

Artículo de Revisión Bibliográfica

Gilberto Pérez Trueba, G. Martínez Sánchez (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **20** (4) Oct.-Dic. 2001

Título:

“ Los flavonoides como antioxidantes naturales”

“ Flavonoids as natural antioxidants”

Autores:

Gilberto Pérez Trueba*

Gregorio Martínez Sánchez

* A quien debe ser enviada la correspondencia.

Filiación:

Licenciado Gilberto Pérez Trueba. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 No. 3102. Playa 11600. La Habana. CUBA.

Teléfono: 537-78-1686.

E-mail: havxnxs@typeb.sita.int (Carlos Pérez Trueba)

Doctor en Ciencias Farmacéuticas Gregorio Martínez Sánchez. Centro de Estudios para las Investigaciones y las Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. San Lázaro y L, Ciudad Habana 4, Cuba. Telef. 537-219531/38, Fax. 537-336811

E-Mail: gregorio@cieb.sld.cu

Resumen.

El estudio de los radicales libres (RL) y de los antioxidantes ha cobrado un gran auge particularmente en el último decenio. Un número creciente de artículos que abordan aspectos clínicos y nutricionales, han puesto de manifiesto la importancia que está requiriendo el empleo de antioxidantes en la dieta, teniendo en cuenta que a menudo las combinaciones vitamínicas, comúnmente recomendadas en el mundo entero, no ejercen los efectos esperados o por el contrario estos resultan dañinos. Los compuestos polifenólicos, específicamente los flavonoides, ocupan un lugar destacado en este contexto. Los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción antioxidante resultan de una combinación de sus propiedades quelatantes de metales de transición y secuestradoras de RL, así como de la inhibición de oxidasas y acción sobre otras enzimas. Esta revisión discute la actividad antioxidante de los flavonoides, a través de dichos mecanismos, en diversos modelos experimentales y la fuerte contribución de la estructura química a dicha actividad. Se recogen también algunas evidencias de la actividad prooxidante que pueden ejercer estos metabolitos.

Palabras Claves: Antioxidantes, Flavonoides, Radicales Libres, Secuestradores.

Abstract.

Over the last tenth years free radicals and antioxidants have gained tremendous interest, being widely discussed in the clinical and nutritional literature. Is a general agreement that vitamin supply in diet as the standard therapy, but sometimes this vitamin supply has no effect or provide unexpectable effects. So, plant phenolics, especially flavonoids, are playing an important role at this point. A combination of transition metal quelation and radical scavenging, inhibition of oxidases and the action over another enzymes are results of flavonioids antioxidant activity. This review discusses the antioxidant activity of flavonoids by using some different experimental systems and the structure-activity relationship. It also appears some references in relation to the prooxidants activities of these metabolites.

Key Words: Antioxidants, Flavonoids, Free Radicals, Scavengers.

LOS FLAVONOIDES COMO ANTIOXIDANTES NATURALES.

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo (1-6). Pueden encontrarse desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos altamente polimerizados con pesos moleculares mayores de 30000 Da (7, 8).

Se dividen en 13 subclases con un total de más de 5000 compuestos (9) (Tabla 1). Pero todos presentan en común un esqueleto hidrocarbonado del tipo C₆-C₃-C₆ (difenilpropano) que se deriva del ácido shiquímico y de tres restos de acetato. Cada porción de seis carbonos comprende un anillo aromático y la de tres carbonos un heterociclo (Figura 1).

Poseen propiedades antioxidantes (2, 3, 10-12); antiinflamatorias (11-13); antitrombóticas (11, 12, 14); antimicrobianas (12, 15, 16); antialérgicas (11, 12, 15); antitumorales (11, 12, 15) y antiasmáticas (15). Al mismo tiempo inhiben un amplio espectro de enzimas entre las que se encuentran la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C, topoisomerasa II y oxidasas como la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa (3, 13, 17).

Sin embargo, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han constituido blancos de un sinnúmero de estudios principalmente de corte clínico y nutricional, tomando en consideración que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados en todo el mundo, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E, vitamina C y β -caroteno), no producen los efectos esperados o estos resultan dañinos, por lo que para una mejor acción antioxidante se prefiere incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos (18).

MECANISMOS ANTIOXIDANTES DE LOS FLAVONOIDES

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus excelentes propiedades quelatantes de hierro (Fe) y secuestradoras de RL (2, 8, 12, 19, 20); así como de la inhibición de oxidasas tales como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO) (3, 21). Otros mecanismos podrían incluir la inhibición de enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, este es el caso de la fosfolipasa A₂ (FLA₂) (22) y la estimulación de otras con reconocidas propiedades antioxidantes como la Catalasa (CAT) y la

superóxido dismutasa (SOD) (23). De esta forma los flavonoides pueden interferir no solo en las reacciones de propagación de RL sino también con la formación del radical en sí (1).

ACTIVIDAD QUELATANTE DE METALES DE TRANSICIÓN Y SECUESTRADORA DE RL DE LOS FLAVONOIDES. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

Las ERO que abarcan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el radical peroxilo ($LOO\cdot$), el oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) entre otras, reaccionan con las biomoléculas conduciendo al daño celular y tisular (24-27). Afortunadamente el organismo cuenta con mecanismos efectivos para protegerse de los efectos nocivos de estas especies químicas (28, 29). Estos mecanismos se componen de las enzimas SOD, CAT, y glutatión peroxidasa (GSPx); pero también de compuestos no enzimáticos como el glutatión hidrosoluble (GSH), y el ácido ascórbico (vitamina C); así como del α -tocoferol (vitamina E) contenido en la membrana, los carotenos y los flavonoides.

Dentro de estos últimos el más estudiado, tanto desde el punto de vista farmacológico como toxicológico, ha sido la quercetina aglicona, perteneciente a la subclase de los flavonoles. Esto probablemente se deba a su amplio predominio en la dieta humana, estimándose su consumo en el intervalo de 4 a 68 mg/d según estudios epidemiológicos en U.S. , Europa y Asia (30-32).

En las últimas dos décadas sin embargo, los estudios de la actividad antioxidante se han extendido a otras subclases de flavonoides. En este sentido los flavonoles, flavanonas, flavonas, flavanoles y antocianidinas, representan los grupos más abordados (Tabla 2).

La mayoría de estos estudios se han realizado *in vitro* . El papel de los polifenoles *in vivo* no está claro. Su aparición en plantas como una mezcla compleja de compuestos polifenólicos crea grandes dificultades en el estudio de su biodisponibilidad y de sus efectos nutricionales y fisiológicos (8). Se plantea que su eficiencia antioxidante depende de la magnitud de la absorción, del metabolismo que sufren, así como de la actividad de las formas metoxiladas y conjugadas circulantes en plasma. Solo pequeñas cantidades de estos metabolitos son absorbidas *in vivo*, pero existen evidencias de que las bajas concentraciones que se alcanzan en plasma son suficientes para ejercer una potente acción antioxidante (33-36).

Uno de los estudios que pudiera constituir el principio de una investigación más profunda con RL biológicos lo constituye la evaluación de la actividad secuestradora de flavonoides sobre el radical químico estable 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). La Tabla 3 ilustra algunos de estos estudios que aparecen en la literatura con estos metabolitos constituyentes de diferentes plantas.

Otras investigaciones han evaluado la actividad antioxidante de los flavonoides polifenólicos frente a los RL generados durante la POL, ya sea enzimática o no enzimática. La Tabla 4 muestra una relación de flavonoides que inhiben este proceso, según estudios basados en la medición de la producción de malonildialdehído (MDA) a través del ensayo de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB). La mayoría de los resultados ponen de manifiesto que aquellos compuestos con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; como sucede con la quercetina (40, 41, 43, 44). Por otra parte se evidencia que las agliconas de los flavonoides se muestran más potentes en sus acciones anti-lipoperoxidativas que sus correspondientes glicósidos (41).

Por otro lado un estudio realizado con 24 flavonoides correspondientes a las subclases de flavonoles, flavanonoles, flavonas, flavanoles, chalconas y antocianidinas, en cuanto a su capacidad para inhibir la POL microsomal inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato, así como la POL inducida por la doxorubicina, generadora de ERO por ciclaje redox, reportó que no existe mucha variación entre las efectividades de los flavonoides inhibiendo ambos procesos peroxidativos. Los valores de CI_{50} estuvieron en el mismo orden de magnitud y la mayoría de los flavonoides quelataron Fe, aunque se diferenciaron ampliamente en sus capacidades quelatantes. Los rasgos estructurales relacionados con la quelación del metal incluyeron fundamentalmente un grupo catecol y grupos OH en posiciones 3 y 5 (46, 47).

Las mediciones electroquímicas han sido muy utilizadas para comparar la capacidad antioxidante de diferentes flavonoides. van Acquire *et al* (1) estudió, mediante el empleo de la voltametría cíclica, los potenciales de oxidación ($\text{Ep}/2$) de varios de estos metabolitos. Esto permitió establecer una correlación, principalmente cualitativa, entre la inhibición de la POL enzimática y no enzimática y los $\text{Ep}/2$ de los flavonoides. De esta manera, por lo general, buenos inhibidores exhiben bajos valores de $\text{Ep}/2$, inhibidores moderados tienen valores intermedios de $\text{Ep}/2$, mientras que malos inhibidores o compuestos inactivos, no pueden ser oxidados por debajo de 1v. En la mayoría de los casos los flavonoides que presentan un grupo catecol en el anillo B, un OH en posición 3 (el cual puede actuar como un sitio de quelación o puede ser también oxidado) y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, se muestran los más activos.

Por su parte las antocianidinas muestran muy buenas propiedades secuestrantes de RL (48, 49) pero, dependiendo de las condiciones del experimento, sus bajos $\text{Ep}/2$ las puede hacer comportar también como agentes prooxidantes, involucrándose en procesos ciclaje redox. En este sentido su peculiar estructura (ión oxonio), con una alta conjugación que le brinda alta estabilidad a los radicales que forma, debido a sus posibilidades de deslocalización, juega un papel muy importante. Por tanto, los flavonoides con un

grupo pirogalo en el anillo B ofrecen una actividad antioxidante mayor que los que presentan un núcleo catecol; pero son muy susceptibles a mostrarse como agentes prooxidantes, lo que neutraliza los referidos efectos antioxidantes (1).

Los flavonoides secuestran $O_2^{\cdot -}$ y $\cdot OH$ (48, 50-52). Morazzoni y Malandrino (1988) pusieron de manifiesto que la rutina, seguida de la quercetina, se comportaba como el secuestrador más fuerte de $O_2^{\cdot -}$, generado enzimáticamente a través del sistema xantina/XO y no enzimáticamente a través del sistema NADH-metosulfato de fenacina. Los valores de CI_{50} de la POL en homogenados de hígado de ratón estuvieron en el orden de 10^{-6} M para ambos flavonoides (49).

El efecto secuestrador de $O_2^{\cdot -}$ también se evidenció en un estudio llevado a cabo con 15 flavonoides, donde las constantes de reacción con el $O_2^{\cdot -}$ se mostraron en el intervalo de 10^5 - 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ (53).

La (+)catequina, la (-)epicatequina, la 7,8-dihidroxi flavona y la rutina, actúan como secuestradores del radical $\cdot OH$ generado en un sistema Fenton en un intervalo de 100 a 300 veces superior a los efectos del manitol, un típico secuestrador de la más tóxica de todas las ERO generadas *in vivo*. Este ensayo se basó en la determinación de ácido metanesulfónico formado por la reacción entre el dimetilsulfóxido y este radical (54). También la quercetina y la luteolina suprimieron la reacción de Fenton interfiriendo la onda catalítica voltamétrica, característica del complejo Fe-ATP/ H_2O_2 , en un ensayo de espectroscopía de absorción. Un grupo catecol en el anillo B, el grupo carbonilo en posición 4 y una región 5-hidroxi, que puede aumentar la quelación de estos compuestos con Fe, pudieran fundamentar estos resultados (55).

El 1O_2 puede ser atrapado por los flavonoides, que además logran inhibir los efectos degradativos provocados por el H_2O_2 , el $NO\cdot$ y el $HOCl$ (3, 48, 50, 56, 57).

La eficiencia en el secuestro físico del 1O_2 es controlada principalmente por la presencia de un grupo catecol en el anillo B, mientras los sustituyentes en el anillo C (particularmente un grupo OH activando el doble enlace) constituye el factor determinante de la eficiencia en la reactividad química; según demostró un estudio con 13 flavonoides, pertenecientes a las familias de los flavonoles, de las flavonas, de las flavanonas y de los flavanoles, frente a esta ERO. Durante el mismo se midieron las constantes de reacción de estos compuestos con el 1O_2 , así como las constantes de captura física, a través de mediciones cinéticas. La (+)-catequina resultó ser el secuestrador más eficiente de las series de flavonoides ensayados (58).

El compuesto S5682 (Daflon 500 mg), integrado por una fracción de flavonoide purificada que se compone de un 90% de diosmina y de un 10% de hesperetina, redujo la formación de H_2O_2 , ya sea generado a través de la estimulación de leucocitos polimorfonucleares (PMN), con una $CI_{50}=1,6\cdot 10^{-6}$ M,

como a través de un mecanismo enzimático *in vitro* ($CI_{50}=2 \cdot 10^{-6}$ M). El S5682 produjo una inhibición de la quimioluminiscencia dependiente del luminol inducida por H_2O_2 ($CI_{50}=5 \cdot 10^{-6}$ M), lo que sugiere una posible actividad de este compuesto en el sistema $H_2O_2/HOCL/MPO$ (59). Por otro lado, la quercetina protege las células del desbalance de calcio inducido por H_2O_2 , lo cual se asocia a desórdenes neurodegenerativos en las personas de edad. Los grupos OH de las posiciones 3' y 4' en el anillo B y que un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, unido al grupo carbonilo de la posición 4 en el anillo C, son cruciales para la actividad protectora (60).

Los efectos tóxicos del HOCL son neutralizados, ya sea por secuestro de esta ERO, como por inhibición de la MPO, enzima que lo genera en presencia de H_2O_2 y de halogenuros como el ión cloruro. La alta sustitución hidroxílica favorece estas acciones (3, 61, 62).

Las antocianidinas son secuestradores muy potentes de NO^{\cdot} , siendo los valores de sus constantes de actividad secuestradora solo 30 veces menos activas en relación con la hemoglobina, secuestrador endógeno más potente de esta especie química (57).

Numerosas evidencias apuntan hacia la protección del ADN ejercida por los flavonoides al inhibir los efectos oxidativos que provocan las ERO sobre esta biomolécula. El pretratamiento con flavonoides, a concentraciones estandarizadas (7,6; 23,2; 93 y 279,4 $\mu M/L$), en el daño al ADN generado por H_2O_2 (100 $\mu M/L$) en linfocitos humanos, analizado a través de un ensayo de electroforesis en gel de células individuales (COMETA), redujo el daño oxidativo al ADN. Los compuestos, a la concentración de 270 $\mu M/L$, fueron efectivos en el siguiente orden: luteolina (9% de inhibición del daño por H_2O_2), miricetina (10%), quercetina (22%), kaempferol (32%), quercitrina (quercetina-3-L-ramnósido) (45%), apigenina (59%), quercetina-3-glucósido (62%) y la rutina (quercetina-3- β -D-rutinósido) (82%). Los flavonoides libres ejercen un mayor efecto protector que los flavonoides conjugados (63).

Otra investigación reportó que los flavonoides presentes en el vino rojo disminuyen la razón 8-OH-2'-desoxiguanosina/2-desoxiguanosina en el ADN hepático hidrolizado, luego de haberse administrado una dosis de esta bebida de 57 mg/kg de peso corporal (dosis 10 veces más alta que la que representa una toma normal) a ratas que fueron tratadas con 2-nitropropano para producir daño al ADN hepático. La determinación se realizó por medio de HPLC acoplado a detectores electroquímicos (64).

No obstante los numerosos estudios que reflejan las propiedades secuestradoras de ERO por parte de los flavonoides, en la literatura se recogen evidencias que muestran a estos metabolitos como generadores de ERO y causantes de daño al ADN, atribuyéndoseles en este sentido efectos genotóxicos y mutagénicos.

De esta manera se ha reportado que, aunque con menos efectividad que los que contienen un núcleo pirogalol, los flavonoides con un grupo catecol generan H_2O_2 en solución amortiguadora acetato pH 7,4 al donar un átomo de hidrógeno de su estructura al oxígeno por conducto de un radical superóxido. La efectividad de los compuestos que se evaluaron se comportó en el siguiente orden: miricetina, baicaleína, quercetina, epicatequina, catequina y fisetina (65). Mientras, en otro ensayo fue puesto en evidencia que la baicalina, la quercetina, la morina y la miricetina, son capaces de incrementar la generación de $\cdot OH$ a través de la reacción de Fenton, al determinarse el ácido metanesulfónico producido por la reacción entre el dimetilsulfóxido y este radical (54).

Por último aparecen reportes que indican que la quercetina, rutina, galangina, apigenina, fisetina, miricetina y baicaleína, provocaron ruptura del ADN de timo de carnero en presencia de Cu y oxígeno molecular; comportándose la quercetina como más efectiva en este contexto produciendo además, conjuntamente con la miricetina y la baicaleína, la formación de la 8-OH-2'-desoxiguanosina, considerada como la lesión oxidativa del ADN de mayor potencial mutagénico (66-68).

Los bajos $E_p/2$ que poseen los flavonoides debido a sus características estructurales, les permite reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} para sufrir una autoxidación o incluso involucrarse en un proceso ciclaje redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes, y comportándose entonces como agentes genotóxicos y mutagénicos en diversos sistemas experimentales (54, 69-71). Esto pudiera explicar los resultados expuestos con anterioridad. Al mismo tiempo, la sustitución orto 3'-4'-dihidroxi en el anillo B resulta esencial para la formación de quelatos con este metal; siendo igualmente importante para la acción prooxidante la conjugación entre los anillos A y B (69, 72).

INHIBICION DE OXIDASAS

La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus actividades antioxidantes. Existen evidencias de que la quercetina y la rutina inhiben la NADPH del sistema de la citocromo P-450 en microsomas hepáticos (73). Este efecto pudiera impedir el metabolismo de una gran diversidad de xenobióticos que emplean esta vía para generar RL.

Otros estudios sugieren que la quercetina, la morina y la catequina, a concentraciones de 0,125; 0,25 y 0,5 mM respectivamente, protegen las células endoteliales de la aorta porcina frente al daño inducido por oxiradicales generados por el sistema XO/hipoxantina. La inhibición de la XO ejercida por la morina y por la quercetina fue significativamente mayor ($p < 0,01$) con respecto a la catequina (74).

Las oxidasas CO y LO, involucradas en la cascada del ácido araquidónico, resultan inhibidas por los flavonoides en múltiples ensayos experimentales. La eficacia de la inhibición varía enormemente; así, un único flavonoide puede inhibir una enzima a bajas concentraciones, pero puede necesitar de concentraciones 100 veces superiores para inhibir otra. Por ejemplo, la silibina inhibe fuertemente la 5-LO de granulocitos humanos y de las células de kuffer humanas y de ratas, con valores de CI_{50} de alrededor de 15 μM determinados por la formación de los leucotrienos (62). Sin embargo, se necesitan concentraciones de hasta 3 y 4 veces más altas de esta para lograr la mitad de la inhibición máxima en la vía de la CO en las células endoteliales y en los granulocitos humanos (3). Otro ensayo efectuado con 11 flavonoides mostró que estos inhibieron tanto la CO como la LO, pero que algunos como el cirsilol, la gossypetina, la hypoletina y sus glicósidos, fueron más efectivos inhibiendo la LO (21).

Algunos estudios también hacen referencia a la inhibición de la enzima MPO por parte de los flavonoides, neutralizando así los efectos nocivos del HOCL (3, 75).

OTROS MECANISMOS DE ACCION ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES

Además de secuestrar RL, quelatar iones metálicos e inhibir oxidasas, los flavonoides son capaces de aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes. Al mismo tiempo pueden inhibir enzimas involucradas en la generación de ERO. Los reportes a tal efecto son escasos en comparación con la amplísima bibliografía que por el contrario se recoge de la actividad quelatante de iones metálicos y secuestrante de RL. En este contexto se reporta que los flavonoides aislados de la *Solanum melongena* (Brinjal) mostraron una potente actividad antioxidante, elevando de manera significativa ($p < 0,01$) los niveles de GSH y la actividad de la CAT en ratas normales y alimentadas con colesterol, luego de que se les administrara por vía intraperitoneal 1mg de flavonoides del Brinjal/100g de peso corporal /d (23).

La rutina demostró tener efectos inhibitorios sobre la FLA₂ grupo I (FLA₂-1) de páncreas porcino, la FLA₂ proveniente de la *Vipera russelli* (FLA₂-II) y de la *Crotalus atrox*, así como sobre la FLA₂-II del fluido sinovial. Sin embargo fue un inhibidor muy débil de la FLA₂-I del jugo pancreático. El grupo OH en posición 5, así como el doble enlace y el oxígeno doblemente enlazado en el anillo del oxano, son rasgos estructurales importantes para poder ejercer una actividad inhibitoria sobre la FLA₂. También los grupos OH en posición 3' y 4' son necesarios para una inhibición selectiva de esta enzima (22). No obstante a estos resultados, se precisa de un análisis más profundo teniendo en cuenta que la FLA₂ puede ser considerada en cierto sentido como una enzima con funciones duales, teniendo en cuenta que si bien

está involucrada en la generación de ERO al activar la cascada del ácido araquidónico, también es necesaria para liberar los hidroperóxidos lipídicos que, como resultado de la POL se acumulan en las membranas celulares, para que estos sean eliminados por enzimas antioxidantes que no pueden actuar a nivel de membranas como es el caso de la GSPx .

Otra investigación dio a conocer que los flavonoides fisetina, 7-monohidroxiethylrutósido y naringenina, restauraron la protección, dependiente de GSH, en microsomas hepáticos deficientes de α -tocoferol. Estos resultados sugieren que estos compuestos, debido a su semejanza química con este último antioxidante de ruptura de cadena, pueden asumir el papel de esta vitamina en las membranas, poniéndose de manifiesto una interacción entre estos compuestos polifenólicos y el GSH (76).

Los flavonoides protegen las LDL de la oxidación. Estas últimas están constituidas por ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a POL. Varios estudios se recogen en este sentido. Así, las suspensiones de células de la *Vitis vinifera* fueron empleadas para aislar y caracterizar los flavonoides (antocianinas y catequinas) encontrados en el vino rojo. Las actividades antioxidantes fueron evaluadas por su capacidad de prevenir la POL inducida por Cu^{2+} en las LDL. Los resultados mostraron que la astringinina es la más activa, indicando que los compuestos fenólicos exhiben propiedades interesantes que pueden acontecer en parte por la llamada “Paradoja Francesa”: la toma moderada de vino rojo por un largo período de tiempo puede proteger contra las enfermedades coronarias (77-79).

Finalmente un estudio *in vivo* con una mezcla estándar de polifenoles, que abarcó todas las clases de flavonoides desde ácidos fenólicos hasta taninos, se obtuvo por extracción selectiva a partir de las hojas de la uva y se utilizó en un modelo de aterosclerosis inducida por colesterol en conejos. Los resultados, obtenidos a través del análisis de la ecuación cinética del grado de emisión fotónica, acompañada de la oxidación del luminol en plasma y utilizando hematina como catalizador para medir los niveles de peróxidos en plasma, mostraron que los animales que consumieron el extracto de las hojas de la uva presentaron niveles reducidos de estos en relación con los animales que solo consumieron la dieta rica en colesterol. De esta forma los flavonoides presentes en el extracto inhibieron la generación de peróxidos por la pared de los vasos cargados con colesterol y previnieron la propagación de las reacciones radicalarias que guían a la acumulación de dichos peróxidos y a la oxidación de las LDL (80).

Conclusiones

Los estudios presentados ponen de manifiesto las acciones antioxidantes de los flavonoides en múltiples sistemas experimentales. Los aspectos estructurales relacionados con dicha actividad, considerando los estudios de secuestro de RL e inhibición de la POL, incluyen un grupo catecol como rasgo estructural fundamental conjuntamente con el grupo carbonilo en posición 4, en conjugación con un doble enlace

entre los carbonos 2 y 3. Un grupo OH libre en posición 3, que aparentemente incrementa la capacidad antioxidante porque la forma libre es más lipofílica que la glicosídica y un grupo OH en posición 5, que puede aumentar la actividad antioxidante por incremento de la deslocalización electrónica (Figura 2). La conjugación total del anillo piránico con el resto de la molécula, lo cual es típico de las antocianidinas, incrementa la estabilización de los radicales formados, produciéndose un aumento de la actividad antioxidante, pero al mismo tiempo la presencia de un grupo pirogalol predispone hacia una actividad prooxidante. Este último rasgo, evidenciado para algunos flavonoides en diversos ensayos, pudiera atribuirse a factores tales como: las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la ERO es formada, la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante, la lipofilicidad para ser captados por la membrana, el pH del medio, así como el estado redox de su ambiente biológico. Por esto, a pesar de que usualmente se asegura que los flavonoides están libres de toxicidad y efectos secundarios, lo que permite sus amplios usos terapéuticos, se requieren de investigaciones adicionales, tomando en cuenta que las estrategias de mercado, seguidas por los fabricantes de concentrados de flavonoides, consisten en exagerar sus efectos no tóxicos, la mayoría de los cuales no están sustentados por ensayos clínicos regulados, recomendando dosis que pueden sobrepasar a las adquiridas a través de una típica dieta vegetariana, conduciendo a la generación de ERO y daño posterior al ADN.

Referencias Bibliográficas

- 1) Van Acquire, S.A. , D.J. Van den Berg, M.N. Tromp, D.H. Griffioen, W.P. van Bennekom, W.J. van der Vijgh & A. Bast (1996) *Free Radic. Biol. Med.* 20: 331-42
- 2) Bohm, H. , H. Boeing, J. Hempel, B. Raab & A. Kroke (1998) *Ernahrungswiss* 2: 147-63
- 3) de Groot, H. & U. Rauen (1998) *Fundam. Clin. Pharmacol.* 3: 249-55
- 4) Hertog, M.G. , P. Hollman & M. Katan (1992) *J. Agric. Food Chem.* 40: 2379-83
- 5) Dwyer, J.T. , B.R. Goldin & N. Saul (1994) *J. Amer. Dietetic Assn.* 94: 739-43
- 6) Hertog, M.G. , P.C. Hollman & M. Katan (1993) *Nutr. Cancer* 20: 21-9
- 7) Würsch, P. , S. del Vedobo, J. Rosset & M. Smiley (1984) *Lebens Wiss Technol* 17: 351-54
- 8) Bravo, L. (1998) *Nut. Rev.* 56: 317-33
- 9) Harborne, J.B. (1986) "Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics". London: Chapman and Hall.
- 10) Prior, R.L. & G. Cao (1999) "Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering *in vivo* antioxidant status". *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 220: 255-61
- 11) Pietta, P.G. (2000) "Flavonoids as antioxidant". *J. Nat. Prod.* 63: 1035-42
- 12) Russo, A. , R. Acquaviva, A. Campisi, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, G. Virgata, M.L. Barcellona & A. Vanella (2000) "Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors". *Cell. Biol. Toxicol.* 16: 91-8
- 13) Formica, J.V. & W. Regelson (1995) "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids". *Food Chem. Toxicol.* 33: 1061-80

- 14) Aviram, M. & B. Fuhrman (1998) "Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis". *Atherosclerosis*. 137: 45-50
- 15) Hirono, I. (1987) "Bioactive Molecular. Naturally occurring carcinogenes of plant origin. Toxicology phatology and Biochemistry". *Biol. Pharm. Bull.* 2: 120-58
- 16) Aziz, N.H. , S.E. Farag, L.A. Mousa & M.A. Abo-Zaid (1998) "Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds". *Microbios*. 93: 43-54
- 17) Christine, F. & T.S. Martyn (2000) "Potential Health impacts of excessive flavonoid intake". *Free Radic. Biol. Med.* 29: 375-83
- 18) Hassing, A. , W.X. Liang, H. Schwabl & K. Stampfli (1999) "Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character". *Med. Hypotheses*. 52: 479-81
- 19) Havsteen, B. (1983) "Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency". *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141-8
- 20) Haenen, G.R.M.M. , F.P. Jansen. & A. Bast (1993) "The antioxidant properties of five O-(Hydroxyethyl)-rutosides of the flavonoid mixture Venoruton". *Phlebology Suppl* 1: 10-17
- 21) Ferrándiz, M.L. & M.J. Alcaraz (1991) "Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids". *Agents Actions*. 32: 283-8
- 22) Lindahl, M. & C. Tagesson (1997) "Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2 ". *Inflammation*. 21: 347-56
- 23) Sudheesh, S. , C. Sandhya, K.A. Sarah & N.R. Vijayalakshmi (1999) "Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*". *Phytother. Res.* 13: 393-6
- 24) Davies, K.J.A. (1995) "Oxidative stres: the paradox of aerobic life". In "Free Radicals and Oxidative Stress: Environment. Drugs and Food" (Rice-Evans, C. , B. Halliwell, G.G. Lunt, ed.), London: Portland Press. pags. 1-35
- 25) de Groot, H. (1994) "Reactive oxygen species in tissue injury". *Hepato-Gastroenterol.* 41: 328-32
- 26) Halliwell, B. & J.M.C. Gutteridge (1989) "Free Radicals in Biology and Medicine". Oxford: Clarendon Press.
- 27) Sies, H. (1991) "Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants". New York: Academic Press.
- 28) Halliwell, B. (1995) "How to characterize an antioxidant: an update". In "Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives" (Rice-Evans, C. , B. Halliwell, G.G. Lunt, ed.). London: Portland. Press. pags. 73-101
- 29) Vladimirov, Iu A. (1998) "Free radicals and Antioxidants". *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 7: 43-51
- 30) Knet, P. , R. Järvinen, R. Seppänen, M. Hellövaara, L. Teppo, E. Pukkala, A. Aromaa (1997) "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms". *Amer. J. Epidemiol.* 146: 223-30
- 31) Hertog, M.G. , D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti & S. Nedeljkovic (1995). "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study". *Arch. Intern. Med.* 155: 381-6
- 32) Hertog, M.G. , E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan & D. Kromhout (1993) "Dietary antioxidant flavonoid and risk of coronary heart disease". *Lancet.* 342: 1007-11
- 33) Xu, X. , H.J. Wang & P.A. Murphy (1994) "Daizein is a more available isoflavone than is genistein in adult women". *J. Nutr.* 124: 825-32
- 34) Van het Hof, K.H. , G.A.A. Kivits, J.A. Weststrate & L.B.M. Tijburg (1998) "Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk". *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 356-9
- 35) Lee, M.J. , Z.Y. Wang & H. Li (1995) "Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 4: 393-9
- 36) Hollman, P.C.H. , M. Van der Gaag & M.J.B. Mengelers (1996) "Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man". *Free Radic. Biol. Med.* 21: 703-7

- 37) Gao, Z. , K. Huang, X. Yang & H. Xu (1999) "Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi". *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 643-50
- 38) Kim, S.Y. , J.J. Gao, W.C. Lee, K.S. Ryu, K.R. Lee & Y.C. Kim (1999) "Antioxidants flavonoids from the leaves of *Morus alba*". *Arch. Pharm. Res.* 22: 81-5
- 39) Lee, S.K. , Z.H. Mbwambo, H. Chung, L. Luyengi, E.J. Gamez, R.G. Mehta, A.D. Kinghorn & J.M. Pezzuto (1998) "Evaluation of the antioxidant potential of natural products". *Comb. Chem. High. Throughput. Screen.* 1: 35-46
- 40) Trueba, P.G. , H.I. Márquez & S.B. Martínez (1997) "Evaluación de la actividad antioxidante de la Gossypitrina a través de ensayos *in vitro e in vivo*". Tesis de Diploma. Universidad de La Habana. pags. 10-14
- 41) Ratty, A.K. & N.P. Das (1988) "Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship". *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39: 69-79
- 42) Koch, H.P. & E. Loffler (1985) "Influence of silymarin and some flavonoids on lipid peroxidation in human platelets". *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 7: 13-8
- 43) Saija, A. , M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina & F. Castelli (1995) "Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes". *Free Radic. Biol. Med.* 19: 481-6
- 44) Yoshino, M. & K. Murakami (1998) "Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization". *Anal Biochem.* 257: 40-4
- 45) Pietrangelo, A. , F. Borella, G. Casalgrandi, G. Montosi, D. Ceccarelli, D. Gallesi, F. Giovannini, A. Gasparetto & A. Masini (1995) "Antioxidant activity of silybin *in vivo* during long-term iron overload in rats". *Gastroenterology.* 109: 1941-9
- 46) Afanase'ev, I.B. , A.I. Dorozhko & A.V. Brodskii (1989) "Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation". *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-9
- 47) Morel, I. , G. Lescoat & P. Cogrel (1993) "Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures". *Biochem. Pharmacol.* 45: 13-9
- 48) Sichel, G. , C. Corsaro, M. Scalia, A.J. Di Bilio & R.P. Bonomo (1991) "*In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻". *Free Radic. Biol. Med.* 11: 1-8
- 49) Morazzoni, P & S. Malandrino (1988) "Anthocyanins and their aglycons as scavengers of free radicals and antilipoperoxidant agents". *Pharmacol Res. Comm.* 20: 254
- 50) Cotellet, N. , J.L. Bernier, J.P. Catteau, J. Pommery, J.C. Wallet & E.M. Gaydou (1996) "Antioxidant properties of hydroxy-flavones". *Free Radic. Biol. Med.* 20: 35-43
- 51) Jovanovic, S.V. , S. Steenken, Y. Hara & M.G. Simic (1996) "Reduction of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2:* 2497-504
- 52) Robak, J & E. Marcinkiewicz (1995) "Scavenging of reactive oxygen species as the mechanism of drug action". *Pol. J. Pharmacol.* 47: 89-98
- 53) Jovanovic, S.V & M.G. Simic (2000) "Antioxidants in nutrition". *Ann. NY. Acad. Sci.* 899: 326-34
- 54) Hanasaki, Y. , S. Ogawa, S. Fukui (1994) "The correlation between active oxygen and antioxidative effects of flavonoids". *Free Radic. Biol. Med.* 16: 845-50
- 55) Cheng, I.F & K. Breen (2000) "On the ability of four flavonoids, baicalein, gluteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex". *Biometals.* 1: 77-83
- 56) Bors, W. , C. Michel, M. Saran (1994) "Flavonoid antioxidants: rate constants for reaction with oxygen radicals". *Methods Enzymol.* 234: 420-9

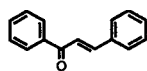
- 57) van Acker, Sabe, M.N.J.L. Tromp, G.R.M.N. Haenen, W.J.F. Van der Vijgh & A. Bast (1995) "Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical". *Biochem. Biophys Res. Commun.* 214: 755-9
- 58) Tournaire, C. , S. Croux, M.T. Maurette, I. Beck, M. Hocquaux, A.M. Braun & E. Oliveros (1993) "Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen (1 delta g) quenching". *J. Photochem. Photobiol. B.* 19: 205-15
- 59) Cypriani, B. , B. Limasset, M.L. Carrie, C. Le Doucen, M. Roussie, A.C. de Paulet & M. Damon (1993) "Antioxidant activity of micronized diosmin on oxygen species from stimulated human neutrophils". *Biochem. Pharmacol.* 45: 1531-5
- 60) Wang, H & J.A. Joseph (1999) "Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells". *Free Radic. Biol. Med.* 27: 683-94
- 61) Mira, L. , M. Silva & C.F. Manso (1994) "Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate". *Biochem. Pharmacol.* 48: 753-9
- 62) Dehmlow, C. , N. Murawski & H. de Groot (1996) "Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells". *Life Sci.* 58: 1591-600
- 63) Noroozi, M. , W.J. Angerson & M.E. Lean (1998) "Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes". *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1210-8
- 64) Casalini, C. , M. Lodovici, C. Briani, G. Paganelli, S. Remy, V. Cheynier & P. Dolaro (1999) "Effect of complex polyphenols and tannins from red wine (WCPT) on chemically induced oxidative DNA damage in the rat". *Eur. J. Nutr.* 38: 190-5
- 65) Miura, Y.H. , I. Tomita, T. Watanabe, T. Hirayama & S. Fukui (1998) "Active oxygens generation by flavonoids". *Biol. Pharm. Bull.* 21: 93-6
- 66) Rahman, A. , F. Fazal, J. Greensill, K. Ainley, J.H. Parish & S.M. Hadi (1992) "Strand scission in DNA induced by idetary flavonoids: role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequences of scission". *Mol. Cell. Biochem.* 111: 3-9
- 67) Yoshino, M. , M. Haneda, M. Naruse & K. Murakami (1999) "Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA". *Mol. Genet. Metab.* 68. 468-72
- 68) Yamashita, N. , H. Tanemura & S. Kawanishi (1999) "Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu (II)". *Mutat. Res.* 425: 107-15
- 69) Cao, G. , E. Sofic & R.L. Prior (1997) "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships". *Free Radic. Biol. Med.* 22: 749-60
- 70) Hodnick, W.F. , E.B. Milosavljevic, J.H. Nelson & R.S. Pardini (1988) "Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids". *Biochem. Pharmacol.* 37: 2607-11
- 71) Ngomuo, A.J & R.S. Jones (1996) "Genotoxicity studies of quercetin and shikimate *in vivo* in the bone marrow and gastric mucosal cells of rats". *Vet. Hum. Toxicol.* 38: 176-80
- 72) Brown, J.E. , H. Khodr, R.C. Hider & C.A. Rice-Evans (1998) "Structural dependence of flavonoids interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties". *Biochem. J.* 330: 1173-8
- 73) Kostiuk, V.A. , A.I. Potapovich, S.M. Tereshchenko & I.B. Afanas'ev (1988) "Antioxidant activity of flavonoids in various systems of lipid peroxidation". *Biokhimiia.* 53: 1365-70
- 74) Zeng, L.H. , J. Wu, B. Fung, J.H. Tong, D. Mickle & T.W. Wu (1997) "Comparative protection against oxyradicals by three flavonoids on cultured endothelial cells". *Biochem. Cell Biol.* 75: 717-20
- 75) Hoult, J.R.S. , M.A. Moroney & M. Paya (1994) *Meth. Enzymol.* 234: 443-54
- 76) van Acker Frédérique. A.A. , O. Schouten, R.M.M. Guido, W.J.F. Haenen, van der Vijgh & A. Bast (2000) *FEBS Letters.* 473: 145-8

- 77) Fauconneau, B. , P. Waffo-Teguo, F. Huguet, L. Barrier, A. Decendit & J.M. Merillon (1997) Life Sci. 61: 2103-10
- 78) Yugarani, T. , B.K.I.I. Tan & N.P. Das (1992) Lipids 27: 181-6
- 79) Tebib, K. , I. Bitri & J.M. Rouanet (1994) Food Chem. Toxicol. 49: 403-6
- 80) Ursini, F. , F. Tubaro, J. Rong & A. Sevanian (1999) Nut. Rev. 57: 241-9

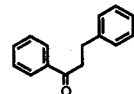
Tabla 1. Subclases de Flavonoides.

Flavonoide	Estructura Básica
------------	-------------------

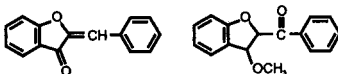
Chalconas



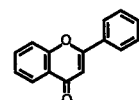
Dihidrochalconas



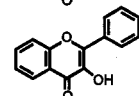
Auronas



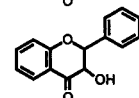
Flavonas



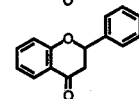
Flavonoles



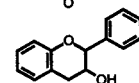
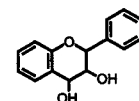
Dihidroflavonoles



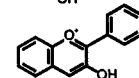
Flavanonas



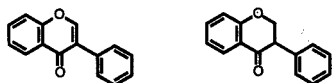
Flavanol

Flavandioles o
Leucoantocianidinas

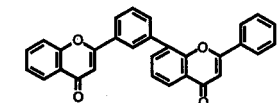
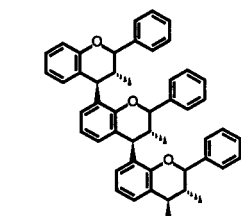
Antocianidina



Isoflavonoides



Biflavonoides

Proantocianidinas o
Taninos condensados

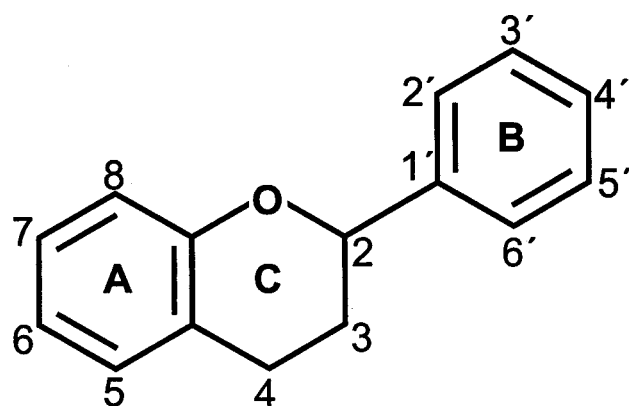


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.

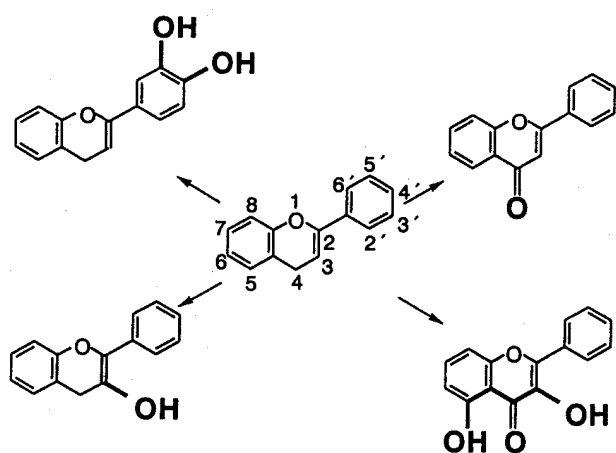


Figura 2. Principales rasgos estructurales por la actividad antioxidante de los flavonoides.

Tabla 2. Grupos de flavonoides más estudiados en relación con sus propiedades antioxidantes y algunos ejemplos de cada grupo.

Clase	Compuesto
Flavonoles	Miricetina
	Quercetina
	Fisetina
	Rutina
	Kaempferol
	Monohidroxiethylrutósido
	Dihidroxiethylrutósido
	Trihidroxiethylrutósido
Flavanonas	Naringenina
	Naringina
	Hesperetina
	Hesperidina
	Taxifolina
Flavonas	Apigenina
	Diosmina
	Luteolina
Flavanoles	(+)-Catequina
	Epicatequina
	Galocatequina
Antocianidinas	Cianidina
	Pelargonidina
	Malvidina

Tabla 3. Actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) ejercida por Flavonoides constituyentes de diferentes plantas.

Planta	Flavonoides Constituyentes	Referencia
<i>Scutellaria baicalensis</i> <i>Georgi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • baicaleína • baicalina • wogonina • wogonósido 	Gao <i>et al</i> (1999) (37)
<i>Morus alba</i>	<ul style="list-style-type: none"> • quercetina-3-O-β-D-(1-6)β-D glucopiranosil glucopiranosido • quercetina 	Kim <i>et al</i> (1999) (38)
<i>Chlorizantha diffusa</i> Benth	<ul style="list-style-type: none"> • 5,7,3',5'-tetrahidroxi-8,4'-dimetoxiflavonol • 5,8,4'-trihidroxi-7,3'-dimetoxiflavonol • 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavonol • 6,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavonol 	Lee <i>et al</i> (1998) (39)
<i>Mezoneuron cuculatum</i> <i>Roxb</i>	<ul style="list-style-type: none"> • picetanol • trans-resveratrol • apigenina • escirpusina A 	Lee <i>et al</i> (1998) (39)
<i>Daphniphyllum calycinum</i> <i>Benth</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 5,6,7,4'-tetrahidroxiflavona-3-O-rutinósido • kaempferol-3-O-neohesperisidósido 	Lee <i>et al</i> (1998) (39)

Tabla 4. Actividad inhibitoria sobre la POL ejercida por diferentes flavonoides. Determinación de la producción de malonildialdehído (MDA) a través del ensayo de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRATB).

Inducción de la POL	Compuesto	Efecto sobre la producción de MDA a través del ensayo de SRATB	Referencia
Por la hepatotoxina tetracloruro de carbono (<i>in vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Gossypitrina 	concentración inhibitoria media (CI ₅₀)=8,011µm	Trueba <i>et al.</i> (1997) (40)
Por ácido ascórbico y sulfato ferroso (<i>in vitro</i> utilizando la fracción mitocondrial del cerebro de rata)	<ul style="list-style-type: none"> quercetina quercitrina rutina taxifolina miricetina miricetrina floretina floridzina diosmetina diosmina apiína hesperetina naringenina catequina morina fisetina crisina 3-hidroxi-flavona 	CI ₅₀ en el intervalo entre 1,47 nM y 900 mM	Ratty <i>et al.</i> (1988) (41)
Por N-etil maleimida (<i>in vitro</i> utilizando plaquetas humanas)	<ul style="list-style-type: none"> catequina silimarina ácidos fenólicos 		Koch <i>et al.</i> (1985) (42)
A través de la peroxidación del linoleato por hierro (Fe ²⁺) (<i>in vitro</i>)	<ul style="list-style-type: none"> quercetina rutina hesperetina naringenina 	rutina >hesperetina >quercetina >naringenina	Saija <i>et al.</i> (1995) (43)
Por autooxidación de las membranas celulares de eritrocitos de ratas (<i>in vitro</i>)	<ul style="list-style-type: none"> quercetina rutina hesperetina naringenina 	quercetina >rutina >hesperetina >naringenina	Saija <i>et al.</i> (1995) (43)
Por oxidación aumentada de Fe ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> baicaleína baicalina quercetina rutina 		Yoshino <i>et al.</i> (1998) (44)
Por sobrecarga de Fe ²⁺ (<i>in vivo</i> utilizando hepatocitos mitocondria de ratas)	<ul style="list-style-type: none"> silimarina 	(Activo en ambos organelos)	Pietrangelo <i>et al.</i> (1995) (45)

