



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)**

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS PROPIEDADES
QUELANTES DE LOS FLAVONOIDES SOBRE SU
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

I.B.Q. María del Carmen Gutiérrez Guerrero

C.U. Santiago de Querétaro, Qro., Marzo de 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS PROPIEDADES QUELANTES DE LOS
FLAVONOIDEOS SOBRE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:


I.B.Q. María del Carmen Gutiérrez Guerrero

Dirigida por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

SINODALES:


Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Presidente


Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario


Firma

Dr. Luis A. Godínez Mora-Tovar
Vocal

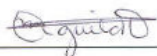

Firma

Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña
Suplente


Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente


Firma


Q.B. Magali Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Marzo, 2008
México

“Lo que importa verdaderamente en la vida no son los objetivos que nos marcamos, sino los caminos que seguimos para lograrlos”

Peter Bamm

A mi mamá por ser mi mejor maestra, mi mentora, mi guía, mi fortaleza, mi apoyo, mi paz espiritual, el sosiego de mi corazón, mi amiga y la persona que ha sostenido mi mano y vigilado mis pasos tan amorosamente desde que llegué a este mundo. Mami, gracias por confiar en mí y por enseñarme el verdadero valor de la vida. Doy gracias a Dios cada día por el privilegio de que seas mi mamá. Te quiero y te agradezco más allá de lo describable.

A Dios por regalarme la vida, por ayudarme a estar en donde estoy y por todas las bendiciones, oportunidades y lecciones que me ha dado en la vida.

A mis hermanos Rebeca y León que han sido, desde que nacieron, mi razón para ser mejor persona cada día y sobre todos mis mejores amigos. Gracias a ustedes la nuestra es algo mucho más especial que sólo una familia. Los quiero muchísimo. Gracias Becky por esa fe que tienes en mí, por escucharme siempre, por quererme como soy y porque no podría haber mejor cómplice que tú. Gracias Leo por poner siempre mis pies en la tierra y por ayudarme a ordenar mis ideas y mis sentimientos, no hay mejor consejero que tú.

A mi tía Alicia por todo tu cariño, por tu preocupación tu ternura y tu apoyo constante, eres como otra mamá para mí.

A mi madrinis, Paty, por ser una gran tía y una gran amiga, por apoyarme en todos mis proyectos y estar siempre al pendiente de mí (y de mi salud) con tanto cariño.

A mi tío Alfredo porque siempre me has echado porras en todo lo que hago y aunque los tiempos sean difíciles siempre dices algo que me hace reír.

A mi papá por apoyarme en esto, nunca es tarde para empezar. Gracias.

A mis primos Andrea y Oscar, que son como mis otros hermanitos, hemos crecido y aprendido juntos, y quiero que sepan que siempre he querido ser un buen ejemplo también para ustedes. Los quiero mucho!

A Emilio por tu paciencia, por tu apoyo, por tu ayuda en todo momento. Por creer en mi y quererme de esa manera tan impresionante y porque siempre estás para tomar mi mano o para detener mis caídas. Tu amor ha sido mi combustible en estos meses de trabajo. Te quiero profundamente amor.

A Edder y César, primos los quiero un chorro, gracias por el cariño que me dan siempre y por todas las sonrisas, alegrías y preocupaciones que hemos compartido, creo que los primos Guerrero hemos hecho un gran equipo. Y también gracias por llevarme a todos los conciertos de mis grupos favoritos!

A mi tía Celia y mi prima Yuni, gracias por aceptarme en su casa y en sus corazones, yo también las llevo en el mío con mucho agradecimiento.

A Aranza y Dey, estábamos unidas por la sangre pero ahora que tuve oportunidad de convivir tan de cerca con ustedes créanme que me siento unida a ustedes por un lazo más fuerte de increíble cariño.

A mi amiga y hermanita del alma Erika, mil gracias por todo lo que has aportado a mi vida, por aceptarme como soy y por enseñarme que la amistad verdadera existe. Mil gracias por apoyarme en todo momento y por compartir conmigo esta experiencia (y todas las que faltan!), sin ti, la venida hasta Querétaro no habría valido tanto la pena. Gracias a Dios que juntó nuestros caminos. Somos la onda!! Tqmm!

A Katy, amiga querida, gracias por toda tu paciencia, por tu apoyo, tu cariño incondicional, por tus regaños y consejos y por toda la alegría que siempre has compartido conmigo. Por tantos años de maravillosa amistad (y los que faltan!). Muchas veces has sido como mi conciencia en este proceso de vivir. Que Dios te bendiga amiga.

Lorenzo muchas gracias por tu autenticidad, por sacarme de apuros, por tu amistad y porque siempre estuviste ahí, en las buenas y en las malas. Gracias!

A mis amigas y amigos Paola (tomate) tu amistad es una bendición, Fernando Dueñas por todas nuestras pláticas y aventuras en ruedas, Carmen (tocaya), Gely, Lulú, Ameri, Poncho, Fanny, Omar, Maya, Blanca, Goretti, Jenny Cabrera, gracias por todo.

De manera especial quiero agradecer a mis amigos de Cideteq:

Jonathan, gracias por ser un excelente amigo, por acompañarme, apoyarme, consolarme, aconsejarme, por todo lo compartido, y porque me has ayudado casi como si esta fuera también tu tesis! espero que nuestra amistad dure por siempre!

Janet infinitas gracias por tus valiosísimas enseñanzas, por tu paciencia y tu gran amistad.

Karen gracias por abrirme las puertas de tu amistad y de tu conocimiento.

Agradecimientos

Gracias al CONACYT por el apoyo económico y por la gran oportunidad de cumplir este sueño.

A la Doctora Sandra Mendoza, muchas gracias por ser la guía de este proyecto, por sus enseñanzas, por su paciencia y por su apoyo en la realización de esta tesis. Gracias por aceptarme como su alumna, por abrirme las puertas de su laboratorio y por contagiarme ese cariño que tiene por lo que hace, además de que gracias a usted ya soy una apasionada más de los antioxidantes y de los nutraceuticos. Fue un placer trabajar con usted.

Gracias a la Universidad Autónoma de Querétaro, honorable institución sede del PROPAC por abrirme sus puertas. En mí tienen a una orgullosa egresada.

Muchas gracias al CIDETEQ y al Doctor Luis Godínez por adoptarme en su laboratorio, por las facilidades y atenciones recibidas durante mi estancia y por su valiosísima aportación y participación en este proyecto.

Gracias al Doctor Eduardo Castaño, a la Doctora Flavia Loarca y al Doctor Moustapha Bah por aceptar formar parte de mi comité de evaluación, por su disposición de atenderme y por sus siempre acertadas recomendaciones y observaciones.

A los doctores y maestros del PROPAC, todos son parte fundamental de mi formación como maestra en ciencia y tecnología de alimentos.

Mil gracias a las secretarias Carmelita, Laurita y Silvia, por su gran ayuda y paciencia.

A aquellas personas que en algún momento me apoyaron, me acompañaron y me brindaron su amistad en la maestría: Giovanna, Fátima, Lolis, Maritza, Lauris, Rocío, Carlos y Miguel de Cideteq, Manuel, Adriana, Betty (Nayarit).

A los que haya olvidado mencionar, a todos y todas gracias porque de alguna manera son parte importante de esto.

Resumen

Los flavonoides, el mayor grupo de fitoquímicos polifenólicos, son secuestradores muy efectivos de radicales libres y por lo tanto tienen un efecto antioxidante muy importante. Sin embargo, en estudios recientes, empieza a darse a conocer que los flavonoides pueden también ejercer su efecto antioxidante como queladores de metales, especialmente del hierro, que al involucrarse en reacciones oxidantes da lugar a la formación de oxirradicales, por ejemplo, a través de las reacciones de Fenton. Las propiedades antioxidantes se reflejan en muchos beneficios a la salud, y a través de muchas investigaciones se han descubierto sus efectos protectores contra muchas enfermedades crónicas degenerativas así como contra bacterias, virus, hongos e incluso contra los signos de la vejez. Las propiedades quelantes de los flavonoides también pueden tener un efecto muy importante sobre la salud al combatir las condiciones de estrés oxidativo que involucren iones de metales de transición. Por lo anterior, se evaluaron las propiedades quelantes y antirradicales de algunos flavonoides así como la fortaleza de los complejos formados entre flavonoides y iones. Para cumplir con estos objetivos se estudiaron siete flavonoides comerciales: quercetina, miricetina, kampferol, rutina, catequina, morina y hesperetina. Estos fueron escogidos con base en su estructura, en sus importantes actividades antioxidantes y en su alta prevalencia en alimentos. Los estudios de quelación se llevaron a cabo por medio de espectroscopia UV/visible y métodos electroquímicos. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron a través de titulaciones de las soluciones de flavonoides con soluciones de los iones de interés a diferentes concentraciones, analizándose los cambios en el espectro para cada caso. La actividad antirradical y reductora de hierro de los flavonoides, ácidos fenólicos y sus mezclas, de dos variedades de frijol común, N8025 y G12892, fueron evaluadas por medio de los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP. Los estudios electroquímicos se llevaron a cabo por medio de la técnica de voltametría cíclica y electro-Fenton para determinar el potencial de oxidación de los flavonoides y su actividad antioxidante en presencia y ausencia de iones de hierro. En las condiciones de los estudios espectrofotométricos y voltamperométricos, los mejores queladores del ión ferroso son la rutina, quercetina y morina. Por su parte, la catequina y hesperetina no tienen efecto alguno sobre este tipo de iones. Los experimentos realizados con iones férricos revelan que ninguno de estos flavonoides forma complejos con éstos. Además, los cambios en los potenciales de oxidación sugieren que, si el flavonoide se asocia con un ión metálico, su capacidad para secuestrar radicales libres disminuye. Los resultados obtenidos de los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP revelan que los compuestos fenólicos con mayor potencial antirradical son la quercetina, ácido ferúlico y kampferol, y la variedad de frijol común con la mayor actividad antirradical es la N8025. Con estos ensayos también se observó un efecto sinérgico de la actividad antirradical cuando se evaluaron las mezclas de los flavonoides y ácidos fenólicos. Los estudios hechos con electro-Fenton confirmaron los resultados obtenidos por espectroscopia y voltametría, por lo que se concluye que las propiedades quelantes de los flavonoides sí tienen un gran efecto sobre su capacidad antioxidante total.

Palabras clave: flavonoides, radicales libres, actividad antioxidante, quelación.

Summary

Flavonoids, the largest group of phytochemical polyphenols, are free radical scavengers so they have an important antioxidant activity. Nevertheless, in recent studies their antioxidant effect has been investigated as metal chelators, especially for iron, when the ions of this metal are involved in oxidation reactions, oxiradicals are formed through the Fenton reactions among others. The antioxidant properties of flavonoids have several health benefits and a number of investigations have discovered their protective effects against several chronic diseases, bacterias, virus, fungi and even against age signs. The chelating properties of flavonoids also suggest that they may play an important role in oxidative stress conditions involving transition metal ions. Hereby, the chelating and anti-radical properties of flavonoids will be studied and also the strength of the complexes formed between flavonoids and metal ions. In order to fulfil this objectives the flavonoids quercetin, miricetin, kaempferol, rutin, catequin, morin and hesperetin were investigated. These flavonoids were chosen based on their structure, high antioxidant activity and their presence in plant related foods. The iron chelation studies were carried out by means of ultraviolet and visible spectroscopy and electrochemistry. The modifications of the absorption spectra of flavonoid solutions when combined with different concentrations of iron ions solutions were spectrophotometrically analysed. The anti-radical and iron ion reduction activity of flavonoids, phenolic acids and their mixtures, from two different common bean varieties, N8025 and G12892, were evaluated by DDPH, ABTS and FRAP assays. The electrochemical studies were carried out by cyclic voltametry and electro-Fenton techniques to determine the oxidation potential of flavonoids and the antioxidant activity in presence and absence of iron ions. At the conditions of the studies carried out by spectroscopy and cyclic voltametry, the best ferrous ion chelators are rutin, quercetin and morin, but catequin and hesperetin has no effects on these ions. The experiments with ferric ions revealed that any of these flavonoids form complexes with this kind of iron ions. Besides, the changes in the oxidation potential suggests that if the flavonoid is associated with the metal ion, its capacity of scavenge free radicals is lower. The data resulted from the DPPH, ABTS and FRAP assays revealed that the phenolic compounds with the higher anti-radical potential were quercetin, ferulic acid and kampferol, and the common bean variety with the higher anti-radical activity was the N8025. A synergistic effect of the antiradical activity was observed when the mixtures of flavonoids and phenolic acids were evaluated. The electro-Fenton studies confirmed the spectroscopy and cyclic voltametry results; therefore, the chelating properties of flavonoids have a great effect on their total antioxidant capacity.

Key words: flavonoids, free radicals, antioxidant activity, chelation.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	I
SUMMARY	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Oxidación y producción de radicales libres	2
2.1.1. Fuentes de radicales libres	3
2.1.2. Enfermedades asociadas al estrés oxidativo	7
2.1.2.1. Enfermedades cardiovasculares	7
2.1.2.2. Cáncer	8
2.1.2.3. Diabetes	9
2.1.2.4. Enfermedades neurológicas	10
2.1.2.5. Enfermedades inmunitarias	11
2.2. Flavonoides	12
2.2.1. Estructura y clasificación de flavonoides	14
2.2.2. Acción antioxidante de flavonoides	16
2.2.2.1. Técnicas para la evaluación de la capacidad antioxidante de flavonoides	18
2.2.2.2. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DDPH)	19
2.2.2.3. Ensayo del ácido 3-etil-benzotiazolin – 6-sulfónico (ABTS)	19
2.2.2.4. Ensayo para evaluar la capacidad reductora de hierro (FRAP)	19
2.2.3. Actividad quelante de los flavonoides	20
2.2.4. Beneficios de los flavonoides	21
2.2.4.1. Actividad antiúlceras	21
2.2.4.2. Actividad contra padecimientos hepáticos	22
2.2.4.3. Actividad contra procesos inflamatorios	22

2.2.4.4. Actividad contra enfermedades relacionadas con los vasos sanguíneos	22
2.2.4.5. Actividad contra bacterias, hongos y virus	23
2.3. Síntesis, absorción y metabolismo de flavonoides	23
2.4. Características de los flavonoides objeto de estudio	24
2.4.1. Quercetina	24
2.4.2. Daidzeína	25
2.4.3. Kampferol	26
2.4.4. Hesperetina	27
2.4.5. Rutina	28
2.4.6. Catequina	29
2.4.7. Genisteína	30
2.4.8. Morina	30
2.5. Acidos fenólicos	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. General	34
3.2. Específicos	34
4. HIPÓTESIS	34
5. JUSTIFICACIÓN	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1. Materiales	36
6.2. Estudios de quelación	36
6.2.1. Estudios espectrofotométricos	36
6.2.2. Estudios electroquímicos	37
6.3. Estudios de Actividad Antioxidante y reductora de hierro	38
6.3.1. Ensayo de actividad secuestradora de DPPH	38
6.3.2. Ensayo de actividad secuestradora de ABTS	39
6.3.3. Ensayo para la evaluación del poder reductor de hierro (FRAP)	40
6.4. Electro-Fenton	41
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
8.1. Estudios de quelación	43
8.2. Estudios de Actividad Antioxidante	58
8.2.1. DPPH	58
8.2.2. ABTS	65
8.2.3. FRAP	71
8.3. Electro-Fenton	78
9. CONCLUSIONES	85
10. BIBLIOGRAFÍA	87

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura	
1. Daños provocados por radicales libres	6
2. Fórmula estructural de los flavonoides	13
3. Estructuras químicas básicas de los flavonoides	17
4. Estructuras de los flavonoides objeto de estudio	32
5. Espectros de absorción de los flavonoides Kampferol y Hesperetina	44
6. Espectros de absorción de los flavonoides Catequina y Rutina	45
7. Espectros de absorción de los flavonoides Rutina y Morina	46
8. Espectro de absorción de la rutina en ausencia y presencia de Fe^{2+} a diez concentraciones diferentes	47
9. Espectro de la quercetina en ausencia y presencia de Fe^{2+} a diez concentraciones diferentes	48
10. Cambios en la longitud de onda de la banda II de Hesperetina y Catequina con respecto a la concentración del titulante	49
11. Respuesta voltamperométrica en ausencia de hierro de los flavonoides: Hesperetina y Catequina 100 μ M en una solución amortiguadora de acetatos pH 5.5	52
12. Respuesta voltamperométrica en ausencia de hierro de los flavonoides: Quercetina y Rutina 100 μ M en una solución amortiguadora de acetatos pH 5.5	53
13. Respuesta voltamperométrica en ausencia de hierro de los flavonoides: Morina y kampferol 100 μ M en una solución amortiguadora de acetatos pH 5.5	54

- 14.** Respuesta voltamperométrica de la Rutina 100 μM en amortiguador de acetatos pH 5.5 en ausencia de iones de hierro, en presencia de Fe^{2+} 100 μM , en presencia de iones Fe^{3+} 100 μM 55
- 15.** Respuesta voltamperométrica de la Quercetina 100 μM en amortiguador de acetatos pH 5.5 en ausencia de iones de hierro, en presencia de Fe^{2+} 100 μM , en presencia de iones Fe^{3+} 100 μM 56
- 16.** Cinética de los porcentajes ARA de los flavonoides: Quercetina, Daidzeína, Kampferol y Genisteína; los ácidos fenólicos: ácido ferúlico (FA), ácido cumárico (CMA), ácido hidroxibenzóico (HBA), ácido vainillínico (VA) y coumestrol y de las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total para las variedades de frijol N8025 y G128912; obtenidos por el ensayo de DPPH. 59
- 17.** Cinética de los porcentajes ARA de los flavonoides: Quercetina, Daidzeína, Kampferol y Genisteína; los ácidos fenólicos: ácido ferúlico (FA), ácido cumárico (CMA), ácido hidroxibenzóico (HBA), ácido vainillínico (VA) y coumestrol y de las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total para las variedades de frijol N8025 y G128912; obtenidos por el ensayo de ABTS. 66
- 18.** Cinética de las absorbancias de los flavonoides: Quercetina, Daidzeína, Kampferol y Genisteína; los ácidos fenólicos: ácido ferúlico (FA), ácido cumárico (CMA), ácido hidroxibenzóico (HBA), ácido vainillínico (VA) y coumestrol y de las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total para las variedades de frijol N8025 y G128912; obtenidos por el ensayo de FRAP. 72
- 19.** Generación electroquímica de H_2O_2 (ppm) a través del tiempo 78

20. Cinética de reacción entre el H ₂ O ₂ y los flavonoides Kampferol y Quercetina y las mezclas de flavonoides y mezcla total	79
21. Generación electroquímica de OH [•] a través del tiempo mediante la reacción de Fenton utilizando FeSO ₄	80
22. Cinética de reacción entre los radicales hidroxilo generados por reacción de Fenton catalizada por FeSO ₄ (0.02 mM) y los flavonoides y mezclas evaluadas	81
23. Cinética de reacción entre radicales hidroxilo generados por medio de reacción de Fenton catalizada por FeSO ₄ (0.5 mM) y el flavonoide Quercetina	82
24. Generación electroquímica de OH [•] a través del tiempo mediante la reacción de Fenton utilizando una membrana de nafi3n con iones de hierro anclados a su estructura	83
25. Cinética de reacción entre los radicales hidroxilo generados por medio de reacción de Fenton, catalizada por iones de hierro anclados a una membrana de nafi3n y los flavonoides y mezclas evaluadas.	84

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro	
1. Valores máximos de absorbancia y coeficientes de absorptividad molar de los flavonoides evaluados	50
2. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 evaluados por medio de la técnica de DPPH.	61
3. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 evaluados por medio de la técnica de DPPH.	62
4. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 al minuto 30, evaluados por medio de la técnica de DPPH.	63
5. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 al minuto 30, evaluados por medio de la técnica de DPPH.	64
6. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 evaluados por medio de la técnica de ABTS.	67
7. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 evaluados por medio de la técnica de ABTS.	68
8. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 al minuto 6, evaluados por medio de la técnica de ABTS.	69
9. Porcentajes de actividad antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 al minuto 6, evaluados por medio de la técnica de ABTS.	70

10. Valores de absorbancia de los compuestos fenólicos del frijol N8025 evaluados por medio de la técnica de FRAP. 73
11. Valores de absorbancia de los compuestos fenólicos del frijol G12892 evaluados por medio de la técnica de FRAP. 74
12. Valores equivalentes de FeSO_4 (μM) para los compuestos fenólicos del frijol N8025 al minuto 60 , evaluados por medio de la técnica de FRAP. 75
13. Valores equivalentes de FeSO_4 (μM) para los compuestos fenólicos del frijol G12892 al minuto 60 , evaluados por medio de la técnica de FRAP. 76

1. INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha observado un incremento en la incidencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes, enfermedades neurodegenerativas, entre otras. En México, por ejemplo, la principal causa de muerte son las enfermedades del corazón, esto podría atribuirse a muchos factores como mala alimentación, estrés y falta de actividad física, principalmente.

A causa del ritmo de vida actual, en todo el mundo se ha visto un detrimento en las condiciones de salud de la población y por lo tanto en su calidad de vida. Se ha observado un cambio muy notorio principalmente en las costumbres de alimentación y se han desplazado los alimentos nutritivos y naturales, por aquellos que contienen altas cantidades de grasas o que han sido sometidos a procesos industriales y que por lo tanto han sufrido cambios en sus propiedades.

Por otro lado, hay una gran cantidad de alimentos, entre los que destacan las frutas y verduras, que contienen cantidades importantes de compuestos con actividad biológica benéfica para la salud y para el buen funcionamiento del organismo. Un grupo importante de este tipo de compuestos son los flavonoides; éstos son compuestos polifenólicos bioactivos con un gran potencial antioxidante. Un antioxidante se define como cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, inhibe o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes pueden donar electrones o átomos de hidrógeno a especies radicales de oxígeno para parar o prevenir reacciones de oxidación, o para regenerar un compuesto fenólico.

Un compuesto que pueda quelar con efectividad metales de transición prooxidantes, también es considerado como un antioxidante. Esta última cualidad también la poseen los flavonoides, aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de reacción por el cual llevan a cabo el atrapamiento de los iones metálicos, por lo que es necesario estudiar cómo es que estos compuestos ejercen su actividad contra estos factores oxidantes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Oxidación y producción de radicales libres

El oxígeno es un gas tóxico mutagénico que se encuentra en cantidades significativas en la atmósfera terrestre. La mayoría de las células eucarióticas tienen un gradiente de oxígeno, que va decreciendo desde la membrana celular a la mitocondria en donde el oxígeno es consumido durante el metabolismo aeróbico. Los mamíferos han desarrollado mecanismos para asegurar que el oxígeno sea transportado a todas las células que lo necesiten. Alrededor del 85-90% del oxígeno tomado del plasma de células animales es utilizado por la mitocondria para producir ATP (Halliwell, 1994).

Sin embargo la mayoría de las células lo requieren para llevar a cabo sus funciones biológicas y en general están expuestas a bajas concentraciones de este gas. El oxígeno es vital para muchos organismos vivos ya que la esencia de la producción de energía metabólica incluye la oxidación de materiales como los alimentos, la pérdida de electrones que son aceptados por acarreadores de oxígeno tales como nicotinamida adenin dinucleótido (NAD^+), flavin mononucleótido (FMN), y flavin adenin dinucleótido (FAD). Estos compuestos reducidos son re-oxidados por el oxígeno en la mitocondria, produciendo ATP. La enzima terminal en esta cadena de transporte de electrones, la citocromo oxidasa, añade cuatro electrones al oxígeno. Es en este paso del proceso donde se generan especies de oxígeno parcialmente reducidas. Aunque en algunos casos se presentan fugas de electrones que dan paso a la generación de radicales libres (Willcox *et al.*, 2004).

Un radical libre se define como cualquier especie capaz de tener una existencia independiente que contiene uno o más electrones libres en forma de singulete. La presencia de electrones libres hace a los radicales libres altamente reactivos debido a que requieren otro electrón para completar el orbital y volverse estables.

Cuando un solo electrón se adiciona a la molécula de oxígeno (O_2), se produce el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Muchas moléculas orgánicas se oxidan en presencia del O_2 para producir el radical superóxido, incluyendo gliceraldehídos, flavonas reducidas, adrenalina, L-dopa, dopamina, cisteína, etc. Estas autooxidaciones son catalizadas por iones metálicos tales como hierro y cobre (Willcox *et al.*, 2004).

2.1.1. Fuentes principales de radicales libres

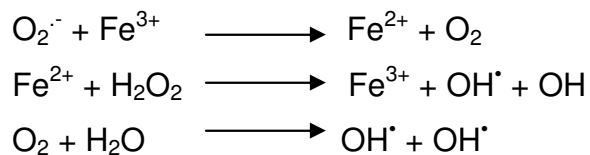
La fuente más importante de radicales superóxido *in vivo* es, la cadena de transporte de electrones, presente en muchas membranas bacterianas, dentro de la mitocondria, del retículo endoplásmico, y las membranas nucleares en las células eucarióticas. La mayoría de estos radicales son producidos por la transferencia incompleta de electrones al O_2 antes del paso terminal de la citocromo oxidasa. Esta producción de radicales se incrementa a medida que la concentración de O_2 también aumenta. Se estima que del 1 al 3% del O_2 reducido en la mitocondria puede formar el radical superóxido (Turrens, 1997; Vinogradov y Grivennikova, 2005). La producción de estos radicales de oxígeno puede así resultar en daño a las proteínas, lípidos, y al ADN en la mitocondria, causando mutaciones en el ADN mitocondrial que pueden estar asociadas con una amplia variedad de enfermedades en humanos así como con el envejecimiento (Shigenaga *et al.*, 1994; Barja, 2004). Otros puntos que pueden ser blanco para el daño oxidativo son el retículo endoplásmico del hígado, la ribonucleótido reductasa, una enzima que es precursora de la síntesis de ADN.

La producción de radicales superóxido se da dentro de todas las células aeróbicas y es dependiente de la concentración de oxígeno. El radical superóxido es relativamente inocuo, pero al pH fisiológico aproximadamente un 1% será protonado para formar el aún más reactivo radical peroxil (HO_2^{\cdot}) (Borg, 1993).

El superóxido puede disminuir o inhibir la actividad de algunas enzimas, incluyendo algunas enzimas de defensa antioxidante como la catalasa, glutatión peroxidasa, y muchas otras en el esquema del metabolismo energético como la NADH deshidrogenasa (Willcox *et al.*, 2004).

Aparte del daño directo que provoca, el superóxido puede ser más citotóxico al generar otras especies reactivas, como el peróxido de hidrógeno, por la adición de otro electrón más. El peróxido de hidrógeno no es un radical, ya que el electrón adicional completa el orbital, pero puede atacar a algunas enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, una enzima de la ruta glucolítica. También puede oxidar algunos ceto-ácidos como el piruvato. El H₂O₂ provoca la reducción del ATP del glutatión y del NADPH. Induce un aumento del Ca²⁺ libre en el citosol y activa una polimerasa que conduce a la muerte celular. Por último, el H₂O₂ puede atravesar las membranas celulares para reaccionar con los iones de hierro y de cobre para formar especies mucho más dañinas como el radical hidroxilo (OH[•]) y el peroxinitrito (NO[•]) (Roberford y Calderon, 1995). A este tipo de reacciones se les conoce por el nombre de reacciones de Fenton. La enzima superóxido dismutasa convierte el O₂ en peróxido de hidrógeno, mediante la reacción de Fenton, este último en presencia de Fe²⁺ y Cu⁺, es transformado a OH[•].

A continuación se presenta la reacción de Fenton descrita por Ebadi (1996) y Mattson (1998):



Según Burdon (1995) y Mattson (1998) el superóxido puede interactuar con el óxido nítrico formando también peroxinitrito.

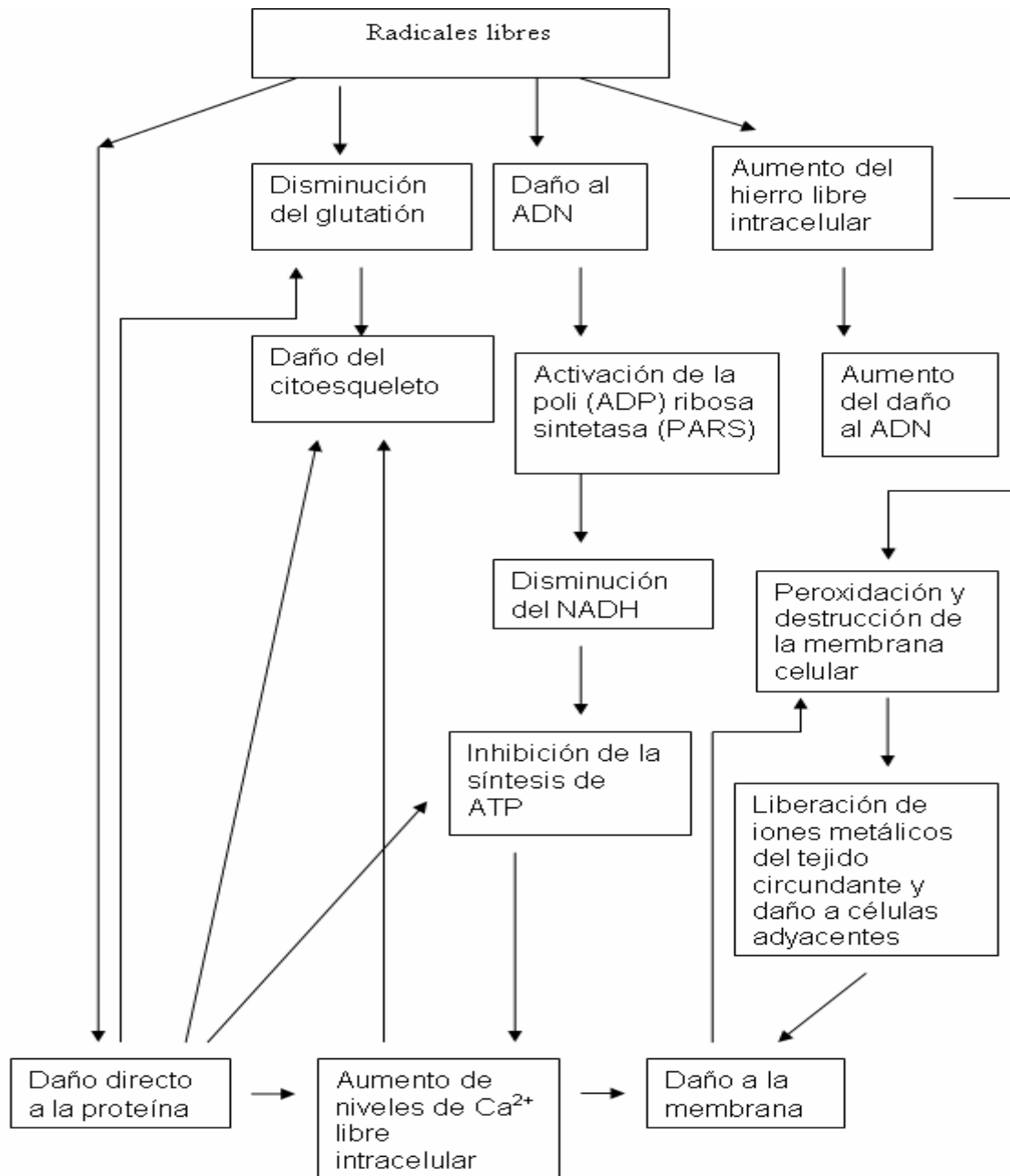
De todos los radicales libres, el OH^\bullet resulta el más dañino para las células, dado que su presencia, aunque sea solamente por una fracción de segundo, es capaz de destruir enzimas proteolíticas, de provocar la ruptura de polisacáridos y de causar peroxidación lipídica de la membrana, alterando su permeabilidad y las funciones asociadas. El peroxinitrito puede ocasionar daño directo a las proteínas y al ADN, también constituye un fuerte inductor de la peroxidación lipídica de la membrana que puede llegar a destruir las neuronas, las cuales son especialmente sensibles a este proceso (Burdon *et al.*, 1989; Nosseri *et al.*, 1994; Mattson, 1998).

Los radicales libres también pueden ser generados por los leucocitos activados como parte de la respuesta inmune. Los macrófagos y neutrófilos poseen la enzima NADPH oxidasa, la cual puede catalizar la reducción del oxígeno (con un electrón) a superóxido que a cambio genera los otros radicales libres antes mencionados. Otra enzima que se encuentra en los leucocitos, la mieloperoxidasa, genera ácido hipocloroso (HOCl) a partir de H_2O_2 . Estas especies reactivas de oxígeno son usadas en la respuesta inmune para matar bacterias extracelulares o ingeridas. Desafortunadamente, su acción no está limitada a su propósito original y entonces pueden contribuir al efecto negativo observado en el proceso oxidativo inductor de radicales libres.

En problemas cardiacos como la isquemia, que ocurre durante el infarto al miocardio y en el trasplante de órganos, pueden producirse radicales libres a través de la acción de la xantin-oxidasa. Cuando el tejido pierde continuidad, la enzima normalmente presente, xantin-deshidrogenasa, puede convertirse en xantin-oxidasa a medida que los grupos $-\text{SH}$ son oxidados o por la proteólisis limitada debida al incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular. Entonces en el tejido isquémico con sangre y oxígeno, la xantin oxidasa convierte a la hipoxantina y a la xantina en ácido úrico produciendo consecuentemente superóxido que puede producir peróxido y, con la entrada de hierro reducido, formar un radical hidroxilo.

Otros factores ambientales también llevan a la formación de radicales libres. La exposición a radiación ultravioleta puede generarlos, así como la contaminación en el aire y el humo de cigarro (Willcox *et al.*, 2004).

Los daños producidos por los radicales libres se muestran en la Figura 1.



(Willcox *et al.*, 2004)

Figura 1. Daños provocados por radicales libres

2.1.2. Enfermedades asociadas al estrés oxidativo

Bajo circunstancias ideales, el cuerpo debería ser capaz de permanecer estable con los radicales libres producidos y eliminados por antioxidantes endógenos. Sin embargo, se ha determinado que este balance no es perfecto ya que el daño oxidativo ocurre en el ADN, proteínas, lípidos, y pequeñas moléculas en sistemas vivos bajo estados de oxígeno ambiental. El estrés oxidativo se refiere a la situación en la que existe un desbalance significativo entre radicales libres y el sistema de defensa antioxidante. El daño resultante se denomina daño oxidativo (Willcox *et al.*, 2004). El estrés oxidativo juega un papel importante en los daños al tejido en diversas enfermedades. El daño en el tejido por infección, trauma, toxinas, temperaturas extremas, y otras causas, generalmente provoca la formación de grandes cantidades de radicales libres que contribuyen a la generación de patologías (Halliwell y Gutteridge, 1999). El desbalance de la homeostasis reducción-oxidación parece ser uno de los procesos que regula la expresión genética en muchas condiciones de patologías (Haddad, 2002).

2.1.2.1. Enfermedades cardiovasculares

Este tipo de enfermedades son la causa principal de muerte en los Estados Unidos, Europa y Japón (Moreno *et al.*, 2003). La mayoría de los eventos de este tipo son arterosclerosis, una enfermedad de las arterias que involucra un engrosamiento local de la pared de los vasos, principalmente presente en arterias musculares de tamaño medio (Mashima *et al.*, 2001).

Una gran variedad de factores han sido implicados en causar estos daños iniciales, incluyendo daños mecánicos por estrés en la circulación, que se ve empeorado por una alta presión en la sangre, infecciones virales como el herpes, xenobióticos del humo del cigarro y niveles elevados de metabolitos normales como glucosa, colesterol y homocisteína ((Halliwell and Gutteridge, 1999).

Trabajos *in vitro* han mostrado que los receptores de los macrófagos eliminadores identifican a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y las absorben de una manera no-regulada, entonces el macrófago se transforma en una célula cargada de lípido. Estos macrófagos transformados son considerados los precursores del desarrollo de plaquetas oclusivas arteroscleróticas (Westhuysen, 1997, Padró *et al.*, 2005).

Se ha visto que las LDL de lesiones arteroscleróticas humanas contiene productos de peroxidación de lípidos que no se encuentran en vasos normales (Pratico *et al.*, 1997).

Un análisis hecho con voluntarios sanos reveló un 4% menos en el riesgo relativo de enfermedades coronarias con cada porción diaria consumida de vegetales con hojas verdes y frutas ricas en vitamina C (Joshi *et al.*, 2001).

2.1.2.2. Cáncer

Inicialmente, el interés de la relación que existe entre la dieta y el riesgo de cáncer se enfocó en las fuentes de carcinógenos provenientes de la dieta. Sin embargo, resultados de estudios epidemiológicos en los años 60 y 70 condujeron a la idea de que la dieta puede proveer cierto potencial protector contra el cáncer. Existe evidencia de que micronutrientes como los antioxidantes están asociados con la reducción de riesgo de cáncer (McLarty, 1997; Manthey y Guthrie, 2002).

Muchas células cancerosas invasivas o metastásicas pueden requerir un cierto nivel de estrés oxidativo para mantener un balance entre proliferación y apoptosis (Willcox *et al.*, 2004). Estas células generan grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que funcionan como moléculas de señalización que están involucradas en la sobrevivencia de células cancerosas. Los antioxidantes pueden suprimir a estas moléculas de señalización de peróxido de hidrógeno y así inhibir la proliferación de estas células (Loo, 2003).

Se estima que aproximadamente el 35% de los casos de cáncer son inducidos por la dieta. Muchos datos experimentales indican que los radicales libres tienen un papel en la iniciación y promoción del cáncer, que involucra cambios en el ADN, ya sea como resultado de anomalías hereditarias genéticas o por daño de la hebra de ADN. En vista de que existe una asociación entre el daño al ADN y la carcinogénesis, es muy probable que cualquier agente capaz de modificar al ADN pueda ser carcinogénico. Los radicales libres caen dentro de esta categoría.

Otros daños diferentes al daño directo al ADN causado por radicales libres, incluyen, daño oxidativo de lípidos y de proteínas como las enzimas de reparación de ADN, que pueden provocar también mutaciones en este.

Las dietas ricas en frutas y vegetales están asociadas con la reducción en el riesgo de esta patología debido a que contienen antioxidantes fitoquímicos. Consecuentemente, se espera que los individuos que sigan dietas con un alto contenido de frutas y verduras estén mejor protegidos contra daños oxidativos celulares que los individuos que no consuman este tipo de alimentos que son ricos en polifenoles entre los que se encuentran los flavonoides (Lampe, 1999; Thompson *et al.*, 2005). Diversos estudios *in vitro* han revelado que la quercetina ejerce una inhibición dosis-dependiente sobre el crecimiento de las células cancerosas. Los flavonoides kaempferol, catequina, toxifolina y fisetina también suprimen este crecimiento celular y la genisteina inhibe de manera particular el crecimiento de células de cáncer gástrico en humanos (Narayana *et al.*, 2001).

2.1.2.3. **Diabetes**

Existe información obtenida a partir de estudios clínicos en la que se implica al estrés oxidativo como uno de los factores principales en la patogénesis de los dos tipos de diabetes (Tipo 1 y Tipo 2) (Maritim *et al.*, 2003).

El aumento de este estrés oxidativo se ve acompañado por una baja en la capacidad antioxidante; se ha visto que los niveles de vitamina C están por debajo de lo normal en pacientes diabéticos (Mezzetti *et al.*, 2000).

Las complicaciones de la diabetes también pueden ser explicadas por incrementos en el daño al ADN debidos al estrés oxidativo. En un estudio se ha informado que en pacientes diabéticos de Tipo 1 se da una elevación significativa en la ruptura de la hebra de ADN y en la oxidación de pirimidinas, en comparación con sujetos normales. Las purinas alteradas mostraron una fuerte correlación positiva con el nivel de glucosa en sangre (Collins *et al.*, 1998).

Por otro lado, en un estudio, 10 pacientes estables con diabetes Tipo II fueron sometidos a una dieta rica en quercetina durante dos semanas, después de seguir una dieta baja en flavonoles las dos semanas previas. Los linfocitos fueron sujetos a estrés oxidativo *in vitro* y se midió el daño al ADN. Este daño fue significativamente reducido después del consumo de altas cantidades del flavonol en la dieta, comparado con la dieta baja en este compuesto (Lean *et al.*, 1999).

2.1.2.4. Enfermedades neurológicas

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo, caracterizado por pérdida de la memoria progresiva y un debilitamiento de las habilidades cognitivas (Pratico, 2002). Existe la hipótesis de que los radicales libres están implicados en la presencia del Alzheimer y de que la edad es un factor de riesgo significativo para su desarrollo (Christen, 2000). Tres factores clave sustentan esta hipótesis (Lovell *et al.*, 1998):

1. Las neuronas son extremadamente sensibles al ataque de radicales libres debido a que su contenido de glutatión es muy bajo, sus membranas son altas en ácidos grasos poli-insaturados y el metabolismo del cerebro requiere una cantidad sustancial de oxígeno.

2. Las lesiones cerebrales del Alzheimer están asociadas con el daño típico de los radicales libres, por ejemplo, daño al ADN, oxidación de proteínas, lípidos y productos terminales glicosilados.
3. Los metales que son capaces de catalizar la producción de radicales libres están presentes de forma natural en el cerebro, por ejemplo, hierro, cobre, zinc y aluminio.

Además, la concentración de hierro es más alta en cerebros de pacientes de Alzheimer.

2.1.2.5. **Enfermedades inmunitarias**

La oxidación y la generación de radicales libres son componentes esenciales de la inmunidad mediada por células. A niveles fisiológicos, los radicales libres son vitales para la presencia del antígeno y para la proliferación celular. Sin embargo, a niveles muy altos pueden disminuir la función inmune (Hughes, 1999). El estrés oxidativo es perjudicial para los linfocitos probablemente debido a la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poli-insaturados en la membrana celular y a la oxidación del LDL del plasma que es linfotóxico. La pérdida de la fluidez en la membrana de los linfocitos se ha correlacionado con una disminución de la respuesta inmune (Douziech *et al.*, 2002).

Los antioxidantes pueden mejorar la respuesta inmune controlando la producción de radicales libres en la célula. La ingesta de antioxidantes antes de la explosión oxidativa protege a los neutrófilos de la destrucción por los radicales libres generados (Grimble, 1998).

2.2. Flavonoides

La dieta juega un papel vital en la producción del sistema de defensa de antioxidantes, ya que provee de antioxidantes esenciales como la vitamina E, β -caroteno, y otros antioxidantes fenólicos de plantas que incluyen a los flavonoides, así como minerales esenciales que forman parte de enzimas antioxidantes importantes, por ejemplo, la superóxido dismutasa requiere zinc y la glutatión peroxidasa, selenio (Punchard, 1997).

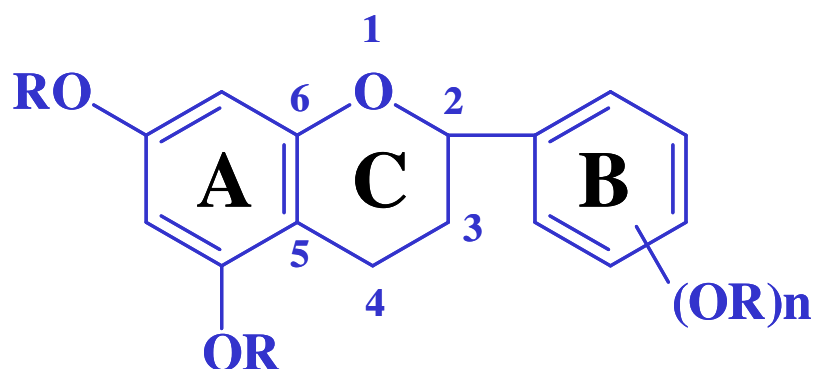
Los flavonoides tienen efectos favorables sobre la salud. Poseen un amplio intervalo de actividad biológica, que se piensa está relacionada con su actividad antioxidante; esta actividad se debe a la habilidad de estos compuestos de atrapar radicales libres, absorber radiación UV y quelar iones metálicos (Bors *et al.*, 1990). Ejercen efectos antiinflamatorios, antihepatotóxicos y acción antiúlceras, algunos tienen además acción antialérgica, antiviral e incluso protección contra las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inhibición del crecimiento de varios tipos de células cancerígenas (Narayana, 2001).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran distribuidos ampliamente en el reino de las plantas y son el grupo de metabolitos secundarios más numeroso en éstas; se consumen relativamente en grandes cantidades en la dieta diaria (de 20 a 1000 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Manach *et al.*, 1999; Erdman *et al.*, 2007).

Como se encuentran en plantas y alimentos relacionados con éstas, incluyendo, frutas, verduras, aceites, nueces y hierbas, y también en bebidas como el vino, té, café y cerveza (Soczynska-Kordala *et al.*, 2001), se podría decir que forman parte integral de la dieta (Soobrattee *et al.*, 2005).

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, que regula la permeabilidad de los capilares (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Los flavonoides tienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, por lo que desempeñan un papel esencial en la protección frente a fenómenos de daño oxidativo (Martínez-Flores *et al.*, 2002). La aglicona de un flavonoide glucosídico consiste en un anillo de benceno (A) condensado con un anillo de seis carbonos (anillo C), el cual se une en la posición 2 a un anillo fenil (B) como sustituyente (Figura 2).



(Paredes-Salido y Clemente- Fernández, 2005)

Figura 2. Fórmula estructural básica de los flavonoides

El mecanismo exacto por el cual los flavonoides ejecutan su acción tóxica o benéfica aún no es muy claro, sin embargo, en estudios recientes se ha especulado que es poco probable que su clásica actividad antioxidante basada en la donación de hidrógeno, sea la única explicación de los efectos celulares que tienen (Williams *et a.*, 2004).

Existen muchos estudios *in vitro* en los que se ha demostrado la actividad antioxidante de los flavonoides como donadores de hidrógeno y secuestradores de radicales libres (Brown *et al.*, 1998; Xueqin Xu *et al.*, 2006). Los flavonoides también inhiben enzimas como las oxidasas, entre las que se encuentran las lipoxigenasas, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxigenasa y la xantina oxidasa, evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos (Ferrandiz *et al.*, 1991; Van Hoorn *et al.*, 2006). Las especies reactivas del oxígeno reaccionan con las biomoléculas conduciendo al daño celular y tisular. Afortunadamente el organismo cuenta con mecanismos efectivos para protegerse de los efectos nocivos de estas especies químicas. Estos mecanismos se componen de enzimas y de compuestos no enzimáticos como el glutatión, el ácido ascórbico, el α -tocoferol contenido en la membrana, los flavonoides y los carotenos, estos últimos obtenidos de la dieta (Pérez, 2003).

2.2.1. Estructura y clasificación de flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), derivado del ácido shiquímico y de tres restos de acetatos, compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los flavonoides se encuentran como derivados O-metilados, O y C-glicosilados y como agliconas (difenilpiranos sin azúcares). El anillo de seis miembros condensado con el anillo de benceno es una α -pirona (flavonoles o flavononas) o sus dihidroderivados (flavanoles o flavanonas). La posición del sustituyente benzenoide divide a los flavonoides en flavonoides (posición 2) e isoflavonoides (posición 3). Los flavonoles difieren de las flavononas por un grupo hidroxilo en la posición 3 y por una doble ligadura entre C₂-C₃ (Narayana *et al.*, 2001).

Se forman en las plantas a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, y malonato. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors *et al.*, 1990; Pietta, 2000).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en (Narayana *et al.*, 2001):

- Flavonas: como la catequina, con un grupo -OH en en la posición 3 del anillo C.
- Flavononas: como la hesperetina con un anillo de seis carbonos condensado con un anillo de benceno (α -pirona).
- Flavanonas: son los dihidroderivados de las flavononas y de los flavonoles.
- Flavonoles: representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavanos: como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en la posición C3.
- Isoflavonoides: tienen un sustituyente benzenoide en la posición 3 del anillo C, a diferencia de los flavonoides que lo tienen en la posición 2.
- Antocianidinas: que tienen unido el grupo -OH en la posición 3, pero además poseen dobles enlaces en las posiciones 1 y 3 del anillo C, formando el anillo flavílico característico de las antocianidinas.

Tres características estructurales son importantes para su función antioxidante: a) la presencia en el anillo B de la estructura catecol u *o*-dihidroxi; b) la presencia de un doble enlace en la posición 2, 3; c) la presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Martínez-Flores *et al.*, 2002). La Quercetina presenta las tres características descritas anteriormente, la Catequina sólo la segunda y la diosmina sólo presenta la primera. A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, generalmente en la posición C3 del anillo C.

La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su respectiva aglicona. En la Figura 3 se muestran las estructuras químicas básicas de los flavonoides.

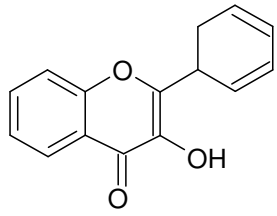
2.2.2. Acción antioxidante de los flavonoides

La capacidad de estos polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta por Benthath *et al.*, 1936. Sin embargo el mecanismo de esta acción fue ignorado en gran medida hasta hace poco.

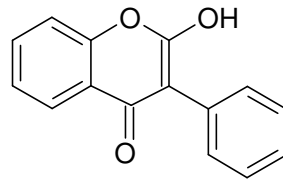
Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides son (Bors *et al.*, 1990; Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Cody *et al.*, 1998):

- Presencia de la estructura O-dihidroxi en el anillo B, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

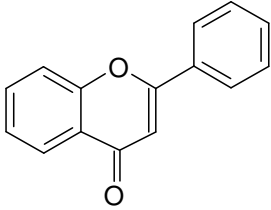
Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante. Los flavonoides también tienen actividad bioquímica, ya que inhiben oxidasas, evitando la generación de ROS. Por otra parte, también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A₂ (Lindahl *et al.*, 1997; Aruoma, 2003), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa y la superóxido dismutasa (Sudheesh *et al.*, 1999). De esta forma, los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación del radical en s.



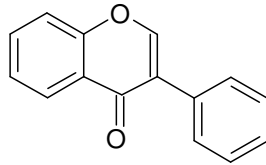
Flavonol



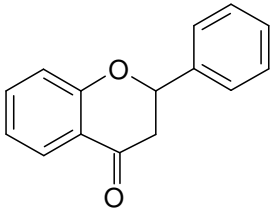
Isoflavonol



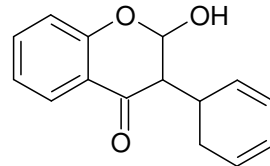
Flavona



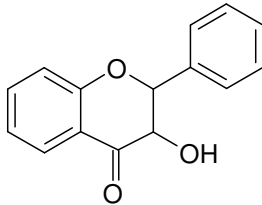
Isoflavonas



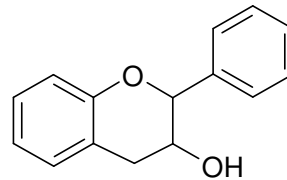
Flavanonas



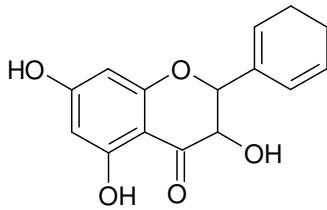
Isoflavonoles



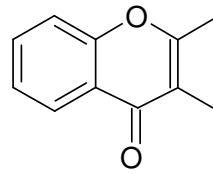
Flavonoles



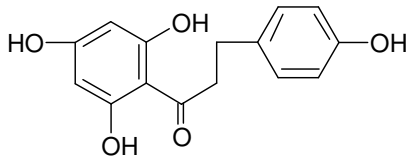
Flavan-3-oles



Flavanololes



Benzo-λ-pironas



Chalconas

(Narayana *et al.*, 2001; Ballester *et al.*, 2006)

Figura 3. Estructuras químicas básicas de los flavonoides

Además de secuestrar radicales libres, quelar iones metálicos e inhibir oxidasas, los flavonoides pueden aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes (Pérez, G., 2003). Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición, no está claro hasta qué punto el secuestro de radicales libres o la quelación de metales puede contribuir a los efectos antioxidantes.

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo que se encuentra especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción nociva de dichas sustancias sobre las células. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoléico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos, o la autooxidación de los homogeneizados del cerebro (Ursini *et al.*, 1994).

Además, flavonoides como la quercetina y el kaempferol son importantes para el control de las concentraciones intracelulares de glutatión. Actuando a nivel del gen de regulación, son capaces de aumentar el nivel en un 50%, induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo así a la prevención de enfermedades (Myhrstad *et al.*, 2002).

2.2.2.1. Técnicas para la evaluación de la capacidad antioxidante de flavonoides

Existen diferentes técnicas que son herramientas importantes para conocer la capacidad antioxidante de especies antioxidantes como los compuestos fenólicos, dentro de los que se encuentran los flavonoides. Las más utilizadas son: ABTS (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Aunque se ha visto que para una misma sustancia, los resultados pueden variar entre cada técnica debido a las diferencias en la naturaleza y fundamento de cada una (Thaipong *et al.*, 2006).

2.2.2.2. Ensayo del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil DPPH

Se basa en la utilización del radical de nitrógeno orgánico difenil-picril-hidrazil, que se caracteriza por su coloración púrpura intensa. Con este ensayo se mide la medición de la capacidad del antioxidante de reducir al radical, a través de un decremento en la absorbancia. Esta técnica fue reportada por primera vez por Brand-Williams y colaboradores (1995). La pérdida de color del DPPH al reaccionar con los compuestos a estudiar se mide a 515-520 nm, siendo esta reacción monitoreada por medio de un espectrofotómetro (Prior *et al.*, 2005)

2.2.2.3. Ensayo del Acido 3-etil-benzotiazolin-6- sulfónico (ABTS)

También conocido como el método de TEAC, es uno de los métodos más utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante total. Se basa en la neutralización del catión radical formado por la oxidación del cromóforo sintético ABTS a su forma radical ABTS^{•+} cuyo máximo de absorbancia se encuentra a los 734 nm. El radical reacciona rápidamente con donadores de electrones e hidrógeno, resultando en la decoloración del catión radical. Un decremento en la concentración del radical es directamente proporcional a la concentración del antioxidante (Stratil *et al.*, 2006).

2.2.2.4. Ensayo para evaluar la capacidad reductora de hierro (FRAP)

Es una prueba para la medición de la habilidad reductora de hierro, inicialmente se diseñó para su utilización en el plasma. Se basa en la reducción del ión férrico al ferroso a un pH bajo que provoca la formación de un complejo colorido al reaccionar el ión ferroso con una triazina por la cual el primero tiene especial afinidad. Los valores de FRAP se obtienen comparando los cambios en la absorbancia a 593 nm de las muestras con respecto a un control que contenga el ión ferroso a concentraciones conocidas (Benzie *et al.*, 1996).

No se ha informado que exista mucha diferencia entre el ensayo de TEAC y el de FRAP, excepto porque el primero se lleva a cabo a un pH neutro y el FRAP a un pH ácido (3.6). En este ensayo se lleva a cabo una reacción de transferencia de electrones (Huang *et al.*, 2005).

2.2.3. Actividad quelante de los flavonoides

Otro mecanismo antioxidante de los flavonoides, que no se ha estudiado detalladamente, es el resultado de las interacciones entre estos compuestos y los iones de metales, principalmente hierro y cobre (Morel *et al.*, 1998). Los flavonoides también tienen actividad prooxidante y ésta se ha relacionado con su actividad reductora de hierro y cobre, ya que estos metales al ser reducidos pueden catalizar la producción de radicales hidroxilo a través de reacciones como la de Fenton.

Para que el hierro sea un catalizador efectivo en este tipo de reacciones, debe estar presente en forma iónica o libre. Normalmente el hierro es secuestrado por proteínas que se unen a él obstaculizando o previniendo su acción como catalizador en reacciones de radicales. Sin embargo, el hierro puede liberarse de estas proteínas a pH bajo como resultado del daño producido a las proteínas por peróxidos (Willcox *et al.*, 2004). El pH puede bajar por inflamación de tejidos y también en las condiciones de lesiones por isquemia/reperfusión (Winrow *et al.*, 1993).

La propiedad de los flavonoides de quelar metales indica que estos compuestos pueden jugar un papel importante en el combate de enfermedades por altas concentraciones de metales y en todas las condiciones de estrés oxidativo que involucran iones de metales de transición (Mira *et al.*, 2002).

La actividad quelante de los flavonoides se puede explicar de la siguiente manera: los flavonoides pueden tener la capacidad de desplazar ligandos prooxidantes del hierro férrico para formar complejos de gran estabilidad, y así, prevenir su ciclación redox y por lo tanto, un daño oxidativo potencial. Por lo anterior se requiere hacer mediciones de las constantes de estabilidad de compuestos férricos-flavonoides (Engelmann *et al.*, 2005).

Para determinar la actividad quelante y la estabilidad de los complejos hierro-flavonoide se llevan a cabo titulaciones de los flavonoides con diferentes concentraciones del metal de interés y posteriormente se hacen mediciones espectrofotométricas (UV/visible) con las muestras de las soluciones tituladas, observando los cambios en el espectro de absorción; con esto se demuestra que existe interacción entre los flavonoides y los iones metálicos. El espectro de los flavonoides consiste en dos máximos de absorción, el primer pico aparece entre los 240-285 nm (banda II) y el segundo a los 300-550 nm (banda I) correspondientes al anillo A y B respectivamente, dependiendo de las sustituciones de hidroxilos (Mira *et al.*, 2002; Engelmann *et al.*, 2005).

2.2.4. Beneficios de los flavonoides

2.2.4.1 Actividad antiúlceras

Muchos flavonoides poseen actividad antiulcerogénica. Un tratamiento oral con la fracción éter del extracto de flavonoides mostró un buen nivel de protección gástrica. La gossipina, naringina, naringenina y cianidanol-3 mostraron actividad anti-úlceras (Parmar y Shikha, 1998). En otro estudio se encontró que los flavonoides obtenidos de extractos de hojas de bambú presentaron una importante actividad antiulcerogénica en ratas (Muniappan *et al.*, 2003).

2.2.4.2. Actividad contra padecimientos hepáticos

Se ha encontrado que muchos flavonoides también poseen actividad hepatoprotectora. En un estudio llevado a cabo para investigar la silimarina, apigenina, quercetina y naringenina como agentes terapéuticos contra la hepatotoxicidad inducida con microcristina LR, se observó que la silimarina resultó la más efectiva (Carlo *et al.*, 1993). La rutina y la venorutina mostraron un efecto regenerativo y hepatoprotectivo en cirrosis experimental. En otro estudio, se probó la eficacia de la quercetina liposomal contra la fibrosis hepática inducida por arsénico en ratas (Mandal *et al.*, 2007).

2.2.4.3. Actividad contra procesos inflamatorios

Se ha informado que un buen número de flavonoides posee actividad antiinflamatoria. La hesperidina, un flavonoide cítrico, tiene efectos antiinflamatorios y analgésicos significativos (Shahidi *et al.*, 1998). Recientemente se ha reportado que la apigenina, luteolina y quercetina tienen también actividad antiinflamatoria (Narayana *et al.*, 2001).

2.2.4.4. Actividad contra enfermedades relacionadas con los vasos sanguíneos

La quercetina y la rutina han sido usados como constituyentes efectivos de varios productos farmacéuticos empleados en el tratamiento contra la fragilidad capilar y la flebosclerosis. La disminución de la agregación celular en la sangre producida por la mayoría de los flavonoides puede explicar los efectos benéficos reportados de estos componentes sobre la permeabilidad y fragilidad capilar anormal, la reducción de síntomas de estas enfermedades y la protección que proveen contra varios traumas y estreses (Versantvoort *et al.*, 1993). Otros flavonoides antiagregatorios, de células de la sangre, reportados fueron la 3-metil quercetina, toxerutina, fisetina, dihidroquercetina y flavonas.

La nobeletina y la sinensetina disminuyeron la agregación de eritrocitos y su sedimentación *in vitro* y pueden ser útiles en el control dietético del síndrome de alta viscosidad de la sangre (Catherine *et al.*, 1996; Felicia *et al.*, 1996; Fritz *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 1997).

2.2.4.5. Bacterias, hongos y virus

Los flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos han sido investigados por sus actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. En un estudio realizado todas las muestras de flavonoides probadas fueron activas contra hongos y cepas de bacterias gram-positivas y la mayoría mostró actividad antiviral (Kujumgier *et al.*, 1999).

2.3. Síntesis, absorción y metabolismo de flavonoides

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones (Das, 1994). Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides (Middleton *et al.*, 2000). Posteriormente, se forman los derivados glicosilados y sulfatados.

La mayoría de los flavonoides se degradan en condiciones alcalinas fuertes, en el tracto gastrointestinal y se rompen por el anillo C (enlace éster). Incluso después de cocinarse, la mayoría de los glucósidos y agliconas flavonoides alcanzan el intestino delgado intactos, donde se metabolizan rápidamente a la forma metilada, glucoronizada o sulfatada. Los flavonoides que alcanzan el colon pueden metabolizarse más a fondo por las enzimas de la flora bacteriana que ahí coloniza, favoreciendo su absorción. En general, su biodisponibilidad es relativamente baja debido a su limitada absorción y su rápida eliminación. Además, se ha informado que los flavonoides se metabolizan rápida y extensamente.

En los seres humanos, todas las clases de estos compuestos experimentan un metabolismo extenso en el yeyuno y el íleon del intestino delgado y entran en la vena porta, donde tienen un metabolismo adicional en el hígado. La microflora que coloniza el colon degrada los flavonoides a ácidos fenólicos más pequeños, que también se absorben. El destino de la mayoría de estos metabolitos es la excreción renal. Sin embargo, aún no es muy conocido el grado en que estos compuestos entran en las células y en los tejidos (Paredes-Salido y Clemente-Fernández, 2005).

2.4. Características de los flavonoides objeto de estudio

2.4.1. Quercetina

Es un flavonol con las principales características antioxidantes. Este compuesto define el clásico potencial antioxidante de los flavonoides. La más importante de estas características es el grupo catecol en el anillo B, otra es la presencia de una insaturación en el anillo C y la presencia de una función 4-oxo también en el anillo C. El grupo catecol también puede contribuir en su habilidad para quelar iones metálicos como el cobre y el hierro (Williams *et al.*, 2004) (Figura 4). La Quercetina posee tres posibles sitios de quelación, el 3-hidroxi-carbonil, el 5-hidroxi-carbonil y el 3, 4-dihidroxil (catecol). La formación de complejos entre los iones metálicos y la Quercetina ha sido reportada para un gran número de metales (Cornard *et al.*, 2005). Este flavonoide se encuentra en manzana, cebolla, té negro, col, brócoli, en el vino, entre otros, donde contribuye en sus propiedades astringentes y en su coloración, así como también se puede encontrar en el frijol (Soobrattee *et al.*, 2005). En varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha comprobado que la quercetina tiene propiedades antitumorales con efectos contra varios tipos de cáncer como el de mama, de pulmón de hígado, de ovarios y de colon (Mouat *et al.*, 2005).

El efecto anticancerígeno observado se debe principalmente a que estimula el sistema inmunológico, a que atrapa radicales libres, altera el ciclo mitótico en las células cancerígenas, modifica la expresión genética, a que posee actividad antiangiogénica, induce la apoptosis, o a una combinación de todas las anteriores (Hayashi, 2000). También se ha encontrado que es uno de los máximos inhibidores del daño oxidativo del LDL, por lo que reduce considerablemente el riesgo de que se desarrolle la arterosclerosis (Negre-Salvayre, *et al.*, 1992; Chopra *et al.*, 2000; Murota *et al.*, 2007). También contribuye a la disminución de la presión sanguínea ejerciendo una vasorelajación coronaria, reduciendo la tensión en las paredes de los vasos sanguíneos (Rendig *et al.*, 2001).

En otros estudios, se ha demostrado que la quercetina es un antihistamínico y antiinflamatorio natural; de hecho, la quercetina es única en su habilidad para inhibir la expresión del gen TNF- α , una citosina involucrada en procesos de inflamación (Wadsworth *et al.*, 2001).

2.4.2. Daidzeína

La Daidzeína es una isoflavona presente en su forma glucosidada en muchas plantas usadas en la dieta humana (Figura 4). La Daidzeína se encuentra concentrada principalmente en la soya y productos derivados de ésta que son usados para el consumo humano. La Daidzeína es la segunda isoflavona en cantidad presente en la soya y sus productos, después de la genisteína (Setchell *et al.*, 1997). Las formas más comunes de fitoestrógenos son precisamente las isoflavonas; estas tienen una estructura química muy parecida al 17- β estradiol, el estrógeno mamario más potente, y entre sus semejanzas se incluyen: el anillo aromático A con un grupo hidroxilo en el mismo plano a una distancia similar que el que se encuentra en el estradiol (Song *et al.*, 1998).

Se ha encontrado en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* que la Daidzeína actúa como un receptor de estrógeno e induce las respuestas estrogénicas que son mediadas por el receptor (Bayer *et al.*, 2001). Por lo que se puede decir que al tener efectos estrogénicos y antiestrogénicos, se puede clasificar de forma más correcta como modulador de receptores selectivos de estrógenos (Anupongsanugool *et al.*, 2005). Existen diversas investigaciones, incluyendo estudios epidemiológicos, que sugieren que la isoflavona Daidzeína puede ayudar a aliviar síntomas postmenopáusicos y puede proveer protección contra enfermedades crónicas como cánceres dependientes de hormonas (cáncer de mama y endometrial), enfermedades cardiovasculares y osteoporosis (Goldwyn *et al.*, 2000). Después de su ingestión, la Daidzeína es convertida a dihidrodaidzeína, S-equol y O-desmetilangolensina por la microflora intestinal. A lo largo de diversas investigaciones, se ha informado que el equol se presenta en aproximadamente el 35% de humanos, probablemente debido a las diferencias existentes en la microflora intestinal. Después de la ingestión de soya, y por consiguiente sus isoflavonas, se ha visto que la cantidad de equol en la orina está correlacionada con la cantidad de soya consumida y con una reducción de riesgo de padecer cáncer de mama (Rowland *et al.*, 2000).

2.4.3. **Kampferol**

Es un flavonol que se encuentra en plantas. Es uno de los principales componentes del té, del frijol y del polen y además se encuentra en frutas y verduras como tomate, brócoli y cebolla (Figura 4). En diversos estudios, se han revelado las funciones biológicas del kampferol como anti-inflamatorio y antioxidante en macrófagos y neuronas (Okamoto *et al.*, 2002). Tiene además efectos inmuno regulatorios y actúa contra células leucémicas (Asai *et al.*, 2005). El kampferol contribuye significativamente en el consumo de flavonoides en humanos (Hertog *et al.*, 1993; Sampson *et al.*, 2002).

Este flavonoide tiene una estructura similar a la de la quercetina por lo que su actividad biológica también es similar. Incluso en estudios epidemiológicos recientes en los que se evaluó el consumo de flavonoides relacionado con enfermedades crónicas, se encontró que grandes cantidades de kampferol en la dieta reducen significativamente el riesgo de enfermedades cerebrovasculares (Knekt *et al.*, 2002).

Este flavonoide también induce la diferenciación en células cancerosas de colon parcialmente diferenciadas; esta diferenciación fue observada principalmente en forma de cambios en la morfología celular (Nakamura *et al.*, 2005).

En otro tipo de estudios se ha demostrado que el kampferol incrementa el gasto de energía en músculos humanos, lo que previene problemas de obesidad (da Silva *et al.*, 2007).

2.4.4. Hesperetina

Es la aglicona de la hesperidina, con acciones antioxidantes y anti-inflamatorias. Es una flavanona con propiedades hipolipémicas. Se han llevado a cabo estudios donde la suplementación de la dieta con hesperetina disminuye considerablemente las concentraciones de colesterol y triglicéridos en el plasma de ratas (Kim *et al.*, 2003). En otros estudios, se ha descubierto que la hesperetina inhibe significativamente la proliferación celular y promueve el arresto celular en células humanas de cáncer de mama MCF-7 (Choi, 2007).

La hesperetina es la flavanona que se encuentra con más incidencia en la dieta y se puede encontrar casi exclusivamente en frutas cítricas, por lo que el consumo de éstas se refleja en la aparición de hesperetina y otras flavanonas en el plasma de humanos (Erlund *et al.*, 2002).

Algunos estudios epidemiológicos sugieren una asociación protectora entre un alto consumo de cítricos y cáncer, como el de pulmón, e isquemia (Voorrips *et al.*, 2000; Joshipura *et al.*, 1999). Estudios experimentales indican que la hesperetina y la naringenina, juegan un papel importante en la prevención de este tipo de cáncer, ya que se ha demostrado que el consumo de jugo de naranja, de toronja o la ingesta de flavanonas puras, inhibe varios tipos de carcinogénesis inducida químicamente en animales de laboratorio (Tanaka *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997); e incluso se ha visto que estos compuestos tienen un efecto importante sobre el metabolismo del colesterol en ratas (Bok *et al.*, 1999).

Además, la hesperetina posee también importantes propiedades antioxidantes ya que en un estudio se encontró que es un potente antioxidante contra el peroxinitrito, de hecho se encontró que la hesperetina manifiesta una propiedad citoprotectora, pues impide el daño celular inducido por el oxidante reactivo peroxinitrito (Kim *et al.*, 2004).

2.4.5. Rutina

Es el glucósido de la quercetina y se puede encontrar en las capas externas de frutas y de hojas de verduras, en las hojas de té sin procesar y en el vino (Bravo, 1998). También se le puede encontrar en cereales pero sólo algunas especies con propiedades nutricionales importantes contienen altas cantidades como la alfalfa, se encuentra en sus hojas, flores y también en los granos y harina (Kreft *et al.*, 1999). Es altamente activo contra compuestos oxidantes, su acción antioxidante se puede desarrollar al intervenir directamente en las reacciones de óxido-reducción, o indirectamente a través de la quelación de hierro. Además de su actividad antioxidante, la rutina posee otras propiedades farmacológicas interesantes: vasoconstrictoras, espasmolíticas, antivirales, inhibe enzimas como la ciclo-oxigenasa y la lipoxigenasa (Kreft *et al.*, 2002). Es usado clínicamente para el tratamiento de insuficiencia venosa y várices.

Se ha reportado en muchos estudios que tiene propiedades anti-trombóticas, anti-inflamatorias, antioxidantes, anticarcinogénicas, citoprotectoras, hepatoprotectoras, vasoprotectoras, relajantes musculares, entre otras. Como el estrés oxidativo participa predominantemente en las lesiones de las células pancreáticas y subsecuentemente en el desarrollo de la diabetes, la rutina, que tiene actividad antioxidante, tiene un efecto protector contra esta enfermedad (Srinivasan *et al.*, 2005). En el tracto gastrointestinal, la rutina es hidrolizada y transformada a su aglicona quercetina por las enzimas glucosidasas de la microflora del colon. La rutina ha demostrado tener actividad quimiopreventiva en una amplia variedad de modelos animales en el laboratorio, incluyendo ratones con tumores colónicos inducidos con azoximetano, y en glándulas mamarias de ratas tratadas con nitrosometilurea (Tanaka *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000).

Al igual que otros flavonoides, absorbe radiación en el rango UV-Visible, por lo que constituye un filtro selectivo que protege a los tejidos de las plantas que los contienen contra los dañinos rayos UV (Rozema *et al.*, 2002).

2.4.6. **Catequina**

Es un flavan-3-ol que tiene la propiedad de aumentar la actividad de la superóxido dismutasa y de la catalasa. Las catequinas del té verde son poderosos quelantes del hierro y del cobre, con lo cual pueden evitar los efectos pro-oxidantes que tienen estos metales cuando se encuentran de forma libre dentro del cuerpo, es decir, no unidos a proteínas. Las catequinas también inhiben la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa, disminuyendo así, la probabilidad de la formación del radical peroxinitrito y sus efectos negativos sobre la salud. También tienen un efecto protector importante contra enfermedades como cáncer, afecciones cardiovasculares y daños oxidativos en el organismo (Valenzuela, 2004).

2.4.7. Genisteína

Es conocida por ser la isoflavona considerada como el constituyente anticancerígeno primario de la soya y de los productos derivados de ésta. Constituye la principal fuente de alimentación en las poblaciones asiáticas. También se encuentra de manera importante en semillas germinadas de frijol (Aruoma, 2003). Se le define como un fitoestrógeno y por lo tanto se le han atribuido beneficios contra malestares propios de la menopausia como la pérdida de densidad ósea. Los fitoestrógenos son análogos de los estrógenos que se encuentran en la naturaleza; se presentan principalmente en productos de soya. En un estudio reciente, se encontró que el fitoestrógeno genisteína consumido junto con vitamina D₃ y calcio, tiene efectos favorables en la salud de los huesos, comparado con la ingesta de la vitamina y el calcio solos (Marini *et al.*, 2007).

La genisteína ha sido propuesta como un agente potencial quimiopreventivo contra algunos tipos de cáncer. La incidencia de tumores en próstata se reduce significativamente en modelos animales de cáncer transgénicos, espontáneos o inducidos químicamente, después de la ingesta de genisteína a través de la dieta a concentraciones nutricionalmente relevantes (Pollard *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007).

Por otro lado también se han hecho patentes las propiedades anti-inflamatorias de la genisteína. En un estudio hecho en animales con artritis inducida con colágeno, se observó que la genisteína ayudó a que los grados de inflamación y de destrucción de articulaciones fueran menores, comparados con un grupo control al que no se le administró genisteína (Verdrengh *et al.*, 2003).

2.4.8. Morina

La morina es un pigmento bioactivo de la familia de los flavonoides. Tiene al igual que los otros flavonoides, actividad antioxidante.

Se ha demostrado que, *in vivo*, el hidrato de morina reduce hasta en un 50% la necrosis del tejido después de la isquemia y de la reperfusión en conejos. Inhibe parcialmente la actividad de la xantina oxidasa, enzima que genera radicales libres a partir del endotelio isquémico. También tiene la propiedad de quelar iones metálicos como el Fe^{2+} , aunque esta aseveración requiere de más análisis para confirmarse (Wu *et al.*, 1995). En la Figura 4 se representan las estructuras de los flavonoides descritos anteriormente.

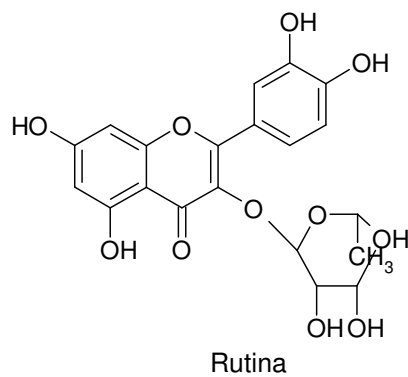
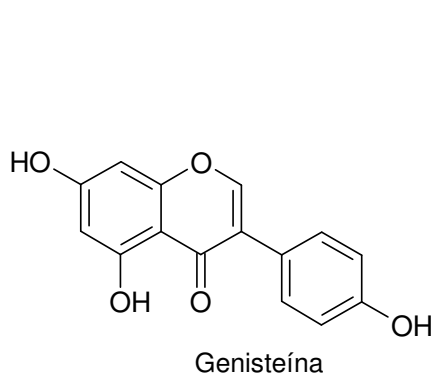
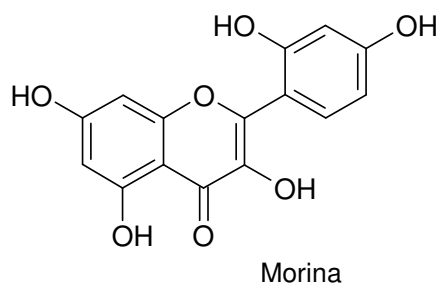
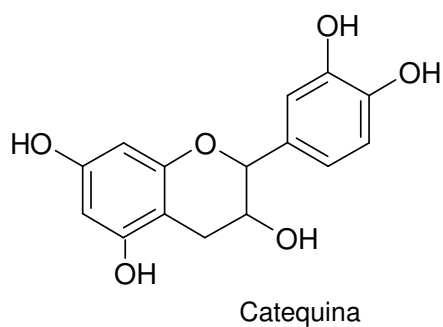
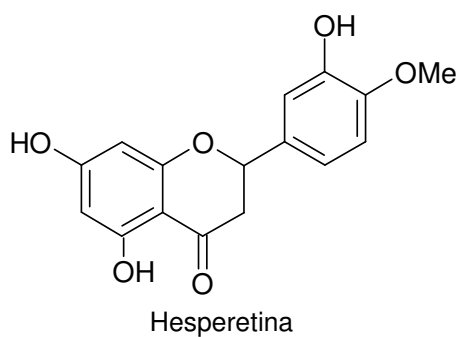
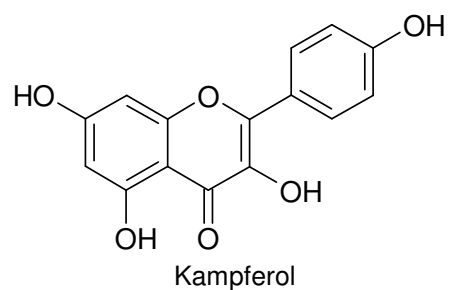
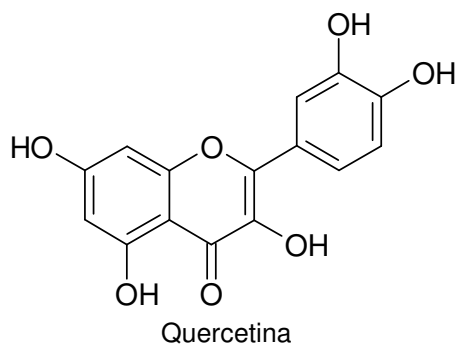


Figura 4. Estructura de los flavonoides objeto de estudio

2.5. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos que también poseen actividad antioxidante y que al igual que los flavonoides se encuentran en frutas y verduras. Son productos secundarios de las plantas y por lo tanto se encuentran comúnmente en alimentos derivados de éstas. Las propiedades antioxidantes y anticarcinogénicas de los ácidos fenólicos pueden ser la razón por la que se asocia inversamente el consumo de frutas y verduras con la incidencia de enfermedades coronarias y cáncer, respectivamente (Radtko *et al.*, 1998). Las investigaciones sobre las propiedades de estos compuestos son importantes en la actualidad debido a sus propiedades biológicas y farmacéuticas, las cuales son atribuidas a su actividad antioxidante (Yeh y Yen; 2003). Se han hecho estudios de alimentos como la miel y el café en donde se hacen patentes sus propiedades antioxidantes (Aljadi *et al.*, 2003), ya que se ha visto que el consumo de estos productos previene la oxidación del LDL y por lo tanto la aparición de enfermedades como la arterosclerosis; particularmente en el caso de la miel, las propiedades antibacterianas que posee se han atribuido a los compuestos fenólicos, principalmente ácidos. Estas propiedades antibacterianas se han comprobado en estudios, como en el realizado por Ejechi *et al* (2005), en donde se encontró que los ácidos fenólicos contenidos en la pimienta inhiben el crecimiento del hongo que causa la putrefacción de tomates. El estudio se extendió a otros microorganismos propios de alimentos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Penicillium* entre otros, y todos resultaron susceptibles a los extractos de ácidos fenólicos de pimienta a una concentración mínima inhibitoria. Se ha visto que tras la ingesta de café, los ácidos fenólicos que contiene (caféico, cumárico y ferúlico) son encontrados en el plasma, por lo que hay suficiente evidencia de que aumentan la resistencia del LDL a la oxidación (Natella *et al.*, 2007). Algunos ácidos como el ferúlico y el caféico han demostrado tener efectos inhibitorios sobre el crecimiento de células y un efecto pro-apoptótico sobre células cancerosas en estudios hechos sobre cáncer de mama (Kampa *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la contribución de la actividad quelante sobre la actividad antioxidante total de diversos flavonoides y de una mezcla que simula la concentración de estos compuestos en el frijol común variedades N8025 y G12892.

3.2. Específicos

- Evaluar la actividad quelante de iones de hierro, de los diferentes flavonoides, mediante UV/visible.
- Determinar la capacidad antioxidante total y la capacidad reductora de hierro de mezclas de flavonoides y ácidos fenólicos simulando el contenido de éstos en frijol por medio de las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP.
- Determinar la capacidad secuestradora de radicales OH llevada a cabo por los flavonoides.
- Determinar la capacidad secuestradora de radicales OH desarrollada por una mezcla de flavonoides, simulando el contenido de éstos en un alimento como el frijol.

4. HIPÓTESIS

Al quelar a los iones férricos se espera que la actividad antioxidante de los flavonoides no se vea afectada.

5. JUSTIFICACIÓN

Los avances en materia de salud y sanidad pública en el siglo XX en casi todo el mundo, repercutieron en un aumento significativo en la esperanza de vida de la población. No obstante, el aumento en los años de vida, no ha sido acompañado por una calidad de vida óptima en las edades avanzadas.

El gasto de los países en la atención de enfermedades crónico degenerativas es muy alto y no se ha revertido la relación entre el incremento de la población envejecida y el aumento de este tipo de enfermedades. Incluso, en edades más jóvenes, se observa el aumento de este tipo de enfermedades en conjunción con otras afecciones generadas por la contaminación, el estrés y malos hábitos alimenticios, entre otros.

En este sentido se deben buscar alternativas alimenticias que posean valores tanto nutritivos como protectores contra este tipo de males. Los flavonoides tienen cualidades para la prevención y combate de enfermedades como la diabetes, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, entre otras; por lo que es importante conocer cuáles de ellos son los más efectivos. Situación que tendrá un impacto positivo en la salud de las personas y por lo tanto repercutirá en beneficios sociales y económicos.

Por otra parte, la actividad antirradical de los flavonoides ha sido ampliamente estudiada, pero no ha sucedido lo mismo con su actividad quelante, por lo que en esta investigación se profundizó en dicha propiedad para con ello contribuir en el estudio de esta actividad quelante. Esto implica comprender a detalle los mecanismos de quelación de metales; así como los complejos que se forman de la interacción entre los flavonoides y los iones, la estabilidad de estos complejos y su relación con los procesos celulares.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron métodos electroquímicos y espectrofotométricos para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos a estudiar: flavonoides y la mezcla de éstos encontrados en dos variedades de frijol común.

6.1. Materiales

En este estudio se evaluó la actividad quelante de seis flavonoides comerciales (Quercetina, Rutina, Kampferol, Morina, Catequina y Hesperetina), así como la capacidad antirradical de nueve compuestos fenólicos presentes en frijol: cuatro flavonoides: Quercetina, Kampferol, Daidzeína y Genisteína; cuatro ácidos fenólicos: Ferúlico, Hidroxibenzóico, Cumárico y Vainillínico; y la fitohormona Coumestrol. Estos se seleccionaron con base en sus características estructurales y en su prevalencia en plantas relacionadas con la alimentación humana. Los flavonoides se obtuvieron de la Compañía Química Sigma (St. Louis, MO, USA).

6.2. Estudios de quelación

6.2.1. Estudios espectrofotométricos

Para alcanzar el objetivo específico 1 se determinó la capacidad quelante de iones de hierro de los flavonoides.

Se prepararon soluciones 100 μM en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM a un pH de 5.0 de los seis flavonoides evaluados: Quercetina, Rutina, Catequina, Hesperetina, Kampferol y Morina. A éstas se les agregaron soluciones de iones de hierro a concentraciones desde 20 μM hasta 2 mM para no afectar la concentración del flavonoide al hacer las adiciones. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y se eliminó el oxígeno con un flujo de gas argón para evitar reacciones de oxidación e interferencias en la experimentación.

Se registraron los cambios en el espectro de absorción haciendo barridos desde los 240 hasta los 550 nm. Las soluciones fueron analizadas espectrofotométricamente por medio de un espectrofotómetro UV-Visible (Perkin Elmer Instruments, Lambda 40). Todos los espectros se corrieron contra blancos que contenían el buffer y el ion metálico. Cada experimento se realizó por triplicado para comprobar la reproducibilidad de los resultados. De estos experimentos se obtuvieron los valores máximos de absorbancia y los valores del coeficiente de absorptividad molar (ϵ) a partir de la fórmula $A = \epsilon bc$; donde A es la absorbancia medida, b es la longitud de la celda y c es la concentración del analito. Estos valores se utilizaron para la determinación de constantes de asociación por métodos y simulaciones electroquímicas (Mira *et al.*, 2002).

6.2.2. Estudios electroquímicos

Con el fin de evaluar más profundamente la actividad quelante de los flavonoides de interés para esta investigación, así como el efecto de esta actividad en específico sobre su capacidad antioxidante total, se obtuvieron sus potenciales de oxidación. Para esto se realizaron estudios electroquímicos de la actividad antioxidante de los flavonoides en un medio donde interactuaran con los iones de hierro, utilizando la técnica de voltamperometría cíclica.

Para la determinación de los potenciales de oxidación de los flavonoides, se utilizó una estación de trabajo BAS equipada con un módulo de corriente baja y controlada por una computadora. Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron en una celda de 10 ml equipada con un electrodo de trabajo de carbono, un contra electrodo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. El electrodo de trabajo era pulido en cada corrida con alumina y se lavaba con agua purificada. Los flavonoides se disolvieron en el sistema utilizado para los estudios espectroscópicos, la solución se colocó en la celda electroquímica y se eliminó el oxígeno con un flujo de nitrógeno.

Las voltamperometrias se registraron en ausencia y presencia de las soluciones de iones de hierro a concentraciones desde 10 hasta 100 μM (de diez en diez), en el mismo sistema de amortiguador de acetatos utilizado en el experimento de UV-Visible los experimentos se desarrollaron a una velocidad de 50 mV s^{-1} en un intervalo de potencial de -500 a 900 mV.

6.3. Actividad Antioxidante y reductora de hierro

Para evaluar estas propiedades se estudiaron los mismos flavonoides descritos en el inciso anterior y una mezcla de estos, considerando los porcentajes en que están presentes estos compuestos en dos variedades de frijol común: N8025 y G12892, según lo reportado por Díaz-Batalla *et al.* en el 2006. Se tomó como base 100 mg de frijol. Se analizó su actividad antioxidante y su capacidad reductora de hierro por medio de los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Las concentraciones manejadas fueron, para la variedad N8025: Quercetina, 14.9 μM ; Daidzeína, 50.7 μM ; Kampferol, 8.14 μM ; Genisteína, 0.35 μM ; Acido Ferúlico, 21.57 μM ; Acido Cumárico, 9.44 μM ; Acido Hidroxi-Benzóico, 0.225 μM ; Acido Vainillínico, 24.26 μM ; Coumestrol, 13.27 μM . Y para la variedad G12892: Quercetina, 4.46 μM ; Daidzeína, 4.64 μM ; Kampferol, 11.28 μM ; Genisteína, 1.85 μM ; Acido Ferúlico, 13.54 μM ; Acido Hidroxi-Benzóico, 2.02 μM ; Acido Vainillínico, 15.28 μM ; Coumestrol, 4.25 μM .

6.3.1. Ensayo de actividad secuestradora del DPPH.

Es un método basado en la transferencia de electrones. En este ensayo se trata de la transferencia de un electrón específicamente, entre el antioxidante y el radical estable DPPH que tiene una coloración violeta intensa con un máximo de absorbancia a 520 nm (Huang *et al.*, 2005). Se trabajó utilizando trolox como sustancia antioxidante control, a concentraciones de 50 a 800 μM en un sistema metanólico; así como con las concentraciones en frijol reportadas por Díaz-Batalla *et al* (2006) de los flavonoides quercetina, kampferol, daidzeína y genisteína y de

los ácidos fenólicos ácido ferúlico, vainillínico, coumárico, hidroxibenzóico y de la fitohormona coumestrol. Las reacciones de transferencia se llevaron a cabo en placas con 96 pocillos. Se toma una alícuota de 20 μL de la solución metanólica de los blancos, controles y soluciones de flavonoides y ácidos fenólicos a varias concentraciones y se mezclan con 200 mL de la solución de DPPH en 80% de metanol. Los controles contienen todos los reactivos necesarios para la reacción excepto la solución objeto de estudio. Se monitorearon los cambios en la absorbancia en una cinética de 30 minutos, tomando lectura desde los 0 y cada 10 minutos. La absorbancia fue registrada a 520 nm en un equipo Spectra-Max 190 (Molecular Devices), apoyado en el software SoftMax Pro 5. Cada muestra se evaluó por cuadruplicado en cada placa y se utilizaron tres placas como experimentos independientes para cada técnica. La disminución en la absorbancia es directamente proporcional a la capacidad antioxidante del compuesto a estudiar.

6.3.2. Ensayo de actividad secuestradora del ABTS

Se evaluaron los mismos flavonoides y ácidos fenólicos a las mismas concentraciones descritas para el ensayo de DPPH.

En el caso del ABTS se requiere de generar el catión radical, para lo que se prepara una solución acuosa 7 mM de ABTS y otra, también acuosa pero a una concentración 140 mM de persulfato de potasio; estas dos soluciones se ponen en contacto y se dejan en reposo en ausencia de luz durante 12 horas a temperatura ambiente, pasado este tiempo se obtiene el catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, de esta solución se toman 500 μL y se aforan a 25 mL con etanol, la razón de esta dilución es, que la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ para el experimento debe tener una absorbancia entre 0.7 y 1.0. La reacción se llevó a cabo en una placa con 96 pocillos. Se toman 20 μL de los blancos, controles y muestras en solución metanólica y posteriormente se les agregan 230 mL de la solución etanólica de $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Los cambios en la absorbancia fueron monitoreados siguiendo una cinética de 6 minutos tomando lecturas a los 0 y 6 minutos a una longitud de onda de 734 nm en un equipo Spectra-Max 190 (Molecular Devices). Las muestras se evaluaron por cuadruplicado en una placa, realizándose 3 experimentos independientes cada uno en una placa diferente. Una disminución en la absorbancia está relacionada directamente con la capacidad antioxidante de las muestras (Cano *et al.*, 2002).

6.3.3. Ensayo para la evaluación del poder reductor de hierro (FRAP)

Con esta técnica se evaluaron los mismos flavonoides y ácidos fenólicos de las dos variedades de frijol mencionadas anteriormente.

Para la realización de este ensayo se requiere la preparación de cinco soluciones. La primera de sulfato ferroso en medio metanólico (FeSO_4) la cual se prepara a concentraciones desde 10 a 1000 μM para ser utilizada como control de la capacidad reductora. La segunda solución es de HCl 40 mM en medio acuoso, la tercera de amortiguador de acetatos 300 mM a un pH de 3.6 en medio acuoso, la cuarta de TPTZ (2, 4, 6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM disuelto en la solución de HCl; y la última de FeCl_3 20 mM en solución acuosa. El reactivo de TPTZ junto con la solución de FeCl_3 deben ser preparadas justo antes del ensayo ya que deben estar frescas en ese momento.

Se trabajó con placas de 96 pocillos, Se toman 25 μL de blancos, controles y muestras, todo por cuadruplicado. Posteriormente se prepara la solución FRAP mezclando 10 ml del amortiguador de acetatos, 1 ml de FeCl_3 y 1 ml de solución de TPTZ, en ese orden; la solución FRAP debe estar a 37°C al momento del ensayo y se debe evitar todo contacto con la luz. Se agregan 175 μL de la solución FRAP en los primeros 3 pocillos de cada control y muestra y en el cuarto pocillo de cada una de estas se agregan 175 μL del amortiguador de acetatos como blanco de la reacción.

Se monitorea la absorbancia en los siguientes tiempos: 0, 4, 10, 30 y 60 min a una longitud de onda de 595 nm y ajustando la temperatura a 37 °C en el equipo Spectra-Max 190 (Molecular Devices). Las absorbancias de los blancos a cada tiempo serán restadas a las de las muestras a los mismos tiempos para obtener los cambios de absorbancia. Se hicieron 3 experimentos independientes cada uno en una placa diferente. En este caso un aumento en la absorbancia esta directamente relacionado con la capacidad reductora de hierro de las muestras (Benzie *et al.*, 1996).

6.4. Electro Fenton

Para la evaluación del efecto de la capacidad quelante de hierro sobre la actividad antioxidante total se usó una técnica que permitiera evaluar la capacidad secuestrante de radicales OH^\bullet , que es un radical libre de importancia biológica, en presencia de iones de hierro. Se diseñaron dos metodologías experimentales, en la primera se consideró el uso de FeSO_4 donde los iones de hierro II permanecían en la solución de prueba al igual que el flavonoide. En la segunda metodología se uso una membrana de nafión la cuál contenía anclados los iones de hierro II evitando así el contacto entre el hierro y el flavonoide. Generación de radicales OH^\bullet : la generación electroquímica de H_2O_2 se realizó en una celda de 50 ml equipada con un electrodo de tela de carbono como cátodo y un electrodo de grafito como ánodo en un sistema de amortiguador de sulfatos a pH 3 (40 ml), el medio se saturó con oxígeno durante media hora y después se polarizó por otra media hora aplicando una corriente de 0.03 A y a 3.5 V con una fuente Laboratory DC Power supply GW. Antes de la generación del OH^\bullet se hicieron algunas electrólisis preliminares para evaluar la capacidad de producción de peróxido por parte del sistema a través de la reducción simultánea de oxígeno en el cátodo y la oxidación del agua en el ánodo. La concentración del H_2O_2 generado en la electrólisis se determinó a través de titulaciones espectrofotométricas con oxisulfato de Titanio (IV) a 406 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 Dt Milton Roy.

Se generaron los radicales OH^\bullet en presencia de hierro vía reacción de Fenton al agregar la cantidad necesaria de FeSO_4 para tener una solución 0.02 mM. La actividad antirradical de los flavonoides contra el OH^\bullet generado, fue evaluada a través del consumo de peróxido de hidrógeno. Las soluciones de los flavonoides, mezclas de los flavonoides y de flavonoides con ácidos fenólicos se hicieron de acuerdo a las concentraciones reportadas por Díaz-Batalla *et al* (2006) se agregaron en la celda donde se encontraba el H_2O_2 electroquímicamente generado homogenizando el sistema por medio de agitación, posteriormente se agregó la solución de la sal de hierro para promover la reacción de Fenton y por lo tanto la generación del radical OH^\bullet . La concentración de H_2O_2 se midió por duplicado cada 2 minutos desde el tiempo 0 hasta los 20 minutos y haciendo una última medición a los 40 minutos. Este experimento se llevó a cabo tomando en cuenta la interacción entre el flavonoide y los radicales OH^\bullet , con el hierro presente en forma de la sal de hierro. El segundo experimento se realizó evitando la interacción del hierro con el flavonoide; esto se logra al anclar el hierro, antes del ensayo, a una estructura de nafión, de esta manera el hierro puede catalizar la reacción de Fenton sin influir directamente en la actividad biológica del flavonoide. Este es un punto importante de la investigación ya que en la generación de los radicales libres vía reacción de Fenton, se emplean iones de hierro y la quelación es un factor que puede tener influencia sobre la actividad antioxidante de los flavonoides. De igual forma la actividad antirradical de los flavonoides contra el OH^\bullet generado fue evaluada a través del consumo de peróxido de hidrógeno y su concentración fue medida por duplicado.

7. ANALISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre las los compuestos y las mezclas que simulan las dos variedades de frijol común en los ensayos de actividad antirradical y de electro Fenton.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Estudios de quelación

Se sabe que un espectro característico de flavonoide consiste en dos bandas de absorción, una de ellas localizada entre los 240-285 nm (banda II, Anillo A) y la otra entre los 300-550 nm (banda I, Anillo B) esto dependiendo de las sustituciones de hidroxilos en la estructura de la molécula (Mira *et al.*, 2002; Engelmann *et al.*, 2005).

Los flavonoides estudiados presentaron estos máximos de absorción en la región UV/vis, correspondientes al anillo B (sistema cinamol o banda I) y al anillo A (sistema benzoil o banda II) de la estructura del flavonoide. Las Figuras 5, 6 y 7 presentan los espectros característicos de los seis flavonoides estudiados.

Se observa que la Catequina y la Hesperetina son dos casos en los que sólo se observa el pico de absorción correspondiente a la estructura del anillo A, esto puede explicarse con base en la estructura de estos flavonoides, ya que a diferencia de los demás flavonoides estudiados, la Catequina carece de la estructura 4-oxo en el anillo C, y la Hesperetina posee un sustituyente metilado, lo que puede repercutir en diferentes interacciones con el medio resultando por lo tanto en la aparición de un solo pico.

Las muestras de flavonoides se titularon con soluciones tanto de Fe^{2+} como de Fe^{3+} , partiendo de una solución concentrada 10 mM de estos iones. Al hacer las adiciones de hierro se observaron cambios en el espectro de absorción, lo que sugiere una interacción entre el flavonoide y el ión metálico; esta interacción puede ser un acomplejamiento o una reacción óxido-reducción (Jungbluth *et al.*, 2000).

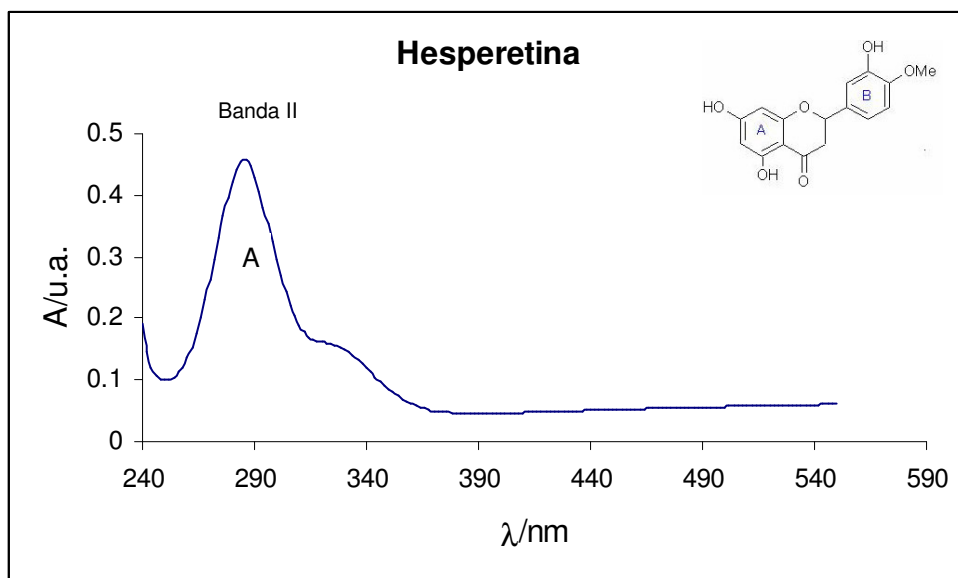
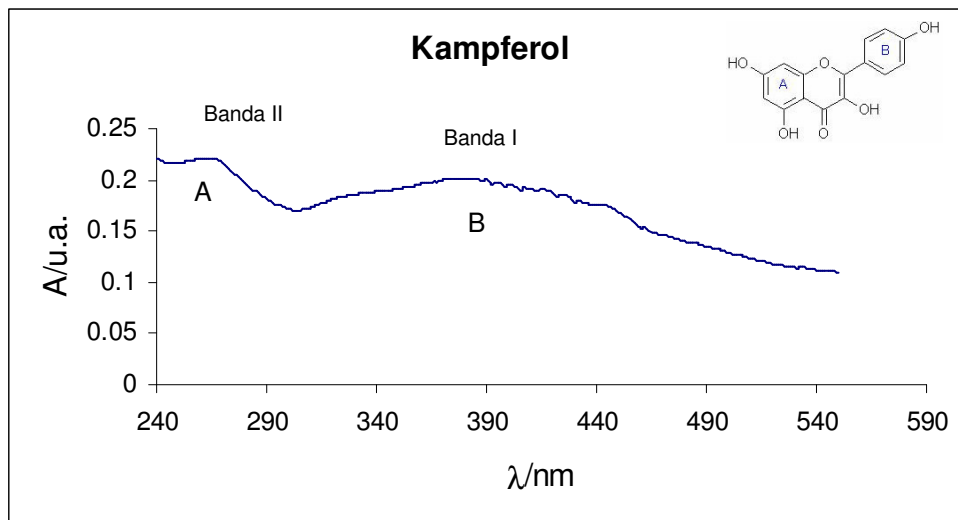


Figura 5. Espectros de absorción de los flavonoides Kampferol y Hesperetina.

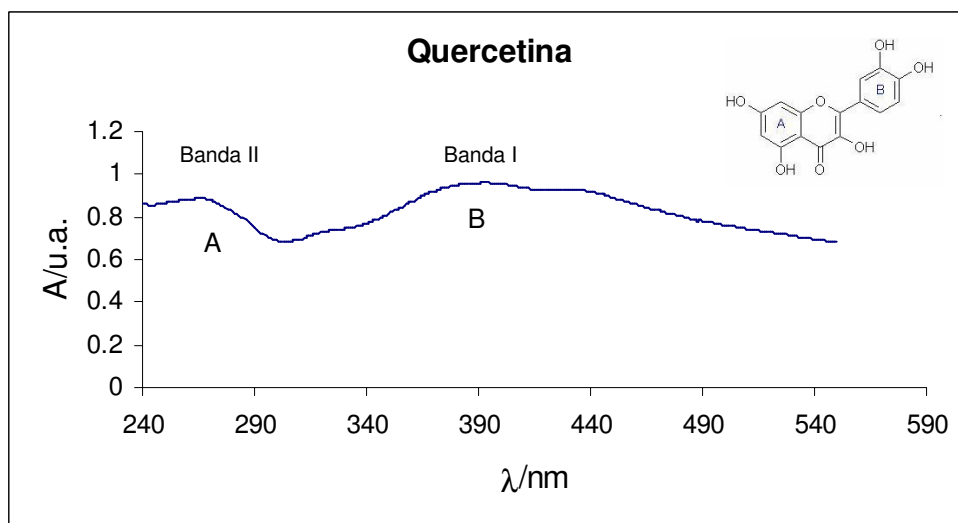
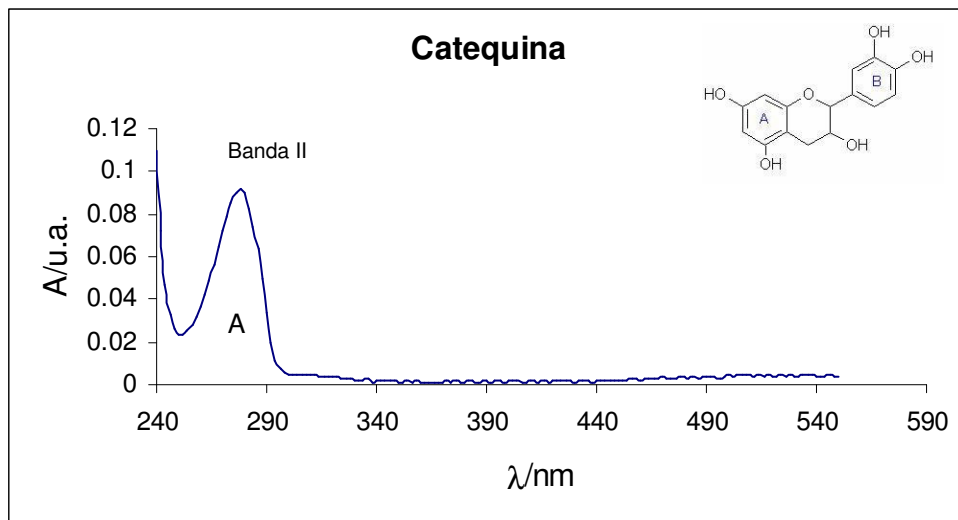


Figura 6. Espectros de absorción de los flavonoides Catequina y Quercetina.

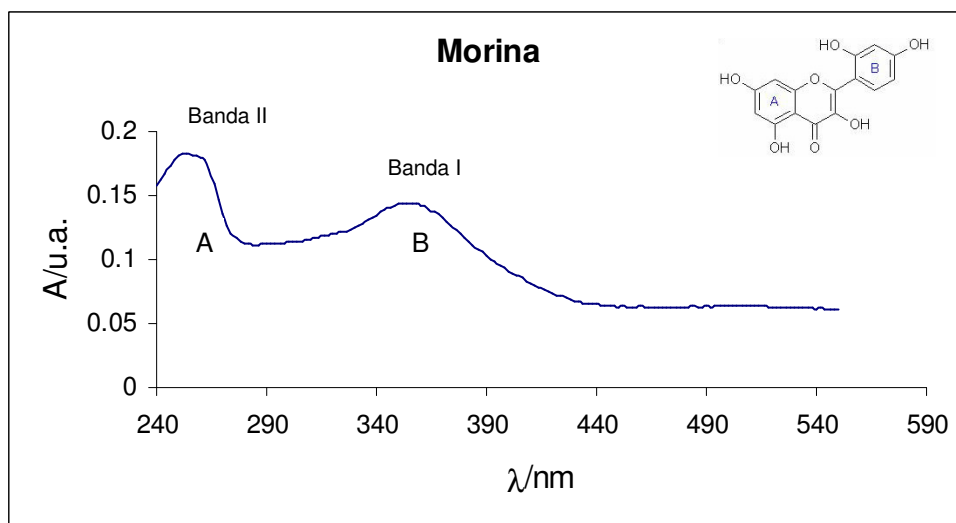
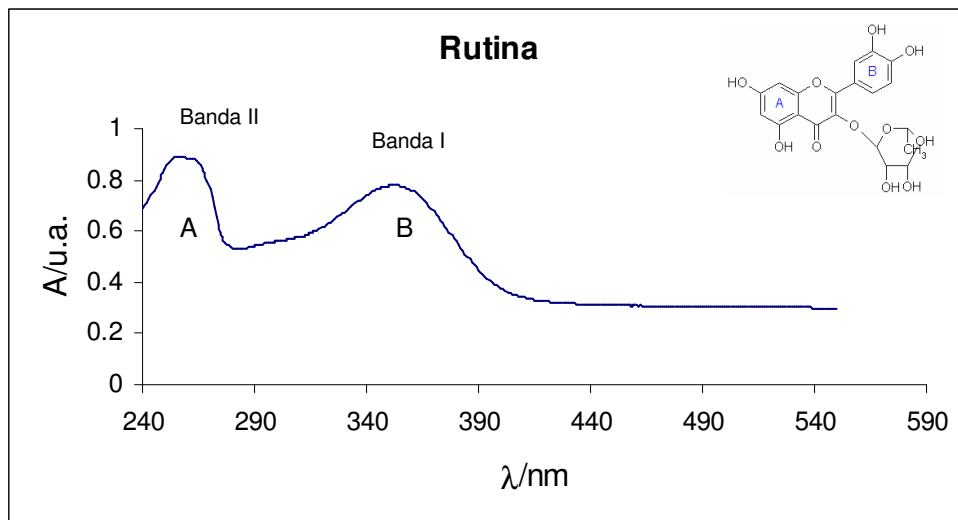


Figura 7. Espectros de absorción de los flavonoides Rutina y Morina.

En la Figura 8 se presenta el espectro de absorción de la Rutina titulada con diferentes concentraciones de Fe^{2+} (20, 40, 60, 80, 100, 300, 600, 1000, 1500 y 2000 μM).

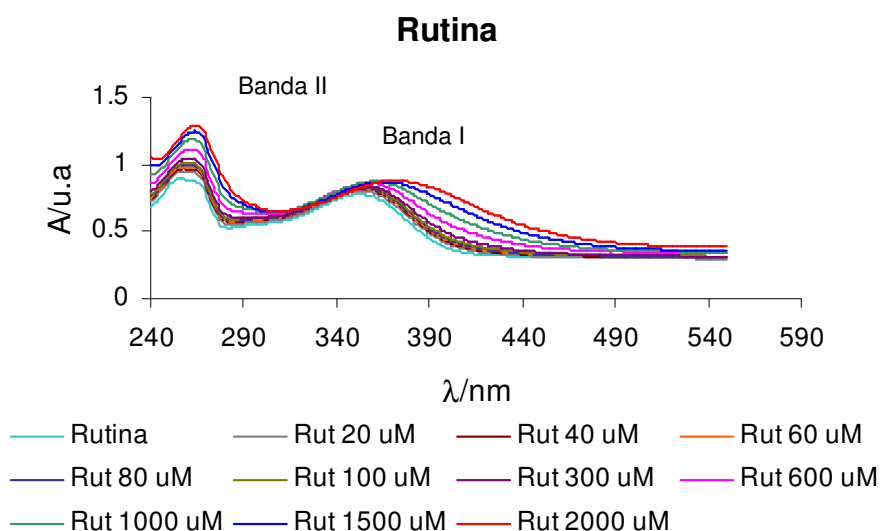


Figura 8. Espectro de absorción de la rutina en ausencia y presencia de Fe^{2+} a diez concentraciones diferentes.

Se puede observar un incremento en la absorbancia conforme aumenta la concentración de hierro, así como un desplazamiento importante en la posición de la banda I de absorción, en donde la máxima absorbancia de la rutina en ausencia del ión ferroso aparece a los 353 nm y en la última adición del ión el máximo se presenta en 383 nm, resultando en un desplazamiento de aproximadamente 30 nm. La Figura 9 presenta el comportamiento de la quercetina cuando iones Fe^{2+} son agregados a la solución. Se observa que este flavonoide también presenta cambios en la absorbancia en presencia de Fe^{2+} , sin embargo no existe un desplazamiento importante en la longitud de onda de sus principales bandas de absorción (≈ 6 y 8 nm respectivamente). En el caso de la quercetina se hicieron sólo nueve adiciones de Fe^{2+} porque al hacer la décima adición (2000 mM) las absorbancias eran demasiado altas debido a que la solución ya estaba saturada

de hierro, por lo que no se observó ningún desplazamiento ni espectro de absorción de interés. En todos los experimentos se restó el blanco que contenía el amortiguador de acetatos y los iones de hierro, para asegurar que los desplazamientos se debieran sólo a la formación de complejos entre flavonoides e iones y que no hubiera interferencia por la absorción de radiación por parte del hierro.

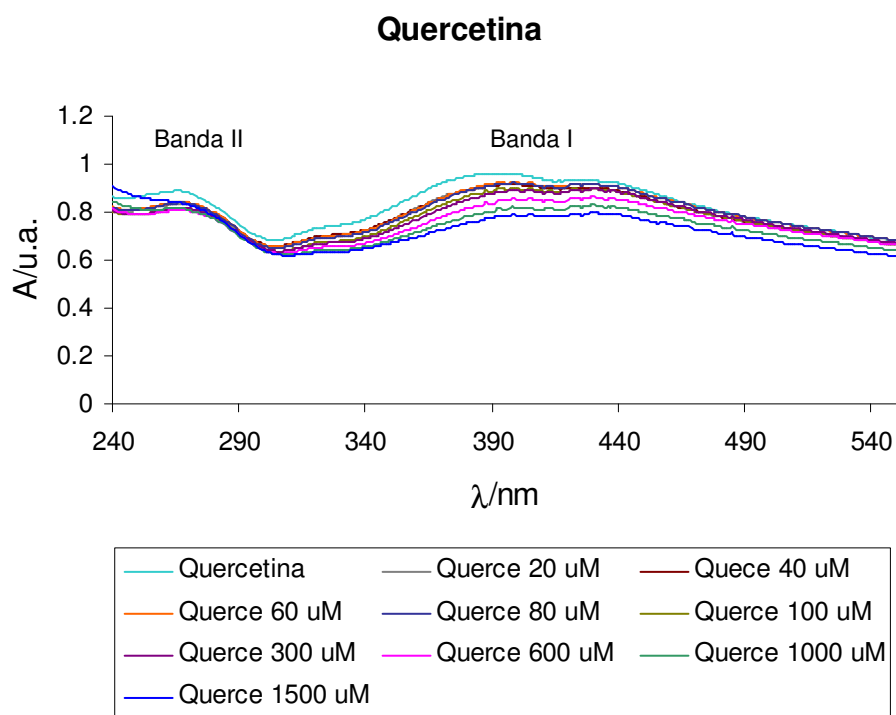


Figura 9. Espectro de absorción de la quercetina en ausencia y presencia de Fe^{2+} a nueve concentraciones diferentes.

Por su parte la Morina, al ser titulada con Fe^{2+} mostró un importante desplazamiento de aproximadamente 54 nm desde 358 nm (en ausencia del ion) hasta 412 nm en la última adición de hierro. No sucede así con el Kampferol, pues las adiciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} no producen un desplazamiento importante. Por otro lado, no se presentan cambios notables en los espectros de absorción de la Rutina, Quercetina y Morina cuando son titulados con Fe^{3+} .

El comportamiento de los flavonoides Catequina y Hesperetina no presenta cambios significativos en los espectros de absorción en presencia de los iones ferroso y férrico, como se puede ver en la Figura 10.

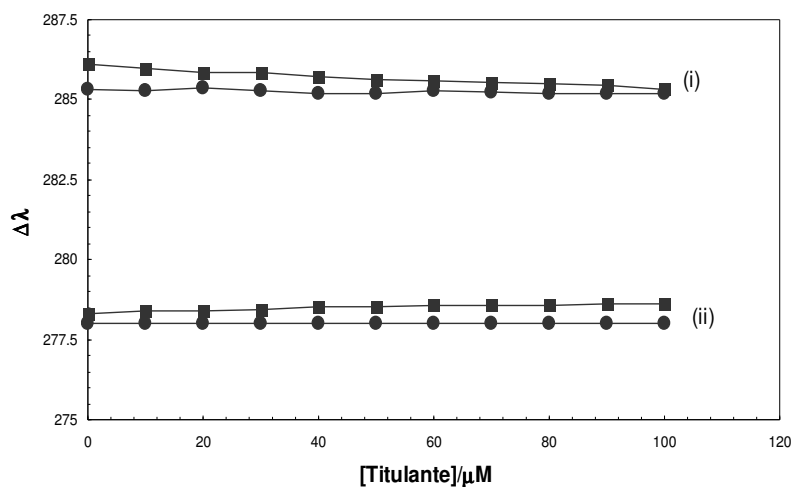


Figura 10. Cambios en la longitud de onda de la banda II de: (i) Hesperetina y (ii) Catequina con respecto a la concentración del titulante: ■ Fe^{2+} y ● Fe^{3+} .

De acuerdo con la Figura 10 se aprecia claramente que la longitud de onda para la banda II de la Hesperetina y Catequina permanece sin cambio conforme aumenta la concentración de Fe^{2+} o Fe^{3+} . El mismo comportamiento se presenta en la absorbancia de dicha banda, aunado a la ausencia de absorción de la banda I en la catequina, ya que en caso de la hesperetina se observa una señal, aunque de muy baja intensidad, la cual permanece constante en presencia de iones de hierro. Este resultado sugiere, de manera preliminar, que no se favorece la formación de complejos entre estos flavonoides y los iones de hierro, a pesar de que la solución de flavonoide permaneció en contacto con el hierro por 15 minutos antes de cada medición.

En el Cuadro 1 se muestran los valores máximos de absorbancia a su respectiva longitud de onda, así como los coeficientes de absortividad molar para cada flavonoide estudiado con la técnica UV-Visible.

Cuadro 1. Valores máximos de absorbancia y coeficientes de absorptividad molar de los flavonoides evaluados.

Flavonoide	Máximo absorbancia (banda I)	Máximo absorbancia (banda II)	Coefficiente de absorptividad molar ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) ($\lambda = 398\text{nm}$)
Quercetina	0.8804, $\lambda = 270$ nm	0.958, $\lambda = 399$ nm	9589
Kampferol	0.2193, $\lambda = 267$ nm	0.1997, $\lambda = 391$ nm	1931
Rutina	0.8827, $\lambda = 261$ nm	0.772, $\lambda = 357$ nm	3873
Morina	0.1818, $\lambda = 256$ nm	0.1436, $\lambda = 358$ nm	2064
Catequina	0.0902, $\lambda = 280$ nm	n.d.	13
Hesperetina	0.4575, $\lambda = 286$ nm	n.d.	464

n.d. = no determinado

Por medio de la Ley de Lambert-Beer se puede determinar la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de un analito, en este caso los flavonoides estudiados; cuando se trabaja con unidades de concentración de molaridad, se utiliza el coeficiente de absorptividad molar (ϵ) este valor es específico para una determinada longitud de onda (λ), por lo que se dice que es dependiente de esta.

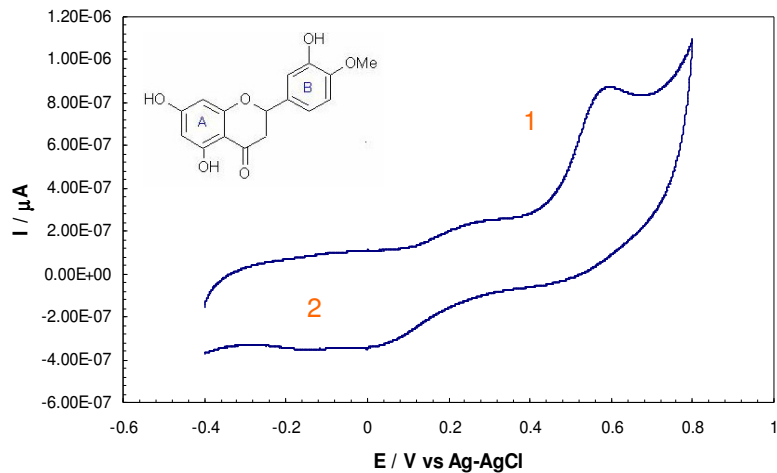
El coeficiente de absorptividad molar es la propiedad característica del ion o molécula en un solvente específico que indica cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada. El valor es independiente de la concentración de la solución y del espesor de la celda en la que se hace la medición espectrofotométrica

De acuerdo con los resultados presentados en el Cuadro 1, se observa que la mayor capacidad de absorción a una longitud de onda de 398 nm (valor arbitrario) la posee la quercetina, y en contraste la catequina absorbe muy poca radiación.

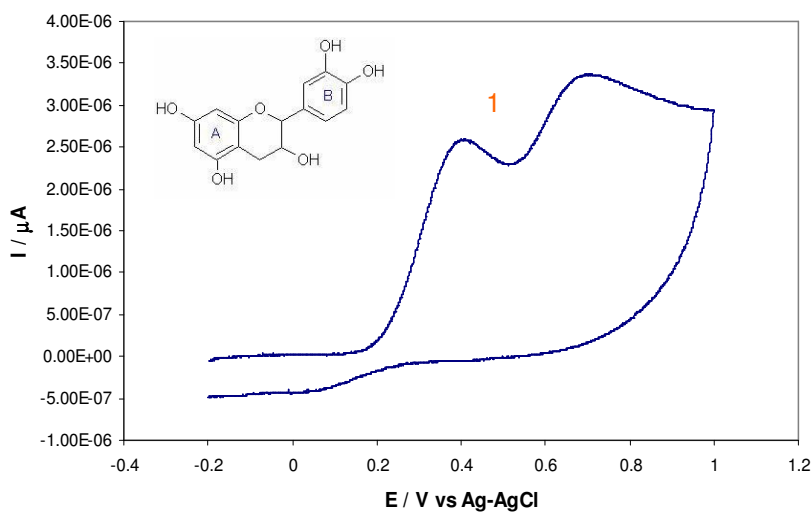
Esto también se relaciona con la estructura de cada flavonoide, pues debido al número y acomodo de los sustituyentes que contienen, su comportamiento ante la radiación monocromática será diferente.

La siguiente etapa de los estudios de quelación consistió en analizar electroquímicamente los flavonoides por medio de la técnica de voltamperometría cíclica, en presencia y ausencia de iones de hierro, Fe^{2+} y Fe^{3+} , en una solución amortiguadora de acetatos (pH 5.5). Los voltamperogramas de los 6 flavonoides estudiados son presentados a continuación.

En las figuras 11, 12 y 13 se observa el comportamiento voltamperométrico de los flavonoides estudiados, aquí se pueden ver los picos de oxidación y de reducción de cada flavonoide estudiado. Estos voltamperogramas arrojan datos como los potenciales de óxido-reducción de una sustancia. Con esta información, se puede saber la capacidad que tiene dicha sustancia para oxidarse o reducirse, es decir, para realizar transferencias de electrones. Esto puede relacionarse directamente con la actividad antioxidante de un compuesto, ya que una capacidad alta de donar electrones puede ser indicativa de un gran potencial antioxidante. En el caso de la Rutina y la Quercetina se observan separaciones de los picos catódicos y anódicos de aproximadamente 85 mV, por la reversibilidad del proceso de óxido-reducción de estos dos compuestos se puede concluir que tienen un mayor potencial antioxidante, ya que tienen una mayor facilidad para intercambiar electrones con su medio. La Hesperetina, Morina y Kampferol presentan un pico anódico notable pero su pico catódico es apenas perceptible por lo que distan mucho de ser procesos reversibles, lo que es indicativo de un menor potencial antioxidante. Por su parte, la Catequina presenta 2 picos intensos en su proceso anódico a 485 y 772 mV, pero en su proceso catódico no presenta señal voltamperométrica, debido muy probablemente también a la ausencia del grupo 4-oxo en el anillo C de su estructura, ya que por esta carencia no se tiene conectividad entre los anillos aromáticos por lo que estos se oxidan de manera independiente.

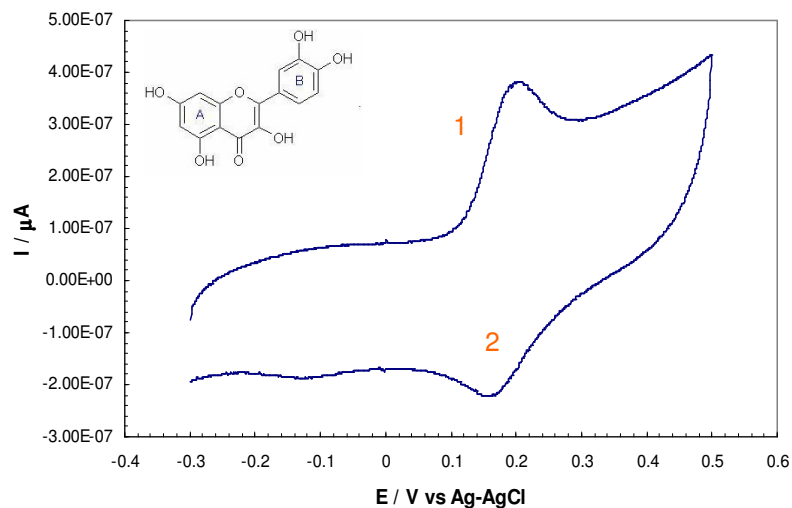


(i)

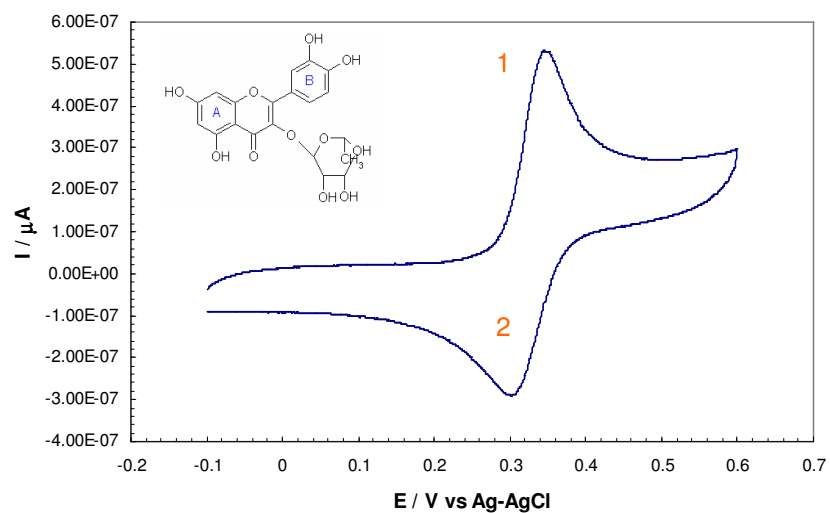


(ii)

Figura 11. Respuesta voltamperométrica en ausencia de hierro de los flavonoides: (i) Hesperetina; (ii) Catequina 100 μM en solución amortiguadora de acetatos pH 5.5. Electrodo de trabajo: carbón vítreo y contraelectrodo: Pt. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 25 $^{\circ}\text{C}$. 1, pico de oxidación (anódico); 2, pico de reducción (catódico).

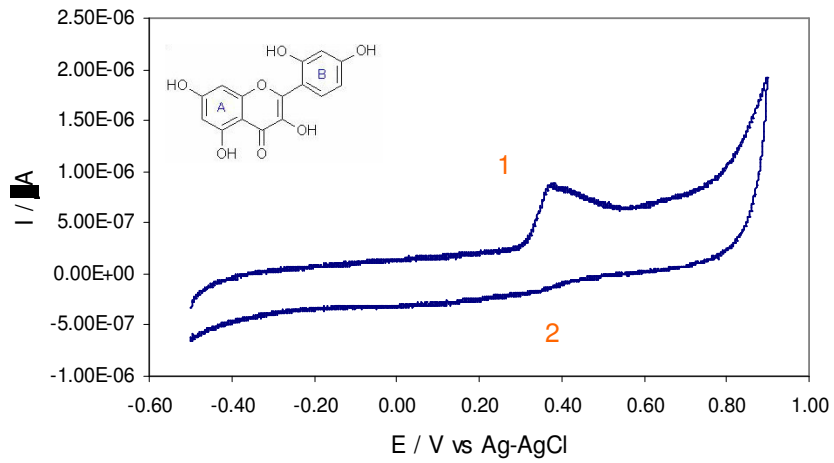


(i)

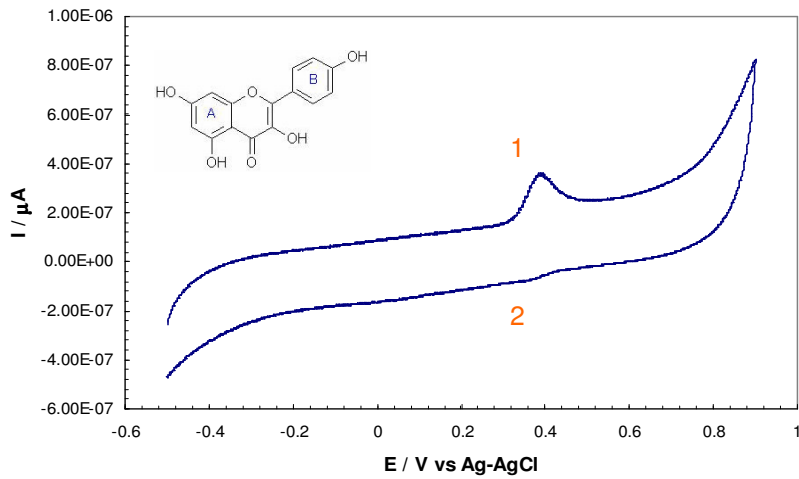


(ii)

Figura 12. Respuesta voltamperométrica en ausencia de hierro de los flavonoides: (i) Quercetina; (ii) Rutina 100 μM en solución amortiguadora de acetatos pH 5.5. Electrodo de trabajo: carbón vítreo y contraelectrodo: Pt. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 25 $^{\circ}\text{C}$. 1, pico de oxidación (anódico); 2, pico de reducción (catódico).



(i)



(ii)

Figura 13. Respuesta voltamperométrica en ausencia de hierro de los flavonoides: (i) Morina; (ii) Kämpferol 100 μM en solución amortiguadora de acetatos pH 5.5. Electrodo de trabajo: carbón vítreo y contraelectrodo: Pt. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 25 $^{\circ}\text{C}$. 1, pico de oxidación (anódico); 2, pico de reducción (catódico).

Los resultados para la Rutina y Quercetina en presencia de Fe^{2+} y Fe^{3+} se presentan en las Figuras 14 y 15.

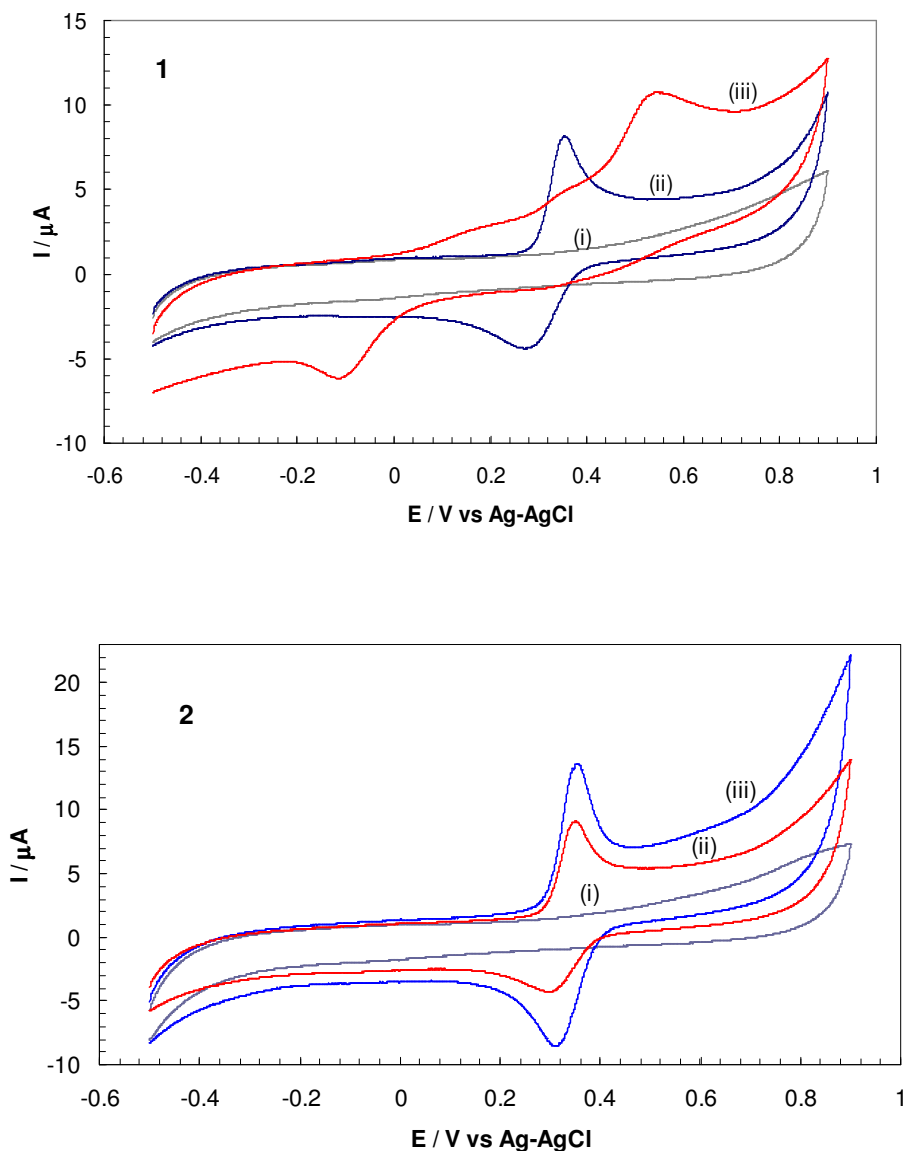


Figura 14. Respuesta voltamperométrica de Rutina $100\mu\text{M}$ en amortiguador de acetatos pH 5.5 en ausencia de iones de hierro 1-ii, 2-ii; en presencia de $\text{Fe}^{2+}100\mu\text{M}$ 1-iii; en presencia de $\text{Fe}^{3+}100\mu\text{M}$ 2-iii. Donde 1-i y 2-i corresponden al buffer de Acetatos pH 5.5 (blanco). Electrodo de trabajo: Carbón vítreo y contraelectrodo: Pt. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

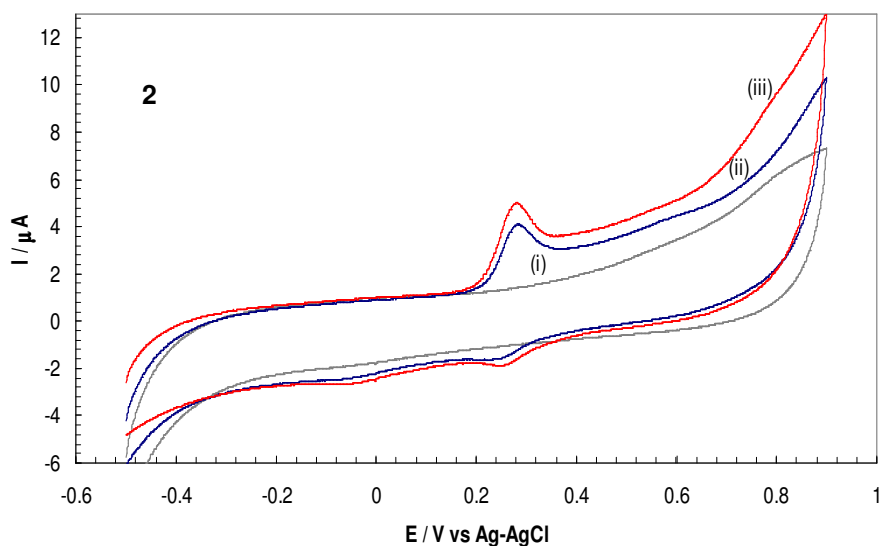
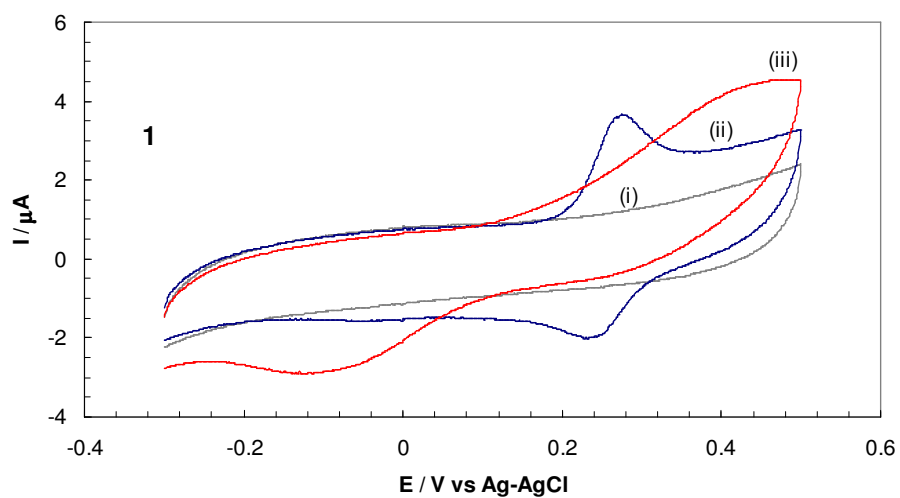


Figura 15. Respuesta voltamperométrica de Quercetina 100μM en buffer de acetatos pH 5.5 en ausencia de iones de hierro 1-ii, 2-ii; en presencia de Fe²⁺100μM 1-iii; en presencia de Fe³⁺100μM 2-iii. Donde 1-i y 2-i corresponden al buffer de Acetatos pH 5.5 (blanco). Electrodo de trabajo: Carbón vítreo y contraelectrodo: Pt. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, 25 °C.

En las Figuras 14 y 15 se pueden observar cambios notables en la respuesta voltamperométrica de los flavonoides en presencia del ion ferroso. Esto sugiere la formación de un complejo entre la molécula del flavonoide y el Fe^{2+} , lo cual se refleja en el importante desplazamiento de la señal de oxidación y la desaparición del pico de reducción para los dos casos (Rutina y Quercetina).

En el caso de la Rutina, en ausencia de hierro, la separación de picos anódico y catódico es de aproximadamente 83 mV; sin embargo, conforme avanza la titulación con Fe^{2+} el pico anódico de la rutina se desplaza hasta 550 mV (alrededor de 200 mV) y la señal de reducción desaparece totalmente, se observa una señal en sentido catódico, pero ésta corresponde al hierro remanente. Por otro lado, cuando la rutina es titulada con Fe^{3+} , la separación de los picos anódico y catódico permanece constante, es decir, no hay desplazamiento del pico de oxidación y se presenta un incremento significativo en la intensidad de corriente. Este comportamiento es el mismo para el caso de la quercetina en ausencia y presencia de los dos iones de hierro.

Para el caso de la Morina y el Kampferol se presentan solamente pequeños desplazamientos de la señal de oxidación y una señal de reducción muy débil, la cual desaparece al hacer las titulaciones con hierro, de igual manera se observa una señal que corresponde al hierro remanente de la titulación. La respuesta electroquímica de la Hesperetina y la Catequina no presenta cambios significativos en su proceso redox en presencia de los dos iones de hierro, ni aumento o disminución de la intensidad de corriente.

Los resultados obtenidos mediante UV-Visible y voltamperometría cíclica, realizando las titulaciones con hierro, revelan la formación de complejos entre la Rutina, Quercetina y Kampferol con Fe^{2+} , ya que con Fe^{3+} no se presentan cambios relevantes con estos flavonoides. La Morina por su parte presenta cambios al ser titulada con ambos iones aunque los desplazamientos más importantes se dan en presencia de Fe^{3+} .

La respuesta de la Catequina y la Hesperetina demuestra que no es favorable la formación de complejos en presencia tanto de Fe^{2+} como de Fe^{3+} . Esto nos indica que los flavonoides que tienen un mayor efecto sobre el Fe^{2+} son, la Rutina, Quercetina y Morina, siendo este último efectivo también contra Fe^{3+} . Contrario a esto se detectó que los flavonoides Catequina y Hesperetina, tienen un efecto muy pobre, incluso casi nulo, contra los iones metálicos.

8.2. Estudios de actividad antioxidante

Por medio de las técnicas para la evaluación de la actividad antioxidante descritas en la metodología se evaluó la actividad antioxidante de cuatro flavonoides y cinco ácidos fenólicos, así como de la mezcla de flavonoides y de ácidos y de la mezcla total (flavonoides + ácidos fenólicos) con base en las concentraciones encontradas en dos variedades de frijol común, N8025 y G12892, descritas por Díaz-Batalla y colaboradores en el 2006.

8.2.1. DPPH

Este ensayo se basa en la medición de la capacidad de los antioxidantes de reducir el radical DPPH \cdot , el cual posee un color púrpura intenso y que al ser reducido pierde su color intenso tornándose en amarillo claro. La pérdida de color del radical se monitorea durante 30 min por espectroscopía a una longitud de onda de 515 nm. Este ensayo proporciona datos sobre el porcentaje de actividad antirradical (ARA) el cual se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%ARA = ((\text{abs control} - \text{abs muestra})/\text{abs control}) * 100$$

En la Figura 16 se presenta una gráfica con las cinéticas de actividad antirradical por el ensayo de DPPH de los flavonoides y ácidos fenólicos evaluados, de las mezclas de flavonoides, de ácidos y la mezcla total para las dos variedades de frijol simuladas, con respecto al tiempo.

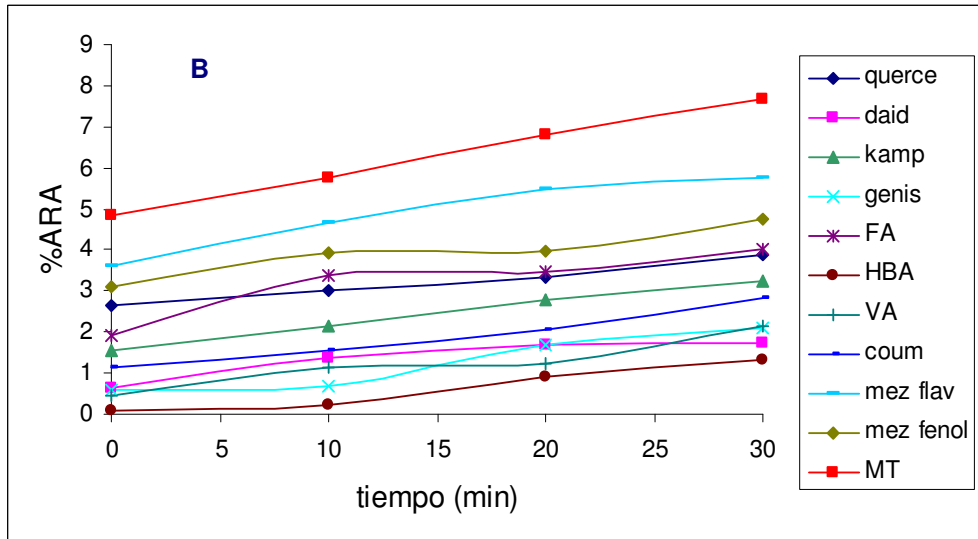
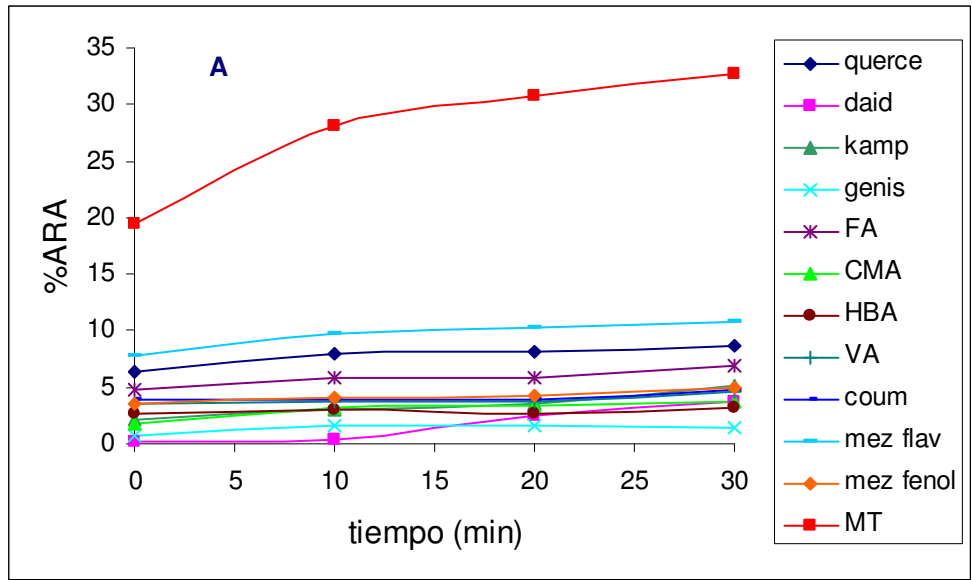


Figura 16. Cinética de los %ARA de los flavonoides, quercetina, daidzeína, kampferol y genisteína; los ácidos fenólicos, ácido ferúlico (FA), ácido cumárico (CMA), ácido hidroxibenzóico (HBA), ácido vainillínico (VA) y coumestrol; y de las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total para las variedades de frijol N8025 (A) y G12892 (B).

Se puede observar que, para ambas variedades de frijol, los compuestos a las concentraciones evaluadas que presentan la actividad antirradical más baja son la genisteína, daidzeína, el ácido cumárico y el ácido hidroxibenzóico. Mientras que la quercetina, el ácido ferúlico y el kampferol, presentan los más altos porcentajes de esta actividad. La mezcla total en ambos casos presenta la mayor actividad antirradical y se puede ver que las mezclas de flavonoides y de ácidos fenólicos tienen una mayor actividad que los compuestos sin mezclar. En los Cuadros 2 y 3 se presentan los porcentajes de actividad antirradical para ambas variedades de frijol evaluadas con el ensayo del DPPH.

En el caso de las mezclas de flavonoides y ácidos fenólicos, se observa que la suma del efecto de los componentes es mayor al efecto logrado por la mezcla, por lo que aquí se puede hablar de un caso de antagonismo. Pero también se observa que al evaluar la mezcla total (flavonoides + ácidos fenólicos), para ambas variedades de frijol, su efecto antirradical es mucho mayor que la suma de las mezclas de flavonoides y ácidos fenólicos por separado, a esto se le llama efecto sinérgico, ya que los efectos se incrementan al mezclar los componentes y se observan actividades que no se presentan en los componentes individuales.

En sistemas de múltiples componentes como es este caso, algunos antioxidantes potencian su actividad mutuamente por medio de efectos cooperativos conocidos como sinergismo (Frankel, 1998; Marinova *et al.*, 2007).

Las diferencias observadas entre las variedades de frijol evaluadas (N8025 y G12892), se podría sugerir son debidas a las diferentes composiciones de éstas como lo reportan Díaz-Batalla y col. en el 2006: por ejemplo, la variedad G12892 carece de ácido cumárico (CMA).

Cuadro 2. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 evaluados por medio de la técnica de DPPH.

Flavonoide	tiempo (min)	ARA	D.E.	Flavonoide	tiempo (min)	ARA	D.E.
Quercetina	0	6.373	0.064	Ac. Hidroxibenzóico	0	2.683	0.051
	10	8.029	0.011		10	3.091	0.017
	20	8.069	0.047		20	2.721	0.036
	30	8.681	0.031		30	3.164	0.006
Daidzeína	0	0.245	0.055	Acido Vainillínico	0	3.564	0.029
	10	0.313	0.029		10	3.761	0.064
	20	2.441	0.047		20	3.693	0.068
	30	3.789	0.018		30	4.618	0.181
Kampferol	0	2.156	0.093	Coumestrol	0	3.904	0.011
	10	3.075	0.011		10	3.809	0.033
	20	3.551	0.047		20	3.922	0.031
	30	5.112	0.041		30	4.765	0.006
Genisteína	0	0.659	0.084	Mezcla Flavonoides	0	7.773	0.073
	10	1.569	0.035		10	9.795	0.023
	20	1.549	0.029		20	10.229	0.044
	30	1.454	0.029		30	10.865	0.018
Acido Ferúlico	0	4.751	0.037	Mezcla Ac Fenolicos	0	3.491	0.011
	10	5.786	0.029		10	4.087	0.042
	20	5.759	0.029		20	4.178	0.018
	30	6.898	0.041		30	4.994	0.011
Acido Cumárico	0	1.692	0.076	Mezcla Total	0	19.446	0.037
	10	3.157	0.011		10	28.099	0.044
	20	3.303	0.024		20	30.713	0.029
	30	3.714	0.031		30	32.723	0.044

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

DE = \pm desviación estándar

Cuadro 3. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 evaluados por medio de la técnica de DPPH.

Flavonoide	tiempo (min)	ARA	D.E.	Flavonoide	tiempo (min)	ARA	D.E.
Quercetina	0	2.656	0.041	Acido Vainillínico	0	0.436	0.006
	10	3.028	0.048		10	1.153	0.024
	20	3.324	0.023		20	1.247	0.017
	30	3.864	0.021		30	2.127	0.024
Daidzeína	0	0.648	0.046	Coumestrol	0	1.139	0.053
	10	1.382	0.023		10	1.569	0.031
	20	1.691	0.024		20	2.058	0.024
	30	1.734	0.053		30	2.841	0.031
Kampferol	0	1.544	0.011	Mezcla Flavonoides	0	3.617	0.031
	10	2.170	0.026		10	4.652	0.017
	20	2.786	0.035		20	5.479	0.027
	30	3.260	0.006		30	5.768	0.017
Genisteína	0	0.594	0.034	Mezcla Ac. Fenol	0	3.104	0.024
	10	0.663	0.033		10	3.926	0.026
	20	1.683	0.048		20	3.987	0.033
	30	2.118	0.024		30	4.740	0.041
Acido Ferúlico	0	1.934	0.037	Mezcla Total	0	4.864	0.024
	10	3.397	0.023		10	5.747	0.047
	20	3.464	0.023		20	6.816	0.024
	30	4.029	0.021		30	7.659	0.035
Ac. Hidroxibenzóico	0	0.108	0.054				
	10	0.221	0.011				
	20	0.908	0.035				
	30	1.311	0.006				

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

DE = \pm desviación estándar

Cuadro 4. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 al minuto 30 evaluados por medio de la técnica de DPPH.

Flavonoide	ARA	
Quercetina	8.681	c
Daidzeína	3.789	h
Kampferol	5.112	e
Genisteína	1.454	j
Acido Ferúlico	6.898	d
Acido Cumárico	3.714	h
Ac Hidroxibenzóico	3.164	i
Acido Vainillínico	4.501	g
Coumestrol	4.765	f
Mezcla Flavonoides	10.865	b
Mezcla Ac Fenólicos	4.994	e
Mezcla Total	32.723	a

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

Los valores representan la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey-Kramer)

Los resultados en el Cuadro 4 indican que las mezclas y la quercetina presentan la mayor actividad antirradical. Los compuestos con la menor capacidad antirradical son el ácido hidroxibenzóico y la genisteína.

Para el caso de la variedad de frijol G12892 (Cuadro 5) los compuestos con mayor capacidad antioxidante determinada con la técnica de DPPH son las tres mezclas, la total, la de flavonoides y la de ácidos fenólicos, seguidas del ácido ferúlico y la quercetina y los de menor capacidad resultaron ser la daidzeína y el ácido hidroxibenzóico.

Cuadro 5. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 al minuto 30 evaluados por medio de la técnica de DPPH.

flavonoide	prom % ARA	
Quercetina	3.864	e
Daidzeína	1.734	i
Kampferol	3.261	f
Genisteína	2.118	h
Acido Ferúlico Ac	4.029	d
Hidroxibenzóico	1.311	j
Acido Vainillínico	2.126	h
Coumestrol	2.841	g
Mezcla Flavonoides	5.767	b
Mez Ac Fenólicos	4.739	c
Mezcla Total	7.659	a

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

Los valores representan la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey-Kramer).

Se obtienen valores mayores de %ARA al evaluar las concentraciones de la variedad N8025 que la G12892. Además, para ambas variedades, N8025 y G12892, podemos hablar de un aditivismo al evaluar las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total; ya que al hacer la comparación de medias con el método de Tukey se observan diferencias significativas entre las mezclas, que tienen la mayor capacidad antioxidante y el resto de los compuestos, especialmente daidzeína, genisteína y ácido hidroxibenzóico que son los que presentan los valores más bajos de porcentaje de actividad antirradical. Se presenta otro caso de sinergismo porque la actividad de la mezcla total es mayor a las actividades de las mezclas de flavonoides y ácidos fenólicos al ser evaluadas por separado.

8.2.2. ABTS

Este ensayo se basa en la capacidad por parte de los antioxidantes de secuestrar al catión radical ABTS^{•+} el cual tiene un color verde intenso, esta coloración disminuye al reaccionar con un antioxidante; por lo que con esta técnica se mide la habilidad de los compuestos para disminuir ese color, al reaccionar directamente con el radical (Prior *et al.*, 2005). En este ensayo los resultados también pueden expresarse como porcentaje de actividad antirradical, utilizando la misma fórmula que para el ensayo del DPPH.

En la figura 17 se presentan las gráficas con las cinéticas de actividad antirradical obtenidas por medio del ensayo del ABTS de los flavonoides y ácidos fenólicos evaluados, así como de las mezclas de flavonoides, de ácidos fenólicos y la mezcla total para las dos variedades de frijol simuladas.

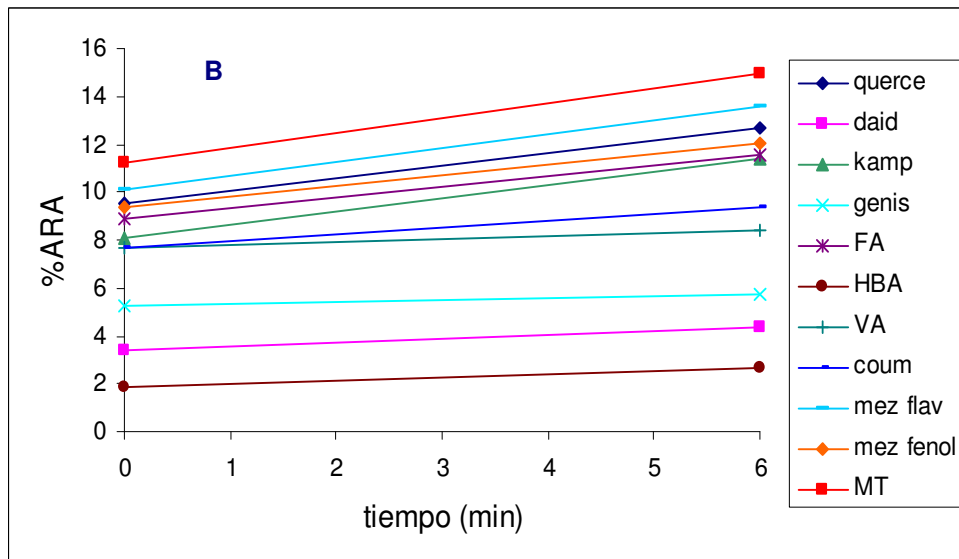
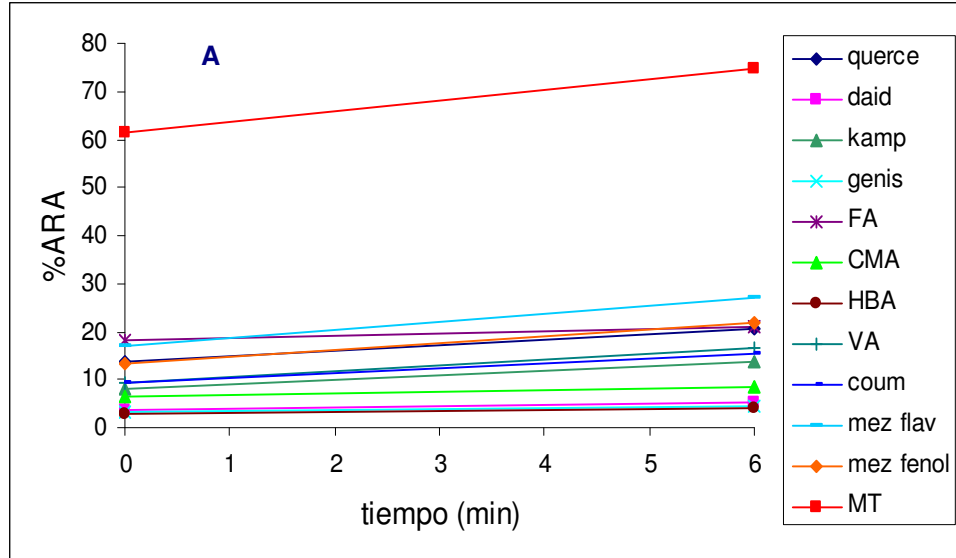


Figura 17. Cinética de los %ARA de los flavonoides, quercetina, daidzeína, kampferol y genisteína; los ácidos fenólicos, ácido ferúlico (FA), ácido cumárico (CMA), ácido hidroxibenzóico (HBA), ácido vainillínico (VA) y coumestrol; y de las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total para las variedades de frijol N8025 (A) y G12892 (B).

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los porcentajes de actividad antirradical para ambas variedades de frijol evaluadas con la técnica del ABTS.

Cuadro 6. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 evaluados por medio de la técnica de ABTS.

Flavonoide	tiempo (min)	ARA	D.E.
Quercetina	0	13.897	0.062
	6	20.673	0.037
Daidzeína	0	3.459	0.044
	6	5.445	0.063
Kampferol	0	8.224	0.044
	6	13.641	0.045
Genisteína	0	3.182	0.054
	6	4.602	0.065
Acido Ferúlico	0	18.349	0.306
	6	21.016	0.021
Acido Cumárico	0	6.665	0.027
	6	8.581	0.072
A. Hidroxibenzóico	0	2.898	0.044
	6	4.079	0.018
Acido Vainillínico	0	9.233	0.235
	6	16.511	0.055
Coumestrol	0	9.328	0.036
	6	15.397	0.031
Mezcla Flavo	0	17.003	0.046
	6	27.135	0.075
Mez Ac Fenolicos	0	13.153	0.027
	6	21.631	0.045
Mezcla Total	0	61.501	0.011
	6	74.626	0.055

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

DE = \pm desviación estándar

Cuadro 7. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 evaluados por medio de la técnica de ABTS.

Flavonoide	tiempo (min)	ARA	D.E.
Quercetina	0	9.571	0.082
	6	12.706	0.031
Daidzeína	0	3.364	0.071
	6	4.341	0.044
Kampferol	0	8.088	0.061
	6	11.411	0.071
Genisteína	0	5.223	0.017
	6	5.749	0.061
Acido Ferúlico	0	8.925	0.011
	6	11.556	0.053
Ac. Hidroxibenzóico	0	1.824	0.017
	6	2.681	0.026
Acido Vainillínico	0	7.704	0.021
	6	8.431	0.031
Coumestrol	0	7.704	0.061
	6	9.339	0.035
Mezcla Flavonoides	0	10.081	1.036
	6	13.545	0.026
Mezcla Ac. Fenol	0	9.389	0.062
	6	12.055	0.035
Mezcla Total	0	11.231	0.096
	6	14.936	0.044

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

DE = \pm desviación estándar

Por la naturaleza del ensayo, se observan %ARA mayores con el ABTS que con el DPPH; y de igual manera que con el ensayo anterior se observan mayores %ARA para las concentraciones del frijol N8025, que para las de la variedad G12892. El DPPH es un radical de nitrógeno de larga vida en comparación con otros radicales, por lo que muchas sustancias que reaccionan rápidamente con otro tipo de radicales, pueden reaccionar muy lentamente e incluso ser inertes con el DPPH (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005).

Cuadro 8. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol N8025 al minuto 6 evaluados por medio de la técnica de ABTS.

Flavonoide	ARA	
Quercetina	20.673	e
Daidzeína	5.445	j
Kampferol	13.641	h
Genisteína	4.602	k
Acido Ferúlico	21.016	d
Acido Cumárico	8.581	i
Ac		
Hidroxibenzóico	4.079	l
Acido Vainillínico	16.511	f
Coumestrol	15.397	g
Mezcla Flavonoides	27.135	b
Mez Ac Fenólicos	21.631	c
Mezcla Total	74.626	a

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

Los valores representan la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey-Kramer).

Para el frijol N8025 los resultados del Cuadro 8 nos revelan que los mayores porcentajes de actividad antirradical los presentan las tres mezclas, la de flavonoides, la de ácidos fenólicos y la mezcla total y los porcentajes más bajos son los de la genisteína y el ácido hidroxibenzóico. Los compuestos evaluados individualmente que presentaron la mayor actividad antirradical fueron el ácido ferúlico y la quercetina.

Cuadro 9. Porcentajes de Actividad Antirradical para los compuestos fenólicos del frijol G12892 al minuto 6 evaluados por medio de la técnica de ABTS.

Flavonoide	ARA
Quercetina	12.706 c
Daidzeína	4.341 i
Kampferol	11.411 f
Genisteína	5.749 h
Acido Ferúlico	11.556 e
Ac Hidroxibenzóico	2.681 j
Acido Vainillínico	8.431 g
Coumestrol	8.377 g
Mezcla Flavonoides	13.545 b
Mez Ac Fenólicos	12.055 d
Mezcla Total	14.936 a

ARA = El promedio de la actividad antioxidante con respecto al control

Los valores representan la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey-Kramer).

Para la variedad de frijol G12892 se tiene que de los compuestos evaluados, los que tienen la mayor capacidad antirradical son la mezcla total, mezcla de flavonoides, quercetina y mezcla de ácidos fenólicos y los de menor capacidad resultaron ser la daidzeína y el ácido hidroxibenzóico (Cuadro 9).

Al igual que en el caso de los resultados obtenidos por el ensayo de DPPH se observa un efecto sinérgico, para ambas variedades de frijol, al evaluar la mezcla total, ya que la suma de los efectos de la mezcla de flavonoides y de la de ácidos fenólicos es menor al efecto ejercido por la mezcla total. Nuevamente, los compuestos con mayor actividad al ser evaluados por separado son la Quercetina, el Kampferol y Acido Ferúlico.

8.2.3. FRAP

Este ensayo fue desarrollado por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor en plasma, aunque posteriormente se adaptó para ser usado para evaluar antioxidantes botánicos. Con este ensayo se mide la habilidad de las sustancias para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} y este último se determina por espectrofotometría a través de la formación de un complejo color azul intenso con la 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). El poder reductor parece estar relacionado con el grado de hidroxilación y de conjugación en los polifenoles (Pulido *et al.*, 2000). En la figura 18 se presentan las gráficas con las cinéticas obtenidas por medio del ensayo de FRAP de los flavonoides y ácidos fenólicos evaluados, y también de las mezclas de flavonoides, de ácidos fenólicos y la mezcla total para las dos variedades de frijol simuladas.

Se observan casi los mismos comportamientos que con los dos ensayos anteriores. Los compuestos que presentan el mayor poder reductor son quercetina, ácido ferúlico y kampferol, así como las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total, siendo estas las que presentan la mayor capacidad reductora sobresaliendo sobre todas la mezcla total. Con este ensayo se observa el mismo efecto sinérgico notado con los dos ensayos anteriores, ya que al evaluar la mezcla total se obtiene un efecto significativamente mayor que el que se obtiene al sumar los efectos de la mezcla de flavonoides y la mezcla de ácidos fenólicos al ser evaluadas por separado.

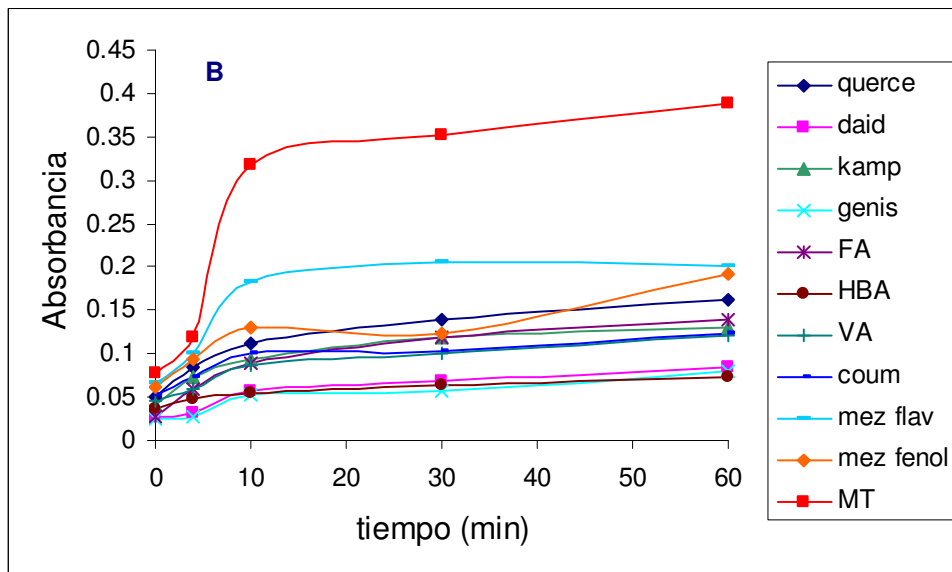
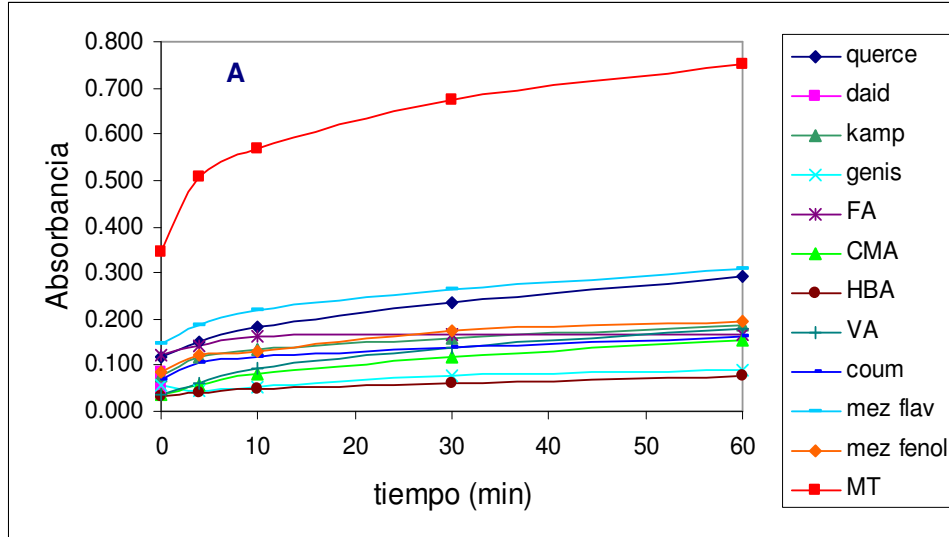


Figura 18. Cinética de las absorbancias de los flavonoides, quercetina, daidzeina, kampferol y genisteína; los ácidos fenólicos, ácido ferúlico (FA), ácido cumárico (CMA), ácido hidroxibenzóico (HBA), ácido vainillínico (VA) y coumestrol; y de las mezclas de flavonoides, ácidos fenólicos y mezcla total para las variedades de frijol N8025 (A) y G12892 (B) obtenidos por el ensayo de FRAP.

En los Cuadros 10 y 11 se presentan los valores de absorbancia de los compuestos y mezclas evaluadas por el ensayo de FRAP para el frijol N8025 y G12892 respectivamente.

Cuadro 10. Valores de absorbancias para los compuestos fenólicos del frijol N8025 evaluados por medio de la técnica de FRAP.

Flavonoide	tiempo (min)	Absorbancia	D.E.	Flavonoide	tiempo (min)	Absorbancia	D.E.
Quercetina	0	0.117	0.0001	Ac. Hidroxibenzóico	0	0.032	0.0001
	4	0.152	0.0002		4	0.042	0.0003
	10	0.185	0.0002		10	0.048	0.0003
	30	0.237	0.0002		30	0.060	0.0002
	60	0.291	0.0001		60	0.075	0.00005
Daidzeína	0	0.039	0.0003	Acido Vainillínico	0	0.036	0.0001
	4	0.050	0.0001		4	0.062	0.0002
	10	0.059	0.0002		10	0.092	0.0003
	30	0.070	0.0002		30	0.140	0.0001
	60	0.084	0.0001		60	0.180	0.0002
Kampferol	0	0.076	0.0001	Coumestrol	0	0.068	0.0002
	4	0.120	0.0003		4	0.104	0.0001
	10	0.133	0.0001		10	0.118	0.0002
	30	0.159	0.0002		30	0.138	0.0001
	60	0.187	0.0002		60	0.161	0.0001
Genisteína	0	0.055	0.0001	Mezcla Flavonoides	0	0.146	0.0003
	4	0.045	0.0001		4	0.189	0.0001
	10	0.053	0.0001		10	0.218	0.0001
	30	0.078	0.0003		30	0.263	0.0002
	60	0.091	0.0002		60	0.310	0.0002
Acido Ferúlico	0	0.123	0.0003	Mezcla Ac. Fenol	0	0.085	0.0002
	4	0.143	0.0001		4	0.123	0.0003
	10	0.162	0.0002		10	0.131	0.0002
	30	0.165	0.0002		30	0.174	0.0002
	60	0.165	0.0002		60	0.196	0.0002
Acido Cumárico	0	0.037	0.0003	Mezcla Total	0	0.345	0.0002
	4	0.058	0.0001		4	0.508	0.0001
	10	0.080	0.0003		10	0.570	0.0002
	30	0.119	0.0003		30	0.675	0.0001
	60	0.155	0.0002		60	0.750	0.0001

Absorbancia = El promedio de la absorbancia con respecto al control

DE = \pm desviación estándar

Cuadro 11. Valores de absorbancia para los compuestos fenólicos del frijol G12892 evaluados por medio de la técnica de FRAP.

Flavonoide	tiempo (min)	Absorbancia	D.E.	Flavonoide	tiempo (min)	Absorbancia	D.E.
Quercetina	0	0.05	0.0001	Acido Vainillínico	0	0.046	0.0001
	4	0.084	0.0002		4	0.059	0.0001
	10	0.111	0.0002		10	0.087	0.0002
	30	0.139	0.0001		30	0.101	0.0003
	60	0.163	0.0001		60	0.121	0.0001
Daidzeína	0	0.027	0.0001	Coumestrol	0	0.052	0.0001
	4	0.031	0.00005		4	0.072	0.0001
	10	0.058	0.0003		10	0.101	0.0006
	30	0.068	0.0002		30	0.103	0.0002
	60	0.085	0.0002		60	0.123	0.0001
Kampferol	0	0.041	0.0001	Mezcla Flavonoides	0	0.067	0.0001
	4	0.073	0.0002		4	0.101	0.00005
	10	0.093	0.0001		10	0.183	0.0001
	30	0.119	0.0002		30	0.205	0.0048
	60	0.131	0.0005		60	0.202	0.0001
Genisteína	0	0.024	0.0002	Mezcla Ac. Fenol	0	0.061	0.0002
	4	0.027	0.0002		4	0.093	0.0003
	10	0.052	0.0002		10	0.131	0.0001
	30	0.056	0.0003		30	0.123	0.0727
	60	0.079	0.00005		60	0.193	0.0001
Acido Ferúlico	0	0.028	0.00005	Mezcla Total	0	0.078	0.0003
	4	0.059	0.0001		4	0.119	0.0002
	10	0.09	0.0002		10	0.318	0.0002
	30	0.119	0.0001		30	0.352	0.0001
	60	0.139	0.0001		60	0.389	0.0042
Acido Hidroxibenzóico	0	0.037	0.0001				
	4	0.047	0.0002				
	10	0.055	0.0003				
	30	0.063	0.0004				
	60	0.073	0.0002				

Absorbancia = El promedio de la absorbancia con respecto al control

DE = \pm desviación estándar

En estas tablas se pueden observar con más detalle las diferencias entre los compuestos y mezclas evaluados, así como el desarrollo de su poder reductor de hierro a través del tiempo, observándose cambios más rápidos y notables con la quercetina, kampferol y ácido ferúlico y con la mezcla de flavonoides y mezcla total. Esta última en ambas variedades de frijol presenta las absorbancias más grandes por lo que es la que tiene el mayor poder reductor de entre todos los compuestos evaluados.

Cuadro 12. Valores equivalentes de FeSO₄ (μM) para los compuestos fenólicos del frijol N8025 al minuto 60, evaluados por medio de la técnica de FRAP.

Flavonoide	eq FeSO ₄	
Quercetina	177.946	c
Daidzeína	45.258	k
Kampferol	115.202	d
Genisteína	37.029	j
Acido Ferúlico	120.345	f
Acido Cumárico	43.201	h
Ac Hidroxibenzóico	44.229	l
Acido Vainillínico	114.174	e
Coumestrol	95.659	g
Mezcla Flavonoides	168.689	b
Mezcla Ac. Fenólicos	148.117	i
Mezcla Total	415.552	a

Los valores representan la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey-Kramer).

En el Cuadro 12 se observa que los compuestos del frijol N8025 que, al ser evaluados con la técnica de FRAP, presentaron valores mayores de equivalentes de FeSO₄ fueron la mezcla total, la mezcla de flavonoides y la quercetina. Y por otro lado los que presentaron los valores más bajos de equivalentes fueron la daidzeína y el ácido hidroxibenzóico.

Para el caso de la variedad de frijol G12892 (Cuadro 13), los compuestos que presentaron los valores más altos de equivalentes de FeSO₄ fueron la mezcla total, la mezcla de flavonoides y la mezcla de ácidos fenólicos y los valores más bajos fueron los correspondientes a la genisteína y al ácido hidroxibenzóico. Con esta técnica existen diferencias significativas, en ambas variedades de frijol, entre los valores más altos y más bajos, al hacer la comparación de medias por el método de Tukey-Kramer.

Cuadro 13. Valores equivalentes de FeSO₄ (μM) para los compuestos fenólicos del frijol G12892 al minuto 60, evaluados por medio de la técnica de FRAP.

Flavonoide	eq FeSO ₄
Quercetina	168.346 d
Daidzeína	87.636 h
Kampferol	135.225 f
Genisteína	82.253 i
Acido Ferúlico	143.351 e
Ac Hidroxibenzóico	75.327 j
Acido Vainillínico	125.351 g
Coumestrol	127.202 g
Mezcla Flavonoides	208.736 b
Mez Ac Fenólicos	199.204 c
Mezcla Total	400.123 a

Los valores representan la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey-Kramer).

Como la actividad antioxidante de una sustancia es comúnmente correlacionada directamente con su capacidad reductora, el ensayo de FRAP nos puede dar datos confiables sobre la actividad antioxidante de diversos compuestos. Se ha reportado que con este ensayo la absorbancia permanece sin cambios en presencia de plasma después de 4 minutos a una temperatura de 37 °C (Benzie y Strain, 1996). Sin embargo, en nuestros experimentos se observó que la absorbancia continuó incrementándose aún después de 4 minutos en presencia de los flavonoides y compuestos fenólicos.

Esto se ha reportado de igual manera en otros estudios (Pulido *et al.*, 2000; Firuzi *et al.*, 2004). Es por esto que se definió el minuto 60 como punto final de la cinética.

Con las tres técnicas se observó que tanto los porcentajes de actividad antirradical como los valores de equivalentes de sulfato ferroso, en el caso de la técnica de FRAP, presentaron diferencias dependientes de la variedad de frijol. Para algunas sustancias una mayor concentración no siempre significó una actividad alta y en otros casos aunque la concentración fuera muy baja se observaban actividades altas. Esto quiere decir que la actividad antirradical y la actividad reductora dependen de la concentración del sustrato evaluado; ya que para algunas sustancias las concentraciones más bajas eran las indicadas para ejercer mejor su poder antirradical como se puede ver en el caso de los ácidos fenólicos y la mezcla de estos para la variedad G12892, que es la que contiene las sustancias estudiadas en menor concentración.

Los diferentes niveles de actividad antioxidante obtenidos por los tres ensayos utilizados reflejan que los fenoles, nuestros compuestos antioxidantes, tienen diferentes habilidades para secuestrar y reducir al ABTS^{•+} y al DPPH y para reducir los iones de hierro en el ensayo de FRAP, esto también se ha informado en otros estudios en donde se han evaluado extractos de frutas y vegetales con estos ensayos (Nilsson *et al.*, 2005; Thaipong *et al.*, 2006). El ABTS^{•+} reacciona rápidamente con los antioxidantes por lo que se obtuvieron valores más altos de actividad antirradical con este ensayo que con el de DPPH, además el ABTS^{•+} tiene la ventaja de no verse afectado por la fuerza iónica y puede ser usado en un amplio intervalo de pH (Prior *et al.*, 2005). Por su parte el ensayo de FRAP fue el que mostró la mayor reproducibilidad, lo cual se refleja en los bajos valores de desviación estándar, aunque en general los resultados de los tres ensayos mostraron una gran reproducibilidad. Los tres ensayos usados en este estudio tienen la ventaja de ser fáciles y rápidos de realizar.

8.3. Electro Fenton

Antes de realizar las pruebas con la reacción de Fenton, se realizaron experimentos electrolíticos para estandarizar y conocer la concentración máxima de H_2O_2 generada en el sistema utilizado. Se obtuvieron los siguientes resultados.

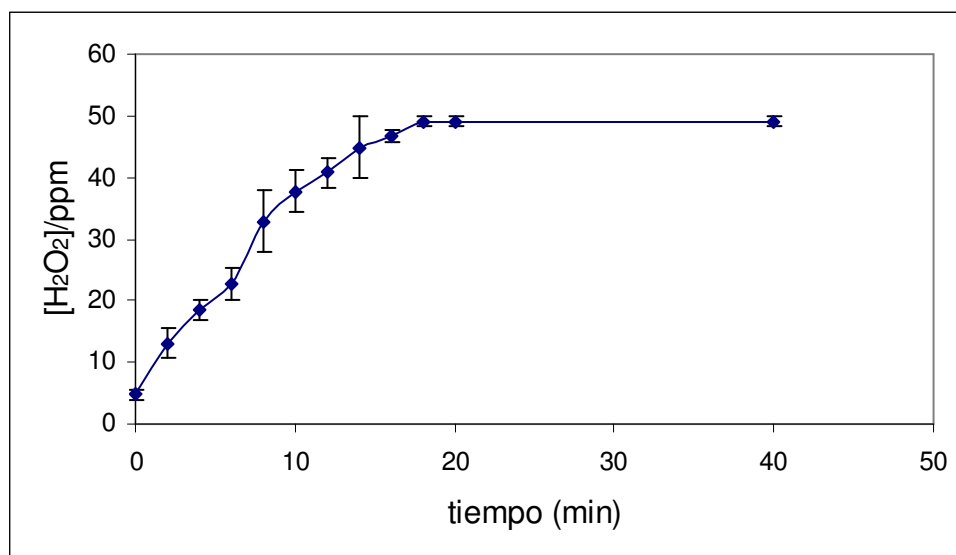


Figura 19. Generación electroquímica de H_2O_2 (ppm) a través del tiempo.

Cátodo: electrodo de tela de carbono; ánodo: electrodo de grafito. Sistema de amortiguador de sulfatos a pH 3. Corriente: 0.03 A; voltaje: 3.5 V

En este estudio se analizó la capacidad del sistema para generar H_2O_2 electroquímicamente por medio de la reducción de O_2 en el electrodo de tela de carbón; se tomaron muestras de la solución cada 2 minutos partiendo del minuto cero hasta los 20 minutos y a los 40 minutos. Se determinó la concentración del peróxido acumulado por espectrofotometría en ausencia de flavonoide y de Fe^{2+} . La Figura 19 muestra la concentración del H_2O_2 generado electroquímicamente en función del tiempo. Esta curva corresponde a un ensayo en el que la densidad de corriente catódica aplicada por 60 minutos fue $i = 0.035 \text{ A/cm}^2$. La concentración de peróxido se incrementó durante los primeros 15 minutos de la electrólisis y después se elevó hasta alcanzar el valor constante de 49.11 ppm.

Peralta-Hernández *et al.* (2006) explican que la forma de la curva es el resultado del equilibrio entre la producción y la descomposición de H_2O_2 . Este estado estacionario permite conocer la concentración constante del peróxido.

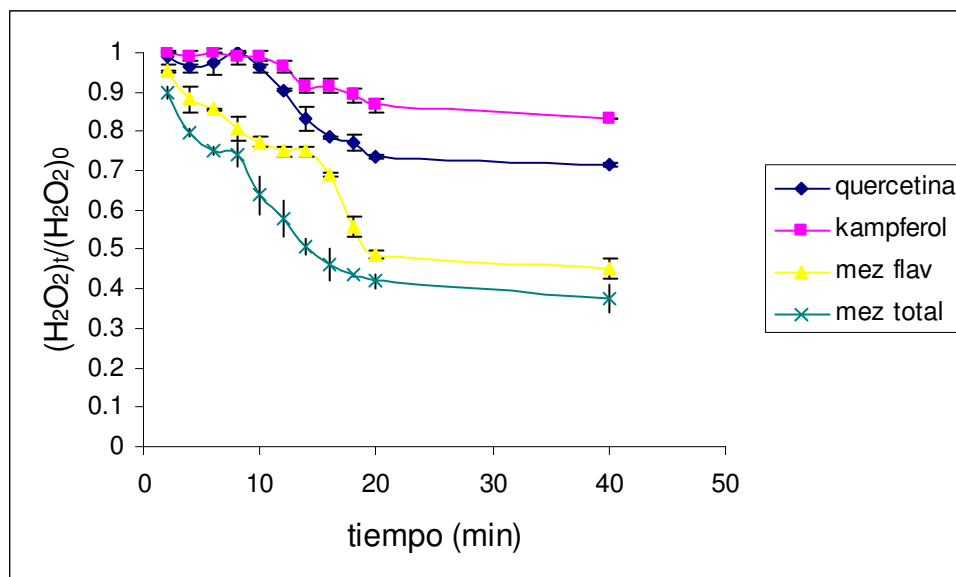


Figura 20. Cinética de reacción entre el H_2O_2 y los flavonoides Kampferol y Quercetina y las mezclas de flavonoides y mezcla total.

Después de alcanzar una concentración constante de H_2O_2 , se agregó a la celda electroquímica la cantidad necesaria de los compuestos fenólicos a evaluar, tal que se tuvieran en solución las concentraciones de estos compuestos y de las mezclas como las reportadas por Díaz-Batalla *et al.* (2006). Los resultados sugieren que la Quercetina y el Kampferol reaccionan con el H_2O_2 ya que disminuye la concentración de éste (Figura 20). Lo mismo se observó cuando se evaluó la mezcla de flavonoides constituida por Quercetina, Daidzeína, Kampferol y Genisteína; y para la mezcla total constituida por los flavonoides mencionados más los siguientes ácidos fenólicos: Ferúlico, Cumárico, Hidroxibenzóico, Vainillínico y la fitohormona Coumestrol, todos a las concentraciones reportadas por Díaz-Batalla *et al.* (2006).

Adicionalmente, se observa que la adición de ácidos fenólicos no disminuye sustancialmente la concentración de H_2O_2 lo cual nos sugiere que estos reaccionan poco con el peróxido.

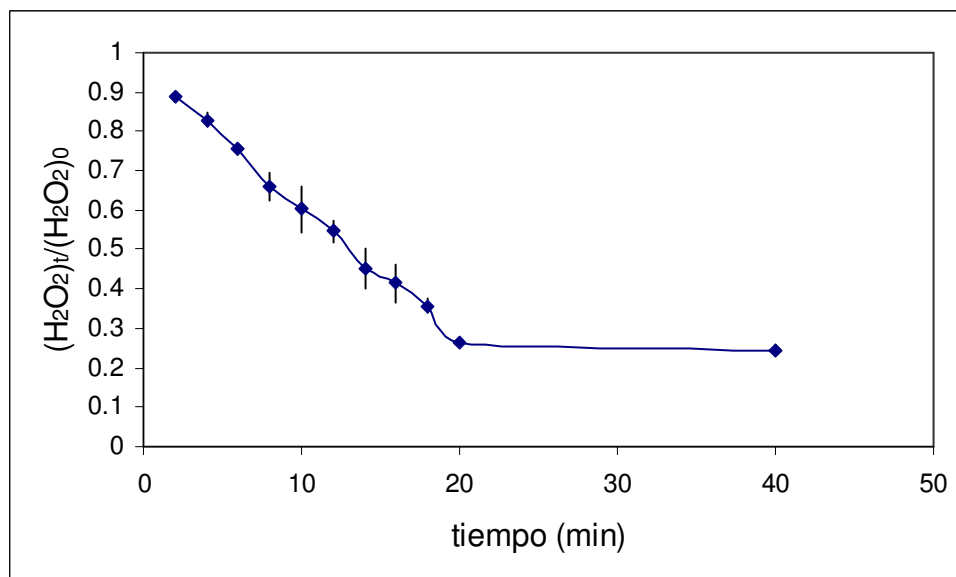
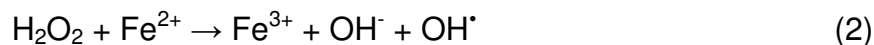
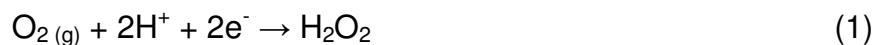


Figura 21. Generación electroquímica de OH^\bullet a través del tiempo mediante la reacción de Fenton utilizando FeSO_4 .

La generación electroquímica *in situ* de OH^\bullet , mediante la reacción de Fenton se basa en la reducción del oxígeno disuelto en medio ácido (reacción 1) y la descomposición catalítica del peróxido de hidrógeno en presencia del ión ferroso (reacción 2).



En la Figura 21 se observa la descomposición catalítica del H_2O_2 por el FeSO_4 . Al alcanzar las concentraciones constantes de H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} , se agregaron los flavonoides y las mezclas objeto de estudio.

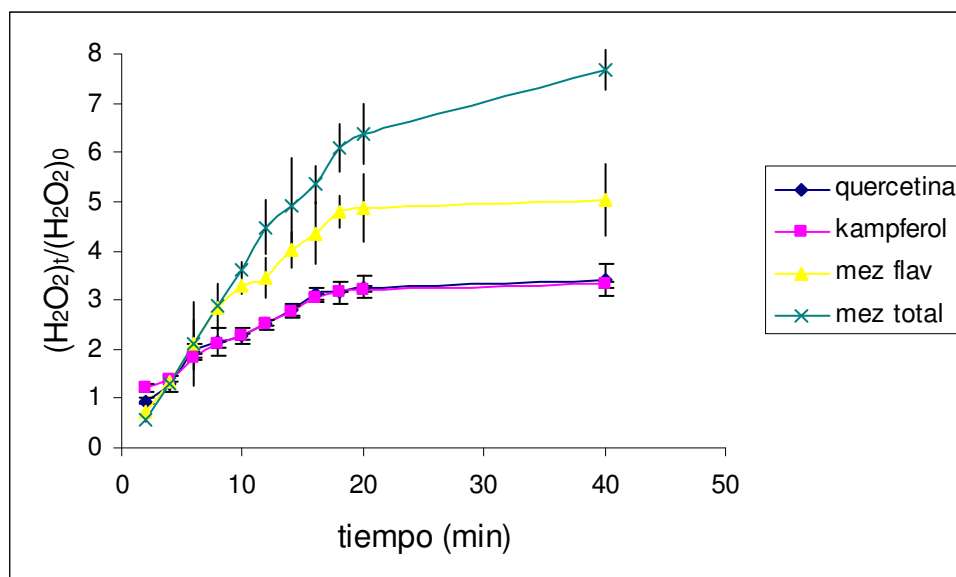


Figura 22. Cinética de reacción entre los radicales hidroxilo generados por medio de la reacción de Fenton catalizada por FeSO_4 (0.02 mM) y los flavonoides y mezclas evaluadas.

Se puede observar en la gráfica de la Figura 22 que al agregar el flavonoide se incrementa la concentración de H_2O_2 . El peróxido se descompone para formar el radical OH^\bullet (reacción 2). Los radicales hidroxilo también reaccionan entre ellos y se forma nuevamente H_2O_2 . La descomposición y formación de peróxido se encuentra en equilibrio. En el caso de la reacción de Fenton la reacción de descomposición del H_2O_2 se ve favorecida.

Al agregar el flavonoide se favorece la reacción de formación de peróxido, lo que sugiere que los flavonoides y mezclas, al secuestrar Fe^{2+} inhiben la reacción de Fenton y por lo tanto la descomposición de peróxido. Esto sucede porque las concentraciones tanto de hierro como de flavonoides y compuestos fenólicos son prácticamente equimolares; Fe^{2+} 20 μM y flavonoides \approx 15 μM .

A estas concentraciones podemos hablar de un equilibrio que permite que la concentración de peróxido llegue a su máximo después de que los flavonoides quelan el hierro, impidiendo la formación de los radicales hidroxilo.



Para confirmar lo anterior, se realizó un experimento donde la concentración de FeSO_4 fue más alta que la del flavonoide.

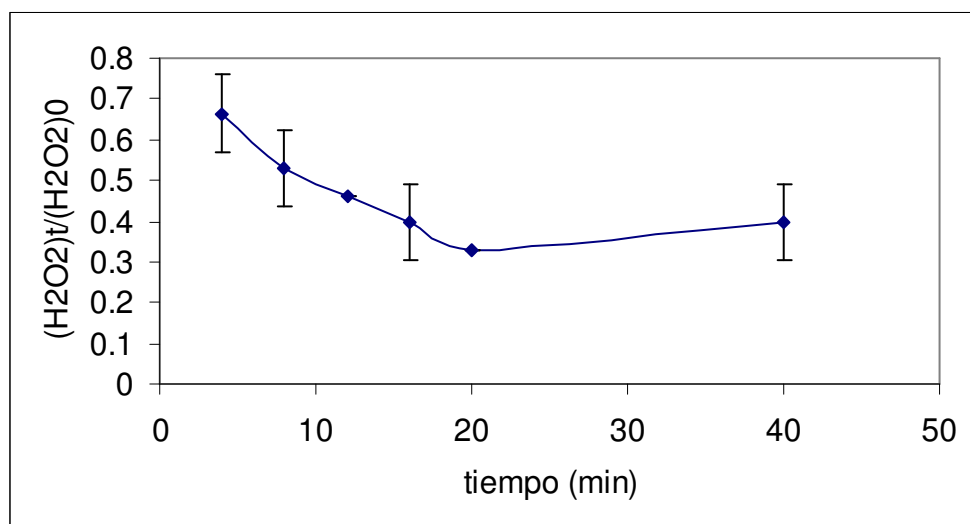


Figura 23. Cinética de reacción entre los radicales hidroxilo generados por medio de la reacción de Fenton catalizada por FeSO_4 (0.5 mM) y el flavonoide quercetina.

La Figura 23 presenta los resultados obtenidos en este caso. Debido al exceso de hierro en el medio la concentración de H_2O_2 disminuye, ya que la reacción ya no se dirige hacia la formación de peróxido; como se tiene una gran cantidad de hierro, la reacción de Fenton se ve favorecida y por lo tanto se descompone el peróxido para dar paso a la formación de los radicales hidroxilo.

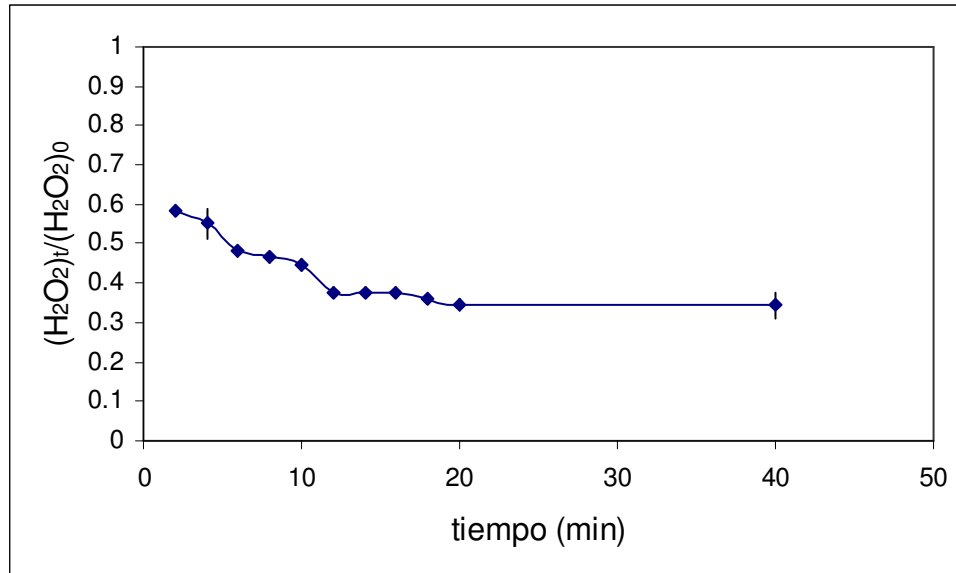


Figura 24. Generación electroquímica de OH a través del tiempo mediante la reacción de Fenton utilizando una membrana de nafi3n con iones de hierro anclados a su estructura.

En otro experimento se generaron radicales hidroxilo vía reacción de Fenton pero en este caso, los iones de hierro se anclaron a una membrana de nafi3n con la intención de que los flavonoides no tuvieran contacto con éstos. En la Figura 24 se observa una generación más rápida de radicales hidroxilo en comparación con el experimento realizado con FeSO_4 como fuente de iones de hierro. Esto se debe a que hay una mayor disponibilidad de iones por el hecho de que el hierro se encuentra adsorbido en el nafi3n por medio de interacciones electrostáticas, por lo que es muy difícil que se desprenda de la membrana para entrar en contacto con la solución (Gumy *et al.*, 2005). Es por lo anterior que la reacción favorece la formación de radicales hidroxilo.

Cuando se alcanzaron concentraciones constantes de H_2O_2 se agregaron los flavonoides y las mezclas (Figura 25).

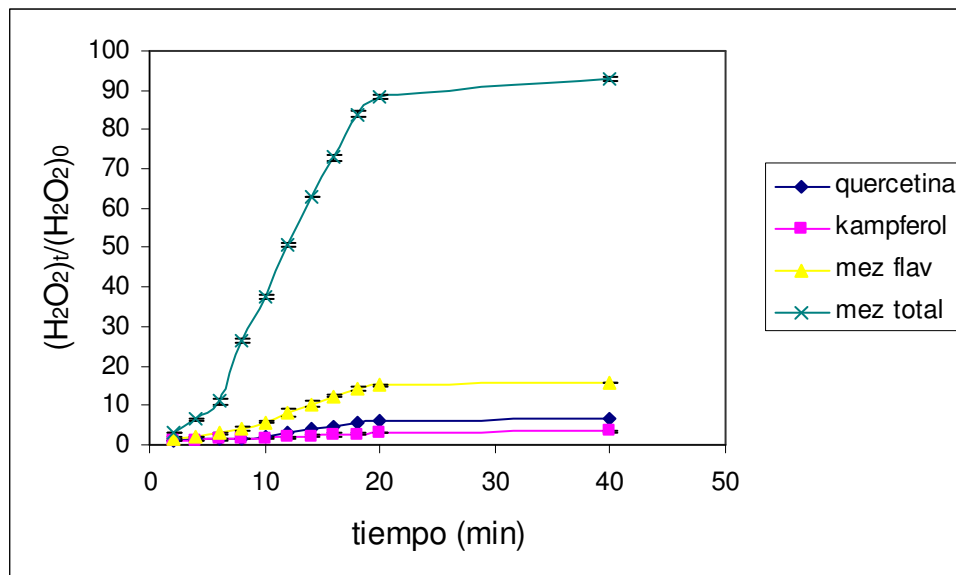


Figura 25. Cinética de reacción entre los radicales hidroxilo generados por medio de la reacción de Fenton, catalizada por iones de hierro anclados a una membrana de nafión, y los flavonoides y mezclas evaluadas.

Se observa que los niveles de peróxido alcanzan mayores proporciones que con el experimento anterior, en el que la reacción de Fenton fue catalizada por el sulfato ferroso; esto puede deberse a que contrario a lo que se pensaba, la membrana de nafión es permeable y no mantiene a los iones lejos del alcance de los flavonoides, es decir, que estos pueden penetrar su estructura y secuestrar a los iones de hierro aunque estos se hallen anclados a la membrana, se observan mayores concentraciones de peróxido en los minutos finales del experimento probablemente debido a que la inmovilidad de los iones dentro de la membrana los hace más disponibles para los flavonoides y por lo tanto son más fáciles de quelar. Esto nos sugiere que aún en presencia de los radicales, los flavonoides tienen tendencia, en estas condiciones, al secuestro de los iones metálicos.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de los experimentos espectrofotométricos, la formación de complejos entre los flavonoides Rutina, Quercetina y Morina con Fe^{2+} se vió ampliamente favorecida. Mientras que para el caso del Fe^{3+} se observó que no es posible formar complejos con estos flavonoides. Por su parte la Hesperetina y la Catequina no mostraron afinidad hacia la formación de complejos con ninguno de los dos iones. Estos resultados se reforzaron con los datos obtenidos por la técnica electroquímica de voltametría cíclica, en donde los potenciales de oxidación y reducción así como sus respectivos desplazamientos revelan que la Rutina y la Quercetina son los flavonoides con mayor capacidad de quelar al ion ferroso y por lo tanto de formar complejos con éste. La estructura de los flavonoides estudiados tiene una gran importancia para la formación de dichos complejos, pues el arreglo de sus sustituyentes es pieza clave para la quelación de iones metálicos y por tanto de la capacidad antioxidante dependiente o no de iones.

Con los ensayos de actividad antioxidante (DDPH, ABTS y FRAP) aplicados a dos mezclas que emularon las concentraciones de los compuestos fenólicos contenidos en dos variedades de frijol, se obtuvo que la variedad con mayor capacidad antioxidante y reductora de hierro es la correspondiente al frijol N8025. Los compuestos que, al ser evaluados por separado, presentaron las mayores actividades antirradicales fueron la Quercetina, el Acido Ferúlico y el Kampferol.

Se observó un efecto sinérgico al evaluar la mezcla total de cada una de las variedades de frijol.

Lo anterior se comprobó al realizar los experimentos de electro-Fenton ya que se observa que las mezclas de flavonoides y la mezcla de todos los compuestos fenólicos del frijol N8025 presentan la mayor capacidad antirradical e incluso presentan un efecto mayor sobre el peróxido que los flavonoides por separado.

En cuanto a las pruebas realizadas con electro Fenton, se concluye que la membrana de nafión no mantiene a los iones metálicos lejos del alcance de los flavonoides, ya que al analizar los resultados se observa un incremento muy notable en las concentraciones de peróxido, lo que indica que el hierro se encuentra más disponible para ser quelado por los flavonoides, es decir que la reacción de Fenton es inhibida.

Con respecto a los efectos de la capacidad quelante de los flavonoides sobre su actividad antioxidante total, la hipótesis era que la capacidad antioxidante no sería afectada por la actividad quelante, pero de acuerdo con los resultados obtenidos por medio de las diferentes técnicas empleadas en este estudio, se concluye que bajo las condiciones de los experimentos aquí planteados, la actividad quelante de los flavonoides tiene prevalencia sobre su capacidad antioxidante, siendo la primera desarrollada con mayor facilidad por los compuestos fenólicos estudiados. En diversos estudios, la hipótesis principal asociada con los efectos biológicos de los flavonoides y demás compuestos fenólicos, está ligada solamente a sus propiedades para secuestrar radicales libres. Sin embargo, se ha visto que además del secuestro directo de radicales, los flavonoides y compuestos fenólicos pueden quelar iones metálicos, como los iones de hierro empleados en este estudio, previniendo así que participen en reacciones del tipo Fenton. Aunque se ha dado a la quelación un papel secundario en la actividad antioxidante de polifenoles, la presencia y eficiencia de grupos queladores de metales en los alimentos explican en gran medida el papel protector para la salud de fenoles específicos que forman parte de la dieta humana. En este estudio y en otro reportado por García-Alonso *et al* en el 2007, se ha comprobado que la actividad que se desarrolla en mayor medida y con más facilidad por parte de los flavonoides y compuestos fenólicos es la que está relacionada con su habilidad para quelar iones de hierro. Con esto se concluye que esta actividad quelante tiene un gran efecto sobre la capacidad antioxidante total de estos compuestos, y que en este caso presentó una relevancia mayor que la capacidad de secuestrar radicales libres.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aljadi, A.M., Yussof, K.M. 2003. Isolation and Identification of Phenolic Acids in Malaysian Honey with Antibacterial Properties. *Turk J. Med. Sci.* 33: 229-236.
- Anupongsanugool, E., Teekachunhatean, S., Rojanasthien, N., Pongsatha, S., Sangdee, C. 2005. Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage compared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women. *BMC Clinical Pharmacology.* 5:2.
- Aruoma, O.I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Res.* 523-524: 9-20.
- Asai, K., Moriwaki, S., Maeda-Yamamoto, M. 2005. Kaempferol, a tea flavonol, effect on interleukin-2 signal transduction of human T cell leukemia. *JARQ.* 39: 175-179.
- Ballester, I., Camuesco, D., Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., Zarzuelo, A. 2006. Flavonoids and inflammatory bowel disease. *Ars Pharm.* 47: 5-21.
- Barja, G. 2004. Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences.* 27(10): 595-600.
- Bayer, T., Colnot, T., Dekant, W. 2001. Disposition and Biotransformation of the Estrogenic Isoflavone Daidzein in Rats. *Toxicological Sciences.* 62: 205-211.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry.* 239: 70-76.
- Bergan, J.J., Schmid-Schonbein, G.W., Takase, S. 2001. Therapeutic approach to chronic venous insufficiency and its complications: place of Daflon 500 mg. *Angiology.* 52: S43-S47.
- Bok, S.H., Lee, S.H., Park, Y.B., Bae, K.H., Son, K.H., Jeong, T.S., Choi, M.S. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are

- lower in rats feed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.* 129: 1182-1185.
- Borg, D.C. 1993. Oxygen free radicals and tissue injury. In: *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage* (Ch 2) Ed. Tarr and Samson. Birkhauser Boston.
- Borradaile, N.M., de Dreu, L.E., Barrett, P.H.R., Huff, M.W. 2002. Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin: enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters. *J. Lipid. Research.* 43: 1544-1554.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymol.* 186: 343-355.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333.
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A. 1998. Structural dependence of flavonoids interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 330: 1173-1178.
- Brown, M.J., Henderson, D.E., Hunt, C. 2006. Comparison of antioxidant properties of supercritical fluid extracts of herbs and the confirmation of pinocembrin as a principle antioxidant in Mexican oregano (*Lippia graveolens*). *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 5: 1265-1277.
- Bugianesi, R., Catasta, G., Spigno, P., D'Uva, A., Maiani, G. 2002. Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *J. Nutr.* 132: 3349-3352.
- Burdon, R.H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad. Biol.* 18: 775-794.
- Burdon, R.H., Gill, V., Rice-Evans, C.A. 1989. Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* 7: 49-59.
- Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., Arnao, M.B. 2002. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. *Redox Report.* 7: 103-109.

- Carlo, G.D., Autore, G., Izzo, A.A., Moiolino, P., Mascolo, M., Viola, P., Diurno, M.W., Capawa, F. 1993. inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats, structure activity relationships. *J. Pham. Pharmacol.* 45: 1045-1059.
- Catherine, C., Malc, S., Esther, H.L., Vadimir, A., Krutorslaikh, et al. 1996. Lack of tumour-promoting effects of flavonoids: studies on rat liver preneostatic foci and on *in vivo* and *in vitro* gap junctional inter cellular communication. *Nutr. Cancer.* 26: 251-263.
- Chen, D., Daniel, K.G., chen, M.S., Kuhn, D.J., Landis-Piwowar, K.R., Dou, Q.P. 2005. Dietary flavonoides as proteasome inhibitors and apoptosis indicers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 69: 1421-1232.
- Choi, E.J. 2007. Hesperetin induced G1-Phase Cell Cycle Arrest in Human Breast Cancer MCF-7 Cells: Involvement of CDK4 and p21. *Nutrition and Cancer.* 59: 115-119.
- Choi, M.S., Do, K.M., Park, Y.B., Jeon, S.M., Jeong, T.S., Lee, Y.K., Bok, S.H. 2001. Effect of naringin supplementation on cholesterol metabolism and antioxidant status in rats fed high cholesterol with different levels of vitamin E. *Ann Nutr. Metab.* 45: 193-201.
- Chopra, M., Fitzsimons, P.E.E., Strain, J.J., Thurnham, D.I., Howard, A.N. 2000. Nonalcoholic Red Wine Extract and Quercetin Inhibit LDL Oxidation without Affecting Plasma Antioxidant Vitamin and Carotenoid Concentrations. *Clinical Chemistry.* 46(8): 1162-1170.
- Chowdhury, A.R., Sharma, S., Mandal, S., Goswami, A., Mukhopadhyay, S. Majumder, H.K. 2002. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem J.* 366: 653-661.
- Christen, Y. 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann. J. Clin. Nutr.* 71: 621-629.
- Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B y cols. 1998.: *Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships.* Alan R. Liss. New York

- Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Frabry, R., Dusinska, M. 1998. DNA damage in diabetes: Correlation with a clinical marker. *Free. Radic. Biol.Med.* 25: 373-377.
- Cornard, J.P., Dangleterre, L., Lapouge, C. 2005. Computational and Spectroscopic Characterization of the Molecular and Electronic Structure of the Pb(II)-Quercetin Complex. *J. Phys. Chem.* 109: 10044 -10051.
- Cross, C.E. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107: 526-545.
- Da Silva, W.S., Harney, J.W., Kim, B.W., Li, J., Bianco, S.D.C., Crescenzi, A., Christoffolete, M.A., Huang, S.A., Bianco, A.C.
- Das, D.K. 1994. Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Enzymol.* 234: 410-420.
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J.M., Fahey, G.C., Castaño-Tostado, E., Paredes-López, O. 2006. Chemical components with health implications in wild and cultivated mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54: 2045-2052.
- Douziech, N., Seres, I., Larbi, A., Szikszay, E., Roy, P., Arcand, M., Dupuis, G., Fulop, T. 2002. Modulation of lumen lymphocyte proliferative response with aging. *Experimental Gerontology.* 37: 369-387.
- Ebadi, M., Svinivasan, S., Baxi, M.D. 1996. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology.* 48: 1-19.
- Ejechi, B.O., Akpomedaye, D.E. 2005. Activity of essential oil and phenolic acid extracts of pepperfruit (*Dennetia tripetala* G. Barker; Anonaceae) against some food-borne microorganisms. *African Journal of Biotechnology.* 4: 258-261.
- Engelmann, M.D., Hutcheson, R., Cheng, I.F. 2005. Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5, 7-dihydroxyflavone (Chrysin), and 3',4'-Dihydroxyflavone. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2953-2960.
- Erdman Jr, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J.,

- Williamson, G., Burrowes, J. 2007. Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington (USA). *Journal Nutr.* 137(3): 718S-737S.
- Erlund, I., Silaste, M.L., Alfthan, G., Rantala, M., Kesäniemi, Y.A., Aro, A. 2002. Plasma concentration of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *European Journal of Clinical Nutrition.* 56: 891-898.
- Felicia, V.S., Najla, G., Ann, P.C., Madeleine, M., Keneeth, K.C. 1996. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. Cancer.* 26: 167-181.
- Ferrandiz, M.L., Alcaraz, M.J. 1991. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions.* 32: 283-288.
- Ferrer Viant, D., Jorge-Fonseca, C., Cutiño-Clavel, I., García-Rodríguez, R.E., Arce-Gómez, D.L. 1999. Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *Medisan.* 3: 5-11.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. 2004. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1721: 174-184.
- Fritz, B., Tobias, S., Albrecht, K., Charlotte, B., Kent, C, et al. 1996. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase-I. *J Biol Chem* 271: 2262-2270.
- García-Alonso, F.J., Guidarelli, A., Periago, M.J. 2007. Phenolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: the role of iron chelation. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 18: 457-466.
- Goldwyn, S., Lazinsky, A., Wei, H. 2000. Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol Drug Interact.* 17(1-4): 261-289.
- Grimble, R.F. 1998. Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients. *Nutrition Research.* 18: 1297-1317.

- Gumy, D., Fernández-Ibáñez, P., Malato, S., Pulgarin, C., Enea, O., Kivi, J. 2005. Supported Fe/C and Fe/Nafion/C catálisis for the photo-Fenton degradation of Orange II under solar irradiation. *Catalysis Today*. 101: 375-382.
- Gutteridge, J.M.C. 1986. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett*. 201: 291-295.
- Haddad, J. 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signaling*. 14: 879-897.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. 52: 253-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Ch. 4. oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair, and Death. In: *Free Radical in Biology and Medicine*. 3rd Ed. Oxford University Press, New York.
- Harsteen, B. 1983. Flavonoids: A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*. 32: 1141-1148.
- Hayashi, A. 2000. Effects of Daily Oral Administration of Quercetin Chalcone nad Modified Citrus Pectin on Implanted Colon-25 Tumor Growth in Balb-c Mice. *Alternative Medicine Review*. Dec.
- Heller, W., Forkmann, G. 1993. Biosynthesis In: *The flavonoids. Advances in Research since 1986* (Harbone, J.B.). Chapman and Hall Ltd. London. 499-535.
- Hertog, M.G., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342: 1007-1011.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinantes in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*. 20: 21-29.
- Holvoet, P., Pérez, G., Zhao, Z., *et al.* 1995. Malonaldehyde-modified low density lipoprotein patients with atherosclerotic disease. *J. Clin Invest*. 95: 2611-2619.

- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.
- Hughes, D.A. 1999. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-age adults. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 79-84.
- Joshiyura, K.J., Ascherio, A., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Rimm, E.B., Speizer, F.E., Hennekens, C.H., Spiegelman, D., Willett, W.C. 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA.* 282: 1233-1239.
- Joshiyura, K.J., Hu, F.B., Manson, J.E. 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Inter. Med.* 134: 1106-1114.
- Jungbluth, G., Rühling I., Ternes W., J. 2000. oxidation of flavonols with Cu(II), Fe(II) and Fe(III) in aqueous media. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2:* 1946-1952.
- Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.* 6: 63-74.
- Kim, H.K., Jeong, T.S., Lee, M.K., Park, Y.B., Choi, M.S. 2003. Lipid-Lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim. Acta.* 327: 129-137.
- Kim, J.Y., Jung, K.J., Choi, J.S., Chung, H.Y., 2004. Hesperetin: A Potent Antioxidant Against Peroxynitrite. *Free Radic. Res.* 38: 761-769.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 560-568.
- Kreft, S., Knapp, M., Kreft, I. 1999. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Fodd Chemistry.* 47: 4649-4652.

- Kreft, S., Strukejl, B., Gaberscik, A., Kreft, I. 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1801-1804.
- Kujumgier, A., Tsvetkova, J., Serkedijieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethno Pharmacol*. 64: 235-240.
- Lampe, J.W. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 475S-490S.
- Lean, M.E.J., Noroozi, M., Kelly, I., Burns, J., Talwar, D., Sattar, N., Crozier, A. 1999. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*. 48: 176-181.
- Lindah, M., Tagesson, C., 1997. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*. 21: 347-356.
- Loo, G. 2003. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review). *J. Nutr. Biochem*. 14: 64-73.
- Lorenz, W., Kusche, J., Barth, H., Mathias, C.H., 1973. Action of several flavonoids on enzyme of histidine metabolism *in vitro*: In histamine. p. 265-269. (Ed Cz. Maslinski) Dowden, Hutchinson and Ross. Stroudsburg. Pennsylvania.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R. 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci*. 158: 47-52.
- Manach, C., Texier, O., Monred, C., Crespy, V., Regerat, F., Deminge, C., Remesy, C. 1999. Comparison of the bioavailability quercetin and catechin in rats. *Free radic.Biol. Med*. 27. 1256-1266.
- Mandal, A.K., Das, S., Basu, M.K., Chakrabarti, R.N., Das, N. 2007. Hepatoprotective Activity of Liposomal Flavonoid against Arsenite-Induced Liver Fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 320: 994-1001.
- Manthey, J.A. 2000. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*. 7: S29-S34.

- Manthey, J.A., Guthrie, N. 2002. Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six Human Cancer Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5837-5843.
- Marini, H., Minutoli, L., Polito, F., Bitto, A., Altavilla, D., Atteritano, M., Gaudio, A., Mazzaferro, S., Frisina, A., Frisina, N., Lubrano, C., Bonaiuto, M., D'Anna, R., Cannata, M.L., Corrado, F., Adamo, E.B., Wilson, S., Squadrito, F. 2007. Effects of the Phytoestrogen Genistein on Bone Metabolism in Osteopenic Postmenopausal Women. A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine.* 146: 839-847.
- Marinova, E., Toneva, A., Yanishlieva, N. 2007. Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry.* 106: 628-633.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B. 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants. *J. Biochem. Molecular Toxicology.* 17: 24-37.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, J.M. 2002. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17: 271-278.
- Mashima, R., Witting, P.K., Stocker, R. 2001. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 411-418.
- Mattson, M.P. 1998. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* 21: 53-57.
- McLarty, J.W. 1997. Antioxidants and Cancer: The Epidemiologic Evidence. (Ch.5). In: *Antioxidants and Disease Prevention.*
- Mezzetti, A., Cipollone, F., Cuccurullo, F. 2000. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: Isoprostenes and new markers on an old paradigm. *Cardiovascular Research.* 47: 475-488.
- Middleton, E. 1984. The flavonoids. *Trends Pharmacol Sci.* 5: 335-338.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673-751.

- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennings, K. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.* 36: 1199-1208.
- Morel, I., Cillard, P., Cillard, J. 1998. Flavonoid-metal interactions in biological systems, In: Rice-Evans, C. and Parker, L., eds, *Flavonoids in Health and Disease* (Marcel Dekker, New York). 163-177.
- Moreno, J.J., Mitjavila, M.T. 2003. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *J. Nutr. Biochem.* 14: 182-195.
- Mouat, M.F., Kolli, K., Orlando, R., Hargrove, J.L., Grider, A. 2005. The effects of quercetin on SW480 human colon carcinoma cells: a proteomic study. *Nutrition Journal.* 4: 11.
- Muniappan, M., Sundararaj, T. 2003. Antiinflammatory and antiulcer activities of *Bambusa arundinacea*. *J. Ethnopharmacol.* 88: 161-167.
- Murota, K., Hotta, A., Ido, H., Hawaii, Y., Moon, J.H., Sekido, K., Hayashi, H., Inakuma, T., Terao, J. 2007. Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites alter onion consumption in humans. *J. of Medical Investigation.* 54: 370-374.
- Myhrstad, M.C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R., Moskaug, J.J.O. 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 386-393.
- Nakamura, Y., Chang, C., Mori, T., Sato, K., Ohtsuki, K., Upham, B.L., Trosko, J.E. 2005. Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells. *Carcinog.* 26(3): 665-671.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology.* 33: 2-16.
- Natella, F., Nardini, M., Belevi, F., Scaccini, C. 2007. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL

- to ex vivo oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 86: 604-609.
- Nilsson, J., Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, A., Akesson, B. 2005 Comparison of the 2, 2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol. Nutr. Food Res*. 49: 239-246.
- Nosseri, C., Coppola, S., Ghibell, L., 1994. Possible involvement of poly (ADP-ribose) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp. Cell. Res*. 212: 367-373.
- Okamoto, I. et al. 2002. The flavonoid kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8⁺ T cell engraftment. *Clin Immunol*. 103: 132-144.
- Padró, T., Mendieta, C., Badimon, L. 2005. Inflamación y arteriosclerosis. *Hipertensión*. 22(4): 173-182.
- Paredes-Salido, F., Clemente-Fernández, A. 2005. Polifenoles de aplicación en farmacia: Metabolismo y acción biológica. *Offarm*. 24: 85-94.
- Parmar, N.S., Shikha, P. 1998. Anti-ulcer potential of flavonoids. *Indian J. Physiology and Pharmacology*. 42: 343-351.
- Paul, P., Rita, J., Ritva, S., Mackku, H., Lyly, T., Eero, P., Arpo, A. 1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol*. 146: 223-230.
- Pérez, T. G. 2003. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 22: 48-57.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*. 63: 1035-1042.
- Pollard, M., Wolter, W. 2000. Prevention of spontaneous prostate-related cancer in lobund wistar rats by a soy protein isolate/isoflavone diet. *Prostate*. 45: 101-105.
- Pratico, D. 2002. Alzheimer's disease and oxygen radicals: New insights. *Biochem Pharm*. 63: 563-567.

- Pratico, D., Iuliano, L., Mauriello, A., *et al.* 1997. Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 100: 2028-2034.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 4290-4302.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric Food Chem.* 48 : 3396-3402.
- Punchard, N.A., Kelly, F. 1997. *Free radicals- A practical Approach.* Oxford University Press. New York.
- Radtke, J., Linseisen, J., Wolfram, G. 1998. Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Z. Ernährungswiss.* 37: 190-197.
- Rendig, S.V., Symons, J.D., Longhurst, J.C., Amsterdam, E.A. 2001. Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38(2): 219-227.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, J. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free rad. Biol. Med.* 20: 933-956.
- Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willent, W.C. 1996. relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annals. Intern. Med.* 125: 384-389.
- Roberford, M., Calderon, P.B. 1995. (Ch. 5). *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems,* Dekker. New York.
- Rowland, I.R., Wiseman, H., Sanders, T.A., Adlercreutz, H., Bowey, E.A., 2000. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer.* 36: 27-32.
- Rozema, J., Björnn, L.O., Bornman, J.F. 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems – an experimental and functional analysis

- of the evolution of UV-B absorbing compounds. *Journal of Phytochemistry and Photobiology*. 66: 2-12.
- Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P.C.H., de Vries, J.H.M., Katan, M.B. 2002. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J. Am. Diet. Assoc.* 102: 1414-1420.
- Setchell, K.D.R., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. 1997. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*. 350: 23-27.
- Shahidi, F., Yang, Z., Saleemi, Z.O. 1998. Natural flavonoids as stabilizers. *J. Food Lipids*. 1: 69-75.
- Shigenaga, M., Hagen, T., Ames, B. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 10771-10778.
- Shigenaga, M., Park, J., Cundy, K., Gimeno, C., Ames, B. 1990. In vivo oxidative DNA damage; Measurement of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol*. 186: 521-530.
- Song, T., Barua, K., Buseman, G., Murphy, P.A. 1998. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(6): 1474-1479.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Res*. 579: 200-213.
- Soczynska-Kordala, M., Bakowska, A., Oszmianski, J., Gabrielska, J. 2001. Metal-ion flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cell. Biol. Mol. Lett.* 6: 277-281.
- Srinivasan, K., Kaul, C., Ramarao, P. 2005. Partial protective effect of rutin on multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Indian J. Pharmacol.*
- Sudheesh, S., Sandhya, C., Sarah, K.A., Vijayalakshmi, N.R. 1999. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother. Res.* 13: 393-396.

- Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Tanaka, T., Ogawa, H. 1997. Chemoprevention of azoxymethane induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*. 18: 957-965.
- Tanaka, T., Kawabata, K., Honjo, S., Murakami, M., Shimada, R., Matsunaga, K., Yamada, Y., Shimizu, T.M. 1999. Inhibition of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats by natural compounds, caffeine, quercetin and morin. *Oncology Rep*. 6: 1333-1340.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zeballos, L., Hawkins Byrne, D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J of food composition and analysis*. 19: 669-675.
- Thompson, H.J., Heimendinger, J., Gillette, C., Sedlacek, S.M., Haegele, A., O'Neill, C., Wolfe, P. 2005. In vivo investigation of changes in biomarkers of oxidative stress induced by plant food rich diets. *J. Agric. Food Chem*. 53: 6126-6132.
- Turrens, J. 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*. 17: 3-8.
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P. 1994.: A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms cellular activation. *Free Radic. Biol. Med*. 16: 547-553.
- Valenzuela, A. 2004. Tea consumption and health: Beneficial characteristics and properties of this ancient beverage. *Rev. Chil Nutr*. 31: 2.
- Van Hoorn, D.E.C., Nijveldt, R.J., Boelens, P.G., Hofman, Z. 2006. Effects of Preoperative Flavonoid Supplementation on Different Organ Functions in Rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 30: 302-308.
- Verdrengh, M., Jonsson, I.M., Holmdahl, R., Tarkowski, A. 2003. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*. 52: 341-346.
- Versantvoort, C.H., Schuurhuis, G.J., Pinedo, H.M., Bekman, C.A., Kuiper, C.M, et al. 1993. Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-p-

- glycoprotein mediated multidrug resistant tumor cells. *Br. J. Cancer.* 68: 939-946.
- Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G. 2005. Generation of Superoxide-Radical by the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase of Heart Mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. 70(2): 120-127.
- Voorrips, L.E., Goldbohm, R.A., Verhoeven, D.T., van Poppel, G.A., Sturman, F., Hermus, R.J., van den Brandt, P.A. 2000. Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *Cancer Causes Control.* 11: 101-115.
- Wadsworth, T.L., McDonald, T.L., Koop, D.R. 2001. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Pharmacol.* 1; 62(7): 963-974.
- Wang, J., Eltoun, I.E., Lamartiniere, C.A. 2002. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett.* 186: 11-18.
- Wang, J., Eltoun, I.E., Lamartiniere, C.A. 2007. Genistein chemoprevention of prostate cancer in TRAMP mice. *Journal of Carcinogenesis.* 6:3.
- Westhuysen, J. 1997. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: An update. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27: 1-10.
- Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Sci and Nutrition.* 44: 275-295.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?. *Free radic. Biol. Med.* 36: 838-849.
- Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J., Blake, D.R. 1993. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* 49: 506-522.
- Wu, T.W., Fung, P.K., Zeng, L.H., Hempel, A., Grey, A.A., Camerman, N. 1995. Molecular properties and myocardial salvage effects of morin hydrate. *Biochem. Pharmacol.* 49: 537-543.

- Yang, M., Tanaka, T., Hirose, Y., Deguchi, T., Mori, H., Kawada, Y. 1997. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int. J. Cancer*. 73: 719-724.
- Yang, K., Lampecht, S.A., Liu, Y., Shinozaki, H., Fan, K., Leung, D., Newmark, H., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Lipkin, M. 2000. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinog*. 21(9): 1655-1660.