, I., Huneau, J.F., Tome, D., Scalbert, A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3(6), 957–967.
- Desch, S., Schmidt, J., Kobler, D., Sonnabend, M., Eitel, I., Sareban, M., Rahimi, K., Schuler, G., Thiele, H. (2010). Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hypertension*, 23(1), 97–103.
- Di Castelnuovo, A., Di Giuseppe, R., Iacoviello, L., de Gaetano, G. (2012). Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease. *European Journal of Internal Medicine*, 23(1), 15–25.
- Ding, E.L., Hutfless, S.M., Ding, X., Girotra, S. (2006). Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition & Metabolism*, 3(2), 1-12.
- Ding, M., Bhupathiraju, S.N., Satija, A., van Dam, R.M., Hu, F.B. (2013). Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease: a systematic review and a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation* 129(6), 643-659.
- Do, G.M., Kwon, E.Y., Kim, H.J., Jeon, S.M., Ha, T.Y., Park, T., Choi, M.S. (2008). Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(1), 55–59.
- Donovan, J.L., Manach, C., Faulks, R.M., Kroon, P.A. (2006). Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites, En: *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, ed. A. Crozier, M.N. Clifford y H. Ashihara, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 303–341.

- Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramas, A., Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 443–449.
- Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Jacques, R.A., Caramao, E.B., Mondello, L. (2009). High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7213–7221.
- Dupas, C., Marsset Baglieri, A., Ordonaud, C., Tomé, D., Maillard, M.N. (2006). Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(11), 1053–1060.
- European Food Safety Authority (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467). Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal*, 9(4), 2033 (25 pp).
- European Food Safety Authority (2012). Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation. Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal*, 10(7), 2809 (21 pp).
- Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L.C., Martin, P.R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1505–1513.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C.M., Lafay, S. (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2309–2315.
- Faria, A., Meireles, M., Fernandes, I., Santos-Buelga, C., González-Manzano, S., Dueñas, M., Freitas, V., Mateus, N., Calhau, C. (2014). Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chemistry*, 149(1), 190–196.

- Farrell, T.L., Dew, T.P., Poquet, L., Hanson, P., Williamson, G. (2011). Absorption and metabolism of chlorogenic acids in cultured gastric epithelial monolayers. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(12), 2338–2346.
- Farrell, T.L., Gómez-Juaristi, M., Poquet, L., Redeuil, K., Nagy, K., Renouf, M., Williamson, G. (2012). Absorption of dimethoxycinnamic acid derivatives in vitro and pharmacokinetic profile in human plasma following coffee consumption. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(9), 1413–1429.
- Federación Española de Café,
www.federacioncafe.com/Publico/ElCafe/Comercializacion.asp
- Feng, R., Lu, Y., Bowman, L.L., Qian, Y., Castranova, V., Ding, M. (2005). Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27888–27895.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2013). *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.
- Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2(3), 155–168.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1-2), 155–171.
- Flammer, A.J., Hermann, F., Sudano, I., Spieker, L., Hermann, M., Cooper, K.A., Serafini, M., Luscher, T.F., Ruschitzka, F., Noll, G., Corti, R. (2007). Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation*, 116(21), 2376–2382.
- Fraga, C.G., Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I., Carrasquedo, F., Lotito, S.B., Lazarus, S., Schmitz, H.H., Keen, C.L. (2005). Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clinical & Developmental Immunology*, 12(1), 11–17.
- Fujioka, K., Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*, 106(1), 217–221.
- Fukushima, Y., Ohie, T., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Watanabe, M., Takeuchi, M., Hasegawa, M., Taguchi, C., Kondo, K. (2009). Coffee and green tea

as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(4), 1253–1259.

Fumeaux, R., Menozzi-Smarrito, C., Stalmach, A., Munari, C., Kraehenbuehl, K., Steiling, H., Crozier, A., Williamson, G., Barron, D. (2010). First synthesis, characterization, and evidence for the presence of hydroxycinnamic acid sulfate and glucuronide conjugates in human biological fluids as a result of coffee consumption. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(22), 5199–5211.

Galati, G., O'Brien, P. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(3), 287–303.

Galeone, C., Turati, F., La Vecchia, C., Tavani, A. (2010). Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes and Control*, 21(11), 1949–1959.

Galijatovic, A., Otake, Y., Walle, U.K., Walle, T. (2001) Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharmacological Research*, 18(3), 374–379.

Gavrieli, A., Yannakoulia, M., Fragopoulou, E., Margaritopoulos, D., Chamberland, J.P., Kaisari, P., Kavouras, S.A., Mantzoros, C.S. (2011). Caffeinated coffee does not acutely affect energy intake, appetite, or inflammation but prevents serum cortisol concentrations from falling in healthy men. *The Journal of Nutrition*, 141(4), 703–707.

Gee, J.M., DuPont, M.S., Rhodes, M.J., Johnson, I.T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(1), 19–25.

Gelatti, U., Covolo, L., Franceschini, M., Pirali, F., Tagger, A., Ribero, M.L., Trevisi, P., Martelli, C., Nardi, G., Donato, F. (2005). Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *Journal of Hepatology*, 42(4), 528–534.

George, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370–1373.

Gibney, M.J., Walsh, M., Brennan, L., Roche, H.M., German, B., van Ommen, B. (2005). Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(3), 497-503.

Giménez-Bastida, J.A., Larrosa, M., González-Sarriás, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C., García-Conesa, M.T. (2012). Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate

- cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8866–8876.
- Giovannucci, E. (1998). Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *American Journal of Epidemiology*, 147(11), 1043–1052.
- Goldenberg, D. (2002). Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 38(7), 646–649.
- Goldenberg, D., Golz, A., Joachims, H.Z. (2003). The beverage maté: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head & Neck*, 25(7), 595–601.
- Gonthier, M.P., Cheynier, V., Donovan, J.L., Manach, C., Morand, C., Mila, I., Lapierre, C., Scalbert, A. (2003). Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(4), 912–918.
- Gonthier, M.P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet, J.M., Poutanen, K., Aura, A.M. (2006). Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60(9), 536–540.
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustín, O., Medina, F.S.D. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 331–362.
- González de Mejía, E., Song, Y.S., Ramirez-Mares, M.V., Kobayashi, H. (2005). Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1966–1973.
- Gosmann, G., Barlette, A.G., Dhamer, T., Arçari, D.P., Santos, J.C., de Camargo, E.R., Acedo, S., Gambero, A., Gnoatto, S.C., Ribeiro, M.L. (2012). Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(2), 156–161.
- Granado-Serrano, A.B., Martín, M.A., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., Ramos, S. (2007). Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 2020–2027.
- Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., Ferri, C. (2005a). Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(3), 611–614.

- Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., Ferri, C. (2005b). Reply to C. J. Kelly. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*(2), 487–488.
- Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., Blumberg, J.B., Ferri, C. (2008). Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *The Journal of Nutrition*, *138*(9), 1671–1676.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A., Ferri, C. (2009). Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(10), 1072–1084.
- Greenberg, J.A., Boozer, C.N., Geliebter, A. (2006). Coffee, diabetes, and weight control. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(4), 682–693.
- Grove K.A., Lambert, J.D. (2010). Laboratory, epidemiological, and human intervention studies show that tea (*Camellia sinensis*) may be useful in the prevention of obesity. *The Journal of Nutrition*, *140*(3), 446–453.
- Gugliucci, A., Stahl, A.J.C. (1995). Low-density-lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, *35*(1), 47–56.
- Gugliucci, A., Markowicz-Bastos, D.H.M. (2009). Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia*, *80*(2), 138–142.
- Guy, P.A., Renouf, M., Barron, D., Cavin, C., Dionisi, F., Kochhar, S., Rezzi, S., Williamson, G., Steiling, H. (2009). Quantitative analysis of plasma caffeic and ferulic acid equivalents by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *877*(31), 3965–3974.
- Habauzit, V., Morand, C. (2012). Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, *3*(2), 87–106.
- Habtemariam, S., Varghese, G.K. (2014). The antidiabetic therapeutic potential of dietary polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *15*(4), 391–400.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, *70*(5), 257–265.
- Hammar, N., Andersson, T., Alfredsson, L., Reuterwall, C., Nilsson, T., Hallqvist, J., Knutsson, A., Ahlbom, A. (2003). Association of boiled and filtered coffee with incidence of first nonfatal myocardial infarction: the SHEEP and the VHEEP study. *Journal of Internal Medicine*, *253*(6), 653–659.

- Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Rucker, R., Schmitz, H.H. (1999). Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 490–496.
- Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950–988.
- Harborne, J.B. (1993). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London, Chapman Hall.
- Hardcastle, A.C., Aucott, L., Reid, D.M., Macdonald, H.M. (2011). Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(5), 941–947.
- Heck, C.I., de Mejia, E.G. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72(9), R138–151.
- Heiss, C., Finis, D., Kleinbongard, P., Hoffmann, A., Rassaf, T., Kelm, M., Sies, H. (2007). Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 49(2), 74–80.
- Heiss, C., Jahn, S., Taylor, M., Real, W.M., Angeli, F.S., Wong, M.L., Amabile, N., Prasad, M., Rassaf, T., Ottaviani, J.I., Mihardja, S., Keen, C.L., Springer, M.L., Boyle, A.J., Grossman, W., Glantz, S.A., Schroeter, H., Yeghiazarians, Y. (2010). Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(3), 218–224.
- Hemmersbach, S., Brauer, S.S., Hüwel, S., Galla, H.-J., Humpf, H.-U. (2013). Transepithelial permeability studies of flavan-3-ol-C-glucosides and procyanidin dimers and trimers across the Caco-2 cell monolayer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(33), 7932–7940.
- Hermann, F., Spieker, L.E., Ruschitzka, F., Sudano, I., Hermann, M., Binggeli, C., Lüscher, T.F., Riesen, W., Noll, G., Corti, R. (2006). Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart*, 92(1), 119–120.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342(8878), 1007–1011.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 96(3), 736–749.

- Higdon, J.V., Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89–143.
- Higdon, J.V., Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 46(2), 101–123.
- Hirose, K., Niwa, Y., Wakai, K., Matsuo, K., Nakanishi, T., Tajima, K. (2007). Coffee consumption and the risk of endometrial cancer: Evidence from a case-control study of female hormone-related cancers in Japan. *Cancer Science*, 98(3), 411–415.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Food Science and Agriculture*, 80(7), 1081–1093.
- Hollman, P.C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition*, 141(5), 989S–1009S.
- Holt, R.R., Lazarus, S.A., Sullards, M.C., Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., Hammerstone, J.F., Fraga, C., Schmitz, H., Keen, C.L. (2002). Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 798–804.
- Holt, R.R., Actis-Goretta, L., Momma, T.Y., Keen, C.L.J. (2006). Dietary flavanols and platelet reactivity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 47(Suppl 2), 187–196; Discussion S206–209.
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38–50.
- Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P.A., Cohn, J.S., Rimm, E.B., Cassidy, A. (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3), 740–751.
- Huang, J., de Paulis, T., May, J.M. (2004). Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA. hy926 endothelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(12), 722–729.

- Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G., Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111–2119.
- Hughes, L.A., Arts, I.C., Ambergen, T., Brants, H.A., Dagnelie, P.C., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., Weijnen, M.P. (2008). Higher dietary flavone, flavonol, and catechin intakes are associated with less of an increase in BMI over time in women: a longitudinal analysis from the Netherlands Cohort Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(5), 1341–1352.
- Huxley, R., Lee, C.M., Barzi, F., Timmermeister, L., Czernichow, S., Perkovic, V., Grobbee, D.E., Batty, D., Woodward, M. (2009). Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, 169(22), 2053–2063.
- Idoate, A., Idoipe, A. (2002). Investigación y ensayos clínicos. En: *Farmacia Hospitalaria*, 3ª Ed. Madrid. Doyma. 325–344.
- Ito, H., Gonthier, M., Manach, C., Morand, C., Mennen, L., Remesy, C., Scalbert, A. (2005). Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *British Journal of Nutrition*, 94(4), 500–509.
- Jaiswal, R., Sovdat, T., Vivan, G., Kuhnert, N. (2010). Profiling and characterization by LC-MSⁿ of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5471–5484.
- Jaiswal, R., Matei, M.F., Glembockyte, V., Patras, M.A., Kuhnert, N. (2014). Hierarchical key for the LC-MSⁿ identification of all ten region- and stereoisomers of caffeoylglucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), 9252–9265.
- Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C., Bibiloni, R. (2009). Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 117–121.
- Johnson, I. (2004). New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutation Research*, 551(1-2), 9–28.
- Johnston, K.L., Clifford, M.N., Morgan, L.M. (2003). Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(4), 728–733.
- Joseph, J.A., Denisova, N.A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Shukitt-Hale, B., Morgan, D. (2003). Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutritional Neuroscience*, 6(3), 153–162.

- Kadowaki, M., Sugihara, N., Tagashira, T., Terao, K., Furuno, K. (2008). Presence or absence of a gallate moiety on catechins affects their cellular transport. *Journal of Pharmacy*, 60(9), 1189–1195.
- Kay, C. D. (2010). The future of flavonoid research. *The British Journal of Nutrition*, 104(Suppl), 91–95.
- Kempf, K., Herder, C., Erlund, I., Kolb, H., Martin, S., Carstensen, M., Koenig, W., Sundvall, J., Bidel, S., Kuha, S., Tuomilehto, J. (2010). Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(4), 950–957.
- Keogh, J.B., McInerney, J., Clifton, P.M. (2007). The effect of milk protein on the bioavailability of cocoa polyphenols. *Journal of Food Science*, 72(3), S230–S233.
- Kern, S.M., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Kroon, P.A., Garcia-Conesa, M.T. (2003a). Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6050–6055.
- Kern, S.M., Bennett, R.N., Needs, P.W. Mellon, F.A., Kroon, P.A., García-Conesa, M.T. (2003b). Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7884–7891.
- Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventós, R.M., Estruch, R. (2012). Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(12), 1046-1053.
- Khan, N., Khymenets, O., Urpí-Sardà, M., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Monagas, M., Mora-Cubillos, X., Llorach, R., Andres-Lacueva, C. (2014). Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, 6(2), 844–880.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3), 229–245.
- Kim, J., Kim, J., Shim, J., Lee, C.Y., Lee, K.W., Lee, H.J. (2013). Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(11), 1458–1472.
- Knapp, A.W. (1920). *Cocoa and Chocolate, Their History from Plantation to Consumer*. London, Chapman and Hall, Ltd.

- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 560–568.
- Kohri, T, Suzuki, M., Nanjo, F. J. (2003). Identification of metabolites of (-)-epicatechin gallate and their metabolic fate in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5561–5566.
- Konishi, Y., Kobayashi, S. (2004). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2518–2526.
- Koo, S.I., Noh, S.K. (2007). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(3), 179–183.
- Kosinska, A., Andlauer, W. (2012). Cocoa polyphenols are absorbed in Caco-2 cell model of intestinal epithelium. *Food Chemistry* 135(3), 999-1005.
- Krogholm, K.S., Bredsdorff, L., Knuthsen, P., Haraldsdóttir, J., Rasmussen, S.E. (2010). Relative bioavailability of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin given simultaneously through diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(4), 432–435.
- Kroon, P.A., Williamson, G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 355–361.
- Kurozawa, Y., Ogimoto, I., Shibata, A., Nose, T., Yoshimura, T., Suzuki, H., Sakata, R., Fujita, Y., Ichikawa, S., Iwai, N., Tamakoshi A. (2005). Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. *British Journal of Cancer*, 93(5), 607–610.
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Scalbert, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition* 96(1), 39-46.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301–311.
- Lane, J.D., Pieper, C.F., Phillips-Bute, B.G., Bryant, J.E., Kuhn, C.M. (2002). Caffeine affects cardiovascular and neuroendocrine activation at work and home. *Psychosomatic Medicine*, 64(4), 595–603.
- Laparra, J.M., Vélez, D., Barberá, R., Montoro, R., Farré, R. An approach to As(III) and As(V) bioavailability studies with Caco-2 cells. *Toxicology In Vitro*, 19(8), 1071-1078.

- Lavandera, J.V., Batlle, A.M., Buzaleh, A.M. (2007). Metabolization of porphyrinogenic agents in brain: involvement of the phase I drug metabolizing system. A comparative study in liver and kidney. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27(6), 717–729.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 296–301.
- Lee, M.J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F.Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S., Yang, C.S. (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11(10pt1), 1025–1032.
- Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.S., Lee, Y.K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157(9), 876–884.
- Lee, M.S., Kim, C.T., Kim, Y. (2009). Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 54(2), 151–157.
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., De Vuyst, L.(2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30(2), 379-392.
- Lenz, W. (2007). Analytical strategies in metabonomics. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 443–458.
- Lettieri-Barbato, D., Villañoa-Bram Beheydt, D., Guadagnia, F., Trogh, I., Serafini, M. (2013) Effect of ingestion of dark chocolates with similar lipid composition and different cocoa content on antioxidant and lipid status in healthy humans. *Diabetic Medicine*, 30(4), 478–483.
- Li, N., Wang, D.D., Sui, Z.G., Qi, X.Y., Ji, L.Y., Wang, X.L., Yang, L. (2013). Development of an improved three-dimensional in vitro intestinal mucosa model for drug absorption evaluation. *Tissue Engineering part c-Methods*, 19(9), 708–719.
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K. (2008). Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. *Trends in Analytical Chemistry* 27(3), 194–204.
- Liu, X., Tam, V.H., Hu, M. (2007). Disposition of flavonoids via enteric recycling: determination of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms responsible for the

- metabolism of flavonoids in intact Caco-2 TC7 cells using siRNA. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 873–882.
- Liu, Y.J., Zhan, J., Liu, X.L., Wang, Y., Ji, J., He, Q.Q. (2014). Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Nutrition*, 33(1), 59–63.
- Llorach, R., Urpí-Sarda, M., Jauregui, O., Monagas, M., Andrés-Lacueva, C. (2009). An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *Journal of Proteome Research*, 8(11), 5060–5068.
- Llorach-Asunción, R., Jauregui, O., Urpí-Sarda, M., Andrés-Lacueva, C. (2010). Methodological aspects for metabolome visualization and characterization: a metabolomic evaluation of the 24 h evolution of human urine after cocoa powder consumption. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 373–381.
- López-García, E., Rodríguez-Artalejo, F., Li, T.Y., Mukamal, K.J., Hu, F.B., van Dam, R.M. (2011). Coffee consumption and mortality in women with cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), 218–224.
- López-García, E., Guallar-Castillón, P., León-Muñoz, L., Graciani, A., Rodríguez-Artalejo, F. (2014). Coffee consumption and health-related quality of life. *Clinical Nutrition*, 33(1), 143–149.
- Loria, D., Barrios, E., Zanetti, R. (2009). Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 25(6), 530–539.
- Lu, H., Meng, X., Li, C., Sang, S., Patten, C., Sheng, S., Hong, J., Bai, N., Winnik, B., Ho C. T. Yang S.C. (2003). Glucuronides of tea catechins: Enzymology of biosynthesis and biological activities. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(4), 452–461.
- Lu, D.L., Ding, D.J., Yan, W.J., Li, R.R., Wang, Q., Yu, S.S., Jin, X.L., Zhou, B. (2013). Influence of glucuronidation and reduction modifications of resveratrol and its biological activities. *Chembiochem*, 14(9), 1094–1104.
- Ludwig, I.A., Clifford, M.N., Lean, M.E., Ashihara, H., Crozier, A. (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food & Function*, 5(8), 1695–1717.
- Lund, E.K. (2003). Ethical aspects of human nutritional intervention studies. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 12(53), 159–165.
- MacFarlane, G.T., MacFarlane, S., Gibson G.R. (1998). Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35(2), 180–187.

- MacFarlane, G.T., MacFarlane, S. (2007). Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 156–162.
- Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Bélanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F., Nebert, D.W. (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 7(4), 255–269.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2007). La alimentación en España, 2006. www.magrama.gob.es.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230–242.
- Markowicz Bastos, D.H., Moura de Oliveira, D., Lobato Teixeira Matsumoto, R., Oliveira Carvalho, P., Lima Ribeiro, M. (2007). Yerba mate: Pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 1(1), 37–46.
- Marmet, C., Actis-Goretta, L., Renouf, M., Giuffrida, F. (2014). Quantification of phenolic acids and their methylates, glucuronides, sulfates and lactones metabolites in human plasma by LC-MS/MS after oral ingestion of soluble coffee. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88(1), 617–625.
- Martín, M.A., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A.B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., Goya, L. (2008). Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(17), 7765–7772.
- Martín, M.A., Ramos, S., Cordero-Herrero, I., Bravo, L., Goya, L. (2013a). Cocoa phenolic extract protects pancreatic beta cells against oxidative stress. *Nutrients*, 5(8), 2955–2968.
- Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S. (2013b). Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 56(1), 336–351.

- Martín-Cerdeño, V.J. (2007). Consumo de chocolate, cacao y sucedáneos. *Distribución y Consumo*, 96(1), 59–67.
- Martínez López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., Bravo-Clemente, L. (2014a). Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International*, 63(Part C), 446-455.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Sierra-Cinos, J.L., Goya, L., Mateos, R., Bravo, L. (2014b). Realistic intake of a flavanol-rich soluble cocoa product increases HDL-cholesterol without inducing anthropometric changes in healthy and moderately hypercholesterolemic subjects. *Food & Function*, 5(2), 364–374.
- Maskarinec, G. (2009). Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutrition and Cancer*, 61(5), 573–579.
- Mateos, R., Pereira-Caro, G., Saha, S., Cert, R., Redondo-Horcajo, M., Bravo, L., Kroon, P.A. (2011). Acetylation of hydroxytyrosol enhances its transport across differentiated Caco-2 cell monolayers. *Food Chemistry*, 125(3), 865–872.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S.M., Jialal, I. (2002). Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3663–3667
- Matsui, Y., Nakamura, S., Kondou, N., Takasu, Y., Ochiai, R., Masukawa, Y. (2007). Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of chlorogenic acids and their metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 858(1-2), 96–105.
- Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S., Fardel, O. (2007). Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21(6), 659–663.
- Mellor, D.D., Sathyapalan, T., Kilpatrick, E.S., Beckett, S., Atkin, S.L. (2010). High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in type 2 diabetes patients. *Diabetic Medicine*, 27(11), 1318–1321.
- Mellor, D.D., Madden, L.A., Smith, K.A., Kilpatrick, E.S., Atkin, S.L. (2013). High-polyphenol chocolate reduces endothelial dysfunction and oxidative stress during acute transient hyperglycaemia in type 2 diabetes: a pilot randomized controlled trial. *Diabetic Medicine*, 30(4), 478–483.
- Menéndez, C., Dueñas, M., Galindo, P., González-Manzano, S., Jiménez, R., Moreno, L., Zarzuelo, M.J., Rodríguez-Gómez, I., Duarte, J., Santos-Buelga, C., Pérez-Vizcaíno, F. (2011). Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(12), 1780–1790.

- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 801457.
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y., Fabre, G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology*, 11(3-4), 187–194.
- Miccadei, S., Di Venere, D., Cardinali, A., Romano, F., Durazzo, A., Foddai, M.S., Fraioli, R., Mobarhan, S., Maiani, G. (2008). Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutrition & Cancer*, 60(2), 276–283.
- Mills, C.E., Oruna-Concha, M.J., Mottram, D.S., Gibson, G.R., Spencer, J.P.E. (2013). The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chemistry*, 141(4), 3335–3340.
- Miranda, D.D., Arçari, D.P., Pedrazzoli, J.jr., Carvalho, P.O., Cerutti, S.M., Bastos, D.H., Ribeiro, M.L. (2008). Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*, 23(4), 261–265.
- Monagas, M., Khan, N., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Llorach, R., Lamuela-Raventós, R.M., Estruch, R. (2009). Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(5), 1144–1150.
- Monagas, M., Urpí-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Andrés-Lacueva, C., Bartolomé, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1(3), 233–253.
- Monteiro, M., Farah, A., Perrone, D., Trugo, L.C., Donangelo, C. (2007). Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *The Journal of Nutrition*, 37(10), 2196–2201.
- Montreau, F.R. (1972). Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *Connaissnace de la Vigne et du Vin*, 24(1), 397–404.
- Morrison, M., Van der Heijden, R., Heeringa, P., Kaijzel, E., Verschuren, L., Blomhoff, R., Kooistra, T., Kleemann, R. (2014). Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NF-κB in vivo. *Atherosclerosis* 233(1), 149–156.

- Mortensen, A., Sorensen, I.K., Wilde, C., Dragoni, S., Mullerova, D., Toussaint, O., Zloch, Z., Sgaragli, G., Ovesna, J. (2008). Biological models for phytochemical research: from cell to human organism. *British Journal of Nutrition*, 99 (E Suppl 1), ES118–126.
- Mosimann, A.L.P., Wilhelm Filho, D., Silva, E.L. (2006). Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (mate) attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors*, 26(1), 59–70.
- Mubarak, A., Bondonno, C.P., Liu, A.H., Considine, M.J., Rich, L., Mas, E., Croft, K.D., Hodgson, J.M. (2012). Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9130–9136.
- Mullen, W., Borges, G., Donovan, J.L., Edwards, C.A., Serafini, M., Lean, M.E.J. (2009). Milk decreases urinary excretion but not plasma pharmacokinetics of cocoa flavan-3-ol metabolites in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), 1784–1791.
- Mullen, W., Nemzer, B., Ou, B., Stalmach, A., Hunter, J., Clifford, M.N., Combet, E. (2011). The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3754–3762.
- Muniyappa, R., Hall, G., Kolodziej, T.L., Karne, R.J., Crandon, S.K., Quon, M.J. (2008). Cocoa consumption for 2 wk enhances insulin-mediated vasodilatation without improving blood pressure or insulin resistance in essential hypertension. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1685–1696.
- Murase, T., Yokoi, Y., Misawa, K., Ominami, H., Suzuki, Y., Shibuya, Y., Hase, T. (2012). Coffee polyphenols modulate whole-body substrate oxidation and suppress postprandial hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia. *British Journal of Nutrition* 107(12), 1757–1765.
- Murphy, K.J., Chronopoulos, A.K., Singh, I., Francis, M.A., Moriarty, H., Pike, M.J., Turner, A.H., Mann, N.J., Sinclair, A.J. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1466–1473.
- Nagao, T., Hase, T., Tokimitsu, I. (2007). A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity*, 15(6), 1473–1483.
- Nagy, K., Redeuil, K., Williamson, G., Rezzi, S., Dionisi, F., Longet, K., Destailats, F., Renouf, M. (2011). First identification of dimethoxycinnamic acids in human

plasma after coffee intake by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1218(3), 491–497.

Nakamura, A., Nakajima, M., Yamanaka, H., Fujiwara, R., Yokoi, T. (2008). Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(8), 1461–1464.

Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5735–5741.

Narita, Y., Inouye, K. (2009). Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas alpha-amylase isozymes I and II. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9218–9225.

Narita, Y., Inouye, K. (2013). Degradation kinetics of chlorogenic acid at various pH values and effects of ascorbic acid and epigallocatechin gallate on its stability under alkaline conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 966–972.

Natella, F., Nardini, M., Giannetti, I., Dattilo, C., Scaccini, C. (2002). Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50(21), 6211–6226.

Natella, F., Nardini, M., Belevi, F., Pignatelli, P., Di Santo, S., Ghiselli, A., Violi, F., Scaccini, C. (2008). Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *British Journal of Nutrition*, 100(6), 1276–1282.

Nicolle, E., Souard, F., Faure, P., Boumendjel, A. (2011). Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. *Current Medicinal Chemistry*, 18(17), 2661–2672.

Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumou, D.O., Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 612–619.

Njike, V.Y., Faridi, Z., Shuval, K., Dutta, S., Kay, C.D., West, S.G., Kris-Etherton, P.M., Katz, D.L. (2011). Effects of sugar-sweetened and sugar-free cocoa on endothelial function in overweight adults. *International Journal of Cardiology*, 149(1), 83–88.

Nogueira, L.D.P., Knibel, M.P., Torres, M.R.S.G., Nogueira Neto, J.F., Sanjuliani, A.F. (2012). Consumption of high-polyphenol dark chocolate improves endothelial function in individuals with stage 1 hypertension and excess body weight. *International Journal of Hypertension*, Article ID 147321, 1–9.

- Ochiai, R., Jokura, H., Suzuki, A., Tokimitsu, I., Ohishi, M., Komai, N., Rakugi, H., Ogihara, T. (2004). Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. *Hypertension Research*, 27(10), 731–737.
- Ochiai, R., Chikama, A., Kataoka, K., Tokimitsu, I., Maekawa, Y., Ohishi, M., Rakugi, H., Mikami, H. (2009). Effects of hydroxyhydroquinone-reduced coffee on vasoreactivity and blood pressure. *Hypertension Research*, 32(11), 969–974.
- Ochiai, R., Sugiura, Y., Shioya, Y., Otsuka, K., Katsuragi, Y., Hashiguchi, T. (2014). Coffee polyphenols improve peripheral endothelial function after glucose loading in healthy male adults. *Nutrition Research*, 34(2), 155–159.
- Oliveira, D.M., Freitas, H.S., Souza, M.F., Arçari, D.P., Ribeiro, M.L., Carvalho, P.O., Bastos, D.H. (2008). Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10527–10532.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C., Katan, M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 131(1), 66–71.
- OMS. (2015). Cáncer. Nota descriptiva nº 297. Centro de Prensa. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- OMS. (2015). Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva nº 311. Centro de Prensa. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Ottaviani, J.I., Momma, T.Y., Kuhnle, G.K., Keen, C.L., Schroeter, H. (2012). Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(8), 1403–1412.
- Ovaskainen, M.L., Torronen, R., Koponen, J.M., Sinkko, H., Hellstrom, J., Reinivuo, H., Mattila, P. (2008). Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *The Journal of Nutrition*, 138(3), 562–566.
- Ozkan, G., Sagdiç, O., Göktürk Baydar, N., Kurumahmutoglu, Z. (2004). Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1807–1811.
- Pabst, G. (Ed.). (1887). *Köhler's Medizinal-Pflanzen in Naturgetreuen Abbildungen mit kurz Erläuterndem Texte Gera–Untermhaus*.
- Pai, T.G., Suiko, M., Sakakibara, Y., Liu, M.C. (2001) Sulfation of flavonoids and other phenolic dietary compounds by the human cytosolic sulfotransferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(5), 1175–1179.

- Pan, M.H., Lai, C.S., Ho, C.T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*, 1(1), 15–31.
- Pang, J., Choi, Y., Park, T. (2008). *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 178–185.
- Papamichael, C.X., Aznaouridis, K.X., Karatzis, E.X., Karatzi, K.X., Stamatelopoulos, K.X., Vamvakou, G., Lekakis, J.P., Mavrikakis, M.E. (2005). Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clinical Science*, 109(1), 55–60.
- Park, J.B. (2009). 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10), 800–805.
- Parra, P. (2013). Overview of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) chain in Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina. http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/producciones_regionales/01_origen_vegetal/05_infusiones/_informes/yerba_mate_chain_argentina_July_2013.pdf
- Paur, I., Balstad, T.R., Kolberg, M., Pedersen, M.K., Austenaa, L.M., Jacobs, D.R., Blomhoff, R. (2010). Extract of oregano, coffee, thyme, clove, and walnuts inhibits NF-κB in monocytes and in transgenic reporter mice. *Cancer Prevention Research*, 3(5), 653–663.
- Pearson, D.A. Holt, R. Rein, D., Paglieroni, T. Schmitz, H.H. Keen, C.L. (2005). Flavanols and platelet reactivity. *Clinical & Developmental Immunology*, 12(1), 1–9.
- Peres, R.G., Tonin, F.G., Tavares, M.F., Rodriguez-Amaya, D.B. (2013). HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. *Molecules* 18(4), 3859–3871.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(Suppl 3), 112–120.
- Pérez-Vizcaíno, F., Duarte, J., Santos-Buelga, C. (2012). The flavanoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1822–1825.
- Peterson, J.J., Dwyer, J.T., Jacques, P.F., McCullough, M.L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutrition Reviews*, 70(9), 491–508.

- Poquet, L., Clifford, M.N., Williamson, G. (2008a). Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(1), 190–197.
- Poquet, L., Clifford, M.N., Williamson, G. (2008b), Investigation of the metabolic fate of dihydrocaffeic acid. *Biochemical Pharmacology*, 75(5), 1218–1229.
- Porrini, M., Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(10), 647–650.
- Prochazkova, D., Bousova, I., Wilhelmova, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513–523.
- Ptolemy, A. S., Tzioumis, T., Thomke, A., Rifai, S., Kellogg, M. (2010). Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. *Journal of Chromatography B*, 878(3-4), 409–416.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, 68(1), 125–131.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(5), 507–526.
- Rebello, S.A., Chen, C.H., Naidoo, N., Xu, W., Lee, J., Chia, K.S., Tai, E.S., van Dam, R.M. (2011). Coffee and tea consumption in relation to inflammation and basal glucose metabolism in a multi-ethnic Asian population: a cross-sectional study. *Nutrition Journal*, 10(61), 1–10.
- Rechner, A.R., Spencer, J.P.E., Kuhnle, G., Hahn, U., Rice-Evans, C.A. (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1213–1222.
- Rechner, A.R., Smith, M.A., Kuhnle, G., Gibson, G.R., Debnam, E.S., Srail, S.K.S., Moore, K.P., Rice-Evans, C. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(2), 212–225.
- Redeuil, K., Smarrito-Menozzi, C., Guy, P., Rezzi, S., Dionisi, F., Williamson, G., Nagy, K., Renouf, M. (2011). Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(29), 4678–4688.

- Renouf, M., Guy, P. A., Marmet, C., Fraering, A. L. Longet, K., Moulin, J., Enslin, M., Barron, D., Dionisi, F., Cavin, C., Williamson, G., Steiling, H. (2010a) Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. *Molecular Nutritional & Food Research*, 54(6), 760–766.
- Renouf, M., Marmet, C., Guy, P., Fraering, A. L. Longet, K., Moulin, J., Enslin, M., Barron, D., Cavin, C., Dionisi, F., Rezzi, S., Kochhar, S., Steiling, H., Williamson, G. (2010b). Nondairy creamer, but not milk, delays the appearance of coffee phenolic acid equivalents in human plasma. *The Journal of Nutrition*, 140(2), 259–263.
- Renouf, M., Marmet, C., Giuffrida, F., Lepage, M., Barron, D., Beaumont, M., Williamson, G., Dionisi, F. (2013). Dose-response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 833–839.
- Renouf, M., Marmet, C., Giuffrida, F., Lepage, M., Barron, D., Beaumont, M., Williamson, G., Dionisi, F. (2014). Dose-response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(2), 301–309.
- Requena, T., Monagas, M., Pozo-Bayón, M.A., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., del Campo, R.; Ávila, M., Martínez-Cesta, M.C., Peláez, C., Moreno-Arribas, M.V. (2010). Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 332–344.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Enslin, M., Offord, E.A. (1999). Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), 22–26.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3438–3442.
- Riksen, N.P., Rongen, G.A., Smits, P. (2009). Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(2), 185–191.
- Rios, L.Y., Gonthier, M.P., Remesy, C., Mila, I., Lapiere, C., Lazarus, S., Williamson, G., Scalbert, A. (2003). Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(4), 912–918.
- Rodríguez-Mateos, A., Vuzour, D., Krueger, C.G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., Del Rio, D., Crozier, A. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of Toxicology*, 88(10), 1803–1854.

- Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., López-Oliva, E., Agis-Torres, A., Gómez-Juaristi, M., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L. (2011a). Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(12), 1895–1899.
- Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L., Martín, M.A. (2011b). Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *22*(12), 1186–1194.
- Roowi, S., Stalmach, A., Mullen, W., Lean, M.E.J., Edwards, C.A., Crozier, A. (2010). Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(2), 1296–1304.
- Rothwell, J.A., Filatre, Y., Martin, J.F., Lyan, B., Pojos-Guillot, E., Fezeu, L., Hercberg, S., Comte, B., Galan, P., Touvier, Manach, C. (2014). New biomarkers of coffee consumption identified by the non-targeted metabolomic profiling of cohort study subjects. *PLoS ONE* *9*(4), e93474.
- Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Jauregui, O., Badia, E., Estruch, R., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventós, R.M. (2005). Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(16), 6190–6194.
- Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estuch, R., Mata-Bilbao, M.L., Izquierdo-Pulido, M., Waterhouse, A.L., Lamuela-Raventós, R.M. (2007). Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *51*(6), 493–498.
- Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R., Mata-Bilbao, L., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventós, R. M. (2008). The effects of milk as a food matrix for polyphenols on the excretion profile of cocoa (-)-epicatechin metabolites in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, *100*(4), 846–851.
- Rubió, L., Serra, A., Maciá, A., Piñol, C., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2014a) In vivo distribution and deconjugation of hydroxytyrosol phase II metabolites in red blood cells: A potential new target for hydroxytyrosol. *Journal of Functional Foods*, *10*(1), 139–143.
- Rubió, L., Maciá, A., Castell-Auvi, A., Pinent, M., Blay, M.T., Ardevol, A., Romero, M.P., Motilva M.J. (2014b). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chemistry*, *149*(1), 277–284.

- Rubió, L., Serra, A., Chen, C.Y.O., Maciá, A., Romero, M.P., Covas, M.I., Solá, R., Motilva, M.J. (2014c). Effect of the co-occurring components from olive oil and thyme extracts on the antioxidant status and its bioavailability in an acute ingestion in rats. *Food & Function*, 5(4), 740–747.
- Rusconi, M., Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the food of the gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61(1), 5–13.
- Salazar-Martínez, E., Willett, W.C., Ascherio, A., Manson, J.E., Leitzmann, M.F., Stampfer, M.J., Hu, F.B. (2004). Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, 140(1), 1–8.
- Sánchez-Patán, F., Chioua, M., Garrido, I., Cueva, C., Samadi, A., Marco-Contelles, J., Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé, B., Monagas, M. (2011). Synthesis, analytical features, and biological relevance of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a microbial metabolite derived from the catabolism of dietary flavan-3-ols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7083–7091.
- Sánchez-Rabameda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventós, R.M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 35–42.
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J.B., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D.A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(1), 5990–5999.
- Sarriá, B., Mateos, R., Sierra-Cinos, J.L., Goya, L., García-Diz, L., Bravo, L. (2012). Hypotensive, hypoglycaemic and antioxidant effects of consuming a cocoa product in moderately hypercholesterolemic humans. *Food & Function*, 3(8), 867–874.
- Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J.L., García-Diz, L., Mateos, R., Bravo, L. (2014). Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. *British Journal of Nutrition*, 111(1), 122–134.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8S), 2073S–2085S.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Remesy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276–282.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jiménez, L. (2005a). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005b). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 215S–217S.
- Schenker, S., Heinemann, C., Huber, M., Pompizzi, R., Perren, R., Escher, R. (2002). Impact of roasting conditions on the formation of aroma compounds in coffee beans. *Journal of Food Science*, 67(1), 60–66.
- Scherbl, D., Muentnich, S., Richling, E. (2014). In vitro absorption studies of chlorogenic acids from coffee using the Ussing chamber model. *Food Research International*, 63(Part C), 456–463.
- Schinella, G.R., Fantinelli, J.C., Tournier, H.A., Prieto, J.M., Spegazzini, E., Debenedetti, S., Mosca, S.M. (2009). Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). *Food Research International*, 42(10), 1403–1409
- Schroeter, H., Spencer J.P.E., Rice-Evans C., Williams, R.J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochemical Journal*, 358(3), 547–557.
- Schroeter, H., Holt, R.R., Orozco, T.J., Schmitz, H.H., Keen, C.L. (2003). Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature*, 426(6968), 787–788.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H.H., Kelm, M. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 1024–1029.
- Selma, M.V, Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501.
- Serafini, M., Bugianesi, R., Maiani, G., Valtuena, S., De Santis, S., Crozier, A. (2003). Plasma antioxidants from chocolate - dark chocolate may offer its consumers health benefits the milk variety cannot match. *Nature*, 424(6952), 1013.
- Shahidi, F., Naczk, M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co.
- Shamat, M.A. (1993). The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 97(1), 1–13.

- Shechter, M., Shalmon, G., Scheinowitz, M., Koren-Morag, N., Feinberg, M.S., Harats, D., Sela, B.A., Sharabi, Y., Chouraqui, P. (2011). Impact of acute caffeine ingestion on endothelial function in subjects with and without coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, 107(9), 1255–1261.
- Shen, C.L., Caom J.J., Dagda, R.Y., Tenner, T.E.Jr, Chyu, M.C., Yeh, J.K. (2011). Supplementation with green tea polyphenols improves bone microstructure and quality in aged, orchidectomized rats. *Calcified Tissue International*, 88(6), 455–463.
- Shirai, M., Moon, J.H., Tsushida, T., Terao, J. (2001). Inhibitory effect of a quercetin metabolite, quercetin 3-O- β -D-glucuronide, on lipid peroxidation in liposomal membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5602–5608.
- Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Akiyama, H., Kanda, T., Ohtake, Y., Goda, Y. (2006). Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(3), 884–892.
- Sies, H., Schewe, T., Heiss, C., Kelm, M. (2005). Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 304–312.
- Silva, E. L., Neiva, T. J. C., Shirai, M., Terao, J., Abdalla, D. S. P. (2008). Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*, 41(10), 973–979.
- Smid, S.D., Maag J.L., Musgrave I.F. (2012). Dietary polyphenol-derived protection against neurotoxic β -amyloid protein: from molecular to clinical. *Food & Function*, 3(12), 1242–1250.
- Smit, H.J., Gaffan, E.A., Rogers, P.J. (2004). Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology*, 176(3-4), 412–419.
- Spencer, J.P., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S.K., Tyrrell, R.M., Hahn, U., Rice-Evans, C. (2001). Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochemistry Journal*, 354(Pt 3), 493–500.
- Spencer, J.P., Abd El Mohsen, M.M., Minihane, A.M., Mathers, J.C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 12–22.

- Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., Steiling, H., Williamson, G., Crozier, A. (2009). Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metabolism & Disposition*, 37(8), 1749–1758.
- Stalmach, A., Steiling, H., Williamson, G., Crozier, A. (2010a). Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 98–105.
- Stalmach, A., Mullen, W., Steiling, H., Williamson, G., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2010b). Absorption, metabolism and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(3), 323–334.
- Stalmach, A., Williamson, G., Crozier, A. (2014). Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food and Function*, 5(8), 1727–1737.
- Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500(1–3), 299–313.
- Stote, K.S., Clevidence, B.A., Novotny, J.A., Henderson, T., Radecki, S.V., Baer, D.J. (2012). Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(10), 1153–1159.
- Stoupi, S., Williamson, G., Drynan, J.W., Barron, D., Clifford, M.N. (2010). Procyanidin B2 catabolism by human fecal microflora: partial characterization of “dimeric” intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 73–78.
- Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I., Saito, I. (2002). Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25(1), 99–107.
- Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., Saito, I. (2006). Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 24(6), 1075–1082.
- Tabrez, S., Priyadarshini, M., Urooj, M., Shakil, S., Ashraf, G.M., Khan, M.S., Kamal, M.A., Alam, Q., Jabir, N.R., Abuzenadah, A.M., Chaudhary, A.G., Damanhour, G.A. (2013). Cancer chemoprevention by polyphenols and their potential application as nanomedicine. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 31(1), 67–98.

- Tagashira, T., Choshi, T., Hibino, S., Kamishikiryou, J., Sugihara, N. (2012). Influence of gallate and pyrogallol moieties on the intestinal absorption of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin gallate. *Journal of Food Science*, 77(10), H208–215.
- Thelle, D.S., Strandhagen, E. (2005). Coffee and disease: an overview with main emphasis on blood lipids and homocysteine. *Food and Nutrition Research*, 49(2), 50–61.
- Tian, S., He, G.R., Song, J.K., Wang, S.B., Xin, W.Y., Zhang, D., Du, G.H. (2012). Pharmacokinetic study of baicalein after oral administration in monkeys. *Fitoterapia*, 83(3), 532–540.
- Tian, X.-J., Yang, X.-W., Yang, X., Wang, K. (2009). Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics*, 367(1-2), 58–64.
- Tian, C., Wang, W., Hong, Z., Zhang, X. (2013). Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a dose–response analysis of observational studies. *Cancer Causes and Control*, 24(6), 1265–1268.
- Tomás-Barberán, F., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerdá, B., Espín, J.C. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3926–3935.
- Tomás-Barberán, F.A., Andrés-Lacueva, C. (2012). Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60(36), 8773–8775.
- Tomás-Barberán F, García-Villalba R, Quartieri A, Raimondi S, Amaretti A, Leonardi A, Rossi M. (2014). In vitro transformation of chlorogenic acid by human gut microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(5), 1122–1131.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M.A., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Saez, G.T., Ruiz-Gutiérrez, V., Warnberg, J., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 23(10), 953–959.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G.G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G.R., Kwik-Uribe, C., Spencer, J.P. (2008). Flavanol monomer–induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 782–792.

- Tzounis, X., Rodríguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G.R., Kwik-Urbe, C., Spencer, J.P. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 62–72.
- Ulmanen, I., Peranen, J., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P., Bernasconi, L., Aubry, J.P., Lundstrom, K. (1997). Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*. 243(1–2), 452–459.
- Urpí-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Llorach, R., Lamuela-Raventós, R.M., Jáuregui, O., Estruch, R., Izquierdo-Pulido, M., Andrés-Lacueva, C. (2009a). Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7258–7267.
- Urpí-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Llorach, R., Lamuela-Raventós, R.M., Santos-Buelga, C., Sacanella, E., Castell, M., Permanyer, J., Andrés-Lacueva, C. (2009b). Epicatechin, procyanidins and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(6), 1545–1556.
- Vaidyanathan, J.B., Walle, T. (2001). Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharmaceutical Research*, 18(10), 1420–1425.
- Vaidyanathan, J.B., Walle, T., Carolina, S. (2002). Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Pharmacology*, 30(8), 897–903.
- Vaidyanathan, J.B., Walle, T. (2003). Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *Pharmacology*, 307(2), 745–752.
- Van Dam, R.M., Hu, F.B. (2005). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Journal of American Medical Association*, 294(1), 97–104.
- Van der Sluis, A.A., Dekker, M., de Jager, A., Jongen, W.M. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606–3613.
- Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J., Spencer, J.P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106–1131.

- Venables, M.C., Hulston, C.J., Cox, H.R., Jeukendrup, A.E. (2008). Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 778–784.
- Verzelloni, E., Pellacani, C., Tagliazucchi, D., Tagliaferri, S., Calani, L., Costa, L.G., Brighenti, F., Borges, G., Crozier, A., Conte, A., Del Rio, D. (2011). Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(Suppl), 35–43.
- Villas-Boas, S.G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(5), 613–646.
- Vita, J.A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 292S–297S.
- Vitaglione, P., Barone-Lumaga, R., Ferracane, R., Sellito, S., Morelló, J.R., Reguant-Miranda, J., Fogliano, V. (2013). Human bioavailability of flavanols and phenolic acids from cocoa-nut creams enriched with free or microencapsulated cocoa polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 109(10), 1832–1843.
- Walgren, R.A., Walle, U.K., Walle, T. (1998). Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, 55(10), 1721–1727.
- Walgren, R.A., Lin, J.T., Kinne, R.H., Walle, T. (2000). Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *Pharmacology*, 294(3), 837–843.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), 829–837.
- Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., Walle, U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 45–52.
- Walter, E., Janich, S., Roessler, B.J., Hilfinger, J.M., Amidon, G.L. (1996). HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(10), 1070-1076.
- Wang, P., Aronson, W.J., Huang, M., Zhang, Y., Lee, R.P., Heber, D., Henning, S.M. (2010). Green tea polyphenols and metabolites in prostatectomy tissue: implications for cancer prevention. *Cancer Prevention Research*, 3(8), 985–993.

- Wang, Z.J., Ohnaka, K., Morita, M., Toyomura, K., Kono, S., Ueki, T., Tanaka, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., Okamura, T., Ikejiri, K., Futami, K., Maekawa, T., Yasunami, Y., Takenaka, K., Ichimiya, H., Terasaka, R. (2013). Dietary polyphenols and colorectal cancer risk: the Fukuoka colorectal cancer study. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(17), 2683–2690.
- Wang, J., Varghese, M., Ono, K., Yamada, M., Levine, S., Tzavaras, N., Gong, B., Hurst, W.J., Blitzer, R.D., Pasinetti, G.M. (2014). Cocoa extracts reduce oligomerization of amyloid- β : implications for cognitive improvement in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *41*(2), 643–650.
- Watanabe, T., Arai, Y., Mitsui, Y., Kusaura, T., Okawa, W., Kajihara, Y., Saito, I. (2006). The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, *28*(5), 439–449.
- Waterhouse, A.L. (2003). UNIT I1.1 Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. DOI: 10.1002/0471142913.faa0101s06
- Welch, A., MacGregor, A., Jennings, A., Fairweather-Tait, S., Spector, T., Cassidy, A. (2012). Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *Journal of Bone and Mineral Research*, *27*(9), 1872–1878.
- Weng, C.J., Yen, G.C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, *38*(1), 76–87.
- Williamson, G., Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(1 Suppl), 243S–255S.
- Williamson, G., Dionisi, F., Renouf, M. (2011). Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(6), 864–873.
- Wollgast J., Anklam E. (2000a). Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. *Food Research International*, *33*(6), 449–459.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000b). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, *33*(6), 423–447.
- Wollgast, J., Pallaroni, L., Agazzi, M.E., Anklam, E. (2001). Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with

- electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 926(1), 211–220.
- Wollgast, J. (2004). *The Contents and Effects of Polyphenols in Chocolate*. Dissertation for obtaining the degree of doctor at the Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics, and Environmental Management at the University of Gießen, Germany.
- Wu, C.H., Lu, F.H., Chang, C.S., Chang, T.C., Wang, R.H., Chang, C.J. (2003). Relationship among habitual tea consumption, percent body fat, and body fat distribution. *Obesity Research*, 11(9), 1088–1095.
- Xiao, J., Hoogger, P. (2015). Stability of dietary polyphenols under the cell culture conditions: avoiding erroneous conclusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5), 1547–1557.
- Yamada, H., Kawado, M., Aoyama, N., Hashimoto, S., Suzuki, K., Wakai, K., Suzuki, S., Watanabe, Y., Tamakoshi, A. (2014). Coffee consumption and risk of colorectal cancer: The Japan Collaborative Cohort Study. *Journal of Epidemiology*, 24(5), 370–378.
- Yamashita, K., Yatsuya, H., Muramatsu, T., Toyoshima, H., Murohara, T., Tamakoshi, K. (2012). Association of coffee consumption with serum adiponectin, leptin, inflammation and metabolic markers in Japanese workers: a cross-sectional study. *Nutrition and Diabetes*, 2(4), e33.
- Yang, C.S., Lee, M.J., Chen, L. (1999). Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 8(1), 83–89.
- Yazdaniyan, M., Glynn, S.L., Wright, J.L., Hawi, A. (1998). Correlating portioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharmacological Research*, 15(9), 1490–1494.
- Yukawa, G.S., Mune, M., Otani, H., Tone, Y., Liang, X.M., Iwahashi, H., Sakamoto, W. (2004). Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry*, 69(1), 70–74.
- Zamora-Ros, Forouhi, N.G., Sharp, S.J., González, C.A., Buijsse, B., Guevara, M., y cols. (2013). The association between dietary flavonoid and lignin intakes and incident type 2 diabetes in European populations. *Journal of Nutrition*, 135(6), 1470–1479.
- Zampelas, A., Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Stefanadis, C. (2004). Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 862–867.

- Zhang, L., Zheng, Y., Chow, M.S.S., Zuo, Z. (2004). Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics*, 287(1-2), 1–12.
- Zhang, W.L., López-García, E., Li, T.Y., Hu, F.B., Van Dam, R.M. (2009). Coffee consumption and risk of cardiovascular events and all-cause mortality among women with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 52(5), 810–817.
- Zhang, H., Jiang, L., Guo, H., Sun, J., Liu, X., Liu, R., Ding, Q., Ren, F. (2013). The inhibitory effect of milk on the absorption of dietary phenolic acids and the change in human plasma antioxidant capacity through a mechanism involving both milk proteins and fats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(7), 1228–1236.
- Zujko, M.E., Witkowska, A.M., Waśkiewicz, A., Sygnowska, E. (2012). Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population. *Advances in Medical Sciences*, 57(2), 375–384.