



Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas
ISSN: 1870-0195
rmcf@afmac.org.mx
Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
México

Drago Serrano, María Elisa
Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 38, núm. 4, octubre-diciembre, 2007, pp. 42-47
Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938407>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

Revisión Bibliográfica

Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica

Recombinant flavonoids of pharmaceutical relevance

Maria Elisa Drago Serrano

Departamento Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco

RESUMEN: algunas especies de plantas elaboran compuestos polifenólicos conocidos como flavonoides en los que figuran diferentes grupos denominados: flavanonas, flavonas, flavonoles, antocianinas e isoflavonoides. Además de dotar a las plantas rasgos fenotípicos como color, fragancia, sabor, resistencia contra radiaciones, plagas y enfermedades, los flavonoides exhiben actividad anti-oxidante, anti-tumoral, anti-inflamatoria, anti-microbiana y hormonal. Todos los flavonoides son metabolitos secundarios provenientes de flavanonas que a su vez derivan de chalconas generadas en la ruta fenilpropanoide. El conocimiento detallado de la bioquímica de flavonoides ha favorecido la manipulación genética de las enzimas implicadas en su biosíntesis. La tecnología de ADN recombinante ha hecho factible la expresión heteróloga de flavonoides en *Escherichia coli*. La disponibilidad de flavonoides recombinantes permitirá explorar con detalle sus efectos terapéuticos para la preparación racional de fármacos.

ABSTRACT: some plant species make up polyphenolic compounds known as flavonoids which include different groups, namely: flavanones, flavones, flavonols, anthocyanins and isoflavonoids. In addition to endow phenotypic traits to plants such as color, fragrance, flavor, resistance against radiations, plagues and diseases, flavonoids display anti-oxidant, anti-tumor, anti-inflammatory, anti-microbial and hormonal activity. All flavonoids are secondary metabolites arising from flavanones which in turn derived from chalcones generated on the phenylpropanoid pathway. Detailed knowledge of flavonoid biochemistry has enabled the genetic manipulation of enzymes involved in their biosynthesis. DNA recombinant technology has made feasible the heterologous expression of flavonoids in *Escherichia coli*.

The availability of recombinant flavonoids will allow exploring their therapeutic properties in order to the rational preparation of pharmaceuticals.

Palabras clave: fitofármacos, fitoestrógenos, metabolitos secundarios vegetales

Key words: phytopharmaceuticals, phytoestrogens, plant secondary metabolites

Correspondencia:

M. en C. Maria Elisa Drago Serrano
Departamento Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco
Calzada del Hueso No. 1100. Col. Villa Quietud.
CP. 04960. Delegación Coyoacán, México D.F.
Teléfono: (52) 55 5483-7251
Fax: (52) 55 5483-7237
e-mail: mdrago@correo.xoc.uam.mx

Fecha de recepción: 08 de diciembre de 2006

Fecha de aceptación: 16 de abril de 2007

pues además de su valor nutricional, aportan un beneficio a la salud². En contraste con los metabolitos primarios que son esenciales para el crecimiento vegetativo³, los flavonoides confieren a las plantas rasgos fenotípicos que las hace atractivas para la polinización como son color de flores, sabor de frutas, aroma o bien para la resistencia y protección contra plagas, radiaciones y enfermedades⁴. Todos los flavonoides se sintetizan a partir de flavanonas derivadas a su vez de chalconas provenientes de la vía fenilpropanoide. Esta última, es una ruta común de biosíntesis de otros metabolitos secundarios vegetales como lignina, salicilatos, ácido hidroxicinámico y cumarinas⁵. Las enzimas que participan de la ruta biosintética fenilpropanoide son blancos atractivos en ingeniería metabólica para obtener intermedios metabólicos como flavonoides.^{6,7}

Tradicionalmente los vegetales han sido las fuentes naturales para la producción de una gran variedad de componentes bioactivos como alcaloides, terpenoides, esteroideos y flavonoides¹. Las principales desventajas de las plantas como materia prima radican en el bajo rendimiento, baja reproducibilidad de su actividad¹ y el riesgo potencial de impacto ambiental que puede causar su

Introducción

Diversas especies vegetales elaboran compuestos polifenólicos conocidos como flavonoides de interés en la industria farmacéutica por sus potenciales aplicaciones terapéuticas¹. Los flavonoides son metabolitos secundarios exclusivamente de origen vegetal distribuidos en algunas plantas consideradas como alimentos funcionales,

escasez. Adicionalmente, la homogeneidad y características de productos derivados de plantas pueden afectarse debido a las variaciones que ocurren cada año e incluso en cada estación anual. Estas limitantes han impulsado los avances en ingeniería metabólica que están haciendo factible la producción a gran escala de fitoquímicos en vegetales transgénicos⁸. La optimización de la producción de metabolitos secundarios ha sido una de las áreas en la que la ingeniería metabólica ha tenido una fuerte repercusión⁹ como ha sido el caso de los flavonoides⁶. Además de los vegetales transgénicos, la aplicación de *Escherichia coli* (*E. coli*) como sistema de expresión, representa una estrategia alternativa para la obtención de flavonoides recombinantes.

En este trabajo, se describen las bases bioquímicas de síntesis de flavonoides para fundamentar el principal propósito que fue exponer la producción de ciertos flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica,⁷ que han sido generados en *E. coli* como sistema de expresión.

Ruta común fenilpropanoide de biosíntesis de flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de importancia farmacológica por exhibir actividad anti-oxidante, anti-alérgica, anti-tumoral, anti-microbiana y hormonal^{10,11}. Los flavonoides tienen un núcleo fenilpropanoide de 15 átomos de carbono¹² el cual consiste en dos anillos de benceno que unidos a través del heterociclo pirano forman el fenilbenzopirano¹³. Al ser modificado enzimáticamente por glicosilación, acilación o metilación el núcleo fenil propanoide genera un escaso número de estructuras básicas del esqueleto fenilpropanoide a partir de las cuales se deriva la amplia gama de flavonoides entre los que se incluyen: flavanonas, flavonoles, flavonas, isoflavonas¹⁴ y antocianinas¹² (Figura 1).

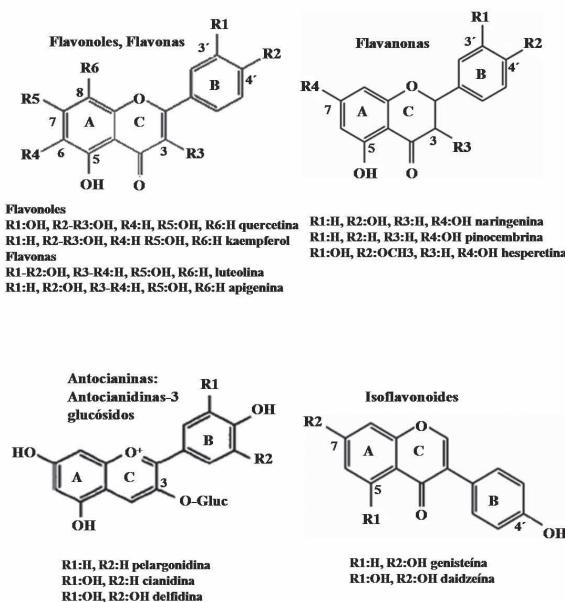


Figura 1. Estructura de Flavonoides

En las plantas, todos los flavonoides son sintetizados a partir de flavanonas derivadas a su vez de chalconas provenientes de la ruta fenilpropanoide⁵. La síntesis de las estructuras básicas de los esqueletos flavonoides recae sólo en 3 grupos de enzimas: oxigenasas dependientes del 2-oxo glutarato, citocromo P₄₅₀ hidroxilasas y reductasas dependientes de NADPH.⁷

Los precursores de los flavonoides proceden de la ruta común fenilpropanoide (Diagrama 2) que inicia con la conversión de fenilalanina en ácido cinámico por la PAL (phenylalanine ammonia-liase, fenilalanina-amonio liasa). El ácido cinámico es convertido en ácido 4-cumárico (*p*-cumárico) por la C4H (cinamato-4 hidroxilasa). En algunas plantas, la PAL exhibe también actividad de TAL (tirosina-amonio liasa) sobre la tirosina para generar directamente ácido 4-cumárico. En el siguiente paso, el ácido 4-cumárico es transformado en 4-cumaroil-CoA por la 4CL (4-cumarato CoA ligasa). La 4-cumaroil-CoA, un producto central de la ruta fenil propanoide⁷, es condensada con 3 moléculas de malonil CoA para formar naringenina-chalcona o pinocembrina chalcona (de tirosina o fenilalanina respectivamente) por la enzima CHS (chalcona sintetasa). Después de esta reacción, la CHI (chalcona isomerasa) cicliza a la naringenina o pinocembrina chalcona mediante la isomerización estereroespecífica para formar las (2S) flavanonas naringenina o pinocembrina. Las flavanonas son ulteriormente modificadas por enzimas de la ruta flavonoide para generar una amplia diversidad de derivados.^{7,12}

Flavanonas

Diversos estudios han enfocado su atención a las (2S) flavanonas recombinantes cuya relevancia radica no sólo en ser precursores de flavonoides, sino también por exhibir *per se*, actividad anti-tumoral, hormonal¹¹, anti-microbiana¹⁵ y efectos terapéuticos contra fragilidad capilar causada por la hipertensión venosa.¹⁶

En el grupo de flavanonas y sus derivados hidroxilados o glicosilados hasta ahora conocidos figuran: hesperetina, pinocembrina, naringenina, naringenina-7-glucósido, taxifolina (flavanonol)¹⁴. Como se comentó anteriormente, las (2S) flavanonas son productos de la insaturación de chalconas por la enzima chalcona isomerasa (Diagrama 2). En el aspecto biotecnológico, la obtención de flavanonas recombinantes en *E. coli* se logró mediante un “cluster” artificial formado por el ensamblaje de los siguientes genes: *pal* de *Rhodotorula rubra* (*R. rubra* levadura), *chs* de *Glycyrrhiza echinata* (*G. echinata*, planta licoriza) y *4cl* (4-cumarato:CoA ligasa de *Streptomyces coelicolor* A3 (*S. coelicolor* A3, actinomiceto)^{17,18}. La expresión de este “cluster” artificial de genes en *E. coli*, dió lugar a 452.6 µg/L de naringenina a partir de tirosina y 751.9 g/L de pinocembrina a partir de fenilalanina¹⁷. De acuerdo a los autores, el éxito de este sistema residió en la inclusión del gen *4cl* de *S. coelicolor* A3 conocido como *ScCCL* (*S. coelicolor* cumarato/cinnamato-CoA ligasa). El gen *ScCCL* codifica una 4CL denominada *ScCCL* de *S. coelicolor*, capaz de activar al ácido cinámico y al ácido 4-cumárico para

convertirlos en cinamoil:CoA y cumaroil:CoA respectivamente. En vegetales, la C4H es necesaria para la conversión del ácido cinámico en ácido cumárico (Diagrama 2). El paso anterior es eludido por la ScCCL ya que su dual especificidad le permite convertir al ácido cinámico directamente en cinamoil-CoA¹⁷. En otros estudios de producción de (2S) flavanonas con *clusters* artificiales de genes reportan rendimientos aun más elevados. La expresión en *E. coli* del *cluster* de genes *tal* de *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sphaeroides*, bacterias fotoheterótrofas), *4cl* y *chs* de la planta *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), generó un rendimiento de 20.8 mg/L de naringenina¹⁹. Con la transformación y expresión en *E. coli* del *cluster* *pal* (*R. rubra*), *ScCCL*, *chs* de *G. echinata* y *chi* de *Pueraria lobata* (*P. lobata*, planta) los rendimientos de naringenina (de tiroamina) y pinocembrina (de fenilalanina) fueron del orden de 60 mg/L²⁰. Este alto rendimiento se logró al aumentar los niveles de malonil-CoA mediante la sobre-expresión del gen *acc* (acetyl-CoA carboxilasa de *Corynebacterium glutamicum*)²⁰.

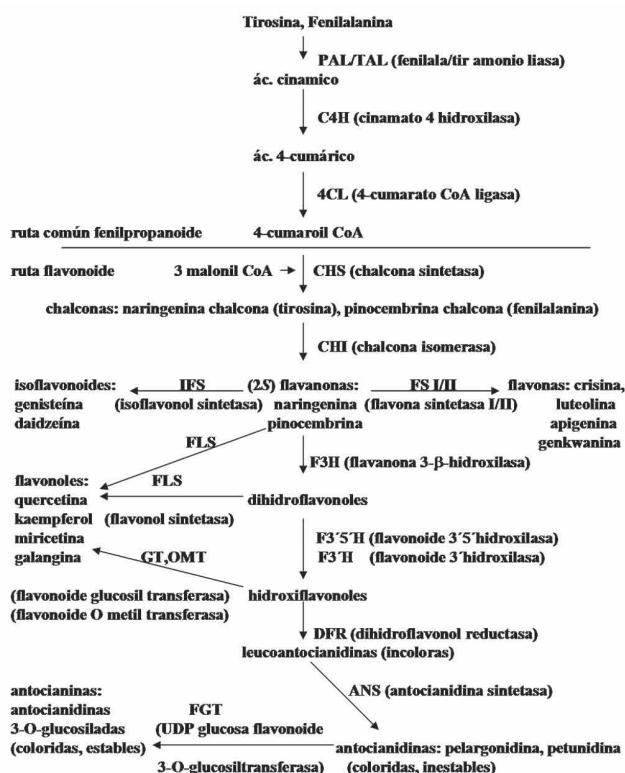


Figura 2. Ruta fenilpropanoide y ruta flavonoide^{7,12}

Flavonas

Dentro del grupo de flavonas se incluyen compuestos relevantes por su actividad de fitoestrógenos¹¹ y antimicrobiana¹⁵. En el grupo de flavonas figuran: apigenina, luteolina, genkwanina y eupatorina, entre otras¹⁴.

Las flavonas derivan de flavanonas cuya conversión (Diagrama 2) precisa de las enzimas FS I o FS II (flavona sintetasa I y

II). Estas enzimas introducen dobles enlaces entre el C2 y C3 del anillo C de la flavanona¹². La FS I es una enzima soluble presente sólo en ciertas especies de apioceas mientras que la FS II es una proteína integral de membrana distribuida en una gran variedad de especies²¹. Una vez insaturada, la flavona puede ser metilada por la enzima 7-OMT (7-O-metil transferasa) para generar flavonas 7-O-metiladas, como es el caso de la metilación de apigenina para generar genkwanina²². A la fecha, se han logrado obtener algunas flavonas recombinantes mediante el ensamblaje de genes *4cl-2* (4-cumarato:CoA ligasa) y *f3l*, ambos derivados de *Petroselium crispum* (*P. crispum*, perejil), *chsA* (chalcona sintetasa A) y *chiA* (chalcona isomerasa A), ambas de *Petunia hibrida* (*P. hibrida*, planta) y *omt1a* (7-O-metil transferasa) de *Mentha piperita* (*M. piperita*, menta). Con la transformación de este *cluster* en *E. coli*, se obtuvieron las siguientes flavonas a partir de sus precursores: apigenina (415 µg) y genkwanina (208 µg) ambos generados de ácido cumárico y luteolina (10 µg) de ácido caféico. La mayoría de estos productos de expresión fueron secretados al medio, sin embargo un 25% fue retenido en la célula²². La producción de las anteriores flavonas en *E. coli* fue superada con la inclusión de *f3l* de *P. crispum*²³ al *cluster* *pal*, *ScCCL*, *chs*, *chi* y *acc*, altamente eficiente en la producción de flavanonas²⁰. Con la inserción de *f3l*, se obtuvieron rendimientos del orden de mg de las siguientes flavonas: apigenina (13 mg/L) a partir de tiroamina y crisina (9.4 mg/L) de fenilalanina.²³

Flavonoles

En este grupo de polifenoles, algunos miembros destacan por su actividad anti-inflamatoria^{10,11} y antioxidante¹¹ y antimicrobiana¹⁵. Dentro del grupo de flavonoles y derivados hidroxilados, acilados, glicosilados o metilados, se incluyen: quercentina, kaempferol, rutina, miricetina, entre otros¹⁴. La sustitución del hidrógeno en el carbono 3 del anillo C de las flavonas por el grupo 3-hidroxi¹⁴ genera los flavonoles (Figura 1). La biosíntesis de los flavonoles puede ocurrir por una vía directa que implica la reducción por insaturación de flavanonas por la FLS (flavonol sintetasa)⁷. La ruta indirecta (Diagrama 2) radica en la hidroxilación de (2S) flavanonas en el carbono 3 del anillo C por la enzima F3H (flavanona 3-β-hidroxilasa) para generar dihidroflavonoles que posteriormente son reducidos mediante la insaturación por la FLS para generar flavonoles¹². En plantas, diversos flavonoles son generados también a partir de la hidroxilación del dihidroflavonol en los carbonos 3'5' o sólo en el carbono 3' del anillo B por la F3'5'H (flavonoide 3'5'-hidroxilasa) o F3'H (flavonoide 3'-hidroxilasa) respectivamente⁷. Otras enzimas como la GT (flavonoide glucosil transferasa) y las OMTs (flavonoide O- metiltransferasas) al llevar cabo reacción de glicosilación o metilación respectivamente, contribuyen a la diversificación de flavonoles.¹⁴

Al igual que otros flavonoides, algunos flavonoles hidroxilados se han logrado obtener mediante la transformación de *E. coli* con genes artificiales. La coexpresión en *E. coli* del *cluster* formado por el gen de la enzima P₄₅₀ flavonoide 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H)

y el gen de una reductasa P450 con un segundo cluster “armado” con *4cl*, *cbs*, *chi*, *f3h* (flavanona 3-beta-hidroxilasa) y *fls* (flavonol sintetasa), dio lugar a la obtención de los flavonoles kaempferol y quercetina a partir del ácido cumárico como precursor²⁴. Otro flavonol, la miricetina se obtuvo a partir de flavanonas empleadas como precursoras²⁴. Para la producción de flavonoles en *E. coli*, el cluster *pal*, *ScCCL*, *cbs*, *chi*, *acc*, altamente eficiente en la producción de flavanonas²⁰ fue modificado con el gen *f3h* y *fls* ambos de *Citrus sinensis* (*C. sinensis*, cítrico)²³. Con este sistema, los altos rendimientos de flavonoles generados a partir de sus correspondientes precursores fueron: kaempferol (15.1 mg/L) de tirosina y galangina (1.1 mg/L) de fenilalanina.²³

Antocianinas

En el reino vegetal, las antocianinas, betalainas, carotenoides forman los tres grupos principales de pigmentos hasta ahora conocidos²⁵. Las antocianinas le confieren a las flores un color azul, púrpura o rojo²⁶. Al igual que otros flavonoides, las antocianinas exhiben actividad anti-inflamatoria, anti-tumoral y una fuerte potencia anti-oxidante²⁶. El color rojo del vino tinto se debe a la presencia de antocianinas. El alto contenido de antocianinas en el vino tinto está al parecer, implicado en la “paradoja francesa”. Esta última radica en que la inclusión de una ración moderada de vino tinto en una dieta alta en grasas saturadas evita el riesgo de enfermedades cardiovasculares y ataques cardíacos.²⁷

Las antocianinas son derivados glicosilados de las antocianidinas, en este último grupo están incluidos los siguientes compuestos: pelargonidina, cianidina, delfidina, peonina, malvidina y petunidina²⁶. En contraste con sus precursores flavonoides, tanto las antocianinas como las antocianidinas se caracterizan por ser pigmentos coloridos, sin embargo las antocianidinas son altamente inestables a diferencia de sus derivados glicosilados antocianinas²⁸. La biosíntesis de las antocianidinas implica la ruta fenolpropanoide²⁹ vía (2S) flavanonas (Diagrama 2). En la formación de las antocianinas, la flavanona es convertida en dihidroflavonol por la F3H (flavanona 3β-hidroxilasa). El paso siguiente implica la conversión del dihidroflavonol en el intermediario incoloro leucoantocianidina por la DFR (dihidroflavol reductasa)¹². Otras enzimas como F3'H y F3'5'H (flavonoide 3' y flavonoide 3'5' hidroxilasa respectivamente) pueden transformar el dihidroflavonol en hidroxiflavonoles. Estos últimos son convertidos en leucoantocianidinas por la DFR^{7,29}. La leucoantocianidina es transformada en antocianidina por la ANS (antocianidina sintetasa). En el paso final, la antocianidina es glicosilada por la FGT (UDP- glucosa: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) para convertirse en antocianina.²⁸

En el primer reporte de la obtención recombinante de las antocianinas se obtuvieron: la pelargonidina-3-O glicosilada y cianidina 3-O- glicosilada en *E. coli* a partir de sus flavanonas precursoras no coloridas³⁰. La producción de estas antocianinas se basó en la construcción y expresión del cluster con los siguientes genes de origen vegetal: *f3h* y *ans* de *Malus domestica*

(*M. domestica*, manzana) *dfr* de *Anthurium andraeanum* (*A. andraeanum*, flor de anturio, flor parecida al alcatraz) y *fgt* de *Phybrida*. Con este sistema, se obtuvieron rendimientos de 5.6 µg/L de pelargonidina-3-O-glicosilada a partir de naringenina y 6.0 µg/L de cianidina-O-3- glicosilada a partir de eriodictiol³⁰. Aunque el rendimiento de antocianinas fue bajo aunado a que la producción colateral de sus precursores fue mayor que la de los productos de interés, con este trabajo inicial se dio el primer paso para el mejoramiento y optimización futura de preparación de antocianinas recombinantes.

Isoflavonoides

Junto con algunos flavonoides, estilbenos y lignanos, ciertos isoflavonoides forman parte del grupo de fitoestrógenos, productos de origen vegetal con actividad estrógena. Diversos efectos farmacológicos de los isoflavonoides han sido explorados por su potencial uso como inmunomoduladores. Evidencias obtenidas en estudios experimentales muestran que los isoflavonoides modulan los efectos negativos de la interleucina 6 (IL-6)³¹. En la menopausia, andropausia y envejecimiento, la pérdida de hormonas sexuales induce el incremento los niveles de IL-6. El exceso de IL-6 promueve tumorigénesis (próstata, pulmón, colon, glándulas mamarias, ovario) así como cambios asociados a ciertas patologías y al envejecimiento entre los que se incluyen: mieloma, artritis, osteoporosis, fragilidad ósea y padecimientos neuro-degenerativos.³¹

Dentro del grupo de los isoflavonoides figuran la genisteína y daidzeína³². La genisteína es análoga al 17β-estradiol humano en cuanto a su estructura química y actividad hormonal³³. Aun cuando algunas verduras, crucíferas y oleaginosas contienen fitoestrógenos, el frijol de soya es por excelencia, la fuente más abundante de genisteína y de otros isoflavonoides. Los primeros indicios del contenido de estrógenos en plantas provinieron de los efectos negativos del consumo de trébol sobre la fertilidad en ganado vacuno y en borregos³². En contraste con otros flavonoides e isoflavonoides, la genisteína se distingue por su potente actividad estrogénica y su fuerte efecto inhibitorio del crecimiento de células tumorales de cáncer mamario³². Estudios epidemiológicos muestran que existe una estrecha correlación entre el consumo isoflavonoides presentes en la dieta basada en soya y la disminución de la incidencia de cáncer de seno, así como de la mortalidad por cáncer prostático. Se ha popularizado la aplicación de genisteína en terapias de reemplazo hormonal, para atenuar la pérdida de masa ósea, resequedad vaginal y falla cardíaca como consecuencia de la baja de estrógenos en mujeres en etapa de climaterio.³²

Desde el punto de vista biosintético, la genisteína es el isoflavonoide más sencillo además de ser el precursor común de isoflavonoides complejos. La genisteína se puede sintetizar por la vía fenilpropanoide a partir de la (2S) flavanona naringenina en presencia de la IFS (isoflavona sintetasa)³⁴. La IFS consiste en dos componentes: una 2-HIS (2-hidroxi-isoflavonona sintetasa)

y en una 2-HID (2-hidroxi isoflavanona deshidratasa)⁷. Al actuar sobre la naringenina, la IFS da lugar a la migración del anillo B del C2 al C3 del anillo C de dicha flavanona seguida de la hidroxilación en el C2 de este mismo anillo (Figura 1)³². El intermediario resultante, la 2-hidroxi-genisteína, es inestable y rápidamente se deshidrata para generar el producto estable correspondiente a la genisteína³⁴. En plantas, la genisteína no conjugada es convertida en su forma glicosilada predominante genisteína-7-O-β-D-glucopiranosa por la acción de la enzima UDP-glucosa:isoflavanona 7-O-β-glucosiltransferasa. En relación al aspecto biotecnológico, se ha logrado obtener genisteína recombinante a partir de tirosina en co-cultivos de organismos genéticamente modificados como son *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, levadura)³⁵. Lo anterior, implicó la transformación de *E. coli* con el *cluster pal*, *ScCCL*, *cbs*, *chi*, *ac*, altamente eficiente en la producción de naringenina²⁰ y la transformación de *S. cerevisiae* con el gene *fsi* de *G. echinata*. La estrategia del co-cultivo se basó en que la naringenina secretada por *E. coli* fue captada por *S. cerevisiae* para transformarla en genisteína. La inclusión de *S. cerevisiae* en el sistema de expresión radicó en que, al carecer de las enzimas de la ruta fenilpropanoide, se evitó alterar la estructura normal de precursores, que de otra forma podrían haber sufrido modificaciones indeseables afectando negativamente el alto rendimiento obtenido de genisteína que fue de 6 mg/L³⁵.

Conclusiones

Aunque diversas propiedades terapéuticas de la flavonoides han sido reconocidas, es preciso llevar a cabo estudios fisiológicos, inmunológicos y farmacológicos por mencionar solo algunos, para evaluar objetivamente sus efectos en la salud¹⁰. Las implicaciones del consumo de flavonoides en la dieta es difícil de estimar debido a su heterogeneidad en las fuentes naturales. El estudio extensivo relativo a las enzimas que participan en las rutas metabólicas de biosíntesis, ha permitido realizar la manipulación genética con el fin de producir flavonoides recombinantes en *E. coli* como sistema de expresión. La disponibilidad de cantidades masivas de preparaciones homogéneas de flavonoides generadas por ingeniería genética permitirá esclarecer sus efectos terapéuticos, así como su inocuidad. Aun cuando la producción de una gran parte de flavonoides recombinantes está en fase experimental, los avances en ingeniería metabólica harán factible su producción a gran escala para cubrir la futura demanda destinada a la elaboración de productos farmacéuticos basados en estos metabolitos secundarios.

Referencias

- Raskin I., Ribnicky D.M., Komamitsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J.M., Comwell T., Pastor I., Fridlander B. 2002. *Plants and human health in the twenty-first century. Trends in Biotechnology*, 20(12): 522-531.
- Drago Serrano M.E., López López M., Saínz Espuña TR. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37(3):58-68.
- Demian AL. 2000. *Microbial Biotechnology*. TibTech 18(1): 26-31.
- Vom Endt D., Kijne J.W., Memelik. 2002. Transcription factors controlling secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, 61(2): 107-114.
- Dixon R.A., Lamb C.J., Masoud S., Sewalt V.J., Paiva N.L. 1996. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses--a review. *Gene*, 179(1): 61-71.
- Forkmann G., Martens S. 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2): 155-160.
- Dixon R.A., Steele C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids: a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4(10):394-400.
- Sumner L.W., Mendes P., Dixon R.A. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62 (6): 817-836.
- Koffas M., Roberge C., Lee K., Stephanopoulos G. 1999. Metabolic engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1: 535-557.
- Nijveltd R.J., van Nood E., van Hoorn D. E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leewen P.A.M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74 (4):418-425.
- Harborne J.B., Williams C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55 (6): 481-504.
- Turnbull J.J., Nakajima J., Welford R.W.D., Yamazaki M., Saito K., Schofield C.J. 2004. Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2):1206-1216.
- Woo H.H., Jeong B.R., Hawes M.C. 2005. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. *Biotechnology Letters*, 27(6):365-374.
- Willits M.G., Giovanni M., Prata R.T., Kramer C.M., De Luca V., Steffens J.C., Graser G. 2004. Biofermentation of modified flavonoids: an example of an in vivo diversification of secondary metabolites. *Phytochemistry*, 65(1): 31-41.

15. Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
16. Katsenis K. 2005. Micronized purified flavonoid fraction (MPFF): a review of its pharmacological effects, therapeutic efficacy and benefits in the management of chronic venous insufficiency. *Current Vascular Pharmacology*, 3(1): 1-9.
17. Hwang E., Kenko M., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2003. Production of plant specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5): 2699-2706.
18. Kaneko M., Hwang E.I., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2003. Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(8): 456-461.
19. Watts K.T., Lee P.C., Schmidt-Dannert C. 2004. Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 5(4): 500-507.
20. Miyahisa I., Kaneko M., Funa N., Kawasaki H., Kojima H., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2005. Efficient production of (2S) flavanones by *Escherichia coli*, containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4): 498-504.
21. Martens S., Forkmann G., Britsch L., Wellman F., Matern U., Lukacin R. 2003. Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate dependent dioxygenases in parsley. *FEBS Letters*, 544(1-3): 93-98.
22. Leonard E., Chemler J., Lim K.H., Koffas M.A.G. 2006. Expression of a soluble flavone synthase allows the biosynthesis of phytoestrogen derivatives in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70 (1): 85-91.
23. Miyahisa I., Funa N., Ohnishi Y., Martens S., Moriguchi T., Horinouchi S. 2006. Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(1): 53-58.
24. Leonard E., Yan Y., Koffas M.A. 2006. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 8(2): 172-181.
25. Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 761-780.
26. Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F., Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5): 923-933.
27. McDougall G.J., Fyffe S., Dobson P., Stewart D. 2005. Anthocyanins from red wine their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66 (21): 2540-2548.
28. Nakajima J., Tanaka Y., Yamazaki M., Saito K. 2001. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3 glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (28): 25797-25803
29. Jaakola L., Määttä K., Pirttilä A.M., Törrönen R., Kärenlampi S., Hohtola A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, protoanthocyanidin and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130 (2): 129-139.
30. Yan Y., Chemler J., Huang L., Martens S., Koffas M.A. 2005. Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 3617-3623.
31. Dijsselbloem N., Vanden Berghe M., De Naeyer A., Haegeaman G. 2004. Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections. Multi- purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anticancer and anti-inflammatory therapy. *Biochemical Pharmacology*, 68(6): 1171-1185.
32. Dixon R. A. 2004. Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Physiology*, 55: 221-261.
33. Dixon R.A., Ferreira D. 2002. Genistein. *Phytochemistry*, 60 (3): 205-211.
34. Liu Ch.J., Blount J.W., Steele C.L. Dixon R.A. 2002. Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 99 (22): 14578-14583.
35. Katsuyama Y., Miyahisa I., Funa N., Horinouchi S. 2006. One pot synthesis of genistein from tyrosine by coincubation of genetically engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, A la fecha disponible solo en línea.
36. Stintzing F.C., Carle R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalins in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 15 (1):19-38.