

Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales

Gilberto PÉREZ TRUEBA ^{1*} & Gregorio MARTÍNEZ SÁNCHEZ ²

¹ Centro de Investigaciones Biomédicas.

Instituto de Ciencias Básicas Preclínicas "Victoria de Girón".
Avenida 146 N° 3102. Playa 11600. La Habana. Cuba.

² 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.

RESUMEN. Los radicales libres (RL) y los antioxidantes están siendo ampliamente discutidos en un número creciente de artículos que abordan aspectos clínicos y nutricionales, 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. El interés acerca del papel de los compuestos polifenólicos en las plantas (específicamente los flavonoides) está creciendo rápidamente. Su actividad antioxidante resulta de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de RL, así como de la inhibición de oxidases. Las modificaciones sobre otras enzimas podrían contribuir también a tal actividad. Esta revisión aborda la actividad antioxidante de los flavonoides a través de diferentes modelos experimentales y la relación estructura-actividad. Se recogen también algunas evidencias de la actividad prooxidante de estos compuestos.

SUMMARY. "Flavonoids as natural antioxidants". Free radicals and antioxidants are widely discussed in the clinical and nutritional literature considering that sometimes the vitamin supplement in the diet as a standard therapy in the whole world either provide no effects or harmful effects. The interest about the role of plant phenolics (especially flavonoids) is growing very fast. The antioxidant activity of flavonoids results from scavenging of free radicals, from the chelation of iron ions and from inhibition of oxidases. Other enzymes modifications seems to be a good reason that contributes to that activity. This review is referred to the antioxidant activity of flavonoids by using different experimental systems and the structure-activity relationship. We also expose some references in relation to the pro-oxidant effects of these compounds.

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 hidrocarbónico del tipo C₆-C₃-C₆ (difencilpropano) que se deriva del ácido shiquímico y de tres restos de acetato. Cada porción de seis carbonos com-

prende un anillo aromático y la de tres carbonos un heterociclo (Figura 1).

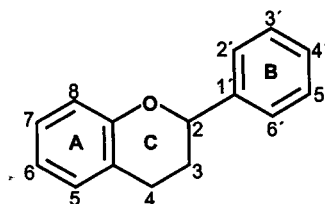


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.

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

KEY WORDS: Antioxidants, Flavonoids, Free Radicals, Scavengers.

PALABRAS CLAVE: Antioxidantes, Flavonoides, Radicales Libres, Secuestradores.

* Autor a quien debe ser enviada la correspondencia. E-mail: havxnxs@typeb.sita.int. Tel. (53 7) 78 1686.

Flavonoide Estructura Básica

Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonas	
Flavonoles	
Dihydroflavonoles	
Flavanonas	
Flavanol	
Flavandioles o Leucoantocianidinas	
Antocianidina	
Isoflavonoides	
Biflavonoides	
Proantocianidinas o Taninos condensados	

Tabla 1. Subclases de Flavonoides. (Tomado de Laura Bravo, 1998 ⁸).

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 oxidasa 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 representado los 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 eficiencia 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 quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL) ^{2,8,12,19,20}, así como de la inhibición de oxidasa 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 sólo 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 especies radicalarias oxidantes (ERO) que abarcan el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical anión superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (OH[•]), el radical peroxilo (LOO[•]), el oxígeno singlete (¹O₂) 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 estu-

dios epidemiológicos en USA, 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).

Clase	Compuesto
Flavonoles	Miricetina, Quercetina, Fisetina, Rutina, Kaempferol, Monohidroxietilrutósido, Dihidroxietilrutósido, Trihidroxietilrutósido
Flavanonas	Naringenina, Naringina, Hesperetina, Hesperidina, Taxifolina
Flavonas	Apigenina, Diosmina, Luteolina
Flavonoles	(+)-Catequina, Epicatequina, Galocatequina
Antocianidinas	Cianidina, Pelargonidina, Malvidina

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

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 análisis 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. Sólo 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.

Planta	Flavonoides
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi ³⁷	baicaleína, baicalina, wogonina, wogonósido
<i>Morus alba</i> ³⁸	quercetina-3-O-β-D-(1-6)β-D glucopiranosil glucopiranosido, quercetina
<i>Chlorizanthe diffusa</i> Benth. ³⁹	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
<i>Mezoneuron cuculatum</i> Roxb. ³⁹	picetannol, trans-resveratrol, apigenina, escirpusina A
<i>Daphniphyllum calycinum</i> Benth. ³⁹	5,6,7,4'-tetrahidroxiflavona-3-O-rutinósido kaempferol-3-O-neohesperisidósido

Tabla 3. Flavonoides con actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) ejercida por Flavonoides 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 malondialdehído (MDA) a través del ensayo de sustancias re-

Inducción de la POL	Compuesto	Efecto sobre la producción de MDA a través del ensayo de SRATB
Por la hepatotoxina tetracloruro de carbono (<i>in vivo</i>) ⁴⁰	gossipitrina	concentración inhibitoria media (CI ₅₀) = 8,011 µm
Por ácido ascórbico y sulfato ferroso (<i>in vitro</i> utilizando la fracción mitocondrial del cerebro de rata) ⁴¹	quercetina, quercitrina, rutina, taxifolina, miricetina, miricetrina, fletina, 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
Por N-etil maleimida (<i>in vitro</i> utilizando plaquetas humanas) ⁴²	catequina, silimarina, ácidos fenólicos	
A través de la peroxidación del linoleato por hierro (Fe ²⁺) (<i>in vitro</i>) ⁴³	quercetina, rutina, hesperetina, naringenina	rutina > hesperetina > quercetina > naringenina
Por autooxidación de las membranas celulares de eritrocitos de ratas (<i>in vitro</i>) ⁴³	quercetina, rutina, hesperetina, naringenina	quercetina > rutina > hesperetina > naringenina
Por oxidación aumentada de Fe ⁺⁺ ⁴⁴	baicaleína, baicalina, quercetina, rutina	
Por sobrecarga de Fe ⁺⁺ (<i>in vivo</i> utilizando hepatocitos y mitocondria de ratas) ⁴⁵	silimarina	(Activo en ambos organelos)

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).

activas 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 los más activos 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 resultaron tener mayor potencia antilipoperoxidativa que sus correspondientes glicósidos⁴¹.

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 Fe³⁺/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 CI₅₀ estuvieron en el

mismo orden de magnitud y la mayoría de los flavonoides quelaron Fe, aunque se diferenciaron ampliamente en sus capacidades quelantes. 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 estudiaron, mediante el empleo de la voltametría cíclica, los potenciales de oxidación (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 Ep/2 de los flavonoides. De esta manera, por lo general, buenos inhibidores exhiben bajos valores de Ep/2, inhibidores moderados tienen valores intermedios de Ep/2, mientras que malos inhibidores o compuestos inactivos no pueden ser oxidados por debajo de 1 v. 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 ser también oxidado) y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 se muestran más activos.

Por su parte las antocianidinas muestran excelentes propiedades secuestrantes de RL^{48,49} pero, dependiendo de las condiciones del experimento, sus bajos Ep/2 las puede hacer comportar también como agentes prooxidantes, involucrándose en procesos de ciclaje redox. En este sentido su peculiar estructura (ión oxonio) con una alta conjugación, que brinda gran estabilidad a los radicales que ella forma, desempeña un papel muy importante. Por tanto, los flavonoides con un grupo pirogalol en el anillo B ofrecen una mayor actividad antioxidante que los que portan un núcleo catecol; pero son muy susceptibles de comportarse como prooxidantes, neutralizándose así los efectos antioxidantes¹.

Los flavonoides secuestran O₂⁻ y OH[·]^{48,50-52}. Morazzoni y Malandrino⁴⁹ pusieron de manifiesto que la rutina, seguida de la quercetina, se comportó como el secuestrador más fuerte de O₂⁻, obtenido enzimáticamente a través del sistema xantina/XO y no enzimáticamente a través del sistema NADH-metosulfato de fenacina. Los valores de CI₅₀ de la POL en homogenados de hígado de ratón estuvieron en el orden de 10⁻⁶ M para ambos flavonoides.

El efecto secuestrador de O₂⁻ se evidenció además en un estudio llevado a cabo con 15 flavonoides⁵³, donde las constantes de reacción con el O₂⁻ se mostraron en el intervalo de 10⁵⁻¹⁰⁷ M⁻¹s⁻¹.

La (+)catequina, la (-)epicatequina, la 7,8-dihidroxi-flavona y la rutina, actúan como secuestradores con el radical 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 metanosulfónico formado por la reacción entre el dimetilsulfóxido y este radical⁵⁴. También la quercetina y la luteolina suprimieron la reacción de Fenton interfiriendo la onda catalítica voltamétrica, característica del complejo Fe-ATP/H₂O₂, 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, podrían fundamentar estos resultados⁵⁵.

El ¹O₂ puede ser atrapado por los flavonoides, que además logran inhibir los efectos degradativos provocados por el H₂O₂, el NO[·] y el HOCl^{3,48,50,56,57}.

La eficiencia en el secuestro físico del ¹O₂ 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 ¹O₂, 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 ensayados⁵⁸.

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 H₂O₂, ya sea generado a través de la estimulación de leucocitos polimorfonucleares (PMN), con una CI₅₀=1,6·10⁻⁶ M, como a través de un mecanismo enzimático *in vitro* (CI₅₀=2·10⁻⁶ M). El S5682 produjo una inhibición de la quimioluminiscencia dependiente del luminol inducida por H₂O₂ (CI₅₀=5·10⁻⁶ M), lo que sugiere una posible actividad de este compuesto en el sistema H₂O₂/HOCl/MPO⁵⁹. Por otro lado, la quercetina protege las células del desbalance de calcio inducido por H₂O₂, 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 protectora⁶⁰. 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 H₂O₂ 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. Los valores de sus constantes de actividad secuestradora son solo 30 veces menos activas en relación con la hemoglobina, secuestrador endógeno más potente de esta especie química⁵⁷.

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 μm/L), en el daño al ADN generado por H₂O₂ (100 μm/L) en linfocitos

tos 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 $\mu\text{M/L}$, 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 menor 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 tanto, en otro ensayo fue puesto en evidencia que la baicalina, la quercetina, la morina y la miricetina son capaces de incrementar la generación de OH a través de la reacción de Fenton, al determinarse el ácido metanosulfónico producido por la reacción entre el dimetilsulfóxido y este radical ⁵⁴.

Por último, también 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 Ep/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 de 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 podría 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 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 oxirradicales 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, de esta manera, un determinado 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 aquélla 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 cirsiolol, la gossipetina, la lipoletina 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, quelar 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 ellos pueden inhibir enzimas involucradas en la generación de ERO. En este contexto se reporta que los flavonoides aislados de *Solanum melongena* (brinjal) mostraron una potente actividad antioxidante, elevando de manera significativa ($p < 0,01$) las concentraciones 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 *Vipera russelli* (FLA₂-II) y de *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 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, ya 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 éstos 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 defi-

cientes 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 Cu²⁺ 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 incluyendo los ácidos fenólicos, 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 este fluido, mostraron que los animales que consumieron el extracto presentaron niveles reducidos de éstos en relación con los animales que sólo consumieron la dieta rica en colesterol. De esta forma los flavonoides extraídos 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

Las investigaciones presentadas 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

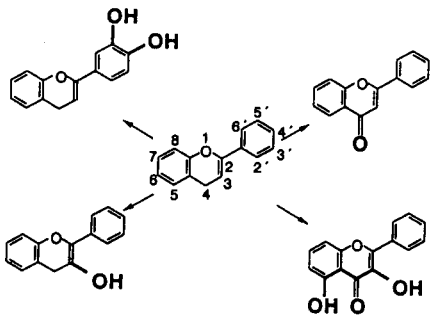


Figura 2. Principales rasgos estructurales par la actividad antioxidante de los flavonoides. (Tomado de Urini *et al.* 1999⁸⁰).

en posición 4, en conjugación con un doble enlace entre los carbonos 2 y 3. Un grupo OH libre en posición 3, que puede servir como sitio de quelación y un grupo OH en 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, 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, podría 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 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 así a la generación de ERO y daño posterior al ADN.

Agradecimientos. Los autores quisiéramos agradecer a la firma RANDOX Ltd. (Diamond Road, Crulim Co. Antrim, U.K. BT2946y) por su soporte económico de gran ayuda en la confesión de este trabajo.

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) *Nutr. 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) *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **220**: 255-61
11. Pietta, P.G. (2000) *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) *Cell. Biol. Toxicol.* **16**: 91-8
13. Formica, J.V. & W. Regelson (1995) *Food Chem. Toxicol.* **33**: 1061-80
14. Aviram, M. & B. Fuhrman (1998) *Atherosclerosis*. **137**: 45-50
15. Hirono, I. (1987) *Biol. Pharm. Bull.* **2**: 120-58
16. Aziz, N.H., S.E. Farag, L.A. Mousa & M.A. Abo-Zaid (1998) *Microbios.* **93**: 43-54
17. Christine, F. & T.S. Martyn (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **29**: 375-83
18. Hassing, A., W.X. Liang, H. Schwabl & K. Stampfli (1999) *Med. Hypotheses.* **52**: 479-81
19. Havsteen, B. (1983) *Biochem. Pharmacol.* **32**: 1141-8
20. Haenen, G.R.M.M., F.P. Jansen. & A. Bast (1993) *Phlebology Suppl.* **1**: 10-17
21. Ferrándiz, M.L. & M.J. Alcaraz (1991) *Agents Actions.* **32**: 283-8
22. Lindahl, M. & C. Tagesson (1997) *Inflammation.* **21**: 347-56
23. Sudheesh, S., C. Sandhya, K.A. Sarah & N.R. Vijayalakshmi (1999) *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. págs. 1-35

25. de Groot, H. (1994) *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. págs. 73-101
29. Vladimirov, Iu A. (1998) *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* **7**: 43-51
30. Knet, P., R. Järvinen, R. Seppänen, M. Hellövara, L. Teppo, E. Pukkala, A. Aromaa (1997) *Amer. J. Epidemiol.* **146**: 223-30
31. Hertog, M.G., D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampoli, A. Jansen, A. Menotti & S. Nedeljkovic (1995) *Arch. Intern. Med.* **155**: 381-6
32. Hertog, M.G., E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan & D. Kromhout (1993) *Lancet* **342**: 1007-11
33. Xu, X., H.J. Wang & P.A. Murphy (1994) *J. Nutr.* **124**: 825-32
34. Van het Hof, K.H., G.A.A. Kivits, J.A. Weststrate & L.B.M. Tijburg (1998) *Eur. J. Clin. Nutr.* **52**: 356-9
35. Lee, M.J., Z.Y. Wang & H. Li (1995) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**: 393-9
36. Hollman, P.C.H., M. Van der Gaag & M.J.B. Mengelers (1996) *Free Radic. Biol. Med.* **21**: 703-7
37. Gao, Z., K. Huang, X. Yang & H. Xu (1999) *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) *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) *Comb. Chem. High. Throughput. Screen.* **1**: 35-46
40. Trueba, P.G., H.I. Márquez & S.B. Martínez (1997) Tesis de Diploma. Universidad de La Habana. págs. 10-14
41. Ratty, A.K. & N.P. Das (1988) *Biochem. Med. Metab. Biol.* **39**: 69-79
42. Koch, H.P. & E. Löffler (1985) *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* **7**: 13-8
43. Saija, A., M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina & F. Castelli (1995) *Free Radic. Biol. Med.* **19**: 481-6
44. Yoshino, M. & K. Murakami (1998) *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) *Gastroenterology* **109**: 1941-9
46. Afanase'ev, I.B., A.I. Dorozhko & A.V. Brodskii (1989) *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1763-9
47. Morel, I., G. Lescoat & P. Cogrel (1993) *Biochem. Pharmacol.* **45**: 13-9
48. Sichel, G., C. Corsaro, M. Scalia, A.J. Di Bilio & R.P. Bonomo (1991) *Free Radic. Biol. Med.* **11**: 1-8
49. Morazzoni, P & S. Malandrino (1988) *Pharmacol Res. Comm.* **20**: 254
50. Cotelle, N., J.L. Bernier, J.P. Catteau, J. Pommeroy, J.C. Wallet & E.M. Gaydou (1996) *Free Radic. Biol. Med.* **20**: 35-43
51. Jovanovic, S.V., S. Steenken, Y. Hara & M.G. Simic (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 2497-504
52. Robak, J & E. Marcinkiewicz (1995) *Pol. J. Pharmacol.* **47**: 89-98
53. Jovanovic, S.V & M.G. Simic (2000) *Ann. NY. Acad. Sci.* **899**: 326-34
54. Hanasaki, Y., S. Ogawa, S. Fukui (1994) *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 845-50
55. Cheng, I.F & K. Breen (2000) *Biometals.* **1**: 77-83
56. Bors, W., C. Michel, M. Saran (1994) *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) *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) *J. Photochem. Photobiol.* **19**: 205-15
59. Cypriani, B., B. Limasset, M.L. Carrie, C. Le Doucen, M. Roussie, A.C. de Paulet & M. Damon (1993) *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1531-5
60. Wang, H & J.A. Joseph (1999) *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 683-94
61. Mira, L., M. Silva & C.F. Manso (1994) *Biochem. Pharmacol.* **48**: 753-9
62. Dehmlow, C., N. Murawski & H. de Groot (1996) *Life Sci.* **58**: 1591-600
63. Noroozi, M., W.J. Angerson & M.E. Lean (1998) *Am. J. Clin. Nutr.* **67**: 1210-8
64. Casalini, C., M. Lodovici, C. Briani, G. Paganelli, S. Remy, V. Cheyner & P. Dolara (1999) *Eur. J. Nutr.* **38**: 190-5
65. Miura, Y.H., I. Tomita, T. Watanabe, T. Hirayama & S. Fukui (1998) *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 93-6
66. Rahman, A., F. Fazal, J. Greensill, K. Ainley, J.H. Parish & S.M. Hadi (1992) *Mol. Cell. Biochem.* **111**: 3-9
67. Yoshino, M., M. Haneda, M. Naruse & K. Murakami (1999) *Mol. Genet. Metab.* **68**: 468-72
68. Yamashita, N., H. Tanemura & S. Kawanishi (1999) *Mutat. Res.* **425**: 107-15

69. Cao, G., E. Sofic & R.L. Prior (1997) *Free Radic. Biol. Med.* **22**: 749-60
70. Hodnick, W.F., E.B. Milosavljevic, J.H. Nelson & R.S. Pardini (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**: 2607-11
71. Ngomuo, A.J. & R.S. Jones (1996) *Vet. Hum. Toxicol.* **38**: 176-80
72. Brown, J.E., H. Khodr, R.C. Hider & C.A. Rice-Evans (1998) *Biochem. J.* **330**: 1173-8
73. Kostiuk, V.A., A.I. Potapovich, S.M. Tereshchenko & I.B. Afanas'ev (1988) *Biokhimiia.* **53**: 1365-70
74. Zeng, L.H., J. Wu, B. Fung, J.H. Tong, D. Mickle & T.W. Wu (1997) *Biochem. Cell Biol.* **75**: 717-20
75. Hoult, J.R.S., M.A. Moroney & M. Paya (1994) *Methods 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) *Nutr. Rev.* **57**: 241-9