

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la aplicación de luz UVC para la inducción de compuestos bioactivos en uvas

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Diez, Arturo Anadón Navarro, Margarita Arboix Arzo, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpenter, M^a Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Manuel Martín Esteban, Susana Monereo Megías, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Andrés Otero Carballeira, Fernando Rodríguez Artalejo, Elías Rodríguez Ferri, José Manuel Sánchez-Vizcaino Rodríguez, Vicente Sanchis Almenar, Gregorio Varela Moreiras, Pablo Vera Vera, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2007-009

Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria de 14 de noviembre de 2007

Grupo de Trabajo

Andreu Palou Oliver
Arturo Anadón Navarro
Vicente Calderón Pascual (AESAN)
Josefa Rubio Mañas (AESAN)
Marta Barea Sánchez (AESAN)
Juan Carlos Espin (Consultor externo)
Francisco A. Tomás-Barberán (Consultor externo)

Resumen

Los polifenoles se encuentran dentro de los constituyentes bioactivos no nutricionales de los alimentos. Constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas, como los taninos hidrolizables y condensados.

La principal de las funciones de los polifenoles está relacionada con la defensa de la planta frente al ataque de patógenos. La resistencia puede ser debida a la acción bactericida-bacteriostática o antifúngica del propio polifenol, o bien por la generación de productos de oxidación de éstos (quinonas y melaninas, de reconocido carácter antimicrobiano).

En lo que respecta al efecto de los polifenoles en humanos, numerosos estudios indican el efecto de los polifenoles frente a diversas enfermedades como las cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas. El mejor aval científico en la actividad de los polifenoles viene dado con el estrés oxidativo y las enfermedades cardiovasculares.

Los estudios de toxicidad de los polifenoles más representativos de los concentrados de uva, resveratrol y catequinas (prociandinas), realizados en animales y humanos, han dado como resultado la ausencia de efectos adversos tanto a dosis moderadas como muy altas.

El contenido de polifenoles en frutas, hortalizas y sus derivados (zumos, vino, confituras, etc.) se ve afectado por diversos factores agronómicos, genéticos, postcosecha y relativos al procesado. El uso de la luz UVC es un procedimiento muy estudiado para inducir la producción de estilbenos en la uva y preservar la calidad de ésta.

El proceso evaluado está basado en tecnologías y procesos ya utilizados en la industria alimentaria (lámparas germicidas). En este sentido, la aplicación de la luz UVC como tecnología para la inducción de compuestos bioactivos de uva recolectada puede aumentar el contenido en fitoalexinas y estilbenos, fundamentalmente el resveratrol.

En ningún estudio realizado se ha documentado la presencia de otros metabolitos en uva como consecuencia del tratamiento con UVC, a excepción de los estilbenos. Así mismo, no se ha documentado evidencia científica que avale la presencia de efectos adversos en animales tras el empleo de resveratrol.

Palabras clave

Compuestos bioactivos, estilbenos, luz ultravioleta, polifenoles, resveratrol, uva, UVC.

Report of the Scientific Panel of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to the use of UVC light for stimulating production of bioactive compounds in grapes.

Abstract

Polyphenols are a type of non-nutritive bioactive compound found in foods. They comprise a large group of substances that include families of differently-structured compounds; some, such as phenolic acid derivatives, are relatively simple, whilst others, such as hydrolysable and condensed tannins, are polymer molecules.

The primary function of polyphenols has to do with defending the plant against attacking pathogens. The resistance may be due to the bactericidal-bacteriostatic or antifungal properties of the polyphenols themselves, or to the oxidation products that they generate (quinones and melanines, recognised antimicrobial agents).

Regarding the effect of polyphenols in humans, numerous studies indicate that polyphenols have an effect on various illnesses such as cardiovascular diseases, different types of cancer, and neurodegenerative diseases. The best scientific evidence of polyphenol activity is seen in cases of oxidative stress and cardiovascular diseases.

Toxicity studies of the polyphenols most commonly found in grape concentrate, resveratrol and catequines (procyanidines), performed in animals and in humans, have shown no adverse results whether with moderate or with very high doses.

Polyphenol content in fruits, vegetables and their derivatives (juices, wine, preserves, etc.) is affected by various agronomic, genetic, post-harvest and processing factors. The use of UVC light for stimulating the production of stilbenes in grapes and preserving their quality has been thoroughly studied.

The assessed procedure is based on technologies and procedures currently in use in the food industry (germicidal lamps). In this way, irradiation with UV-C light as a technology to induce production of bioactive compounds in harvested grapes can increase content of phytoalexins and stilbenes, mainly resveratrol.

Apart from stilbenes, no other grape metabolites resulting from UVC treatment have had their presence documented in a study. Furthermore, no documented scientific evidence shows that use of resveratrol causes adverse effects on animals.

Key Words

Bioactive compounds, stilbenes, ultraviolet light, polyphenols, resveratrol, grape, UVC.

Introducción

Los efectos que ejercen algunos alimentos sobre la salud van más allá de los que cabría esperar por su contenido en nutrientes. Se ha sugerido que las propiedades adicionales se deban a los metabolitos secundarios que contienen estos alimentos (polifenoles, derivados azufrados, terpenoides, etc.). La propiedad antioxidante es la que ha recibido más interés, ya que los procesos oxidativos son el origen de muchas enfermedades, como son las cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. El consumo de antioxidantes, abundantes en los alimentos de origen vegetal, ayuda a disminuir la incidencia y virulencia de dichas enfermedades.

Los efectos adicionales sólo tienen reflejo en la fisiología cuando forman parte de un hábito alimentario que hace que se ingieran estas sustancias durante un largo periodo de tiempo y cuando los síntomas de la enfermedad que ayudan a combatir todavía no han aparecido (Dragsted et al., 1993). Es decir, ejercen una actividad preventiva y no curativa. Esto se debe a que se trata de moléculas con relativamente baja actividad biológica, sobre todo cuando se comparan con fármacos, lo que dificulta considerablemente probar su actividad en experimentos realizados durante periodos limitados de tiempo, como es el caso de la mayoría de los farmacológicos. Para estudiar esta actividad, que sólo se hace evidente a largo plazo, es necesario recurrir a estudios epidemiológicos.

Dentro de los constituyentes bioactivos no nutricionales de los alimentos se encuentran los polifenoles. Constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas (Figura 1), desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas, como los taninos hidrolizables y condensados.

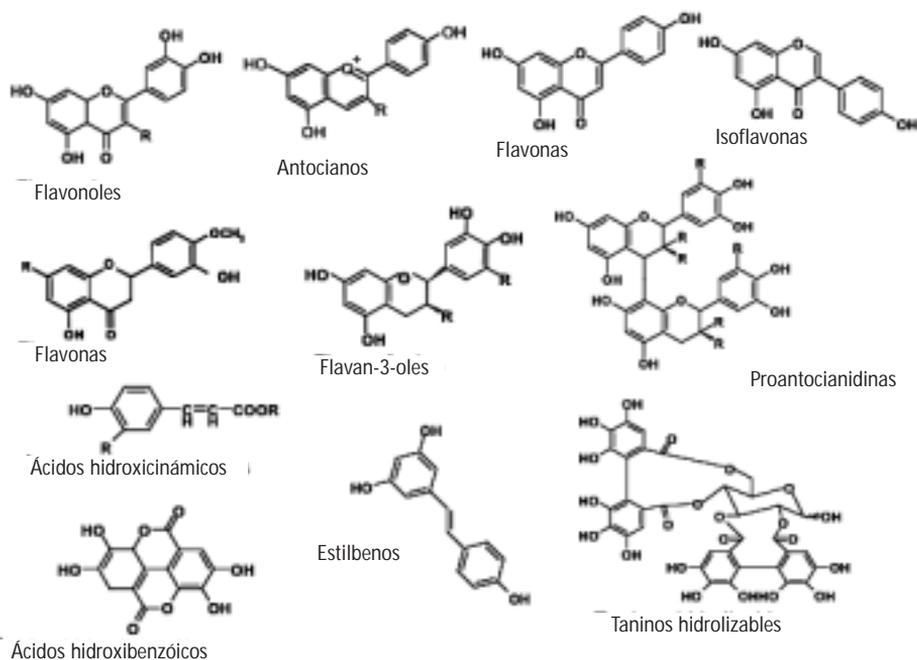


Figura 1. Principales familias de polifenoles de alimentos

Polifenoles

Los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica.

- Los flavonoides (más de 5.000 compuestos), incluyen a las antocianinas, los flavonoles y flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavan-3-oles.
- Los fenil propanoides que incluye a los derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, sinápico, p-cumárico).
- Los estilbenoides (especialmente resveratrol y piceatanol).
- Los derivados del benzoico (ácido gálico y elágico, etc.).

La principal de las funciones de los polifenoles está relacionada con la defensa de la planta frente al ataque de patógenos. La resistencia puede ser debida a la acción bactericida-bacteriostática o antifúngica del propio polifenol, o bien por la generación de productos de oxidación de éstos (quinonas y melaninas, de reconocido carácter antimicrobiano). Existen algunos metabolitos secundarios de plantas, denominados fitoalexinas, que se inducen específicamente ante la respuesta de un estrés, como el causado por los patógenos.

Atendiendo al número de estudios realizados relativos a su actividad biológica o a su contenido en la dieta, los polifenoles más relevantes son los flavonoles (derivados de la quercetina; presentes en la mayoría de las frutas), las procianidinas (uva, cacao), catequinas (té), las isoflavonas (soja), los estilbenos (uva, vino), el hidroxitirosol (aceite de oliva virgen) y el ácido elágico (frutas del bosque, nueces, granada).

1. Efecto de los polifenoles en humanos

Numerosos estudios indican el efecto de los polifenoles frente a diversas enfermedades como las cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Williamson y Manach, 2005). El mejor aval científico en la actividad de los polifenoles viene dado con el estrés oxidativo y las enfermedades cardiovasculares.

1.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la producción de compuestos reactivos y los antioxidantes. Durante el estrés oxidativo los compuestos reactivos pueden agredir a las estructuras celulares produciendo un daño. Como resultado se puede producir una adaptación de las células (o del organismo) por una sobre-expresión de los sistemas de defensa; un daño celular; o bien, la muerte celular.

Los compuestos o especies reactivas en general y, particularmente, los radicales libres, están implicados en un gran número de enfermedades como son el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, infertilidad masculina, enfermedades inflamatorias, enfermedades renales, cataratas, enfermedades hepáticas, enfermedades infecciosas (VIH), enfermedades respiratorias y el proceso de envejecimiento celular en general (Chowienczyk et al., 2000) (Halliwell, 2000) (Halliwell, 2001) (Halliwell, 2002) (Sohal et al., 2002) (Galli et al., 2002).

1.2 Enfermedades cardiovasculares

Son numerosas las vías por las cuales los polifenoles podrían mejorar la función endotelial, produciendo un efecto neto vasodilatador-hipotensivo y contribuyendo a regular la agregación plaquetaria:

- Aumento de NO: inducción de eNOS, iNOS.
- Aumento de prostaciclina (vasodilatador).
- Mantenimiento del correcto balance de citoquinas.
- Inhibición de moléculas de adhesión.
- Disminución de endotelina (vasoconstrictor).
- Disminución del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF).
- Inhibición de metaloproteasas (MMPs), etc.

Se ha constatado el papel preventivo para la salud cardiovascular de algunos alimentos debido a la presencia de ciertos compuestos, como la uva y sus derivados, por su presencia en procianidinas y resveratrol (Lekakis et al., 2005) (Marfella et al., 2006).

2. Resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-*trans*-trihidroxiestilbeno) fue aislado por primera vez de las raíces del heléboro (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) en 1940 (Takaoka, 1940), y después, en 1963, de las raíces de *Polygonum cuspidatum* (Nonomura et al., 1963). Otras fuentes de resveratrol menos significativas se encuentran en el cacahuete (Sobolev y Cole, 1999), o en algunas bayas del género *Vaccinium* (arándanos) (Rimando et al., 2004).

El resveratrol proviene en muchos casos de extractos de *Vitis vinifera* y en los países asiáticos (especialmente China y Malasia) ha sido extraído y purificado a partir de la raíz del *Polygonum cuspidatum*, un arbusto originario de Asia. Actualmente existen muchos preparados que contienen resveratrol, comercializados en todo el mundo. En España se fabrica y se comercializa por varios elaboradores de complementos alimenticios.

Se ha descrito que el resveratrol podría prevenir o disminuir el riesgo de un amplio rango de enfermedades, incluyendo el cáncer (Jang et al., 1997) (Asensi et al., 2002), las enfermedades cardiovasculares y daños isquémicos (Sinha et al., 2002) (Wang et al., 2002) (Bradamante et al., 2004) así como aumentar la resistencia a situaciones de estrés y prolongar la vida media de varios organismos, desde levaduras (Howitz et al., 2003) hasta peces (Valenzano et al., 2006) y ratones (Baur et al., 2006).

El resveratrol se encuentra en Fase I y II de ensayos clínicos como preventivo de cáncer. Un estudio reciente de Fase I en humanos ensayó resveratrol sin encontrar efectos adversos (Boocock et al., 2006).

2.1 Biodisponibilidad y metabolismo del resveratrol

El resveratrol presenta una absorción alta, alcanza varios órganos y se metaboliza dando lugar principalmente a derivados glucurónidos y sulfatos. Por otro lado se ha atribuido un papel significativo a la flora colónica en la producción del metabolito dihidroresveratrol (Walle et al., 2004).

El resveratrol alcanza picos máximos de concentración en plasma aproximadamente tras 30 minutos de la ingesta, siendo los glucurónidos y sulfatos, cuya concentración varía en función de la dosis

administrada, los mayoritarios en plasma (Wenzel y Somoza, 2005) (Marier et al., 2002). La concentración del precursor ingerido (aglicona) en plasma depende, hasta cierto punto, de la dosis administrada, pero nunca alcanza valores mayores de 7 μM en ratas (Marier et al., 2002), y presenta una vida media relativamente corta, de 8 a 14 minutos (Marier et al., 2002) (Asensi et al., 2002), lo que sugiere un intenso metabolismo presistémico fruto de la acción de enzimas detoxificantes de Fase II (Walle et al., 2004), apoyando el hecho de que a mayor dosis administrada sí se encuentre mayor concentración de derivados en plasma (pero no de aglicona).

La circulación enterohepática del resveratrol únicamente se ha descrito en ratas (Marier et al., 2002), no se ha podido establecer este punto en el hombre, aunque se ha sugerido que implica una re-entrada de resveratrol aglicona y posterior conjugación (Goldberg et al. 2003) (Walle et al., 2004).

Como en el caso de la mayoría de polifenoles, las formas conjugadas (glucurónidos, sulfatos, metilglucurónidos, etc.) son, con diferencia, las más abundantes en la circulación sistémica. El hecho de que se haya descrito que la actividad *in vivo* sea a veces mayor que la descrita *in vitro* sugiere que alguna forma conjugada, generada *in vivo*, es más potente que el precursor (aglicona) ingerido (Casper et al., 1999). El análisis de los metabolitos de plasma después de administrarse oralmente no ha podido ser completamente detallado excepto en la presencia de derivados glucuronidos y sulfatos.

En la orina se han encontrado 5 metabolitos, el resveratrol monosulfato, dos isómeros del derivado glucurónido, y los conjugados monosulfato y monoglucurónido del metabolito bacteriano dihidroresveratrol. Estudios previos muestran que la suma total de derivados sulfatos se aproxima al 37% de metabolitos en la orina, y el total de glucurónidos al 19% junto con trazas de resveratrol aglicona. Los derivados glucurónidos y sulfatos del resveratrol son excretados en orina (de ratas y hombre), en lo que se considera la mayor vía de eliminación de este estilbeno, lo que viene avalado por la progresiva disminución de resveratrol detectada en riñón de ratas (Bertelli et al., 1998). Considerando estas cifras, existe un alto porcentaje de resveratrol cuyo destino se desconoce. También siguen sin identificar algunos metabolitos (Walle et al., 2004).

La vida media de los metabolitos en sangre se aproxima a las 9 horas, lo que indica que la exposición a estos derivados es mucho mayor que la debida al resveratrol aglicona. Al menos en parte la actividad debida a algunos de estos derivados podría explicar la paradoja relativa a la actividad del resveratrol respecto a su rápido metabolismo y escasa presencia como forma aglicona (Gesher et al., 2003). Otra explicación a este hecho podría residir en la participación de cascadas de señales activadas por el resveratrol aglicona a pesar de su baja concentración y/o rápido metabolismo. Se ha descrito en hombre que la excreción con el tiempo depende de la concentración de resveratrol presente en plasma. Sin embargo, no existe una correlación entre la cantidad excretada y la ingerida. Por tanto, cuando se ingieren pequeñas cantidades de resveratrol, éste es rápidamente metabolizado y eliminado mientras que si la cantidad ingerida es grande, entonces se puede detectar en tejidos y puede potencialmente entrar en las células para desplegar su acción (Meng et al., 2004). Esto podría explicarse por una "inhibición por exceso de sustrato" en transportadores y/o por una "inhibición competitiva" de estos transportadores mediada por la presencia de otros polifenoles (Lancon et al., 2004).

Urpí-Sardá et al. (2005) demostraron que el resveratrol se acumula en las partículas LDL, pudiendo contribuir a disminuir su susceptibilidad a oxidarse y por tanto incidiendo en un paso clave de la

aterogénesis. Se ha constatado que se detecta en plasma en igual cantidad tras administrar disuelto el resveratrol en diferentes vehículos (Goldberg et al., 2003).

Se ha asumido que la biodisponibilidad del resveratrol es baja, entendiéndose como ésta, la presencia circulante en sangre de la molécula sin modificar. Sin embargo, como se ha expuesto anteriormente, incluso la ingesta de dosis bajas pueden acumularse en las LDL incidiendo favorablemente en la prevención de episodios de aterosclerosis y, además, algunas formas conjugadas de larga vida media en circulación sistémica parecen presentar una alta actividad biológica. Geshet et al. (2003) se hicieron eco de esta aparente contradicción, la alta actividad biológica mostrada por el resveratrol y su aparente baja biodisponibilidad.

3. Toxicidad de los polifenoles

Kuhnau (1976) determinó que la ingesta diaria de polifenoles en EE.UU. era de aproximadamente 1 gramo al día. Los métodos de detección han evolucionado desde entonces, pero esta cifra sigue manteniéndose de forma general (Manach et al., 2004) (Brat et al., 2006) (Chun et al., 2007), aunque puede sufrir variaciones sustanciales entre países (Gran Bretaña por el consumo del té, China y Japón por el consumo de soja, etc.) y entre distintos sectores de la población, según sea su consumo de este tipo de alimentos (Manach et al., 2004).

Los estudios de toxicidad de los polifenoles más representativos de los concentrados de uva, resveratrol y catequinas (procianidinas), realizados en animales (Fujii et al., 2007) y humanos (Clifton, 2004), han dado como resultado la ausencia de efectos adversos a dosis muy altas, así como a dosis más moderadas (Brooker et al., 2006).

Por lo que respecta al resveratrol, existen evidencias de ausencia de toxicidad incluso a dosis muy altas. En este sentido, Juan et al. (2002) y Hebbar et al. (2005) demostraron la ausencia de efectos adversos en animales a dosis elevadas. Así mismo, Valverde et al. (2001) describen que el resveratrol no es mutagénico en el ensayo de mutación inversa en bacterias con y sin activación metabólica. En este mismo sentido, el estudio genotóxico llevado a cabo en el Centro Nacional de Alimentación (CNA) de la AESAN ha obtenido unos resultados que muestran efecto antimutagénico frente a todos los mutagenos y en todas las cepas en las que se realizó el estudio. Otros autores no han observado toxicidad renal en ratas (Crowell et al., 2004) ni efectos adversos serios en ratones, excepto una ligera anemia e incremento del colesterol (Horn et al., 2007) a altas dosis durante largo tiempo.

Cuestión y términos en que se plantea

Se plantea la aplicación de la luz ultravioleta C en uva recolectada como tecnología para inducir estilbenos, fundamentalmente resveratrol, evaluándose la seguridad y eficacia del proceso.

Inducción de polifenoles

El contenido de polifenoles en frutas, hortalizas y sus derivados (zumos, vino, confituras, etc.) se ve afectado por diversos factores. Dichos factores pueden aumentar el contenido en polifenoles cuando inducen la actividad enzimática anabólica (síntesis versus degradación); también pueden promover

asociaciones y derivar a nuevos compuestos, o bien pueden provocar la disminución cuando la actividad predominante es la catabólica (enzimas oxidativas), o cuando se producen degradaciones espontáneas relacionadas con la temperatura, pH, etc. Los factores más importantes que afectan el contenido de polifenoles (Tomás-Barberán y Espín, 2001) son:

- *Agronómicos*: clima, plagas, luz, suelo, zona geográfica, etc.
- *Genéticos*: cantidad de enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de estos metabolitos, tipo de isoenzimas, localización de éstas en los tejidos, etc.
- *Postcosecha*: manipulación, daño mecánico, conservación, etc.
- *Procesado*: tanto industrial (fermentaciones, tratamientos térmicos, triturados, etc.) como doméstico (tipo de cocinado-microondas-vapor-agua, etc.).

Cuando los factores que afectan se pueden controlar y usar de manera dirigida para un objetivo concreto, se puede hablar de 'estrategias' para afectar el contenido polifenólico. Normalmente, las estrategias van encaminadas a preservar los polifenoles (mediante la inactivación de enzimas oxidativas) o bien para aumentar el contenido de éstos, bien por su efecto en la calidad sensorial, bien por su potencial efecto en la salud. Así, podríamos hablar de estrategias (Tomás-Barberán y Espín, 2001):

- *Genéticas*: cuando el objetivo es manipular genéticamente el vegetal para obtener variedades con mayor o menor actividad de alguna(s) enzima(s) concretas (normalmente para obtener variedades con menor actividad polifenol oxidasa, la principal enzima implicada en el pardeamiento enzimático de frutas y hortalizas a través de la oxidación de compuestos fenólicos para formar melaninas). Sin embargo, existe rechazo entre los consumidores a este tipo de manipulaciones y además, suele tener graves consecuencias para la planta (menor crecimiento, menor resistencia a las plagas, etc.).

- *Agronómicas*: como el uso de hormonas, ciclos luz-oscuridad como en el caso de manzanas para aumentar su pigmentación, etc.

- *Postcosecha*: entre las que, por ejemplo, se encuentran la refrigeración, los tratamientos a altas temperaturas, tratamientos 'emergentes' (como ultrasonidos, altas presiones, luz UVC y radiaciones ionizantes), atmósferas controladas, recubrimientos comestibles, tratamientos químicos, y combinaciones de dos o más de los anteriores.

1. Empleo de la luz UVC para la inducción de polifenoles

La energía ultravioleta (UV) es un tipo de radiación no ionizante con una longitud de onda de 100 a 400 nm que se clasifica en tres tipos: onda larga, UVA (313-400 nm), onda media, UVB (280-315 nm) y onda corta, UVC (200-280 nm). La UVC tiene su pico de emisión a 254 nm y es, de las tres, la que mayor acción germicida posee. El uso de la luz UVC como técnica de conservación de productos alimenticios se conoce desde principios del siglo XX y ha sido estudiada intensamente en este sentido (Abshire y Dunton, 1981) (Bintsis et al., 2000). El tratamiento con UVC ha sido considerado un tratamiento alternativo para preservar la calidad de frutas y hortalizas (Yaun et al., 2004) y se ha descrito el efecto beneficioso de la aplicación de pequeñas dosis de esta radiación para la conservación de distintas frutas y hortalizas (Ben-Yehoshua et al, 1992) (Nigro et al., 1998).

Dentro de los distintos tipos de estreses utilizados para inducir estilbenos, la luz ultravioleta C es uno de los más extensamente estudiados (Langcake y Pryce, 1976) (Langcake y Pryce, 1977) (Pryce y

Langcake, 1979) (Cantos et al., 2001) (Cantos et al., 2002) (Cantos et al., 2003a) (Cantos et al., 2003b) (González-Barrio et al., 2006). Según los estudios realizados, no existe ninguna hipótesis sólida que implique la presencia de otros compuestos no identificados en uva tras el tratamiento UVC.

1.1 Eficacia del proceso

En este sentido, Cantos et al. (2001) observaron que al someter las uvas a un tratamiento con luz ultravioleta se producía el aumento de un polifenol de manera significativa. Este polifenol mayoritariamente inducido se identificó como *trans*-resveratrol. Otros compuestos identificados fueron el piceatanol, químicamente similar al resveratrol pero con un grupo hidroxilo adicional, y varios tipos de viniferinas que son dímeros y trímeros de resveratrol. Todos estos compuestos forman parte del grupo de los estilbenos, por lo que se concluía que, en esencia, el proceso simula lo que ocurre en la naturaleza cuando la uva se ve agredida por algún tipo de estrés, si bien, en este caso, el proceso se controla para enriquecer la uva selectivamente en estilbenos. La optimización del tratamiento de la uva con luz UVC se llevó a cabo determinando las relaciones adecuadas entre tiempo de iluminación, potencia de las lámparas, distancia, etc., según la variedad de la uva para inducir el máximo de estilbenos posible sin deterioro de dichas uvas. El contenido de resveratrol en las uvas tratadas se situaba, según la variedad de las uvas, entre 0,69 mg/100 g peso fresco y 2,3 mg/100 g de peso fresco (Figura 2) (Cantos et al., 2002).

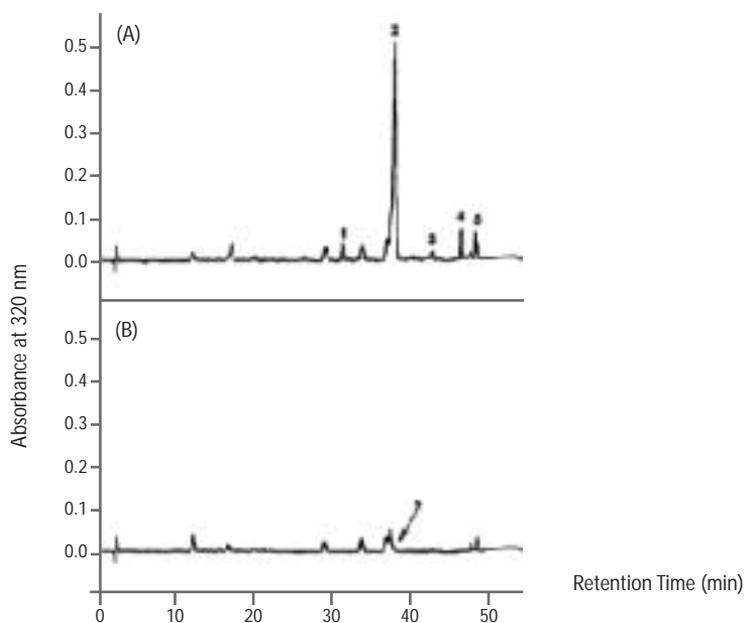
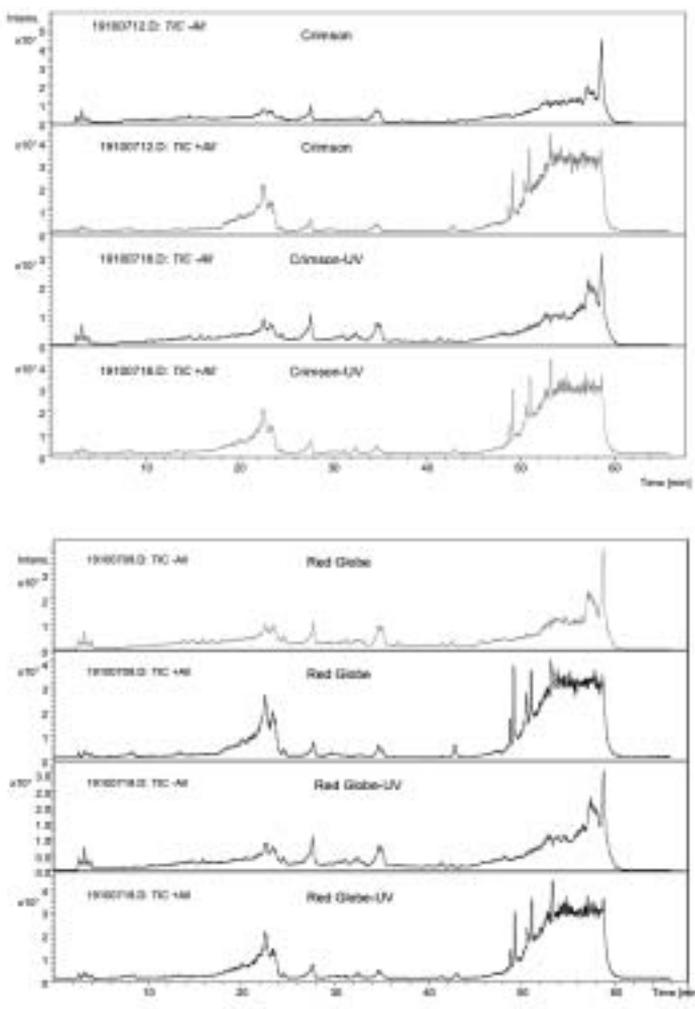


Figura 2. Cromatogramas HPLC de extractos de piel de uva roja variedad Red Globe a 320 nm (A) Uvas irradiadas UVC: (1) Piceatanno, (2) *trans*-resveratrol (el pico señalado con la flecha), (3) *cis*-resveratrol, (4) ϵ 1- viniferina y (5) ϵ 2 - viniferina. (B) Uvas control (no tratadas). Fuente: (Cantos et al., 2002).

1.2 Seguridad del proceso de inducción de polifenoles

La aplicación continua de luz UVC ha sido descrita en manzanas (Wilson et al., 1997). Esta técnica no deja residuos en el vegetal y es letal para la mayoría de microorganismos (Bintsis et al., 2000). En EE.UU. se permite el uso de luz UVC en productos alimentarios, incluyendo frutas, para controlar la carga microbiana superficial (Rhim et al., 1999).

La luz UVC es un procedimiento extensivamente estudiado para inducir estilbenos en uva, y preservar la calidad de ésta (Langcake y Pryce, 1976) (Langcake y Pryce 1979) (Pryce y Langcake, 1977) (Roggero y García-Parrilla, 1995) (Nigro et al., 1998) (Douillet-Breuil et al., 1999) (Versari et al., 2001) (Cantos et al., 2000) (Cantos et al., 2001) (Cantos et al., 2002) (Cantos et al., 2003a) (Cantos et al., 2003b) (Takayanagi et al., 2004) (González-Barrio et al., 2006) (Romanazzi et al., 2006). En ningún estudio realizado se ha documentado la presencia de otros metabolitos de uva como consecuencia del tratamiento con UVC, a excepción de los estilbenos (Figuras 3 y 4).



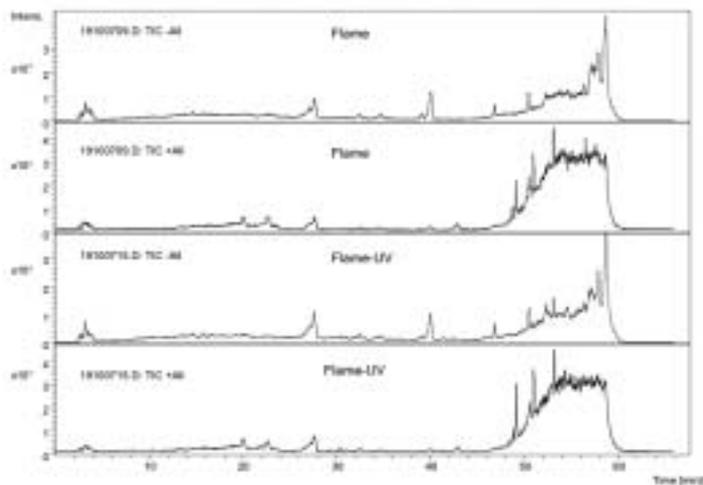


Figura 3. 'Total Ion Chromatogram' (cromatograma total de iones moleculares) en modo positivo y negativo, de tres variedades de uva antes y después del tratamiento con UVC. No se detectan nuevos iones a excepción de los estilbenos en las tratadas con luz UVC.

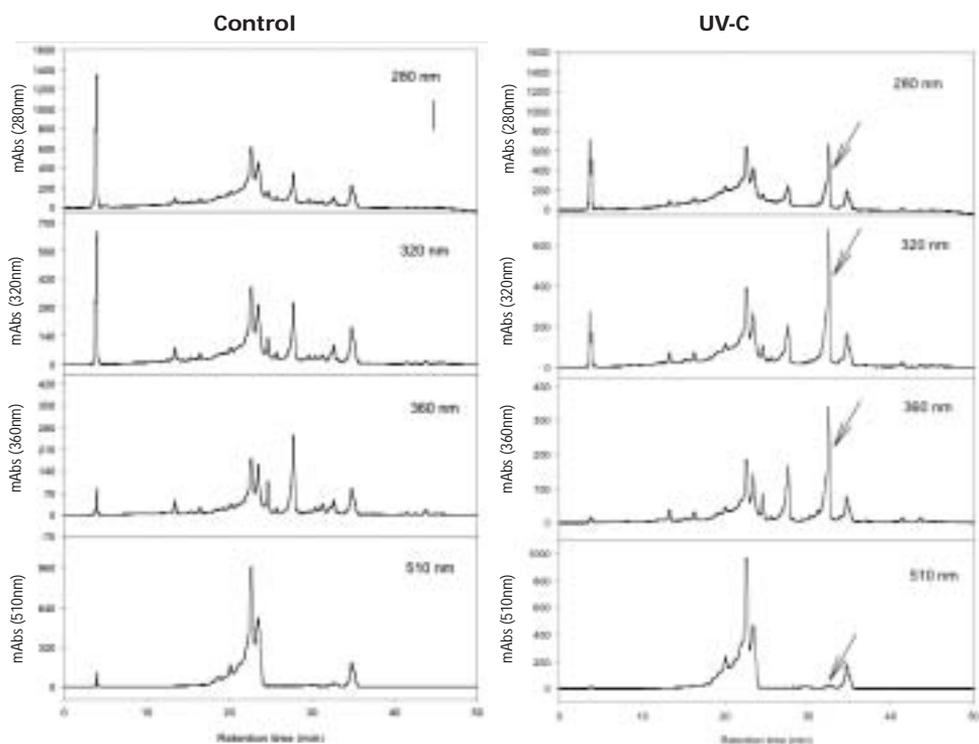


Figura 4. Cromatogramas a distintas longitudes de onda (ultravioleta y visible) de una variedad de uva tinta (Crimson), antes y después del tratamiento con UVC. No se observa la inducción de ninguna otra sustancia a excepción del resveratrol (marcado con una flecha).

2. Procedimiento para la inducción de polifenoles por luz UVC

La optimización del tratamiento de la uva con luz UVC se lleva a cabo determinando las relaciones adecuadas entre tiempo de iluminación, potencia de lámparas, distancia, etc. Se calculó el tiempo que necesitaban las uvas (según variedad) para inducir el máximo de estilbenos posible sin deterioro de estas uvas. Todas esas variables son críticas pues, de no controlarlas convenientemente, se puede causar daño en la uva o inducir tan poca cantidad que sea irrelevante. La esencia de esta modelización (aunque se omiten algunos detalles propios de cualquier *know-how* de una patente) quedó reflejada en la publicación de Cantos et al. (2001). En ella se constata que el tratamiento con luz UVC no induce ningún otro metabolito secundario aparte de los estilbenos mencionados (avalado también por otros estudios recogidos en la literatura científica). Las uvas preservaron su contenido en vitamina C y no cambió significativamente el perfil del resto de los polifenoles. A partir de ahí se ha aplicado el método a otras variedades de uva blancas y tintas de mesa (Cantos et al., 2002) y de vino (Cantos et al., 2003a) así como unos preliminares en la fabricación de vino (Cantos et al., 2003b), si bien, el estado de la uva en vendimia hacen difícil el empleo de esta técnica (madurez, rotura de granos, etc.).

El contenido medio de resveratrol en estas uvas tratadas es de aproximadamente 2-3 mg/100 g peso fresco.

El escalado se consigue en un túnel piloto con lámparas germicidas UVC similares a las usadas en la desinfección de frutas y hortalizas. El tratamiento es en continuo y la iluminación dura aproximadamente 1 minuto. Después, la uva permanece en una cámara a temperatura controlada el tiempo necesario (viable industrialmente) para que la uva induzca el resveratrol.

Conclusiones del Comité Científico

El proceso evaluado está basado en tecnologías y procesos ya utilizados en la industria alimentaria (lámparas germicidas).

La aplicación de la luz UVC como tecnología para la inducción de compuestos bioactivos de uva recolectada puede aumentar el contenido en fitoalexinas y estilbenos, fundamentalmente el resveratrol.

No se ha documentado la inducción por la luz UVC de otros metabolitos secundarios en uva aparte de los estilbenos mencionados. Así mismo, no se ha documentado evidencia científica que avale la presencia de efectos adversos en animales tras el empleo de resveratrol.

Referencias

- Abshire, R.L. y Dunton, H. (1981). Resistance of selected strains of *Pseudomonas aeruginosa* to low intensity ultraviolet radiation. *Applied Environmental Microbiology*, 41. pp:1419-1423.
- Asensi, M., Medina, I., et al. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology and Medicine*. 33. pp: 387-398.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444. pp: 337-342.
- Baur, J.A. y Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential or reveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews*. 5. pp: 493-506.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., et al. (1992). Performed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40. pp: 1217-1221.

- Bertelli, A., Bertelli, A.A.E., Gozzini, A., et al. (1998). Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 24. pp: 133-138.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R.K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry-a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80. pp: 637-645.
- Boocock, D.J., Gesher, A.J., et al. (2006). Phase I single-dose safety and pharmacokinetics clinical study of the potential cancer chemopreventive agent resveratrol. *Proceedings of the American Association of Cancer Research*. 47: Abstract #5741.
- Bradamante, S., Barengi, L., et al. (2004). Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews*. 22. pp: 169-188.
- Brat, P., George, S., et al. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal of Nutrition*, 136. pp: 2368-2373.
- Brooker, S., Martin, S., et al. (2006). Double-blind, placebo-controlled, randomised phase II trial of IH636 grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) in patients with radiation-induced breast induration. *Radiotherapy and Oncology*. 79. pp: 45-51.
- Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, F.A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48. pp: 4606-12.
- Cantos, E., Espín, J.C., et al. (2001). Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes. A new functional fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49. pp: 5052-5058.
- Cantos, E., Espín, J.C., et al. (2002). Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. pp: 6322-6329.
- Cantos, E., Tomás-Barberán, F.A., et al. (2003a). Differential stilbene induction susceptibility of seven red wine grape varieties upon postharvest UV-C irradiation. *European Food Research and Technology*, 217. pp: 253-258.
- Cantos, E., Espín, J.C., et al. (2003b). Postharvest UV-C Irradiated Grapes as Potential Source for Producing Stilbene-Enriched Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51. pp: 1208-1214.
- Casper, R.F., Quesne, M., Rogers, I.M., et al. (1999). Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity. *Molecular Pharmacology*. 56. pp: 784-790.
- Chowieniczky, P.J., Brett, S.E., et al. (2000). Oral treatment with an antioxidant (radoxelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes. *Diabetologia*. 43. pp: 974-977.
- Chun, O.K., Chung, S.J., et al. (2007). Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *Journal of Nutrition*. 137. pp:1244-1252.
- Clifton, P.M. (2004). Effect of grapeseed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high risk subjects. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. pp: 272-278.
- Crowell, J.A., Korytko, P.J., et al. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological Sciences*. 82. pp: 614-619.
- Douillet-Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M. y Bessis, N. (1999). Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. In response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 pp: 4456-4461.
- Dragsted, L.O., Strube, M., et al. (1993). Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacology & Toxicology*. 72. pp: 116-35.
- Fujii, H., Sun, B.X., et al. (2007). Evaluation of the safety and toxicity of the oligomerized polyphenol Oligonol. *Food and Chemical Toxicology*. 45. pp: 378-387.
- Galli, R.L., Shukitt-Halle, B., et al. (2002). Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits. *Annals of New York Academy of Sciences*. 959. pp: 128-132.
- Gesher, A.J. y Steward, W.P. (2003). Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 12, pp: 953-957.
- Goldberg, D.A., Yan, J. et al. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*. 36. pp: 79-87.

- González-Barrio, R., Beltrán, D., Cantos, E., Gil, M.I., Espin, J.C. y Tomás-Barberán, F.A. (2006). Comparison of Ozone and UV-C Treatments on the Postharvest Stilbenoid Monomers, Dimers and Trimers Induction in Var. 'Superior' White Table Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. pp: 4222-4228
- Halliwell, B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*. 47. pp: 410-418.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 18. pp: 685-716.
- Halliwell, B. (2002). Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical & Biology Medicine*. 32. pp: 968-974.
- Hebbar, V., Shen, G.X., et al. (2005). Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sciences*. 76. pp: 2299-2314.
- Horn, T.L., Cwik, M.J., et al. (2007). Oncogenicity evaluation of resveratrol in p53 (+/-) (p53 knockout) mice. *Food and Chemical Toxicology*. 45. pp: 55-63.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., et al. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 425. pp: 191-196.
- Jang, M.S., Cai, E.N., et al. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275. pp: 218-220.
- Juan, M.E., Vinardell, M.P. y Planas, J.M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *Journal of Nutrition*. 132. pp: 257-260.
- Kuhnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 24. pp: 117-91.
- Lancon, A., Delmas, D., Osman, H., et al. (2004). Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316. pp: 1132-1137.
- Langcake, P. y Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiology & Plant Pathology*. 9. pp: 77-86.
- Langcake, P. y Pryce, R.J. (1977). Production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to UV irradiation. *Phytochemistry*. 16. pp: 1193-1196.
- Lekakis, J., Rallidis, L.S., et al. (2005). Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 12. pp: 596-600.
- Manach, C., Scubert, A., et al. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79. pp: 727-747.
- Marfella, R., Cacciapuoti, F., et al. (2006). Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent acute myocardial infarction of subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*. 23. pp: 974-981.
- Marier, J.F., Vachon, P., Gritsas, A., et al. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 302. pp: 369-373.
- Meng, X.F., Maliakal, P., Lu, H., et al. (2004). Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. pp: 935-942.
- Nigro, F., Ippolito, A., et al., (1998). Use of UV-C light to reduce Botrytis storage rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 13. pp: 171-181.
- Nonomura, S., Kanagawa, H., et al. (1963). Chemical constituents of polygonaceous plants I. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc.). *Yakugaku Zasshi*. 83. pp: 988-990.
- Pryce, R.J. y Langcake, P. (1979). α -Viniferin-Antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*. 16. pp: 1452-1454.

- Rhim, J.W., Gennadios, A., et al. (1999). Properties of ultraviolet irradiated protein films. *Lebensmittel Wissenschaft u. Technologie*. 32. pp: 129-133.
- Rimando, A.M., Kalt, W., et al. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in Vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52. pp: 4713-4719.
- Roggero, J.P. y Garcia-Parrilla, C. (1995). Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes. *Sciences des Aliments*. 15. pp: 411-422.
- Romanazzi, G., Gabler, F.M. y Smilanick, J.L. (2006). Preharvest chitosan and postharvest UV irradiation treatments suppress gray mold of table grapes. *Plant Disease*. 90. pp: 445-450.
- Sinha, K., Chaudhary, G., et al. (2002). Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sciences*, 71. pp: 655-665.
- Shaheen, S.O., Sterne, J.A., et al., (2002). Dietary antioxidants and asthma in adults:
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., et al. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical & Biology Medicine*. 33. pp: 575-586.
- Sobolev, V.S. y Cole, R.J. (1999). Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47. pp: 1435-1439.
- Takaoka, M.J. (1940). Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil). *Journal of Faculty of Sciences Hokkaido Imperial University*. 3. pp: 1-16.
- Takayanagi, T., Okuda, T., Mine, Y. y Yokotsuka, K. (2004). Induction of resveratrol biosynthesis in skins of three grape cultivars by ultraviolet irradiation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 73. pp: 193-199.
- Tomás-Barberán, F.A. y Espín, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agricultural*. 81. pp: 853-876.
- Urpí-Sardá, M., Olaga-Jarúregui, Lamuela-Raventós, R.M., et al. (2005). Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 77. pp: 3149-3155.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., et al., (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology*. 16. pp: 296-300.
- Valverde, M., Barea, M., Pollastrini, M.T., Pérez-Labad, M.L., Escaso-Salguero, M. y Sanz, F. (2001). Resveratrol: ensayo de mutación inversa. *Revista de Toxicología*. 18. pp: 165.
- Versari, A., Parpinello, G.P., Torielli, G.B., Ferrarini, R. y Glutivo, C. (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49. pp: 5531-5536.
- Vinson, J., Proch, J., et al. (2001). MegaNatural gold grapeseed extract: in vitro antioxidant and in vivo human supplementation studies. *Journal of Medicinal Food*. 4. pp: 17-26.
- Vitseva, O., Varghese, S., et al. (2005). Grapeseed and skin extracts inhibits platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 46. pp: 445-451.
- Walle, T., Hsieh, F., et al. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 32. pp: 1377-1382.
- Wang, Q., Xu, J.F. et al. (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Research*. 958. pp: 439-447.
- Wenzel, E. y Somoza, V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition and Food Research*. 49. pp: 472-481.
- Williamson, G. y Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81. pp: 243S-255S.
- Wilson, C.L., El Ghaouth, B., et al. (1997). Using an on-line UV-C apparatus to treat harvested fruit for controlling postharvest decay. *Technology Products Reports*. 7. pp: 278-282.

- Yamakoshi, J., Kataoka, S., et al. (1999). Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 142. pp: 421-422.
- Yaun, B.R., Sumner, S.S., et al. (2004). Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *International Journal of Food Microbiology*. 90. pp: 1-8.