



NIVELES SÉRICOS DE FITOESTRÓGENOS DETERMINADOS POR HPLC-DAD-ESI-MS EN MUJERES SONORENSES

SERUM PHYTOESTROGEN LEVELS DETERMINED BY HPLC-DAD-ESI-MS IN SONORAN WOMEN

Susana Alejandra Palma Durán¹, María del Refugio Robles Burgueño², Ana Isabel Valenzuela Quintanar², Graciela Caire Juvera², Patricia Grajeda Cota², María del Carmen Bermúdez Almada², María del Socorro Saucedo Tamayo², María Isabel Ortega Velez² y María de Lourdes Gutiérrez Coronado^{2*}

¹ Human Nutrition. School of Medicine. College of Medical, Veterinary & Life Sciences, University of Glasgow. Room 3.85, Level 3, New Lister Building, Glasgow Royal Infirmary. 10-16 Alexandra Parade. G31 2ER

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km. 0.6. Hermosillo, Sonora, 83000, México. Tel: 662 2892400 ext 292.

RESUMEN

Estudios epidemiológicos, al investigar la asociación entre fitoestrógenos y salud, se han visto limitados por la dificultad de cuantificar su consumo. El propósito del estudio fue determinar niveles séricos de 16 fitoestrógenos por HPLC-DAD-ESI-MS como un reflejo de su consumo reciente. Participaron 100 mujeres \geq 25 años, quienes proporcionaron una muestra de sangre y respondieron un cuestionario de salud y otro sociodemográfico. Los niveles séricos de fitoestrógenos más altos fueron para equol, kaempferol y luteolina (71,2, 50,4 y 18,7 nmol/L respectivamente). Los más bajos para matairesinol, secoisolariciresinol y formononetina (0,1 nmol/L), reflejando el consumo de una dieta que incluye frutas y verduras, alimentos de origen animal, y en menor proporción granos y cereales. Incluir en la dieta el consumo de fitoestrógenos representaría una alternativa para prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas. Los niveles séricos de estos fitoestrógenos serían de gran utilidad en estudios epidemiológicos en donde se desee conocer su consumo.

Palabras clave: fitoestrógenos, suero, mujeres, HPLC-MS

ABSTRACT

Epidemiological studies investigating the association between phytoestrogens and health have been limited by the difficulty in quantifying their consumption. The purpose of the study was to determine serum levels of 16 phytoestrogens by HPLC-DAD-ESI-MS as a reflection of their recent consumption. The study involved 100 women \geq 25 years, who provided a blood sample and completed a health and sociodemographic questionnaires. Serum levels were higher for equol, kaempferol and luteolin (71.2, 50.4 and 18.7 nmol/L). Lower levels were for matairesinol, secoisolariciresinol and formononetin (0.1 nmol / L respectively). These levels reflected a phytoestrogens diet composed of fruits and vegetables, animal-derived food, and to a lesser extent grains and cereals. To include dietary intake of phytoestrogens represents an alternative to prevent the development of chronic diseases. Serum levels of these phytoestrogens

would be useful in epidemiological studies where they attempt to know their consumption.

Key words: Phytoestrogens, serum, women, HPLC-MS

INTRODUCCIÓN

Los fitoestrógenos son compuestos difenólicos biológicamente activos de origen vegetal, que estructuralmente mimetizan la acción del 17 β -estradiol (Kurzer and Xu, 1997; Moutsatsou, 2007; Mense et al., 2008). Su actividad puede producirse a través de la unión a receptores hormonales, o bien, a través de la regulación enzimática (Kurzer, 2002; Moutsatsou, 2007). De esta forma, intervienen en el metabolismo y producción de hormonas sexuales, proliferación de células malignas, diferenciación celular, regulación de niveles enzimáticos intracelulares y balance oxidativo (Valentin-Blasini et al., 2003).

La determinación de fitoestrógenos es fundamental para poder llevar a cabo estudios en áreas como la de la salud, y evaluar el efecto potencial que puedan tener estos compuestos para reducir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas (Valentin-Blasini et al., 2000), tales como cáncer de mama, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, así como síntomas menopáusicos. Diversos estudios epidemiológicos señalan que una dieta rica en fitoestrógenos se asocia con una reducción del riesgo de desarrollar estas enfermedades (Valentin-Blasini et al., 2000; den Tonkelaar et al., 2001; Grace et al., 2004; Limer et al., 2004). A su vez, estudios *in vitro* e *in vivo* con animales de experimentación, sugieren que los fitoestrógenos presentan un papel protector en el desarrollo de cáncer de mama, próstata y colo-rectal (Valentin-Blasini et al., 2003; Qu et al., 2014). En este sentido, incluir en la dieta el consumo de fitoestrógenos, podría representar una vía para disminuir el riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas (Duffy, Perez and Partridge, 2007; Sirotkin y Harrath, 2014). Asimismo, altos niveles de fitoestrógenos en sangre y orina se han asociado con la reducción del riesgo de padecer estas enfermedades (Setchell et al., 2014).

El interés que han recibido los fitoestrógenos en la salud humana ha llevado a la necesidad de desarrollar téc-

*Autor para envío de correspondencia: María de Lourdes Gutiérrez Coronado
Correo electrónico: lulu@ciad.mx

Recibido: 07 de febrero de 2015

Aceptado: 31 de julio de 2015

nicas cada vez más rápidas, sensibles y específicas para su cuantificación en numerosos alimentos y fluidos biológicos como plasma, suero y tejidos (Valentin-Blasini et al., 2000); siendo la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS por sus siglas en inglés) el método cromatográfico preferido por su alta sensibilidad, selectividad y confirmación de los analitos de interés (Knust et al., 2006; Prasain et al., 2010; Wyns et al., 2010).

Los fitoestrógenos, por lo general son eliminados del organismo en un lapso de 6 a 96 h. Es por ello, que el análisis de fitoestrógenos en suero corresponde principalmente a su consumo reciente dada la rápida eliminación de estos compuestos (Horner et al., 2002; Cao et al., 2009). De este modo, se ha observado una mayor relación entre los niveles de fitoestrógenos en plasma y la dieta actual que con la dieta habitual, reflejando los niveles séricos de fitoestrógenos un consumo reciente.

Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar niveles de fitoestrógenos en suero de mujeres sanas de Hermosillo, Sonora por cromatografía líquida acoplada a detector de arreglo de diodos y espectrómetro de masas (HPLC-DAD-ESI-MS por sus siglas en inglés) como un reflejo de su consumo reciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

En el estudio participaron 100 mujeres aparentemente sanas mayores de 25 años de edad, con residencia mínima de 5 años en Hermosillo, Sonora. Las mujeres participantes no debieran de estar embarazadas, ni en periodo de lactancia, sin antecedentes de enfermedades como cáncer, diabetes o del corazón, y que no hubieran consumido algún medicamento o antibiótico siete días antes de la toma de muestra. El estudio fue aprobado por el comité de ética del CIAD A.C. y a cada participante se le solicitó que leyera y firmara, si estaba de acuerdo, una carta de consentimiento informado en donde se le explicó el objetivo de la investigación así como los riesgos y responsabilidades de las participantes.

Diseño experimental

El diseño del estudio fue de corte transversal. Las mujeres fueron seleccionadas a través del Marco Muestral Maestro (MMM) proporcionado por el Instituto Nacional de Salud Pública. El MMM comprende áreas geoestadísticas básicas (AGEBs), las cuales se agruparon en unidades primarias de muestreo (UPM) para fines de selección muestral. Las UPM se agruparon por niveles socioeconómicos bajos, medios y altos. Para cada uno de estos subgrupos se seleccionó de manera aleatoria una manzana. El número de viviendas muestreadas (una mujer por vivienda), se distribuyó de manera proporcional al número de viviendas en cada subgrupo de nivel socioeconómico. En cada manzana se seleccionaron de manera aleatoria las viviendas donde se buscaba la presencia de una mujer que cumpliera con los criterios de elegibilidad. Cuando no se encontró una mujer elegible o que no haya aceptado formar parte del estudio, se procedió a ubicarla en

el siguiente domicilio de la lista. A las mujeres participantes en el estudio se les aplicó un cuestionario de salud y un cuestionario socio-demográfico.

Muestras de suero

Se solicitó a cada participante la donación de una muestra de sangre, de preferencia en ayunas, la cual fue recolectada en tubos vacutainer con gel separador sin anticoagulante. Las muestras fueron transportadas en una hielera al laboratorio de Toxicología de Plaguicidas de la Coordinación de Ciencia de los Alimentos del CIAD, A. C. Posteriormente se separó el suero a 1 400 x g durante 15 min a 4 °C (centrífuga refrigerada Allegra 6R Beckman) y se formaron alícuotas de 1,0 mL de suero en viales de polipropileno de 2 mL. Todas las muestras se almacenaron a una temperatura de -70 °C hasta su análisis.

Soluciones de trabajo de fitoestrógenos

Los fitoestrógenos estudiados fueron biochanina A (bio), formononetina (for), kaempferol (kae), gliciteína (gli), daidzeína (dai), cumestrol (cum), secoisolariciresinol (sec), genisteína (gen), matairesinol (mat), enterolactona (enl), enterodiol (end), equol (eq) y resveratrol (res) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y quercetina, luteolina, y naringenina de INDOFINE Chemical Company Inc. (Hillsborough, NJ, USA) grado HPLC, GC y TLC. Se prepararon las soluciones patrón de cada fitoestrógeno a 1,0 mg/mL en metanol, excepto para biochanina A que se preparó en etanol. A gliciteína y cumestrol se le añadieron 20 µL de dimetilsulfóxido para aumentar su solubilidad en metanol. A partir de éstas, se preparó la solución de trabajo a un nivel de concentración en suero de 16 ng/mL en metanol. Se utilizó como estándar interno a 4-hidroxibenzofenona (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), la cual fue preparada en metanol a una concentración de 0,2 µg/mL. Los disolventes metanol y etanol fueron grado HPLC de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El dimetilsulfóxido fue grado HPLC (pureza ≥ 99,7%) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tratamiento y extracción de fitoestrógenos en suero

A 1 mL de la muestra de suero se le agregó 1 mL de hexano. De esta mezcla 800 µL fueron transferidos a un tubo de polipropileno de 2 mL, y se le adicionaron 200 µL de metanol para la precipitación de proteínas. Posteriormente, se adicionaron 50 µL del estándar interno, 10 µL de estándares de deconjugación (4-metilumbeliferilsulfato de potasio y fenoltaleína glucurónido (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), 800 µL de la mezcla de enzimas (33 mg/mL de *Helix pomatia* en buffer acetato de sodio pH 5, 0.1 M; 300 U/mg de β-glucuronidasa y 15,3 U/mg de sulfatasa) y se incubó a 37°C por 12 h. Los cartuchos Bond Elut C₁₈ (3mL, 100 mg, Varian) fueron previamente acondicionados con 3 mL de metanol y 3 mL de buffer acetato de sodio. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 7 200 x g y el sobrenadante se aplicó a los cartuchos para ser lavados con 3 mL de metanol al 5%. Los cartuchos se dejaron secar durante 5 min a -10 kPa. Los

fitoestrógenos se eluyeron con 4 mL de metanol. El eluato se llevó a sequedad con nitrógeno y se resuspendió con 200 μ L del disolvente de reconstitución (metanol/fase móvil inicial 40:60, v/v).

Niveles séricos de fitoestrógenos por HPLC-DAD-ESI-MS.

El análisis de los fitoestrógenos se realizó mediante una técnica previamente descrita la cual fue optimizada, obteniendo los siguientes parámetros: Linealidad del Método: 0,02-10,7 nmol/L; $R^2=0,98$, Límite de Detección: 0,02-2,0 nmol/L, Porcentajes de Recuperación: 60- 110 % (lut, kae, bio A y cou <60%) y Coeficientes de Variación < 12%.

Se utilizó un equipo Agilent 1100 serie LC/MSD acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo simple G1946A, modelo VL, con software Chemstation (Rev B,03,02) (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Ca, USA). La separación cromatográfica se realizó con una columna X Bridge C_{18} (150 x 3 mm, 3,5 μ m) conectada a una precolumna X Bridge C_{18} (20x3 mm, 3,5 μ m). La fase móvil consistió en agua (solución A) y metanol/acetronitrilo 80:20, v/v (solución B), ambas acidificadas con ácido fórmico al 0,025 % (v/v). La velocidad de flujo y gradiente fue como sigue: 0–5,0 min; 35–40 % de B (flujo: 0,6 mL/min), 5,0 - 16 min; 40–100 % de B (flujo: 0,6 mL/min); 16–19 min; 100% de B (flujo: 0,8 mL/min), 19–19,1 min; 100 – 35 % de B (flujo: 0,6 mL/min) y 2,9 min para reequilibrar la columna. Los compuestos eluidos fueron detectados a 260, 280, 290, 310 y 360 nm e identificados por comparación de los tiempos de retención de acuerdo a los estándares y con los espectros de absorción de 190 a 500 nm utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD). La confirmación de los compuestos se hizo por espectrometría de masas, con un cuadrupolo simple y fuente de ionización por electrospray en modo negativo (HPLC-ESI-MS). Los analitos entraron a la cámara de ionización durante los primeros 15 min. Se seleccionó el ión padre, voltaje de fragmentación y el valor de ganancia óptimo para cada fitoestrógeno a través de su análisis por FIA (análisis por flujo de inyección) y por SCAN (barrido completo de iones). Se utilizaron las cuatro señales del detector de espectrometría de masas para la cuantificación en monitoreo del ión selecto (SIM).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo a las variables demográficas de los sujetos de estudio utilizando media aritmética y desviación estándar. Los niveles de fitoestrógenos en suero se describen utilizando la media aritmética y desviación estándar, e intervalo de confianza al 95%. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa estadístico NCSS 2001. Para cada uno de los análisis, la significancia estadística se consideró a un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características generales de la población de estudio

En la tabla 1 se presentan las características generales de las 100 mujeres participantes en el estudio. Se observó

Tabla 1. Características generales de la población del estudio
Table 1. General characteristics of the study population

Características	Media aritmética \pm DS
Edad (años)	44,9 \pm 12,9
Estado Civil ⁺	
Soltera	25
Casada	75
Nivel Socioeconómico ⁺	
Bajo	62
Medio	21
Alto	13
No contestó	4
IMC (kg/m ²)	29,6 \pm 6,1
<25	21%
25-30	41%
>30	38%
Nivel de escolaridad (años)	10,4 \pm 4,4
Menarquia	12,8 \pm 1,4
Menopausia	46,5 \pm 5,9

IMC= índice de masa corporal

⁺ Expresado en porcentaje

que la edad promedio fue de 44,9 años, siendo la mayoría (75%) casada de un nivel socioeconómico bajo con un ingreso menor a 5 salarios mínimos. De acuerdo a la clasificación basada en el IMC (índice de masa corporal) propuesta por la Organización Mundial de la Salud, las mujeres presentaron sobrepeso (IMC de 25,0 a 29,9). Este valor coincide con lo reportado para el norte del país por la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2006) donde se señala que el 83% de las mujeres urbanas de 40 a 49 años mostraron sobrepeso y obesidad (Shamah-Levy et al., 2007). De la población evaluada, 21 % clasificó con un IMC normal, 41 % con sobrepeso y 38 % con obesidad, es decir, un 79 % de las mujeres presentó problemas de sobrepeso y obesidad. Se observó un nivel de escolaridad de alrededor de 10 años, ligeramente mayor al promedio de 9,4 años de escolaridad reportado para el estado de Sonora (INEGI, 2010). Las mujeres participantes en el estudio presentaron una edad de menarquia y menopausia de alrededor de 13 y 46,5 años respectivamente.

Niveles séricos de fitoestrógenos determinados por HPLC-DAD-ESI-MS

En el presente trabajo se analizaron 16 fitoestrógenos en suero por el método de HPLC-DAD-ESI-MS (Palma-Durán, 2012). Las concentraciones de los fitoestrógenos fueron ajustados al 100% de recuperación. En la figura 1 se muestra un cromatograma representativo del análisis de fitoestrógenos en suero.

Los niveles séricos de fitoestrógenos de las 100 muestras analizadas se presentan en la tabla 2. Los niveles

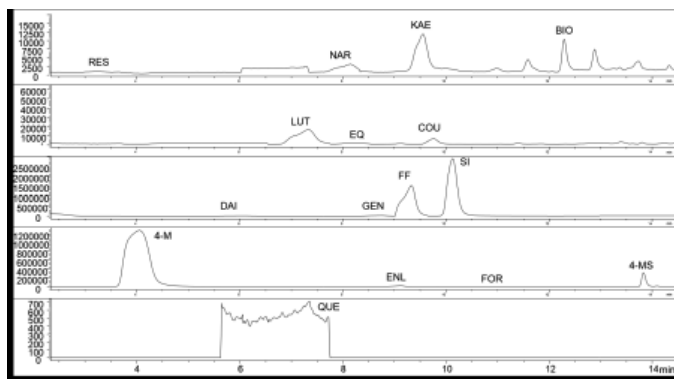


Figura 1. Cromatograma representativo de una muestra problema en las cuatro señales del detector de masas, indicando los fitoestrógenos, los estándares de deconjugación e interno presentes.

Figure 1. Representative chromatogram from a sample in the four mass detector signals indicating the phytoestrogens, deconjugation and internal standards present.

Tabla 2. Niveles séricos de fitoestrógenos (nmol/L) en mujeres sonorenses (n=100)

Table 2. Phytoestrogen serum levels (nmol/L) in sonoran women (n=100)

	Media aritmética ± DE
Fitoestrógenos	214,7 ±221,3
Flavonoides e Isoflavonas	203 ±214,8
Isoflavonas	107,5 ± 210,3
Formononetina	0,1 ±0,3
Biochanina A	1,1 ±1,0
Gliciteína	1,8 ±5,8
Genisteína	16,6 ±41,9
Daidzeína	16,7 ±42,4
Equol	71,2 ±194,7
Flavonoides	95,7 ± 47,4
Luteolina	18,7 ±16,0
Naringenina	9,6 ±21,0
Kaempferol	50,4 ±25,5
Quercetina	17,2 ±11,00
Lignanos	3,4 ±3,9
Matairesinol	0,1 ±0,4
Secoisolariciresinol	0,1 ±0,6
Enterodiol	0,2 ±0,6
Enterolactona	3,2 ±3,6
Cumestrol	2,2 ±7,3
Resveratrol	5,6 ±49,1

DE: Desviación Estándar

séricos de fitoestrógenos más altos fueron para equol (71,2 nmol/L), kaempferol (50,4 nmol/L), y luteolina (18,7 nmol/L). En cambio, los niveles más bajos fueron para matairesinol (0,1 nmol/L), secoisolariciresinol (0,1 nmol/L) y formononetina (0,1 nmol/L). El flavonol kaempferol y la flavona luteolina presentaron las concentraciones más altas. Para las isoflavonas, genisteína, daidzeína y su metabolito equol, fueron las que se encontraron en mayor concentración. En el caso de los lignanos, enterolactona y enterodiol se presentaron en mayor concentración.

A pesar de que en Sonora, el consumo de frutas y verduras es poco frecuente y en pequeñas cantidades, se observaron altos niveles de flavonoides. Lo anterior puede deberse a que el muestreo se realizó en temporadas de invierno y primavera, en las cuales se presenta una mayor variedad de frutas y verduras al alcance de la población, lo que provocaría un aumento en el consumo y por ende una mayor concentración de flavonoides en circulación.

Los niveles séricos de flavonoides presentaron una amplia variación (9,6 a 50,4 nmol/L), lo cual coincide con estudios reportados previamente. Los niveles de quercetina fueron menores a los reportados en mujeres finlandesas (52 nmol/L) y alemanas (20,3 nmol/L). Los niveles de kaempferol fueron superiores a los de quercetina, lo cual difiere a lo ya reportado. Incluso, la concentración de kaempferol fue mayor a la reportada por Radtkeet al., (2002), (8,7 nmol/L) y Cao et al., (2009), (38 nmol/L) al evaluar sus concentraciones en estudiantes mujeres. Para naringenina se observó un comportamiento similar, ya que los niveles encontrados fueron mayores a los publicados por Radtkeet al., (2002) y Erlundet al., (2002), (4,8 nmol/L). En contraste, la concentración de luteolina fue menor a la reportado por Cao et al., (2009) (77,5 nmol/L), en estudiantes mujeres.

Los bajos niveles de isoflavonas observados en el presente estudio sugieren un consumo limitado de productos derivados de soya, ya que los niveles de genisteína y daidzeína, fueron inferiores a los reportados para japonesas (genisteína; 200 a 230 nmol/L, daidzeína; 109 a 73 nmol/L), y estadounidenses vegetarianos (198 y 143 nmol/L respectivamente) cuyo consumo de soya fue similar al oriental. Sin embargo, los niveles de genisteína fueron más altos a los reportados para mujeres neoyorquinas y asiáticoamericanas (5,7 y 6,6 nmol/L respectivamente), así como para daidzeína, cuya concentración fue más alta que la reportada para las asiáticoamericanas (6,5 nmol/L) y las europeas (1,5 a 4,1 nmol/L). A diferencia de lo reportado en la literatura, los niveles de daidzeína (16,7 nmol/L) fueron similares a los de genisteína (16,6 nmol/L).

El presente trabajo muestra los más altos niveles de equol reportados hasta el momento, ya que en contraste con estudios anteriores, la concentración de equol fue alrededor de 40 veces superior a las reportadas, correspondiendo la concentración más alta a 1,7 nmol/L en japonesas.

Los altos niveles de equol podrían deberse a los patrones dietarios en el estado. En Sonora, se estima que el 50% de la población tiene un patrón alimentario compuesto

principalmente de frijol, tortilla de maíz y trigo, huevos, carne (pollo, salchicha, jamón y res), leche, azúcar, tomates y papa (Ortega y Valencia, 2002). Dado que el equol se encuentra en los productos de origen animal, su consumo podría contribuir en parte a sus concentraciones séricas (Kuhnle et al., 2008). Las bacterias intestinales a su vez son un factor importante en la producción de equol. Existe una gran variedad de bacterias intestinales involucradas en la conversión de daidzeína/daidzina a equol (Setchell et al., 2010). Aldercreutz (1987) presume que el consumo de grasa y proteína de origen animal incrementa un ambiente en el colon permitiendo la supervivencia de estas bacterias (Lampe, 2003; Brown et al., 2014).

Existen una gran variedad de factores involucrados en la formación de equol, no sólo el tipo y cantidad de alimento consumido. En conjunto, la presencia de bacterias productoras de equol, los sustratos específicos (daidzina o daidzeína) y las condiciones intestinales óptimas para el metabolismo (lípidos; sobre todo los poliinsaturados y proteínas) determinarán la producción de equol en el individuo (Lampe, 2003; Bolca et al., 2007; Setchell et al., 2010).

La evaluación de las isoflavonas se ha centrado en la determinación de genisteína, daidzeína y equol, y en menor medida en la cuantificación de gliciteína. Los escasos reportes realizados de gliciteína corresponden a mujeres europeas, donde su concentración (0,1 nmol/L) es inferior a la encontrada en el presente trabajo (Grace et al., 2004; Peeters et al., 2007). Por otro lado, hasta el momento, no se han reportado concentraciones séricas de formononetina y biochanina A. Esto puede deberse a que los dos fitoestrógenos son metabolizados a genisteína, daidzeína y equol, por lo que su determinación podría ser irrelevante. Sin embargo, hay evidencia de que formononetina y biochanina A no se metabolizan por completo. Por lo que la cuantificación de formononetina y biochanina A debería ser incluida al evaluar los niveles séricos de isoflavonas.

La cuantificación de lignanos en suero se centra en enterolactona y en menor medida en enterodiol. En algunas ocasiones, se incluye el análisis de matairesinol pero no así el de secoisolariciresinol. Lo anterior se debe a que los niveles plasmáticos/séricos de enterolactona son utilizados generalmente como biomarcadores del consumo de lignanos (Horner et al., 2002; Bhakta et al., 2005). En este sentido, la determinación de lignanos en sangre podría limitarse a la cuantificación de enterolactona.

Los bajos niveles de lignanos (3,4 nmol/L) podrían deberse al bajo consumo de granos y cereales. La Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH) estimó que sólo el 18% de los gastos en alimentación se destinaron al consumo de cereales (INEGI, 2011). Por su parte, los alimentos de origen animal, frutas y verduras representan un 40,5% y 16% de los gastos respectivamente. En Sonora, el porcentaje destinado al gasto de cereales es aún menor (13,6%) (INEGI, 2005). Lo anterior se ve reflejado en las bajas concentraciones de lignanos encontradas en el presente estudio.

Por su parte, la concentración de enterolactona en las mujeres del presente estudio (3,2 nmol/L) fue inferior o igual a las reportadas para británicas (28,5 a 3,2 nmol/L), estadounidenses (20,2 a 14 nmol/L), y asiáticas (14 a 11 nmol/L) (Zeleniuch-Jacquotte et al., 1998; Horner et al., 2002; Bhakta et al., 2005; Peeters et al., 2007). Incluso, aparentemente no existen reportes semejantes a los niveles de enterolactona encontrados. La concentración más baja reportada (de 0,1 nmol/L) se presentó en la Tercera Encuesta Nacional de Evaluación de Salud y Nutrición (NHANES III, 1988-1994) en los Estados Unidos (Valentin-Blasini et al., 2003). Por lo que, los bajos niveles observados, como se mencionó anteriormente, podrían deberse al consumo limitado de granos y cereales.

Los niveles de enterodiol, secoisolariciresinol y matairesinol fueron menores a los de enterolactona. Valentin-Blasini et al., (2003) presentaron niveles de enterodiol superiores (5,44 nmol/L) a los observados en el presente trabajo (Valentin-Blasini et al., 2003). Asimismo, mujeres europeas y neoyorquinas presentaron mayores concentraciones (con una mediana de 0,24 y 1,5 nmol/L respectivamente) (Peeters et al., 2007). En cuanto a secoisolariciresinol, no se han reportado niveles séricos o plasmáticos. En conjunto, los niveles de lignanos fueron bajos comparados con la mayoría de los estudios mencionados.

Finalmente, se presentan los niveles séricos de cumestrol y resveratrol. Los niveles de cumestrol fueron bajos (2,2 nmol/L), en comparación con otros fitoestrógenos. El cumestrol se encuentra en una gran variedad de alimentos, desde derivados de soya hasta productos de origen animal que forman parte de la dieta sonorense (Ortega et al., 2002; Thompson et al., 2006; Kuhnle et al., 2008) Sin embargo, la concentración de cumestrol en estos alimentos es baja. Para el caso de resveratrol se encontró una concentración de (5,6 nmol/L). El resveratrol se encuentra principalmente en el vino y uvas, por lo que su consumo se ve limitado (Versari et al., 2001; Labinsky et al., 2006).

En conjunto, los niveles séricos de la mayoría de los fitoestrógenos en el presente trabajo fueron inferiores a los encontrados en otros estudios de diferentes poblaciones. En cambio, kaempferol, naringenina y equol presentaron los niveles más altos reportados hasta el momento. Además, la inclusión de resveratrol, cumestrol, secoisolariciresinol, biochanina A, gliciteína, formononetina y matairesinol incrementó el número de fitoestrógenos a cuantificar que no han sido considerados en otros estudios.

Los niveles séricos de fitoestrógenos permitirían conocer su consumo a través de la dieta. Con esta información se apoyarían estudios epidemiológicos que se han visto limitados por la dificultad de cuantificar el consumo de fitoestrógenos, debido a la escasez de datos relacionados con el contenido de éstos en los alimentos y en la dieta.

CONCLUSIONES

Los altos niveles de flavonoides encontrados en este estudio podrían relacionarse al consumo de frutas y verduras de temporada por los sujetos participantes, los altos niveles

de equol a los patrones dietarios del estado de Sonora, basados en alimentos de origen animal y los bajos niveles de lignanos al bajo consumo de granos y cereales. El análisis de fitoestrógenos en suero humano por el método de HPLC-DAD-ESI podría aplicarse en estudios epidemiológicos en donde se desee conocer el consumo de fitoestrógenos y su impacto en la salud, así como también serían muy útiles para probar el efecto de nuevos alimentos funcionales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero brindado para la realización de este estudio. Proyecto # CB-2008-106028.

BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz, H†., Höckerstedt, K., Bannwart, C., Bloigu, S., Ämäläinen, E., Fotsis, T. y Ollus, A. 1987. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem*, 27, pp. 1135-1144.
- Bhakta, D., Silva, I. D., Higgins, C., Sevak, L., Kassam, K. T., Mangtani, P., Adlercreutz, H. y McMichael, A. 2005. A semiquantitative food frequency questionnaire is a valid indicator of the usual intake of phytoestrogens by South Asian women in the UK relative to multiple 24-h dietary recalls and multiple plasma samples. *Journal of Nutrition*, 135: 116-123.
- Bolca, S., Possemiers, S., Herregat, A., Huybrechts, I., Heyerick, A., De Vriese, S., Verbruggen, M., Depypere, H., De Keukeleire, D., Bracke, M., De Heneuw, S., Verstraete, W. y Van De, W. T. 2007. Microbial and dietary factors are associated with the equol producer phenotype in healthy postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, 137: 2242-2246.
- Brown, N. M., Galandi, S. L., Summer, S. S., Zhao, X., Heubi, J. E., King, E. C. y Setchell, K. D. 2014. Equol production is developmentally regulated and related to early diet composition. *Nutrition Research*.
- Cao, J., Zhang, Y., Chen, W. y Zhao, X. 2009. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *British Journal of Nutrition*, 103: 249-255.
- Den Tonkelaar, I., Keinan-Boker, L., Vant Veer, P., Arts, C. J. M., Adlercreutz, H., Thijssen, J. H. H. y Peeters, P. H. M. 2001. Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 10: 223-228.
- Duffy, C., Pérez, K. y Partridge, A. 2007. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *Cancer Journal for Clinicians*, 57: 260-277.
- Erlund, I., Silalaste, M., Alfthan, G., Rentala, M., Kesäniemi, Y. y Aro, A. 2002. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 891
- Grace, P. B., Taylor, J. I., Low, Y. L., Luben, R. N., Mulligan, A. A., Botting, N. P., Dowsett, M., Welch, A. A., Khaw, K. T., Wareham, N. J., Day, N. E. y Bingham, S. A. 2004. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13: 698-708.
- Horner, N. K., Kristal, A. R., Prunty, J., Skor, H. E., Potter, J. D. y Lampe, J. W. 2002. Dietary determinants of plasma enterolactone. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 11: 121-126.
- INEGI, 2005. Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares.
- INEGI, 2010. Censo de Población y Vivienda. 12 junio 2010 ed.
- INEGI, 2011. Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares 2010.
- Knust, U., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Strowitzki, T. y Owen R. W. 2006. Analysis of enterolignan glucuronides in serum and urine by HPLC-ESI-MS. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1038-1049.
- Kuhnle, G. G. C., Delcaquillo, C., Aspinall, S. M., Runswick S. A., Mulligan, A. A. y Bingham, S. A. 2008. Phytoestrogen content of foods of animal origin: Dairy products, eggs, meat, fish, and seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10099-10104.
- Kurzer, M. S. 2002. Hormonal effects of soy in premenopausal women and men. *Journal of Nutrition*, 132: 570S-573S.
- Kurzer, M. S. y Xu, X. 1997. Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition* 17: 353-81.
- Labinskyy, N., Csiszar, A., Veress, G., Stef, G., Pacher, P., Oroszi, G., Wu, J. y Ungvari, Z. 2006. Vascular dysfunction in aging: Potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Current Medicinal Chemistry*, 13: 989-996.
- Lampe, J. W. 2003. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *Journal of Nutrition*, 133: 2920-2920.
- Limer, J. L. y Speirs, V. 2004. Phytoestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Research*, 6: 119-127.
- Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K. y Bhat, H. K. 2008. Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, 116: 426-433.
- Moutsatsou, P. 2007. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones*, 6: 173-193.
- Ortega, M. y Valencia, M. 2002. Measuring the intakes of foods and nutrients of marginal populations in north-west Mexico. *Public Health Nutrition*, 5: 907-910.
- Palma, D. S. A. 2012. Niveles séricos de fitoestrógenos determinados por HPLC-DAD-ESI-MS como biomarcadores de su consumo dietario reciente en mujeres sonorenses. Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Peeters, P. H. M., Slimani, N., Van Der Schouw, Y. T., Grace, P. B., Navarro, C., Tjonneland, A., Olsen, A., Clavel-Chapelon, F., Touillaud, M., Boutron-Ruault, M. C., Jenab, M., Kaaks, R., Linseisen, J., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Dills, V., Boeing, H., Weikert, C., Overvad, K., Pala, V., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Bueno-De-Mesquita, H. B., Van Gils, C. H., Skeie, G., Jakszyn, P., Hallmans, G., Berglund, G., Key, T. J., Travis, R., Riboli, E. y Bingham, S. A. 2007. Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults. *Journal of Nutrition*, 137: 1294-1300.
- Prasain, J. K., Arabshahia, A., Moore, D. R., Greendalec, G. A., Wyssd, J. M. y Barnes, S. 2010. Simultaneous determination of 11 phytoestrogens in human serum using a 2 min liquid chromatography/tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B*, 878: 994-1002.

- Qu, X. L., Fang, Y., Zhang, M. y Zhang, Y. Z. 2014. Phytoestrogen intake and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of 10 observational studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15: 9085.
- Radtke, J., Linseisen, J. y Wolfram, G. 2002. Fasting plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary dietary intake. *Eur. J. Nutr.*, 41, 203-209.
- Setchell, K. D. R. y Clerici, C. 2010. Equol: history, chemistry, and formation. *The Journal of nutrition*, 140: 1355S-1362S.
- Setchell, K.D., Brown N.M., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., Jhap, P. y Heubi, J.E. 2014. Metabolism of secoisolariciresinol-diglycoside the dietary precursor to the intestinally derived lignan enterolactone in humans. *Food Function*. 5(3):491-501.
- Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S. y Rivera-Dommarco, J. 2007. Resultados de nutrición de la ENSANUT 2006. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Sirotkin, A.V. y Harrath, A.H. 2014. Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*. 741:230-236.
- Thompson, L. U., Boucher, B. A., Liu, Z., Cotterchio, M. y Kreiger, N. 2006. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutrition and Cancer an International Journal*, 54: 184-201.
- Valentin-Blasini, L., Blount, B. C., Caudill, S. P. y Needham, L. L. 2003. Urinary and serum concentrations of seven phytoestrogens in a human reference population subset. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 13: 276-282.
- Valentin-Blasini, L., Blount, B. C., Rogers, H. S. y Needham, L. L. 2000. HPLC-MS/MS method for the measurement of seven phytoestrogens in human serum and urine. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 10: 799-807.
- Versari, A., Parpinello, G. P., Tornielli, G. B., Ferrarini, R. y Giulivo, 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: 5531-6.
- Wyns, C., Bolca, S., De Keukeleire, D. y Heyerick, A. 2010. Development of a high-throughput LC/APCI-MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum. *Journal of Chromatography B*, 878: 949-956.
- Zeleniuch-Jacquette, A., Adlercreutz, H., Akhmedkhanov, A. y Toniolo, P. 1998. Reliability of serum measurements of lignans and isoflavonoid phytoestrogens over a two-year period. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 7: 885-889.